



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Tesis de Licenciatura

Que presenta:

Nancy Romero Manriquez

“Efecto de la administración por vía oral de *Mucor circinelloides* a ratones sanos”

Para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista

Asesor Interno:

M.C. Ana María Ríos Alanís

Asesor Externo:

Dr. Víctor Meza Carmen

Co asesor:

Dr. Marco Iván Valle Maldonado

Morelia, Michoacán; diciembre, 2020.

INDICE

A. RESUMEN	7
B. ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. La Ganadería	12
2.1 Sistemas de producción ganadera.	13
2.1.1 Sistemas extensivos	13
2.1.2 Sistemas intensivos	14
2.2 Zonas productoras de carne bovina en México	14
2.2.1 Zonas áridas y semiáridas	15
2.2.2 Zona templada	15
2.2.3 Zona tropical (Húmeda y subhúmeda)	16
III. Importancia de la ganadería en México	17
IV. Implicaciones de las parasitosis en el ganado	19
V. Pruebas diagnósticas para la identificación de parásitos	21
5.1 Toma de Muestra para análisis	21
5.1.1 Heces	21
5.1.2 Sangre	21
5.1.3 Vísceras y tejido muscular	21
5.2 Examen coprológico	22
5.2.1 Directo de heces frescas	22
5.2.2 Método de enriquecimiento (cualitativo)	22

a)	Flotación	22
b)	Flotación en solución saturada de NaCl	22
c)	Sedimentación	22
d)	Coprocultivos o incubación de heces	23
e)	Esporulación de ooquistes de coccidios	23
VI.	Biocontrol de parásitos	23
6.1	Endoparásitcidas	26
6.2	Ovicidas	27
6.3	Depredadores	28
6.4	Estructuras de atrapamiento de hongo	30
6.5	Formas de administración de los hongos nematófagos	31
a)	Granos de cereales con los hongos	31
b)	Bloques minerales	32
c)	Bloques energéticos	33
d)	Pellets de alginato	33
e)	Bolos de liberación controlada	34
VII.	<i>Mucor circinelloides</i>	35
7.1	Generalidades	35
7.2	Ciclo de vida de <i>Mucor circinelloides</i>	36
7.2.1	Ciclo sexual	37
7.2.2	Ciclo asexual	37

7.3	Dimorfismo	39
7.4	Aspectos biomédico asociados a <i>Mucor circinelloides</i>	40
7.5	Aspectos biotecnológicos asociados al uso de <i>Mucor circinelloides</i>	41
7.6	<i>Mucor</i> y otros mucorales como flora de los animales	41
7.7	Importancia de las proteínas <i>Arf</i> en <i>M. circinelloides</i>	43
VIII.	Hipótesis	44
IX.	OBJETIVO GENERAL	44
9.1	Objetivos específicos	44
X.	MATERIAL Y METODOS	45
10.1	METODOLOGIA	45
10.2	Cepas utilizadas	45
10.2.1	Medio de cultivo	46
	YPG (Glucosa, Peptona de gelatina, Extracto de levadura)	46
10.2.2	Obtención y conteo de esporas de <i>M. circinelloides</i>	46
10.3	Ensayo de infección en ratones (Vía oral).	47
10.4	Aislamiento de ácido desoxirribonucleico total de heces de ratones	48
10.5	Ensayo de qPCR para determinar la presencia y calidad de <i>M. circinelloides</i> en heces de ratones	50
10.6	Determinación de abundancia de DNA de <i>Mucor circinelloides</i> por qPCR	52
10.7	Sacrificio de <i>Mus musculus</i>	53
10.8	Elaboración de cortes histológicos de órganos de ratón	53
10.9	Aislamiento de ácido ribonucleico total de órganos de ratones	54

10.10 Ensayos tipo RT-qPCR para determinar la expresión de marcadores de inflamación en *Mus musculus* 56

XI. RESULTADOS 56

11.1 Variación de pesos en *Mus musculus posterior* de la administración por vía oral de las cepas silvestre MU402 y mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*. 57

ETAPA 1
.....57

ETAPA 2
.....58

11.2 Cuantificación mediante qPCR de DNA de *M. circinelloides*, presente en heces de ratón.....59

11.3 Análisis histopatológico de estómago y colon de *Mus musculus* de la administración por vía oral de las cepas silvestre MU402 y $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*. 62

XII. DISCUSIÓN 66XIII. CONCLUSIÓN 72

XIV. BIBLIOGRAFIA 73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas de producción ganadera en México por condición climática. 15

Figura 2. Consumo per cápita nacional de carne de bovino, cerdo, pollo y pavo del 2017, en 10 países.....16

Figura 3. Ciclo biológico de un nematodo gastrointestinal, en bovino. 18

Figura 4. Ciclo de vida de *C. elegans* a 20 °C.. 23

Figura 5. Nematodo parasitando y desintegrado por hongo, se observa crecimiento micelial interno con absorción del contenido del nematodo. 24

Figura 6. Hongo parasitando huevo de nematodo, el cual consumio el contenido del huevo y ceso el procesi de embriogenesis 25

Figura 7. Nematodo atrapado en redes pegajosas de hongo	27
Figura 8. Morfología de las trampas de atrapamiento de los hongos nematófagos.....	28
Figura 9. Árbol filogenético de especies fúngicas.	33
Figura 10. Ciclo de vida de <i>M. circinelloides</i> .	35
Figura 11. Dimorfismo de <i>M. circinelloides</i> .	36
Figura 12. Estructura de la metodología.....	42
Figura 13. Curva estándar de concentración de DNA de <i>Mucor circinelloides</i> .	49
Figura 14. Variación de pesos en <i>Mus musculus</i> de la administración por vía oral de las cepas silvestre MU402 y $\Delta arf3$, en los tratamientos 1, 5 y 10 millones de esporas.	54
Figura 15. Variación de pesos en <i>Mus musculus</i> en la administración de las cepas silvestre MU402 y $\Delta arf3$ en los tratamientos 20 y 40 millones de esporas.	55
Figura 16. Abundancia de DNA de <i>M. circinelloides</i> en heces de ratones.	56
Figura 17. Abundancia de DNA de <i>M. circinelloides</i> en colon y estómago de ratón.	57
Figura 18. Determinación de niveles de transcrito de marcadores de inflamación en tejidos de ratón.	58
Figura 19. Corte histológico de estómago de ratón de la primera fase.	59
Figura 20. Corte histológico de estómago de ratón de la segunda fase.	60
Figura 21. Corte histológico de colón de ratón de la primera fase.	61
Figura 22. Corte histológico de colón de ratón de la segunda fase.	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Primera fase de infección.	44
Tabla 2. Segunda fase de infección.	45

Tabla 3. Oligonucleótidos y sondas empleadas la qPCR y la RT-qPCR.

48

A. RESUMEN

El control biológico en la ganadería moderna es un tema de interés mundial, ya que el uso indiscriminado de antiparasitarios, a provocado resistencia tanto en animales como en la salud pública. *Mucor circinelloides*, es un hongo nematofago capaz de infectar su hospedero provocando gran virulencia. Sin embargo, existe evidencias que la administración intraperitoneal de la cepa mutante, causa gran virulencia e incluso alta mortalidad en ratones diabéticos e inmunocomprometidos. El objetivo de este trabajo fue identificar el efecto de la administración de *Mucor circinelloides* por vía oral a ratones sanos. A fin de determinar el efecto de la inoculación oral de esporas de *M. circinelloides* (cepa silvestre o mutante $\Delta arf3$) sobre el peso de ratones sanos de la línea BALB/c se realizaron dos tipos de tratamientos. En el primer tratamiento se inocularon 1, 5 y 10 millones y en el segundo tratamiento se inocularon 20 y 40 millones de esporas, vía oral. Treinta días posteriores a la administración de *M. circinelloides*, tras la evaluación de tejido de estomago y colon post mortem, se identifico histológicamente infiltrado inflamatorio caracterizado en un rango leve-moderado, también se evaluaron e identificaron los siguientes marcadores moleculares mediante qRT-PCR: *TNF- α* , *IL-6*, *IL1- β* , *MIP2* y *BIP* y el gen normalizador empleado fue β -actina, los cuales están asociados a inflamación o daño celular, no mostraron diferencia en los niveles acumulados de transcrito en muestras de estomago ni de colon en los ratones inoculados. Los resultados indican para ambos tratamientos, independientemente de la carga de esporas y cepa inoculada, no existe mortalidad ni disminución en el peso de los ratones sanos. En conclusión, la administración de *M. circinelloides* como una nueva técnica de control biológico en la ganadería, sugiere ser una alternativa prometedora.

Palabras Clave: control biológico *Mucor circinelloides*, hongo nematofago, marcadores inflamatorios, infiltrado inflamatorio

B. ABSTRACT

Biological control in modern livestock is a matter of global interest, since the indiscriminate use of antiparasitics has caused resistance in both animals and public health. *Mucor circinelloides*, is a nematophagous fungus capable of infecting its host causing great virulence. However, there is evidence that intraperitoneal administration of the mutant strain causes great virulence and even high mortality in diabetic and immunocompromised mice. The objective of this work was to identify the effect of the oral administration of *Mucor circinelloides* to healthy mice. In order to determine the effect of oral inoculation of *M. circinelloides* spores (wild strain or $\Delta arf3$ mutant) on the weight of healthy mice of the BALB/c line, two types of treatments were carried out. In the first treatment, 1, 5 and 10 million were inoculated and in the second treatment, 20 and 40 million spores were inoculated, orally. Thirty days after the administration of *M. circinelloides*, after the evaluation of the stomach and colon tissue post mortem, an inflammatory infiltrate was histologically identified characterized in a mild-moderate range, the following molecular markers were also evaluated and identified by qRT-PCR: *TNF- α* , *IL-6*, *IL1- β* , *MIP2* and *BIP* and the normalizing gene used was β -actin, which are associated with inflammation or cellular damage, did not show a difference in the accumulated levels of transcript in stomach or colon in the inoculated mice. The results indicate for both treatments, regardless of the spore load and inoculated strain, there is no mortality or decrease in the weight of healthy mice. In conclusion, the administration of *M. circinelloides* as a new biological control technique in livestock, suggests being a promising alternative.

Key Words: biological control, *Mucor circinelloides*, nematophagous fungus, inflammatory infiltrate, molecular markers

I. INTRODUCCIÓN

En México la producción pecuaria representa un 45% de la producción agropecuaria, lo que indica que es una de las fuentes de mayor ingreso económico y generadora de más de un millón de empleos. México ocupa el octavo lugar en producción y consumo de carne de bovino a nivel mundial con un 3.1 por ciento del total y el décimo lugar en exportación, con una participación del 2.7 por ciento del total mundial **(FIRA, 2016; SAGARPA, 2008)**.

Sin embargo, dentro de la producción pecuaria existen problemas que retardan y dificultan el desarrollo óptimo de la ganadería, como el clima, condición ambiental, alimentación, desnutrición, agentes físicos, químicos y biológicos.

Dentro de los agentes biológicos, los parásitos tienen un alto impacto en las granjas a nivel mundial. La producción ganadera se ve amenazada por parasitosis gastrointestinales, producidas principalmente por helmintos (nematodos y cestodos) y protozoarios **(Rodríguez et al., 2001)**.

Los nematodos y cestodos ocasionan problemas de gastroenteritis verminosa caracterizadas clínicamente por diarrea, debilidad, hemorragias y deshidratación **(Mawatari et al., 2014)**; afectan la absorción de nutrientes atentando contra la salud y bienestar de los animales, al ocasionar una disminución del potencial productivo, lo que indica una importante pérdida económica en términos de enfermedad, parámetros productivos, decomiso de canal y la muerte de animales **(Fernández et al., 2015)**.

Los nematodos tienen un ciclo de vida directo, con una fase dentro del sistema gastrointestinal del animal y una externa en los pastos, donde ocurre el desarrollo de huevos hasta el tercer estado larval infectante **(Cordero et al., 1999)**.

En la fase interna los parásitos son blanco de los antihelmínticos, selección genética y nutrición; en la fase contaminante depende principalmente de desparasitaciones estratégicas, rotación de praderas, pastoreo alternativo, reducción de capacidad de carga y hongos nematófagos que tienen efecto sobre control biológico de praderas; y la fase infectante depende de los mismos factores que en la fase contaminante **(Roeber et al., 2013)**.

En la actualidad las enfermedades parasitarias se controlan utilizando fármacos; en su mayoría seguros, eficaces y de amplio espectro en cuanto a su actividad, sin embargo, el uso inadecuado y excesivo de estos, puede inducir resistencia y adicionalmente interferir con la capacidad del hospedador para generar una respuesta inmunológica efectiva **(Miller et al., 2012)**.

El Dr. Carlos Entrocasso, PhD., experto parasitólogo argentino indico “el que está enfermo es el campo”, y con esto manifestó la importancia de preservar el medio ambiente **(Almada, 2015)**.

En México, existen una gran prevalencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos **(Rodríguez, 2014)**, entre los que se encuentran parásitos que causan enfermedades zoonóticas. Las zoonosis parasitarias representan un impacto importante en la salud pública, y pueden ser adquiridas por el contacto fecal- oral, consumo de agua o carne contaminada **(Hernández et al., 2011)**, por lo cual es importante tener un control biológico parasitario eficaz y óptimo, tanto en el campo como en animales domésticos.

Otro punto a considerar en la resistencia de los animales a los antihelmínticos y el uso indiscriminado de estos sin respetar el tiempo de retiro, ya que el consumo de

carne de ganado con tales características repercute en la salud de la sociedad al transmitir dicha resistencia.

En un estudio realizado por **Cortiñas et al., 2015**, sobre terneros en pastoreo y lechones, se detectó una gran carga de endoparásitos, por lo cual se les administro esporas de *M. circinelloides* en el concentrado del alimento; en los resultados se observó una reducción significativa en la viabilidad de los huevos de áscaris en lechones y fasciola en terneros, lo cual demuestra la capacidad de *M. circinelloides* para sobrevivir en el tracto digestivo y generar antagonismo con parásitos en animales de granja.

Estas son algunas de las razones por las cual cada día se busca una forma más natural o alternativa para la erradicación o control de patógenos. Este trabajo se enfoca en un hongo con características ovicidas, cuyas hifas colonizan la superficie de huevos de parásitos, se introducen en ellos y destruyen los embriones (**Arias et al., 2016**).

La presente investigación, se realizó en la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad de San Nicolás de Hidalgo, en una etapa nombrada “Efecto de la administración por vía oral de *Mucor circinelloides* a ratones sanos”, en el que se identificó el grado de inflamación y fatalidad que causa la cepa $\Delta arf3$ al ser administrada por vía oral en grupos de ratones sanos.

II. La Ganadería

La ganadería es una actividad económica, que consiste en la crianza de animales domésticos para el consumo humano y obtención de insumos como carne, leche, lana y pieles. Las principales especies que son explotadas en los sistemas de producción animal son:

Ganado bovino o vacuno, porcinos (cerdos), ovinos (ovejas), caprinos (cabras), equinos (caballo, asno), camélidos (camellos, dromedarios, llamas), y actualmente se ha introducido la cunicultura (conejo), apicultura (abejas), avicultura (gallinas, patos), entre otros **(Riojas et al., 2018)**.

Un sistema de producción es definido, como un conjunto de recursos humanos, naturales, financieros y tecnológicos, organizados desde el punto de vista normativo y metodológico para desarrollar las funciones necesarias con el fin de lograr el objetivo propuesto **(Bertalanffy, 1950)**.

Un sistema ganadero se define como una unidad de investigación que expresa un conjunto de elementos de orden natural, económico y sociológico, en un área delimitada **(Fremond, 1967)**. Es decir, en un sistema de producción animal interactúan tres elementos principales, los naturales, los socioeconómicos y los técnicos. Entre los elementos naturales destacan el conocer la geología, suelo, vegetación, clima y fauna que interactúan entre ellos.

En México, la producción de ganado bovino para carne se desarrolla en diferentes contextos agroclimáticos, tecnológicos, de sistema de manejo **(Contreras et al., 2018)**, tamaño y finalidad de la explotación, principalmente comprende la producción de novillos para abasto, cría de becerros para explotación y la

producción de pie de cría. Para la producción de carne se emplean ganado cebuino (*Bos indicus*), ganado europeo (*Bos Taurus*) y sus diversas cruizas, de acuerdo al propósito que se desee (**Rubio et al. 2013**).

Asimismo, la tecnología aplicada varia, desde explotaciones tradicionales hasta las que utilizan tecnología de última generación (**Carrera et al., 2014**).

2.1 Sistemas de producción ganadera.

Los sistemas de producción animal, existentes en Latinoamérica son principalmente los sistemas extensivos y los sistemas intensivos (**Marín, 2011**). En México los sistemas de producción de carne que destacan son intensivo (en corrales de engorda) con una producción del 21.5 % y extensivo (engorda en praderas y agostaderos) con una producción de 78.5% (**Contreras et al., 2018**).

2.1.1 Sistemas extensivos

Los sistemas de producción extensivos, son los sistemas tradicionales o convencionales, además son los más comunes que se encuentran entre los ganaderos pequeños y medianos del sector rural de nuestro país. Son la aproximación más cerca de un ecosistema natural, ya que si son manejados adecuadamente tienden a conseguir el equilibrio entre producción y conservación (**Martín et al., 2001**), que, aunque son construcciones humanas, se basan en una amplia relación con el medio ambiente, especialmente en aquellos sistemas donde interactúan pastos y animales. Los sistemas extensivos consisten en que los animales salen a buscar su alimento en unas áreas naturales (como prados, pastizales, montañas), por lo cual es necesario adecuar los niveles de carga ganadera a la disponibilidad de recursos (**Riojas et al., 2018**)(**Marín, 2011**).

Dentro de los sistemas extensivos se realizan diferentes tipos de pastoreo, entre los más comunes:

- Pastoreo continuo o extensivo.
- Pastoreo intermitente o rotativo.
- Pastoreo racional intensivo (PRI) **(Osvaldo, 2003)**.

2.1.2 Sistemas intensivos

En los sistemas de producción intensivos, los animales se encuentran estabulados, estos sistemas son creados por el hombre **(OIE, 2012)**, las instalaciones deben ser funcionales y se les adecuan las condiciones de temperatura, alimentación y cuidados sanitarios necesarios para que la producción animal sea sana y que lleguen a finalización en el menor tiempo posible **(Riojas et al., 2018)**, el alimento se les brinda en comederos, por lo cual, es muy poco ejercicio el que realizan y por tanto mayor la producción de energía. Estos sistemas son eficientes productivamente, pero los más costosos y su rentabilidad es baja debido a que requieren de muchos recursos externos e inversiones económicas para brindar las condiciones óptimas para su desarrollo (tecnología, alimentación, mano de obra especializada y equipos sofisticados) **(Arronis, 2010)**.

El sistema intensivo ofrece una eficiencia productiva, una alta cantidad de alimentos que responde a una demanda del mercado, por la homogeneidad en cuanto a su calidad, tamaño, forma y sabor, pero incrementa el stress en los animales, muchas veces se viola los principios de bienestar animal y eleva significativamente costos de producción **(Marín, 2011)**.

2.2 Zonas productoras de carne bovina en México

Los sistemas productivos aplicados en la bovinicultura mexicana de carne se encuentran determinados por los factores climáticos predominantes de las diferentes regiones del país **(Carrera et al., 2014)**.

2.2.1 Zonas áridas y semiáridas

Se encuentran ubicadas al norte del país, donde se tienen condiciones más propicias para la engorda en corral, donde se tienen condiciones de desarrollo cultural y comercial similar a EUA. El clima seco favorece el manejo del ganado en confinamiento y existe disponibilidad de insumos para la alimentación **(Villegas et al., 2001)**. Los productores se enfocan en su mayoría a la producción vaca- becerro, cuyo mercado ha sido la exportación a Estados Unidos, los más integrados buscan la agregación de valor mediante la exportación de cortes de alto valor **(Carrera et al., 2014)**.

Las razas que predominan en la zona son productoras de carne como Hereford, Angus, Charolais y cruzas con razas cebuínas. Los estados que conforman dicha zona son: Baja California Sur, Baja California Norte, Sonora, Chihuahua, Durango, Coahuila, Zacatecas, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas como se muestra en la **Figura 1 (Rubio et al., 2013)**.

2.2.2 Zona templada

Se ubican en el centro del país, donde actualmente se ha convertido en una de las zonas productoras de carne en corral más importantes del país. En esta zona predominan cruzas con razas europeas, principalmente animales criollos cruzados con cebuinos y razas europeas, Pardo Suizo, Angus y Beefmaster. La mayoría de las producciones son extensivas, sustentadas en el pastoreo durante tiempo de lluvia, y se complementan el resto del año con dietas con base de esquilmos agrícolas. La actividad que se desarrolla es el sistema vaca-becerro para consumo local o finalización en corrales de engorda **(Carrera et al., 2014)**.

Los estados que la conforman son: Jalisco, Colima, Guanajuato, Michoacán, Aguascalientes, Querétaro, Estado de México, Ciudad de México, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla como se muestra en la **Figura 1 (Rubio et al., 2013)**.

2.2.3 Zona tropical (Húmeda y subhúmeda)

Se encuentra ubicada al sur del país, en ella el pastoreo es el sistema predominante debido a la abundante producción de forraje, sin embargo, actualmente la finalización en corral está tomando gran terreno.

En esta zona predomina el ganado doble propósito (**Palma, 2014**), debido a las necesidades del terreno predominan las razas cebuinas (Indobrasil, Brahman, Guzerat, Gyr y cruza de razas europeas, principalmente ganado suizo) (**Villegas et al., 2001**).

Esta región se ha consolidado como la zona ganadera más dinámica y de expansión, con el mayor inventario nacional, ha sido caracterizada por ser abastecedora de ganado joven que es finalizado en otras partes del país. El sistema

de engorda en esta región se realiza en potreros de abundante forraje, pero con ciertas limitaciones nutricionales (Carrera *et al.*, 2014).

Figura 1. Sistemas de producción ganadera en México por condición climática. Tomada de Rubio *et al.*, 2013.



Los estados que conforman esta zona son: Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Yucatán, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Campeche, Quintana Roo como lo muestra la **Figura 1** (Rubio *et al.*, 2013).

III. Importancia de la ganadería en México

En México la ganadería comienza con la introducción por parte de los españoles del ganado bovino alrededor del año 1524.

Para el año 1963, la ganadería contribuyó a la actividad general de la Republica, con más del 20% del producto Nacional Bruto, con un valor de 30,000 millones de

pesos manteniendo un ritmo de producción mayor a la tasa de crecimiento demográfico (Barrera, 1996).

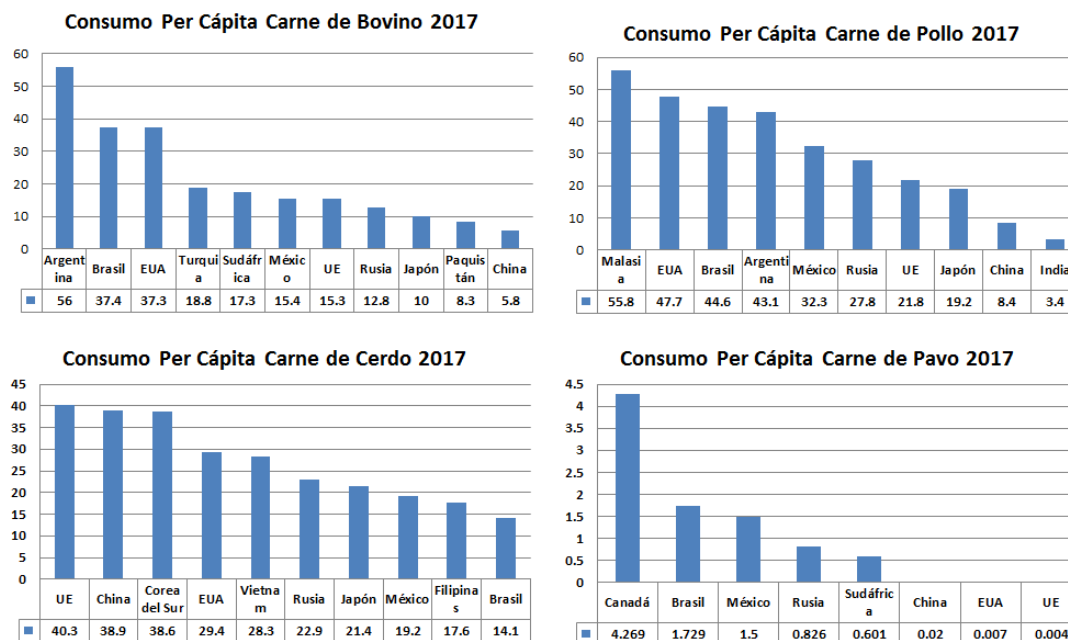


Figura 2. Consumo per cápita nacional de carne de bovino, cerdo, pollo y pavo del 2017, en 10 países (Consejo mexicano de la carne, 2017).

Dentro de los 10 países de mayor consumo per cápita de carne de bovino, México ocupó el 6to lugar (Figura 2) en el 2017, esto indica que es un país con auge en producción y consumo de carne de bovino, lo cual sugiere la importancia económica de la ganadería.

En el país existen más de 3.4 millones de unidades de producción ganadera. Las unidades de Producción pecuaria ocupan más de 110 millones de hectáreas del territorio nacional, muchas de las cuales no tienen otra opción productiva (SAGARPA, 2008).

IV. Implicaciones de las parasitosis en el ganado

Las infecciones parasitarias son una de las principales causas de enfermedad que afectan negativamente la productividad en las explotaciones ganaderas de todo el mundo (**Castro et al., 2015; Arias et al., 2016**), una evaluación preliminar revela que el impacto económico de las enfermedades parasitarias en las producciones ganaderas son inciertas (**Rodríguez et al., 2001; Rodríguez et al., 2005; Rodríguez et al., 2011, Bautista et al., 2012**) y reconoce el reto que involucra la pérdida económica en relación a la productividad de la producción, ligada a variables multifactoriales influenciados por áreas geográficas, condiciones climáticas, manejo, tamaño y densidad de hato (**Rodríguez et al., 2017**).

Las parasitosis gastrointestinales están asociadas al pastoreo, debido a que desarrollan parte de su ciclo de vida en la pastura para alcanzar el estadio infectivo (Figura 3) (**Steffanet al., 2018**).

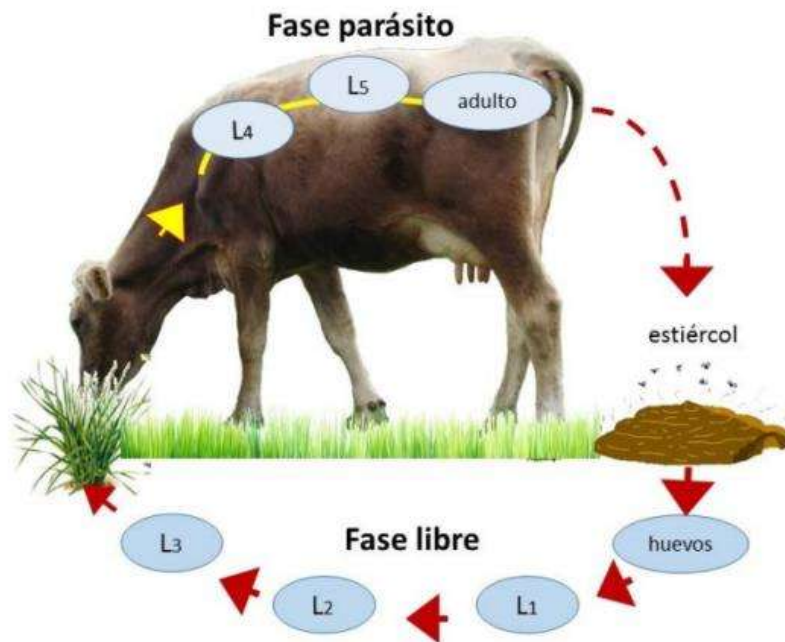


Figura 3. Ciclo biológico de un nematodo gastrointestinal, en bovino (Huerta et al., 2016).

El ganado bovino es hospedador natural de un gran número de parásitos, entre los que figuran, protozoarios como *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Eimeria*, infecciones que producen diarrea, deshidratación muerte en animales jóvenes (**Díaz de Ramirez et al., 2001**), nematodos como *Strongylos*, *Ancylostoma* y cestodos como *Taenia Sp.* que provocan gastroenteritis verminosa caracterizada clínicamente por diarrea, debilidad, hemorragias y deshidratación (**Mawatari et al., 2014**) y tremátodos como, *Fasciola hepatica*, su evolución es lenta en los bovinos y se caracteriza por pérdida de peso, emaciación, edema, debilidad, diarrea y ascitis (**Cordero del campillo, et al., 1999; Rojas et al., 2016; Tsegaye et al., 2012**).

Las parasitosis gastrointestinales son un problema zoonosanitario que repercute en la salud publica ya que algunas enfermedades son zoonoticas en humanos, y su control en los animales es un requisito indispensable para reducir las infecciones humanas (**Castro et al., 2015**).

V. Pruebas diagnósticas para la identificación de parásitos

Tradicionalmente, las pruebas diagnósticas para identificación de parásitos gastrointestinales se realizan mediante un examen microscópico de las heces del paciente. Sin embargo, existen pruebas más complejas y específicas para diagnosticar parasitosis (**Corripio et al., 2010**).

5.1 Toma de Muestra para análisis

5.1.1 Heces

Se debe tomar directamente del recto del animal, para evitar contaminación por nematodos de vida libre. La muestra de excremento se deposita en un frasco limpio con un algodón húmedo, o en una bolsa herméticamente cerrada y un ambiente de humedad.

5.1.2 Sangre

Entera y con anticoagulante, en refrigeración a 4°C hasta su remisión, o en frotis sanguíneos fijados previamente con mentol u otro medio. Para serologías se toma sangre entera y se espera a que forme un coagulo, extrayéndose el suero sanguíneo y se procede a su coagulación.

5.1.3 Vísceras y tejido muscular

Debe seccionarse el órgano, refrigerarse y trasladarse lo más rápido posible, o bien depositarse en un frasco con glicerina, cerrado herméticamente creando un ambiente anaerobio que evite la putrefacción. El tejido muscular debe mantenerse en refrigeración hasta su traslado.

5.2 Examen coprológico

5.2.1 Directo de heces frescas

Esta técnica permite reconocer cualquier elemento de diseminación de los parásitos, pero en caso de no observar ninguna forma parasitaria por este método, no debe descartarse la posibilidad de una parasitosis, ya que el tamaño de la muestra es tan pequeño que el resultado negativo no es excluyente. Sin embargo, no es sustituible por ser el más sencillo, rápido y fundamentalmente porque algunos parásitos no son evidenciables por otra técnica (protozoos móviles).

5.2.2 Método de enriquecimiento (cualitativo)

a) Flotación

Se basa en lograr la concentración de los elementos de diseminación (huevo, larva y quistes) por flotación en un líquido de mayor densidad que ellos. Dicha densidad oscila generalmente entre 1.05 y 1.10. la densidad de las soluciones empleadas, no debe ser más alta para no deformar los elementos parasitarios y para que no floten otras partículas sólidas.

b) Flotación en solución saturada de NaCl

Tiene una densidad de 1.18 y se prepara hirviendo una solución en exceso de sal común durante un minuto. Se deja enfriar y se filtra y se ajusta a la densidad indicada. Con ella se observan la mayoría de los huevos y larvas de nematodos, los ooquistes de coccidias y algunos huevos de cestodos.

c) Sedimentación

Se trata de concentrar los posibles elementos de diseminación existentes en las heces por simple gravedad. Para el diagnostico de amebas y ciliados, huevos de trematodos y cestodos pseudofilideos, huevos de helmintos, larvas de nematodos y quistes de protozoos en condiciones de viabilidad y sin distorsión.

d) Coprocultivos o incubación de heces

Se debe mantener la muestra en condiciones de humedad temperatura y oxigenación para que los elementos parasitarios evolucionen y alcancen estadios en que la identificación resulte más fácil y exacta, simulando las condiciones medioambientales.

e) Esporulación de ooquistes de coccidios

Para esta prueba son necesarios ooquistes esporulados (**Girard, 2003; Serrano et al., 2010, Fiel et al., 2011**).

VI. Biocontrol de parásitos

Los últimos treinta años se han caracterizado por el desarrollo y aplicación en distintas áreas del mundo de numerosas estrategias químicas (antiparasitario o antihelmíntico) para el control de parásitos gastrointestinales y pulmonares en el ganado. Sin embargo, dichas estrategias han provocado una gran presión de selección en las poblaciones parasitarias, produciendo resistencia (**Sagüés, et al., 2011**).

Actualmente el manejo de la sanidad animal en lo que a parasitosis se refiere se ha dirigido hacia el llamado "Combate Integrado de Parásitos" o CIP, cuyo objetivo es combinar adecuadamente varias herramientas de control, a efecto de desestabilizar la formación de aquellas poblaciones parasitarias con mayor proporción de individuos genéticamente resistentes, manteniendo un nivel adecuado de producción (**Orozco, et al., 2009**).

El CIP contempla el uso de hongos nematófagos depredadores para el control biológico de nemátodos gastrointestinales y pulmonares en pasturas o suelo. Los hongos nematófagos son microorganismos que atrapan, destruyen y se alimentan de nemátodos vivos en el suelo (**Nari, et al., 2003**).

El Control Biológico (CB) o Biocontrol, es un método ecológico diseñado por el hombre para disminuir las poblaciones parasitarias a un nivel subclínico aceptable, conservando estas poblaciones en un nivel no perjudicial, gracias a antagonistas vivos naturales (**Grønvold et al., 1996**).

Resulta fundamental entender el CB como una medida reguladora cuyo objetivo no es acabar con el organismo blanco, sino controlar su población para reducir sus efectos nocivos, diferenciándose de los antihelmínticos, que fueron elaborados con el propósito de eliminar la totalidad de los parásitos sobre el animal (**Larsen, 2000**).

Entre los distintos organismos estudiados como posibles agentes de CB se encuentran artrópodos coprófagos, bacterias y hongos. En estos últimos, existen hifomicetos (conocidos como hongos nematófagos) capaces de atrapar y digerir las formas libres de los nematodos en el suelo (**Larsen, 1999**). Muchos de estos hongos producen esporas de resistencia o tienen fases saprofiticas en ausencia de sus hospedadores. Además, no son patógenos para los organismos que no son su blanco (**Deschines, 1939**).

Existen más de 200 especies de hongos nematófagos descritas; la mayoría pertenecen a los denominados hongos imperfectos o *Deuteromycetes*. Dichos hongos constituyen un grupo heterogéneo y ubicuo, viviendo normalmente en forma saprofitica y ocupando diferentes nichos en el suelo, donde también pueden alimentarse de una amplia gama de nematodos de vida libre, ya sea como recurso principal o secundario (**Nordbring et al., 2006**).

El ciclo de vida de *C. elegans* consta de una fase embrionaria, seguido de cuatro estadios larvales (llamados L1, L2, L3 y L4) y los adultos (Figura 4). Cada etapa larval se caracteriza por patrones específicos de división y diferenciación celular, estando marcadas por una muda de cutícula (**Casada et al., 1975**). Es un ciclo de vida corto, pues en condiciones de laboratorio normales a 20 °C, ocurre en 4 días. El desarrollo embrionario se produce durante unas 14 h y el postembrionario durante 43 h.

Este nematodo puede crecer en un amplio rango de temperaturas, de tal manera que con el aumento de la misma se eleva también su tasa de crecimiento, variando así la longitud 7 de su ciclo desde los 6 días a 15 °C hasta los 3 días a 25 °C. A lo largo de su vida, genera entre 200 y 300 huevos. Estos se deponen aproximadamente en la fase de 30 células (**Yochem, 2006**).

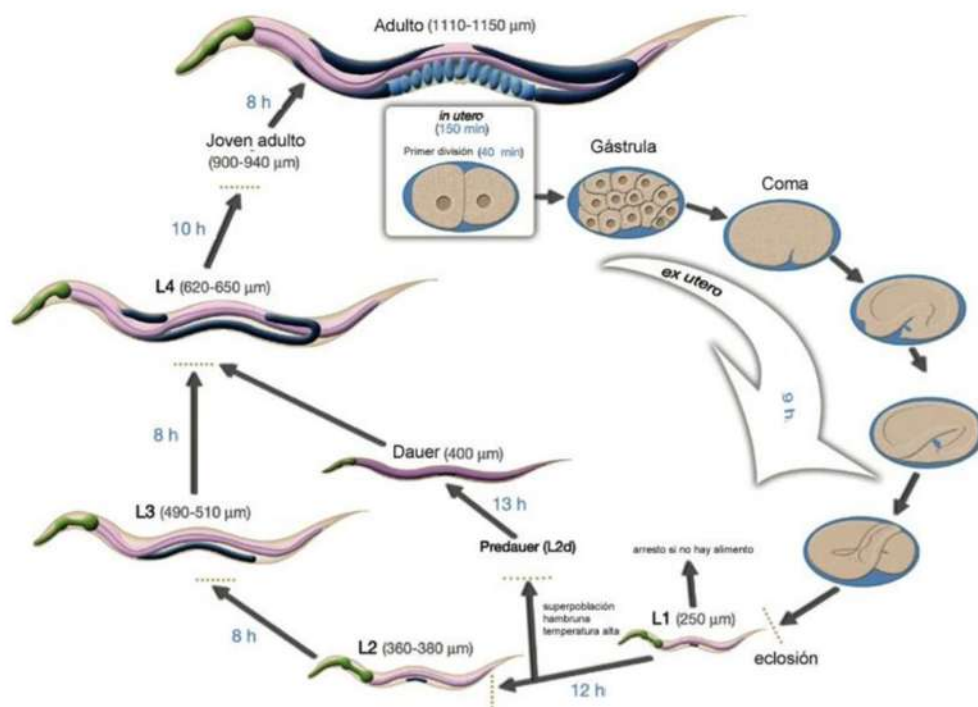


Figura 4. Ciclo de vida de *C. elegans* a 20 °C. Se indica en azul el tiempo entre cada muda larval y la longitud corporal (μm) para cada etapa de desarrollo. Tomado de Clavijo, 2006.

En función, del modo en que utilizan a los nematodos como recurso nutritivo, los hongos nematófagos se dividen en tres grupos: endoparásitcidas, ovicidas y depredadores.

6.1 Endoparásitcidas

Sus hifas crecen únicamente dentro del nematodo, excepto las hifas fértiles que crecen en el exterior (Figura 5). Según la especie, las esporas pueden ser ingeridas para penetrar en el interior del nematodo y posteriormente germinar; las esporas se pueden adherir y perforar la cutícula del nematodo, o pueden presentar zoosporas móviles, que parecen tener un tropismo positivo hacia los nematodos. Ensayos in vitro realizados con las especies *Harposporium anguillulae* y *Drechmeria coniospora* demostraron una alta eficacia en la disminución de larvas en cultivos. Sin embargo, el carácter de parásito obligado de este grupo de hongos limita su empleo como agentes de control biológico ya que su dispersión únicamente se realiza por contacto directo entre individuos parasitados, precisan de un medio con alta concentración de agua para difundirse y aquellos que deben ser ingeridos solo serían activos contra los estadios parasitarios de larva 1 (L1) y larva 2 (L2), que son los que se alimentan, y no sobre la larva 3 (L3) infectante que, al presentar cutícula doble, no se alimenta, por lo tanto no sería atacada.

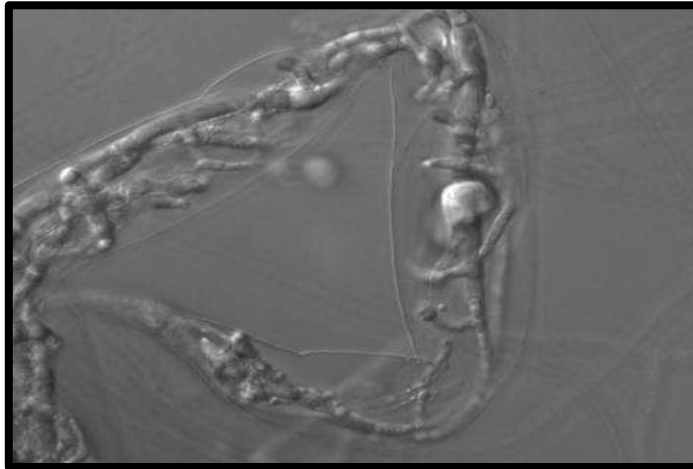


Figura 5. Nematodo parasitando y desintegrado por hongo, se observa crecimiento micelial interno con absorción del contenido del nematodo (Peraza *et al.*, 2014).

6.2 Ovicidas

Los hongos ovicidas pueden ser usados para el control biológico de nematodos parásitos y especialmente nematodos fitopatógenos (patógenos de las plantas). En su mayoría son saprófitos, por lo que no dependen de la presencia de huevos en el medio. La mayoría de los estudios se han enfocado en la colonización de quistes conteniendo huevos de nematodos fitopatógenos. Existe un pequeño grupo de hongos especializados en el parasitismo de huevos de nematodos parásitos, entre los que se encuentra *Verticillium chlamydosporium*, capaz de infectar huevos de *Ascaris lumbricoides* in vitro.

Se proponen dos mecanismos de acción de penetración del hongo en el huevo: a través de una simple penetración de la hifa vegetativa a través de la cáscara del

huevo, o a través de la formación de un órgano específico de penetración en el sitio de contacto de la hifa con la cáscara del huevo (Figura 6).

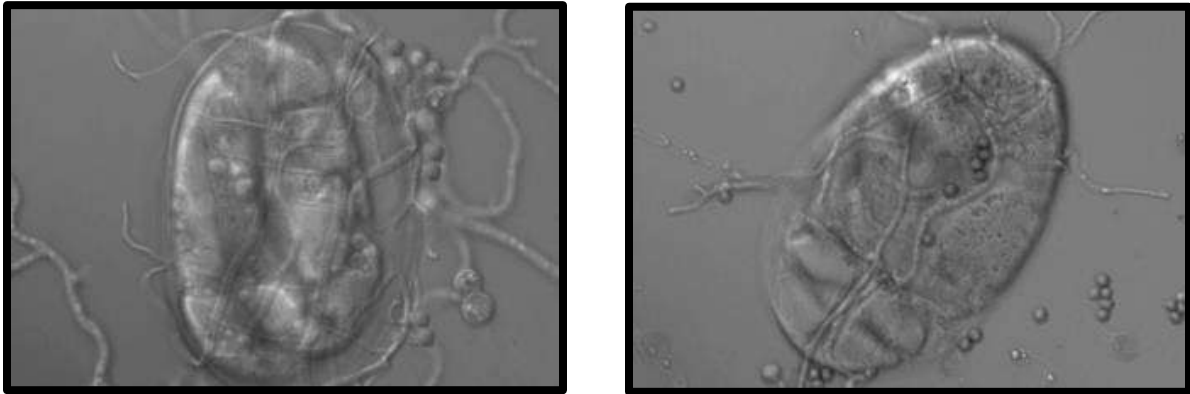


Figura 6. Hongo parasitando huevo de nematodo, el cual consumió el contenido del huevo y cesó el proceso de embriogenesis (Peraza *et al.*, 2014).

6.3 Depredadores

Son hongos saprófitos que forman un sistema micelial extensivo en el medio y emplean como recurso nutritivo las fases de vida libre de los nematodos. Algunos de los géneros más importantes dentro de este grupo son *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* y *Monacrosporium*. A través de diferentes mecanismos, que van desde la producción de un material adhesivo sobre las hifas hasta la formación de complejos anillos constrictores (Figura 7), los hongos depredadores son capaces de atrapar y consumir los estadios larvarios de los nematodos presentes en el suelo y en las heces.

Un grupo abundante de hongos depredadores utiliza como estrategia de captura la formación de redes tridimensionales adhesivas. Toda la red está cubierta por una capa mucilaginosa a la que quedan adheridos los nematodos y cuya producción

parece estar estimulada por el forcejeo de los nematodos atrapados. La forma de capturar de los hongos nematófagos es una combinación de una fuerza mecánica (órganos de captura) y la liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares tales como proteasas séricas, quitinasas y colagenasas que digieren la cutícula del nematodo (compuesta principalmente por proteínas). Una hora después de la penetración, el hongo forma un bulbo infectivo en el interior del nematodo y en pocas horas ocupa completamente el cuerpo de este. El proceso de digestión puede llegar a durar hasta una semana, tras lo cual la hifa trófica se lisa y el hongo se desarrolla de nuevo saprofiticamente, hasta que la presencia de nematodos en el medio estimula nuevamente su actividad predadora.

Los géneros de nematodos parásitos de los animales domésticos, cuyas larvas son más móviles (*Cooperia*, *Ostertagia*, *Haemonchus* y *Cyathostomas*), estimulan una mayor producción de redes tridimensionales que aquellas larvas de movimientos más lentos, como son *Oesophagostomum* y *Nematospiroides*. Las L1 y las L2 son más lentas en sus movimientos, pero más susceptibles de morir rápidamente que las L3, las que al mantener la vaina de la L2 obtienen más protección y son más resistentes a la mortalidad.

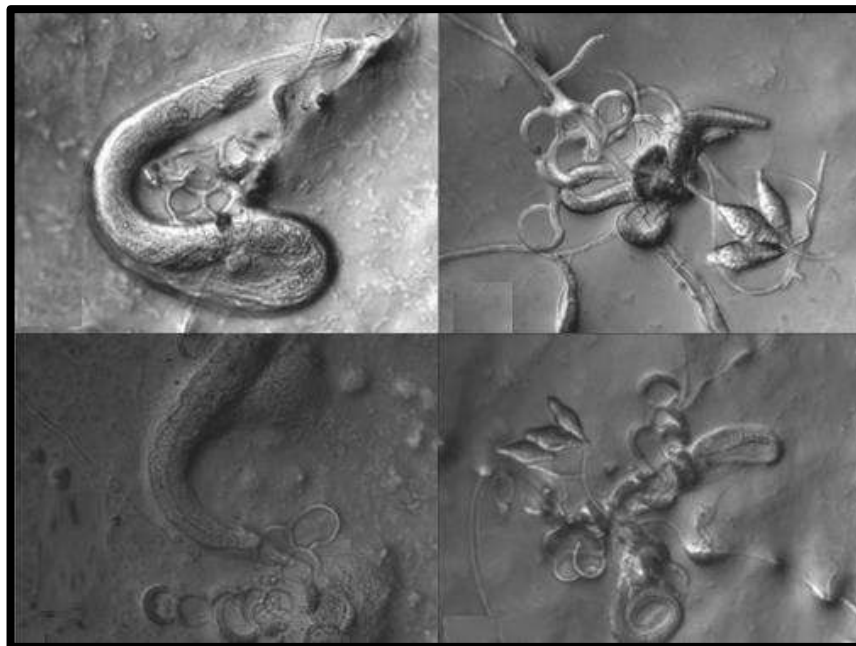


Figura 7. Nematodo atrapado en redes pegajosas de hongo (Peraza *et al.*, 2014).

En la búsqueda de hongos nematófagos para el control de los nematodos gastrointestinales, la mayoría de los trabajos se han centrado en las especies depredadoras, ya que su carácter saprofítico permite su aislamiento y mantenimiento en cultivos puros, facilitando así su producción en el laboratorio. Estos hongos han sido aislados en gran variedad de hábitats, especialmente en medios ricos en materia orgánica, como el estiércol, el abono o los pastos. Entre las especies conocidas de hongos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* cumple con todas las características antes descritas y, además, tiene la capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal de los bovinos y otras especies domésticas, como equinos, cerdos y ovinos, pudiendo germinar y luego reducir el número de larvas infectantes en materia fecal. La supervivencia en el tracto gastrointestinal se debe a que sus clamidosporas (esporos de resistencia) presentan una gruesa pared que les permite tolerar las condiciones extremas.

La temperatura óptima para el crecimiento y función depredadora del hongo se sitúa entre 10 y 30°C, alcanzando su máxima actividad para la formación de redes entre 25 y 28°C. Otros factores tales como luz, humedad, pH y la presencia de oxígeno, pueden también influir en la formación de elementos de captura.

Cualquier agente de CB debe resultar inocuo para el medio ambiente, por este motivo se ha de valorar si la presencia masiva de clamidosporas en las heces puede alterar el equilibrio natural del ecosistema.

6.4 Estructuras de atrapamiento de hongo

Los hongos nematófagos, capturan nematodos mediante trampas producidas a partir del micelio vegetativo, los tipos de trampas reportadas incluyen: redes

adhesivas, dedos adhesivos, anillos constrictores, anillos no constrictores y ramas adhesivas (Figura 8) (Zhang *et al.*, 2001; Tzean *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 2007).

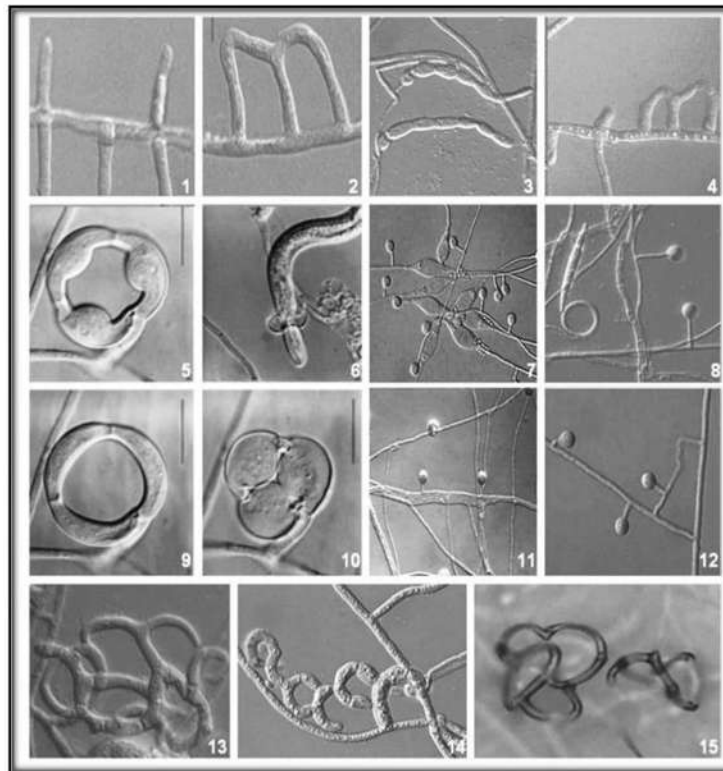


Figura 8.
las

**Morfología de
trampas de
atrapamiento**

de los hongos nematófagos. 1-4: hifas adhesivas; 5-6, 9-10: anillos constrictores; 7, 11-12: botones adhesivos; 8: dedos adhesivos y anillos no constrictores; 13-15 redes adhesivas (Li *et al.*, 2014).

6.5 Formas de administración de los hongos nematófagos

Entre las formas de administración evaluadas hasta el momento se encuentran:

a) Granos de cereales con los hongos

Los granos de cereales proveen un sustrato ideal para el crecimiento y producción de gran cantidad de esporas de hongos nematófagos. Administraron diariamente 5 g de cebada con 3×10^6 clamidosporas durante 5 días, resultando suficiente para disminuir el número de larvas en materia fecal, cuando la misma fue cultivada en agar agua. Este método puede llegar a utilizarse en sistemas intensivos o cuando el encierre diario de los animales forma parte de la rutina de manejo. Otra opción de aplicación sería para suplementar períodos nutricionalmente críticos para los animales, tales como el destete y el parto, períodos en que la excreción de huevos de parásitos por materia fecal es mayor.

b) Bloques minerales

D. flagrans fue incorporado con éxito en bloques minerales, usaron ovinos a los que acostumbraron a consumir el bloque antes del inicio del tratamiento. Los bloques eran pesados durante el transcurso del ensayo para determinar el consumo diario. *D. flagrans* sobrevivía en el bloque mineral un mínimo de 18 semanas, cuando era almacenado a 4°C. Un importante punto a considerar es el tiempo de vida de los esporos en los bloques debido a su posible germinación si existiera humedad en el ambiente.

Las ventajas que presenta la administración de bloques minerales conteniendo clamidosporas de *D. flagrans* son el bajo coste y el doble propósito de su fabricación, que es la de ser un suplemento nutricional y un vehículo para los hongos nematófagos al mismo tiempo. Las desventajas de esta forma de administración son la variación que existe en su consumo por los animales, y que debe almacenarse en un lugar fresco (4°C) para evitar la absorción de humedad y la germinación de las clamidosporas, con la consecuente pérdida de la eficacia del bloque. Los bloques minerales con clamidosporas podrían ser una forma de

administración en sistemas productivos donde los animales son criados a pasto, y podrían administrarse en los períodos de máxima contaminación de las pasturas para evitar así los picos de infectividad larvaria.

c) Bloques energéticos

Fueron incorporados clamidosporas de *D. flagrans* en bloques energéticos. Los autores evaluaron a través de un test de eficacia en ovinos la administración del mismo. Dos superficies con pasturas fueron contaminadas a partir de animales parasitados. Una superficie alimentó animales que recibieron bloques con hongos y la otra animales que recibieron bloques sin hongos. Posteriormente, los animales fueron retirados y se colocaron dos grupos de animales libres de parásitos que permanecieron un mes pastoreando. Finalizado este período, se sacrificaron los animales para determinar el número y las especies de nematodos presentes en el tracto gastrointestinal. El porcentaje de eficacia del hongo sobre el total de la población parasitaria susceptible fue del 92%. Los bloques minerales como forma de administración de agentes de CB podrían utilizarse en producciones extensivas donde los animales son criados a pasto y su administración podría realizarse en los momentos en que la contaminación de la pastura es un riesgo para la salud animal.

d) Pellets de alginato

Otra forma de administración estudiada con éxito en varias especies de animales domésticos es la incorporación de hongos nematófagos en pellets de alginato de sodio. Estudios realizados, demostraron que la incorporación de estos hongos en los pellets no afectó su capacidad predatora. Las especies de hongos nematófagos incorporadas con éxito en los pellets fueron *Monacrosporium thaumasium* y *Arthrobotrys robusta*. Después de administrar pellets conteniendo *A.*

robusta por vía oral a bovinos, lograron aislarlo en materia fecal, demostrando así que el pasaje a través del tracto gastrointestinal no afectó la capacidad predadora de ese hongo.

D. flagrans y *M. thaumasium*, fueron incorporados respectivamente, en pellets de alginato. Estos pellets fueron administrados a equinos para probar de esta manera el control de larvas de *Cyathostomas*. Las yeguas utilizadas recibieron una dosis oral de 1 g de pellets por 10 kilogramos de peso vivo una vez a la semana durante 6 meses, demostrando reducciones significativas en el número de huevos de nematodos en materia fecal y de larvas en los coprocultivos. La reducción significativa del número de larvas de *Cyathostomas* usando pellets de alginato conteniendo *D. flagrans* y *M. thaumasium* hace que este tipo de tratamiento efectivo pueda ser usado como una herramienta para el CB de nematodos parásitos en equinos.

e) Bolos de liberación controlada

Otra forma de administración de hongos nematófagos puede ser a través de bolos de liberación controlada (BLC), en forma de dispositivos intrarruminales.

Estudios han demostrado que las clamidosporas de *D. flagrans* fueron capaces de sobrevivir las presiones de fabricación al ser incorporadas dentro de matrices en la elaboración de prototipos intrarruminales de BLC. Los estudios in vitro demostraron que las clamidosporas permanecieron viables durante 9 meses dentro de los BLC almacenados a 4°C. En estudios in vivo se observó que los bolos liberaron clamidosporas viables de forma constante hasta 23 días, tras su colocación en el

rumen; después de ese período el dispositivo se humedeció en el centro y dejó de liberar clamidosporas correctamente.

En el futuro se podrían usar los BLC si la contaminación de las pasturas resultara riesgosa por la posible aparición de altas cantidades de larvas infectivas en el pasto. La liberación de las clamidosporas por materia fecal sería entonces efectiva para disminuir el número de larvas migrando desde la materia fecal hacia las pasturas (Silvina, 1999; Sagües *et al.*, 2011).

VII. *Mucor circinelloides*

7.1 Generalidades

Mucor circinelloides es un hongo filamentoso integrante de la clase Zygomycetes y orden Mucorales, (Figura 9). Posee una amplia distribución en diferentes ambientes

y circunstancias. El género *Mucor*, presenta esporangioforos ramificados en forma de racimos o cimas y esporangios globosos (López, 2015).

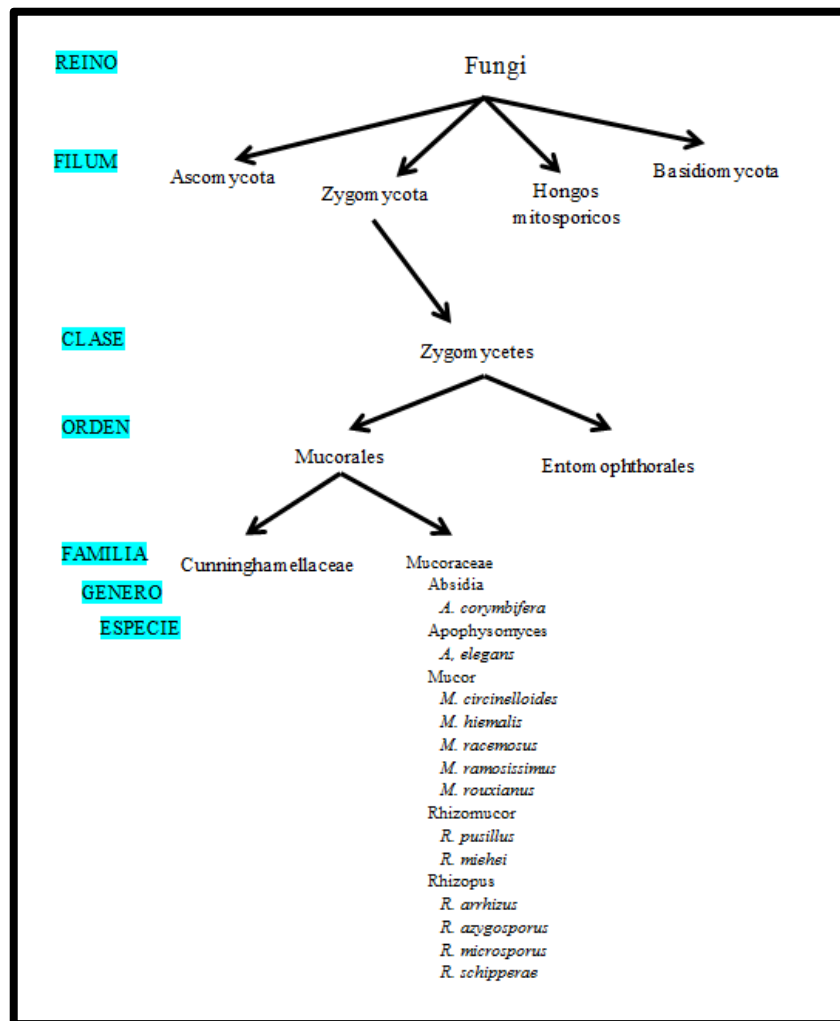


Figura 9. Árbol filogenético de especies fúngicas. Tomado de Ribes *et al.*, 2000.

Mucor es un género que engloba especies que causan el moho que se encuentra en vegetales en estado de descomposición y algunas plantas. Es responsable de invadir una amplia variedad de alimentos y vegetales, debido a su capacidad de producir enzimas en grandes cantidades (Jordán, 2013).

7.2 Ciclo de vida de *Mucor circinelloides*

M. circinelloides presenta dos ciclos de vida diferentes, uno sexual que permite la recombinación genética y se presenta en dos tipos (+) y (-) los cuales son morfológicamente iguales, y un ciclo asexual en el cual la reproducción del microorganismo es rápida.

7.2.1 Ciclo sexual

En la cual se presenta de dos tipos (+) y (-), los cuales al aproximarse presentan ciertos cambios morfo-fisiológicos que dan lugar a zigoforos. Los estar cerca los ápices de los zigoforos se fusionan y mediante diversos cambios, se unen y forman la zigospora, en donde se fusionan ambos núcleos dan lugar a los germoesporangioforos que producen los germoesporangios que contienen nuevas germoesporas que por medio de mitosis con llevan a un nuevo ciclo (Figura 10). Este proceso permite la recombinación del material genético de las estirpes que participan en él, generando variabilidad genética en la especie **(López, 2015; Jordán, 2013)**.

7.2.2 Ciclo asexual

Se caracteriza por la formación de esporangiosporas multinucleadas. Estas esporas maduran en el esporangio, al germinar producen uno o varios tubos germinativos, donde dan lugar a hifas que crecen por el ápice, ramificando para formar el micelio, en este punto algunas hifas comienzan a ser aéreas originando esporangioforos y estos a su vez dan lugar a los esporangios los cuales contienen las nuevas esporas (Figura 10) **(López, 2015; Jordán, 2013)**.

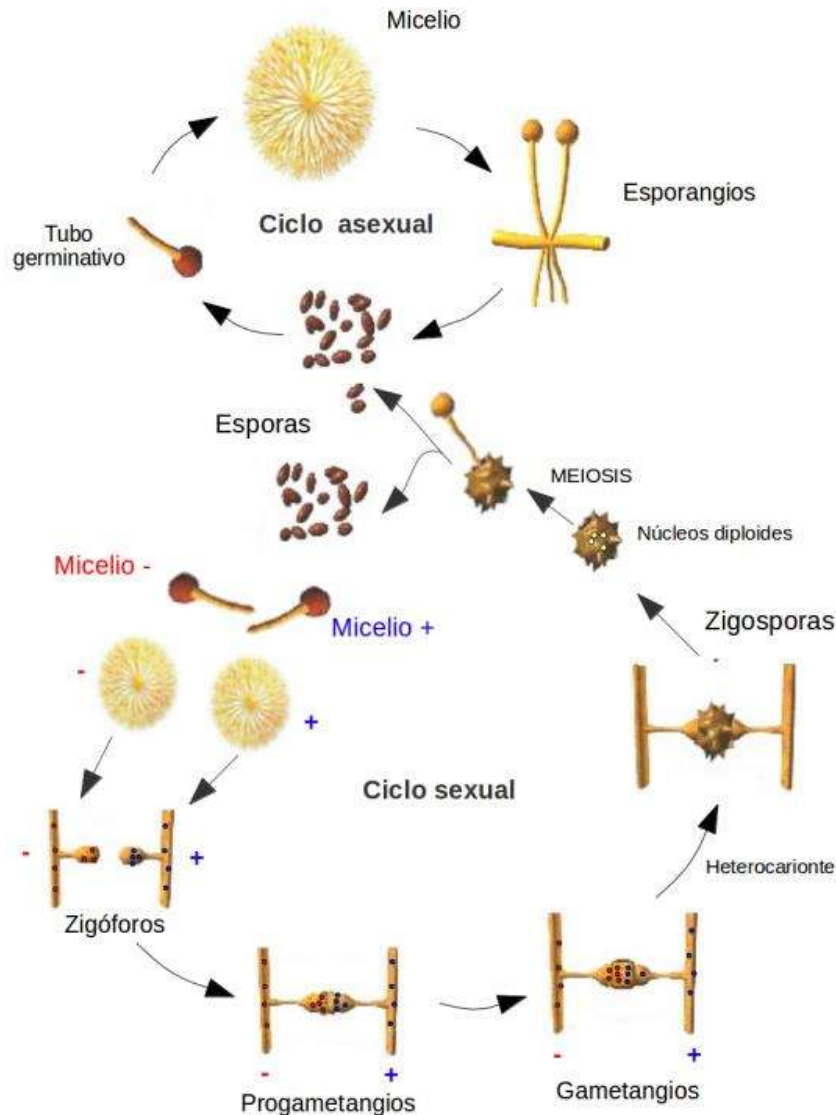


Figura 10. Ciclo de vida de *M. circinelloides*. En el ciclo asexual a partir de la esporangiospora, una célula haploide, si se crece en presencia de oxígeno está desarrollará la morfología de micelio, mientras que si crece en ausencia de oxígeno y en presencia de una fuente de carbono fermentable desarrollará la morfología de levadura. Mientras en el ciclo sexual, a partir del micelio de los dos tipos sexuales (+) y (-), estos se fusionaran mediante hifas especializadas, a partir de cada tipo sexual, las cuales se generan una vez desencadenado el proceso de reproducción sexual, mediado por la hormona ácido trispórico (derivada del β -caroteno) para dar lugar a la zigospora, una célula producto de la meiosis **(Tomada y modificada de Silva, 2013; Patiño, 2017).**

7.3 Dimorfismo

M. circinelloides es un importante modelo de estudio por su capacidad dimórfica (Lübbehüsen et al., 2003; Li et al., 2011), dicha característica le permite un crecimiento alternativo entre hifa o levadura (Figura 11), de acuerdo a las condiciones ambientales a las que se encuentre sometido. Condición que poseen muchos patógenos, siendo una de las dos morfologías la causante de su patogenicidad., la virulencia de *Mucor* se da en su morfología de hifa. Además, se conoce que el tamaño del esporangioforo es el que determina la virulencia (Jordán, 2013).

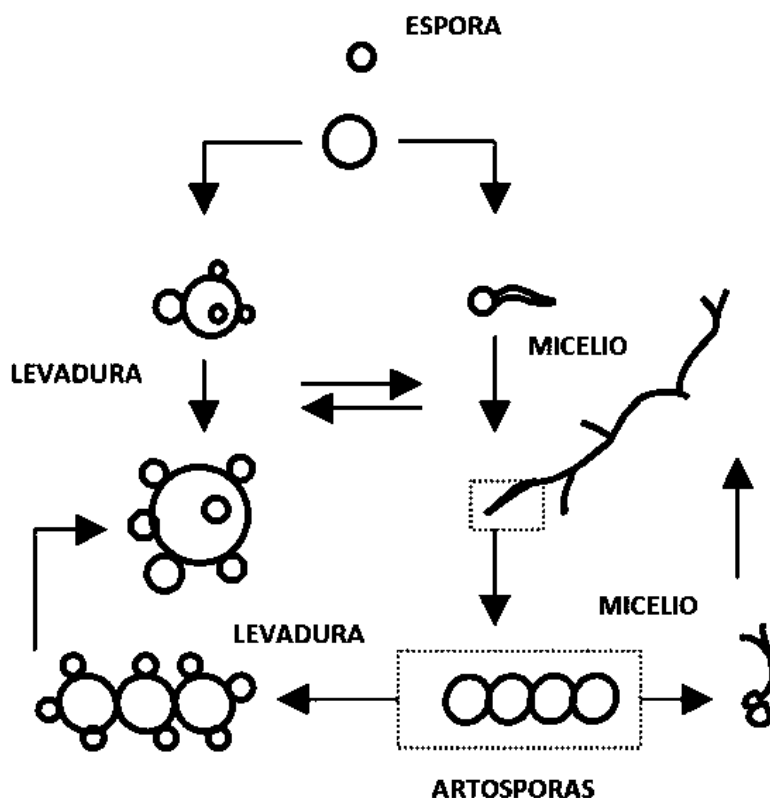


Figura 11. Dimorfismo de *M. circinelloides*. A partir de la espora y una vez que se han detectado condiciones favorables para el desarrollo vegetativo, la espora aumenta su tamaño y toma forma esférica. Dependiendo de las condiciones nutricionales y ambientales, *M. circineliodes* crece como micelio en presencia de oxígeno y crece como levadura en ausencia de oxígeno y una fuente de carbono fermentable. Si las condiciones cambian, este mucoral es capaz de hacer transición de una morfología a otra (Tomada y modificada de Lübbehüsen et al., 2003; Patiño, 2017).

Los esporangiosporas asexuales están involucrados en la diseminación, mientras que los zigosporas sexuales se consideran inactivas. En la subespecie *M. circinelloides* f. *lusitanicus* (Mcl) los esporangiosporas presentan un tamaño y forma diferente entre (-) y (+). Las cepas (+) tienen un tamaño pequeño de $4.7 \pm 0.9\mu\text{m}$ y una forma homogénea mientras la cepa (-) producen esporas irregulares y más grandes de $12.3 \pm 2.7\mu\text{m}$, siendo estos más virulentas. La diferencia radica en que las esporas más grandes germinan dentro de los macrófagos mientras las más pequeñas quedan inactivas dentro de los macrófagos (**Li et al., 2011**).

M. circinelloides tiene un dimorfismo basado estrictamente en las condiciones de crecimiento, el cual puede ser manipulado fácilmente. El crecimiento levaduriforme se efectúa básicamente en una atmosfera anaerobia de N_2 , CO_2 , una mezcla de ellos o en grandes cantidades de glucosa. Mientras el crecimiento micelar se lleva a cabo en condiciones aerobias de O_2 , véase en la **figura 11 (Chiericatti, 2013)**.

7.4 Aspectos biomédico asociados a *Mucor circinelloides*

M. circinelloides es considerado como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos (**Bastidas et al., 2012**) con condiciones como diabetes, VIH, personas con trasplantes de órganos y células madres (**Lanternier et al., 2012**), traumas, herida quirúrgicas, desnutrición severa o que presenten ruptura primaria en la integridad de la barrera cutánea (**Ribes et al., 2000**). Las vías de infección más comunes son, sinusal 39%, pulmonar 24% y cutáneo 19%. También se observan enfermedades rinocerebral, gastrointestinal y alérgica, se les asocia a una enfermedad angioinvasiva que conduce a trombosis e infarto en tejidos afectados, destrucción tisular medida por proteasas fúngicas, lipasas y micotoxinas. Se reportaron y trataron 241 casos de mucormicosis cutánea de los cuales hubo una tasa de supervivencia del 3%, lo cual indica que el orden mucoral es causante de altas tasas de mortalidad en las diferentes presentaciones de la infección (**Roden et al., 2005; Li et al., 2011**). Las infecciones mucorales se presentan raramente en pacientes sanos (**Ribes et al., 2000**).

Se le atribuye actividad inhibitoria para microorganismos Gram positivos (**Chaparro, 2010**). Se le asocian propiedades ovicidas (**Cortiñas, 2015**), que se han utilizado para control biológico de nematodos gastrointestinales (**Cazapal et al., 2013**) como *Ascarissuum* (**Hernández et al., 2015**), trematodos como la *fasciolahepatica* (**Arias Vazquez et al., 2016**), y *Calicophorondaubneyi* (**Arroyo et al., 2015**).

7.5 Aspectos biotecnológicos asociados al uso de *Mucor circinelloides*

Ha sido empleado para la producción de enzimas industriales, por ejemplo, de proteasas extracelulares (**Sousa et al., 2002**) en la utilización en la producción de quesos, debido a su capacidad coagulante y se ha llegado a sustituir las quimosinas de ternero. También se emplea en la elaboración de detergentes y productos farmacéuticos, se estima que tiene una venta del 60% a nivel mundial gracias a su variedad de usos (**Alves 2005; Sousa et al., 2002 y Solera et al., 2010**).

Se ha utilizado como materia prima para la producción de biodiesel (**Martín, 2008, Vicente et al.; 2009**) por medio de la transformación directa de los lípidos del micelo del cual se estima que tiene un rendimiento del 18% con respecto al peso seco del micelo y una pureza del 99% (**Dufour, 2010**).

7.6 *Mucor* y otros mucorales como flora de los animales

El tracto gastrointestinal de los animales es un lugar donde se pueden encontrar diferentes y grandes cantidades de hongos. En una investigación realizada en pollos en la región de Yogyakarta, Indonesia, se aislaron 6 tipos diferentes de hongos en el tracto gastrointestinal entre los que destacaba a *M. circinelloides*.

Las regiones del tracto digestivo con mayor carga fúngica fueron el íleon y ciego, mientras el duodeno fue la porción del tracto gastrointestinal con menor carga de esporas (**Yudiarti et al.; 2012**). Esto se debe a las condiciones del ambiente en el que se encuentran, tal como pH, los hongos tienen mayor crecimiento en pH neutro a alcalino (**Yamanaka, 2003**), esto coincide con la mayor carga de hongos en el íleon y ciego mientras el pH ácido inhibe el crecimiento de los hongos, es por ello, que en el duodeno con pH ácido existe una menor carga fúngica.

En un estudio sobre terneros en pastoreo y lechones, se detectó una gran carga de endoparásitos, y al administrar esporas de *M. circinelloides* en el concentrado del alimento, se observó una reducción significativa en la viabilidad de los huevos de áscaris en lechones y fasciola en terneros, lo cual demuestra la capacidad de *M. circinelloides* para sobrevivir en el tracto digestivo y generar antagonismo con parásitos en animales de granja (**Cortiñas et al.; 2015**).

En un estudio realizado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica se aislaron mucorales del intestino de larvas de coleópteros (**Acuña, 2009**) y se ha encontrado rRNA mucoral en el intestino delgado y colon de ratones libres de patógenos específicos (**Scupham, 2006**).

Además, en un estudio realizado en 15 hatos de vacas alimentadas con un alto contenido de fibra, se aislaron cepas de *Mucor spp.* en las diferentes porciones del intestino, en el duodeno 19 cepas, íleon 30 cepas, ciego 5 y 13 en el colon, de los cuales 4, 6, 2 y 2 fueron positivas (**Maki et al.; 1964**).

Algunos mucorales se han visto como parte de la microbiota en el pelo de los perros, con grandes fluctuaciones en tiempo de lluvias, otoño y en algunos meses durante la primavera (**Ribes et al.; 2000**).

7.7 Importancia de las proteínas *Arf* en *M. circinelloides*

En hongos, las proteínas *Arf* son reguladoras clave de procesos de tráfico vesicular que a su vez está asociado estrechamente con crecimiento y virulencia (**Lee et al., 2008**).

El tráfico vesicular es un proceso altamente regulado y es indispensable para la señalización de proteínas. Dentro de las células, las vesículas transportan moléculas entre organelos, dicha actividad incluye a los procesos endocíticos y exocíticos. De tal manera que la importancia a nivel celular del tráfico vesicular podría incluir biosíntesis o la regulación funcional de organelos (**Agrawal et al., 2013; Ackema et al., 2014**).

Recientemente **Patiño-Medina et al., 2018** reportaron la identificación y caracterización funcional de 4 genes (*arf1-4*) que codifican para proteínas *Arf* en *M. circinelloides*. Mediante un enfoque genético-molecular encontraron que:

- *arf1* regula positivamente el crecimiento micelial y esporulación, al interrumpir dicho gen disminuye la cantidad de esporas generadas y la longitud de la hifa.
- *arf2* es relevante para la regulación del crecimiento levaduriforme.
- *arf3* es importante para la regulación de la virulencia, ya que al ser interrumpido genera una cepa significativamente más virulenta en contra del modelo murino diabético y el nematodo *Caenorhabditis elegans*.
- *arf4* generó afectaciones menores en el fenotipo. Incluyendo crecimiento radial disminuido.

VIII. Hipótesis

La administración por vía oral de *Mucor circinelloides* en ratones sanos no causa la muerte de los ratones.

IX. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los efectos de la administración por vía oral de *Mucor circinelloides* a ratones sanos.

9.1 Objetivos específicos

- ♦ Evaluar la sobrevivencia de los ratones posterior a la administración de esporas de *M. circinelloides* por vía oral.
- ♦ Evaluar el grado de inflamación sobre el sistema gastrointestinal de la administración de *M. circinelloides* por vía oral a ratones sanos.
- ♦ Determinar la carga de esporas de *M. circinelloides* que se establecen en la flora intestinal del ratón como efecto de la administración por vía oral.

X. MATERIAL Y METODOS

10.1 METODOLOGIA

Con la finalidad de establecer una estructura en la elaboración y seguimiento de los procedimientos, se utilizó la siguiente metodología:



Figura 12. Estructura de la metodología.

10.2 Cepas utilizadas

Fueron utilizadas las cepas de *M. circinelloides* MU402 obtenida mediante mutagénesis química, la cual es auxótrofa a leucina (*leuA*⁻) y uracilo (*pyrG*⁻) (Nicolás y col., 2007) y la cepa mutante *Δarf3* derivada de MU402 la cual muestra virulencia en los modelos *Caenorhabditis elegans* (nematodo) y *Mus musculus* (ratón) (Patiño Medina et al., 2018).

10.2.1 Medio de cultivo

M. circinelloides se cultivó en placas de YPG solida a 28°C, en presencia de luz y se incubó durante 6 días.

YPG (Glucosa, Peptona de gelatina, Extracto de levadura)

Cada litro contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de glucosa (BD Bioxon) y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido, se ajustó el pH a 4.5 (**Bartnicki-García, 1968**).

10.2.2 Obtención y conteo de esporas de *M. circinelloides*

En placas de Petri con medio YPG sólido, se inocularon 100 esporas de *M. circinelloides* y se incubaron a 28°C en presencia de luz durante 5 días. Las esporas se colectaron agregando 9 mL de agua destilada estéril sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico, posteriormente las esporas se aspiraron y se depositaron en un tubo de 50 mL estéril.

Las esporas se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y centrifugadas de la misma manera tres veces. Finalmente, las esporas se resuspendieron en 35 mL de agua destilada estéril. El conteo se realizó en un hematocitómetro (PGC Scientific) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2000 (Leika). Se depositó 20 µL en la parte superior y 20 µL en la inferior, respectivamente. Se contaron las cuadrículas de los extremos y la del centro para ambas celdas de la cámara. Las esporas cuantificadas se multiplicaron por el factor de dilución 2.5×10^4 . El resultado expresa las esporas por mililitro de muestra. Las esporas contadas y lavadas se conservaron a 4°C y se emplearon en un máximo de 15 días después de su obtención.

10.3 Ensayo de infección en ratones (Vía oral).

El estudio se llevó a cabo en dos fases. En ambas fases se tomaron ratones sanos, machos de aproximadamente tres semanas de edad. Se colocaron en cajas de metal, en el Bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. En la primera fase se formaron seis grupos con tres especímenes cada uno y con la ayuda de una pipeta micrométrica se les administraron las siguientes concentraciones de esporas:

Grupo	Concentración de esporas	Cepa	Volumen administrado (μL)
1	1'000'000	Mu402	200
2	5'000'000	Mu402	200
3	10'000'000	Mu402	200
4	1'000'000	$\Delta arf3$	200
5	5'000'000	$\Delta arf3$	200
6	10'000'000	$\Delta arf3$	200

Tabla 1. Primera fase de infección. A cada grupo de ratones se le administró 1, 5 ó 10 millones de esporas de la sepa silvestre Mu402 ó $\Delta arf3$ en un volumen de administración de 200 μL de agua destilada, cada 48 horas por tres dosis.

En la segunda fase de infección, se formaron cuatro grupos con cuatro especímenes cada uno, se siguió el mismo procedimiento para su inoculación y se les administraron las siguientes concentraciones de esporas:

Grupo	Concentración de esporas	Cepa	Volumen administrado (μL)
1	20'000'000	Mu402	200
2	40'000'000	Mu402	200
3	20'000'000	<i>Δarf3</i>	200
4	40'000'000	<i>Δarf3</i>	200

Tabla 2. Segunda fase de infección. A cada grupo de ratones se les administró 20 ó 40 millones de esporas de la sepa silvestre Mu402 ó *Δarf3* en un volumen de administración de 200 μL de agua destilada, cada 48 horas por tres dosis.

Una vez inoculadas las cepas, se observó el comportamiento de los especímenes, se pesaron y se recolectó una muestra representativa de heces por grupo, cada tercer día durante un mes para su posterior análisis.

10.4 Aislamiento de ácido desoxirribonucleico total de heces de ratones

Las muestras de heces de ratón fueron colectadas cada tercer día, durante 30 días, de las cuales fueron seleccionadas la primera y la última muestra por individuo.

La extracción de ADN se realizó empleando el kit High PurePreparation Kit (Roche) como a continuación se explica:

- 1.- Se tomó un pellet de muestra (aproximadamente 30 mg) y se colocó en un tubo de perlas de cerámica (MagNaLyser Green Beads-Roche) junto con 250 μL de agua libre de nucleasas.
- 2.- Se sometió el tubo a 6500 rpm a un rompimiento mecánico en el lisador de células (MagNa-Lyser-Roche) durante 1 minuto.
- 3.- Se centrifugó el tubo a 8000 x g durante 1 minuto, y se tomaron 200 μ

L de sobrenadante y se colocaron en un nuevo tubo de 2 mL.

4.- Se agregaron a dicho tubo 200 µL de solución de lisis, que contiene tiocianato de guanidina, además se agregaron 40 µL de proteinasa K.

5.- Se incubaron las muestras durante 10 minutos a 70°C a 600 rpm en un termomezclador con agitación.

6.- Se agregaron 100 µL de isopropanol a la muestra.

7.- Se tomó el contenido del tubo y se vertieron a una columna de extracción.

8.- Se centrifugó durante 8000 x g durante 1 minuto. Y se descartó el sobrenadante.

9.- Se agregaron 500 µL de removedor de inhibidores.

10.- Se centrifugó durante 8000 x g durante 1 minuto. Y se descartó el sobrenadante.

11.- Se agregaron 500 µL de solución de lavado.

12.- Se centrifugó durante 8000 x g durante 1 minuto. Y se descartó el sobrenadante.

13.- Se agregaron 500 µL de solución de lavado.

14.- Se centrifugó durante 8000 x g durante 1 minuto. Y se descartó el sobrenadante.

15.- Se centrifugó durante 13000 x g durante 15 segundos. Y se descartó el sobrenadante.

16.- Se agregaron 100 µL de agua libre de nucleasas a 70°C.

17.- Se centrifugó durante 8000 x g durante 1 minuto. Y se recuperó el sobrenadante.

18.- Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente (NanoPhotometer P360 Implen) registrando la concentración en ng / µL, al igual que la relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$.

Las relaciones $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ en todos los casos estuvieron entre 1.8 y 2.0. Por lo tanto, se aseguró una calidad óptima de extracción (Yamaguchi y col., 1992).

Las muestras de ácidos nucleicos cuyo valor de relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ resultó menor a 1.8 fueron descartadas para los análisis posteriores.

10.5 Ensayo de qPCR para determinar la presencia y calidad de *M. circinelloides* en heces de ratones

A fin de determinar la presencia de DNA fúngico proveniente de *M. circinelloides* en heces de ratones se realizaron ensayos moleculares de qPCR. Las pruebas consistieron en realizar una extracción de DNA total de las heces de ratón, la cual fue usada como templado para la reacción de qPCR. El gen de *M. circinelloides* que fue detectado fue *tfc-1*, el cual codifica para una de las seis subunidades que componen al factor de iniciación de la transcripción de la RNA polimerasa III. Dicho gen ha sido validado para la detección de esporas, micelio o levaduras de *M. circinelloides* mediante qPCR (Valle-Maldonado *et al.*, 2015).

Las pruebas moleculares de qPCR y RT-qPCR se realizaron en el sistema LightCycler 480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA), empleando el kit SuperScript III PlatinumOne-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada 25 µL de volumen de reacción contenía 5 µl de DNA templado, 0.5 µl de mezcla de enzimas, 12.5 µl de mezcla de reacción 2X, 0.5 µl de oligonucleótido directo 10 µM, 0.5 µl de oligonucleótido reverso 10 µM, 0.5 µl de sonda 5 µM, y 5.5 µl de agua libre nucleasa, esta mezcla fue preparada en un gabinete para PCR (UVP).

La qPCR se inició por una desnaturalización inicial (95°C, 10 min), seguida por 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Las señales de fluorescencia fueron colectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C. Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm (ya que el componente fluoróforo de la sonda es FAM). En cada experimento fueron controles positivos (DNA genómico de *M. circinelloides*), y agua como control negativo.

Secuencia (Número de ID)	Oligonucleótido directo (5´-3´)	Tm (°C) / GC (%)	Eficiencia de amplificación (%)	Tamaño del amplícón (bp)
	Oligonucleótido reverso (5´-3´)			
	Sonda (5´-3´) FAM-BHQ1			

mctfc-1 (106349)	ATGGCGGTGACGAGGGTTT GGGCATCTGTGGCAATCTTTC TGGATGCAGAGGAAGACATCAACGC	67.21 / 57.9 66.32 / 52.4 68.48 / 52.6	91	90
mm β -actina (NM_007393.5)	TGACAGGATGCAGAAGGAGAT GCGCTCAGGAGGAGCAAT ACTGCTCTGGCTCCTAGCACCAT	65.48 / 47.62 66.96 / 61.11 70.37 / 56.62	92	76
mmMIP2 (NM_009140.2)	GCGCTGTCAATGCCTGAAG CGTCACACTCAAGCTCTGGAT CCCTGCCAAGGGTTGACTTCAAGA	66.8 / 57.89 65.4 / 52.38 69.9 / 54.17	98	67
mmIL-1 β (NM_008361.4)	TGGCAGCTACCTGTGTCTTTC GGATGGGCTCTTCTTCAAAGATG CCGTGGACCTTCCAGGATGAGGA	66.1 / 52.3 64.2 / 47.83 70.9 / 60.87	95	88
mmIL-6 (NM_031168.2)	CACGGCCTTCCCTACTTCAC ACAGGTCTGTTGGGAGTGGTA CCCTGCCAAGGGTTGACTTCAAGA	68.8 / 60 66.3 / 52.3 69.9 / 54.2	97	69
mmTNF- α (BC137720.1)	GGCCTCCCTCTCATCAGTTCT GTGGGCTACAGGCTTGTC TGGCCCAGACCCTCACACTCAG	66.2 / 57 64.4 / 57.8 70.2 / 63.64	91	84

Tabla 3. Oligonucleótidos y sondas empleadas la qPCR y la RT-qPCR. En donde (mc): *mucor circinelloides*, (mm): *mus musculus*. Los números de ID de las secuencias de *M. circinelloides* (mc) fueron obtenidas del proyecto de secuenciación de este (<http://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.info.html>), mientras que las secuencias de *Mus musculus* (mm) muestra su número de acceso del banco de genes (GeneBank) del NCBI. FAM (carboxífluoresceína hace referencia al componente fluoróforo presente en la región 5' de la sonda de hidrólisis.

10.6 Determinación de abundancia de DNA de *Mucor circinelloides* por qPCR

A fin de preparar la curva estándar, 50 esporas de la cepa MU402 de *Mucor circinelloides* fueron inoculadas sobre medio YPG sólido, y después de cinco días, las esporangiosporas fueron colectadas, contadas y preservadas como previamente se ha descrito. Se utilizaron concentraciones de esporas entre 1×10^2 y 1×10^7 mL⁻¹ haciendo uno de diluciones seriales de factor 1:10. Consecuentemente, se realizó una extracción de DNA, y se utilizó dicho material genético como templado para la detección del gen nuclear validado *tfc-1*. Dicho gen codifica para una subunidad del factor de transcripción TFIIIC el cual es necesario para el ensamblaje del complejo de preiniciación de la RNA polimerasa III; véase en la figura 13.

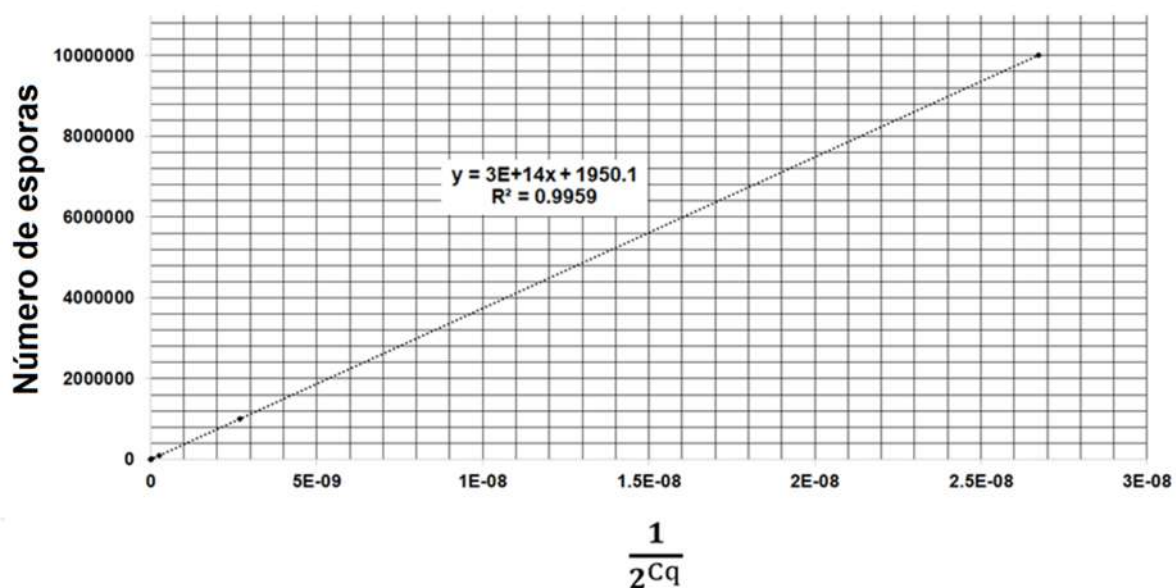


Figura 13. Curva estándar de concentración de DNA de *Mucor circinelloides*.

10.7 Sacrificio de *Mus musculus*

Para el sacrificio se tomaron los especímenes, y se les administro pentobarbital sódico de uso veterinario (**Penta- Hypnol®**) por vía intraperitoneal en una dosis ya establecida para causar eutanasia de 50 mg/kg (**Plumb et al., 2010**). Una vez eutanasiado el ratón, se realizó una disección para recolectar una porción de estómago, intestino delgado, colon, pulmón, hígado y riñón. Ya seccionadas las porciones de estómago, intestino y colon, se lavaron con una solución buffer para vaciar el contenido y retardar el deterioro celular. La conservación de los órganos fue en base a la prueba que se realizó.

- Análisis histopatológico: en tubos de plástico con solución de formaldehído al 4%, se rotularon y se conservó en un tubo estomago e intestino, en el segundo colon y en el tercer tubo, hígado, pulmón y riñón, y se almacenó a temperatura ambiente.
- Análisis molecular: en tubos eppendorf, se recolecto una pequeña porción de cada órgano, se rotulo y se almaceno en el congelador a -2°C.

10.8 Elaboración de cortes histológicos de órganos de ratón

Para la elaboración de los cortes histológicos, se tomaron las porciones de órgano aislado en solución de paraformaldehído al 4%, se colocaron en pequeñas cajas de plástico, se identificaron y se introdujeron en un histoquinete de 12 cilindros para ser sometidos a un proceso de deshidratación.

Primero se pasaron por un baño de alcohol al 96% por media hora, un segundo baño de alcohol al 100% por una hora, posteriormente un baño de gilol por una hora y por último se pasó por un baño de parafina por dos horas.

Se prosiguió a realizar los bloques, en un molde de metal sobre una plancha caliente se le agrego parafina caliente, se colocó la muestra de tejido en dirección deseada, ya acomodado el tejido se pasó a una plancha fría para solidificar la parafina y se identificaron.

Posteriormente, con la ayuda de un cortador manual se hicieron cortes delgados del tejido, se le agregaron unas gotitas de alcohol con agua y se pasó por una solución de agua caliente con gelatina de agar para que el tejido se expandiera y se fijara a la laminilla, ya montado se llevó a una estufa por 10 minutos, para quitar el exceso de parafina. Una vez fijado el tejido, se realizó la tinción Hematoxilina Eosina (HYE), para lo cual las muestras fueron sometidas a un proceso inverso al que se realizó para formar los bloques de parafina.

Primero se pasó en solución de gilol (dos baños), un baño de alcohol absoluto (100%) y un siguiente baño de alcohol al 96%, se enjuagó con agua, se pasó por un baño de hematoxilina (colorante básico que tiñe únicamente núcleos), y por último se pasó por un baño de Eosina (colorante ácido que tiñe citoplasmas). Ya teñida la laminilla se dejaron secar, se le colocó un cubreobjetos con resina para proteger el tejido y de nuevo se dejaron reposar hasta que la resina secara.

10.9 Aislamiento de ácido ribonucleico total de órganos de ratones

Las muestras de órganos (estómago y colon) de ratón fueron colectadas posteriormente al sacrificio de los ratones. La extracción de ADN se realizó empleando el kit High PurePreparation Kit (Roche) como a continuación se explica:

- 1.- Se tomó aproximadamente 30 mg y se colocó en un tubo de perlas de cerámica (MagNaLyser Green Beads-Roche) junto con 250 μ L de agua libre de nucleasas.
- 2.- Se sometió el tubo a 6500 rpm a un rompimiento mecánico en el lisador de células (MagNa-Lyser-Roche) durante 1 minuto.
- 3.- Se centrifugó el tubo a 8000 x *g* durante 1 minuto, y se tomaron 200 μ L de sobrenadante y se colocaron en un nuevo tubo de 2 mL.
- 4.- Se agregaron a dicho tubo 200 μ L de solución de lisis, que contiene tiocianato de guanidina, además se agregaron 40 μ L de proteinasa K.
- 5.- Se incubaron las muestras durante 10 minutos a 70°C a 600 rpm en un termomezclador con agitación.
- 6.- Se agregaron 100 μ L de isopropanol a la muestra.
- 7.- Se tomó el contenido del tubo y se vertieron a una columna de extracción.
- 8.- Se centrifugó durante 8000 x *g* durante 1 minuto. Y se descartó el sobrenadante.
- 9.- Se agregaron 500 μ L de removedor de inhibidores.
- 10.- Se centrifugó durante 8000 x *g* durante 1 minuto. Y se descartó el sobrenadante.
- 11.- Se agregaron 500 μ L de solución de lavado.
- 12.- Se centrifugó durante 8000 x *g* durante 1 minuto. Y se descartó el sobrenadante.
- 13.- Se agregaron 500 μ L de solución de lavado.
- 14.- Se centrifugó durante 8000 x *g* durante 1 minuto. Y se descartó el sobrenadante.
- 15.- Se centrifugó durante 13000 x *g* durante 15 segundos. Y se descartó el sobrenadante.
- 16.- Se agregaron 100 μ L de agua libre de nucleasas a 70°C.
- 17.- Se centrifugó durante 8000 x *g* durante 1 minuto. Y se recuperó el sobrenadante.

18.- Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente (NanoPhotometer P360 Implen) registrando la concentración en ng / μ L, al igual que la relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$.

Las relaciones $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ en todos los casos estuvieron entre 1.8 y 2.0. Por lo tanto, se aseguró una calidad óptima de extracción (Yamaguchi y col., 1992). Las muestras de ácidos nucleicos cuyo valor de relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ resultó menor a 1.8 fueron descartadas para los análisis posteriores.

10.10 Ensayos tipo RT-qPCR para determinar la expresión de marcadores de inflamación en *Mus musculus*

La RT-qPCR se inició por la transcripción reversa (50°C, 30 min) y la desnaturalización inicial (95°C, 10 min), seguida por 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Las señales de fluorescencia fueron colectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C. Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm (ya que el componente fluoróforo de la sonda es FAM). En cada experimento fueron controles positivos (DNA genómico de *M. circinelloides*), y agua como control negativo.

XI. RESULTADOS

11.1 Variación de pesos en *Mus musculus posterior* de la administración por vía oral de las cepas silvestre MU402 y mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*.

Con la finalidad de determinar el efecto de ganancia y pérdida de peso que inducen la cepa silvestre MU402 y $\Delta arf3$ sobre el modelo *Mus musculus* en la administración de los diferentes tratamientos se llevó a cabo un análisis sobre la varianza en peso de los grupos de ratones figura 13 y figura 14.

ETAPA 1

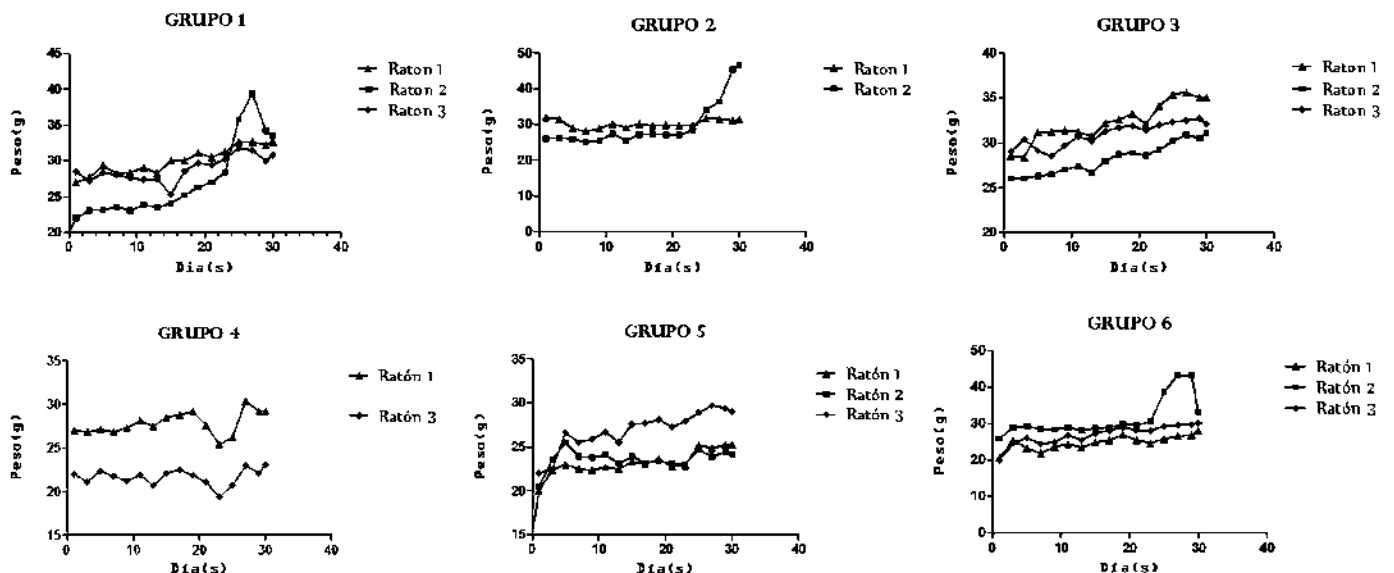


Figura 14. Variación de pesos en *Mus musculus* de la administración por vía oral de las cepas silvestre MU402 y $\Delta arf3$, en los tratamientos 1, 5 y 10 millones de esporas. Se cuantificó la variación de pesos durante un mes, de los ratones de los grupos 1, 2 ó 3, inoculados con 1 (A), 5 (B) ó 10 (C) millones de esporas de la cepa silvestre MU402, y el grupo 4, 5 ó 6, inoculados con 1 (D), 5 (E) ó 10 (F) millones de esporas de $\Delta arf3$ respectivamente de la cepa *M. circinelloides*.

ETAPA 2

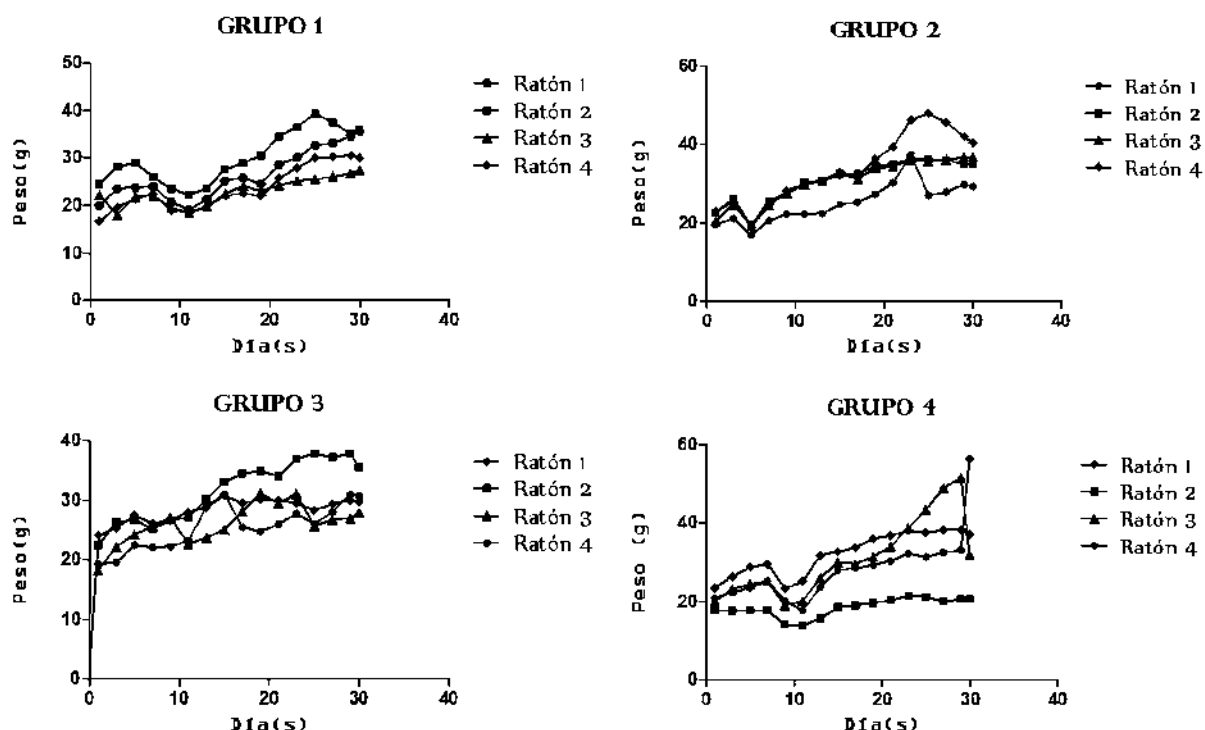


Figura 15. Variación de pesos en *Mus musculus* en la administración de las cepas silvestre MU402 y $\Delta arf3$ en los tratamientos 20 y 40 millones de esporas. Se cuantificó la variación de pesos durante un mes, de los ratones de los grupos 1 ó 2 inoculados con 20 (A) ó 40 (B) millones de esporas de la cepa silvestre MU402, y el grupo 3 ó 4 inoculados con 20 (C), 40 (D) millones de esporas de $\Delta arf3$ respectivamente de la cepa *M. circinelloides*.

Las gráficas indican un aumento en el peso de los ratones posterior a la administración por vía oral de las esporas de la cepa silvestre MU402 y $\Delta arf3$,w en sus diferentes concentraciones y en el seguimiento del pesaje en los siguientes 30 días. En donde no se observó una pérdida de peso significativa, lo que indica que no hay una correlación entre la carga de esporas administradas y la ganancia o pérdida de peso de los ejemplares.

11.2 Cuantificación mediante qPCR de DNA de *M. circinelloides*, presente en heces de ratón.

A fin de cuantificar la carga de esporas presente en heces de ratones se graficó la ganancia y pérdida de peso que inducen la cepa silvestre MU402 y mutante $\Delta arf3$ sobre el modelo *Mus musculus* en la administración de los diferentes tratamientos se llevó a cabo un análisis sobre la varianza en peso de los grupos de ratones.

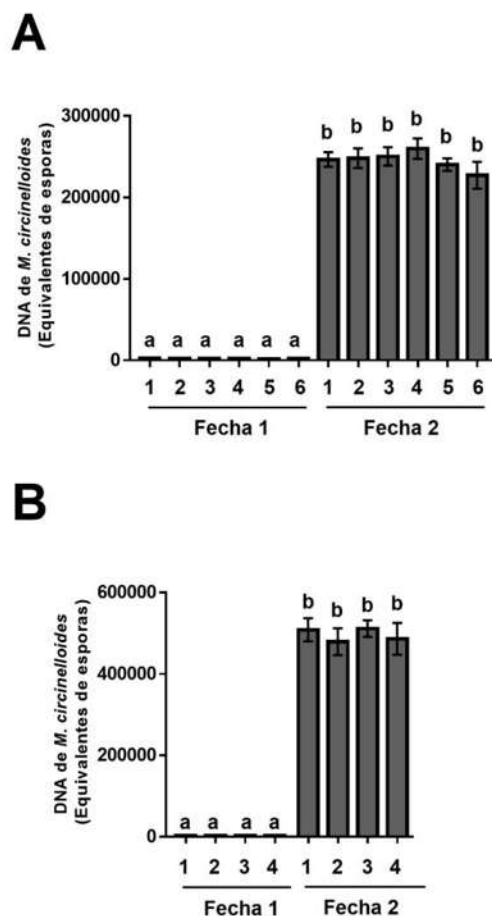


Figura 16. Abundancia de DNA de *M. circinelloides* en heces de ratones.

(A) Se cuantificó mediante qPCR el DNA de *M. circinelloides*, presente en heces de ratones a las 48 h (Fecha 1) o al mes (Fecha 2) posterior a la administración oral de 1, 5 ó 10 millones de esporas de la cepa silvestre MU402 (1, 2 ó 3) o de la cepa mutante $\Delta arf3$ (4, 5 ó 6). (B) Se cuantificó mediante qPCR el DNA de *M. circinelloides*, presente en heces de ratones a las 48 h (Fecha 1) o al mes (Fecha 2) posterior a la administración oral de 20, ó 40 millones de esporas de la cepa silvestre MU402 (1, ó 2) o de la cepa mutante $\Delta arf3$ (3 ó 4). Las barras representan

la desviación estándar y las letras denotan diferencias estadísticamente significativas, ANOVA, Fisher $p < 0.05$.

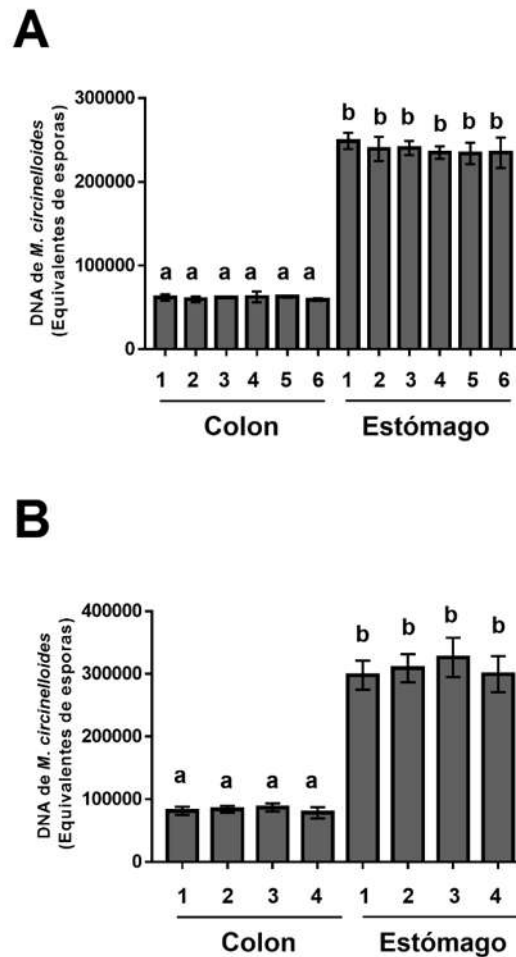
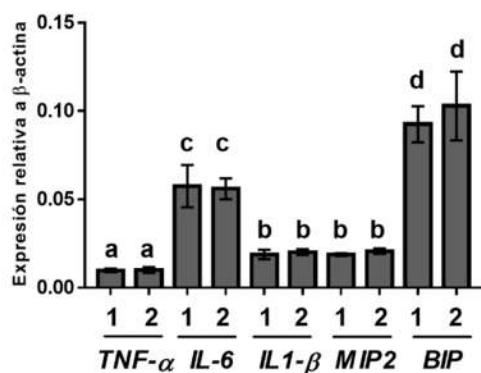


Figura 17. Abundancia de DNA de *M. circinelloides* en colon y estómago de ratón.

(A) Se cuantificó mediante qPCR el DNA de *M. circinelloides*, presente en colon y estómago de ratones un mes posterior a la administración oral de 1, 5 ó 10 millones de esporas de la cepa silvestre MU402 (1, 2 ó 3) o de la cepa mutante $\Delta arf3$ (4, 5 ó 6). (B) Se cuantificó mediante qPCR el DNA de *M. circinelloides*, presente en colon y estómago de ratones posterior a la administración oral de 20, ó 40 millones de esporas de la cepa silvestre MU402 (1, ó 2) o de la cepa mutante $\Delta arf3$ (3 ó 4). Las barras representan la desviación estándar y las letras denotan diferencias estadísticamente significativas, ANOVA, Fisher $p < 0.05$.

A



B

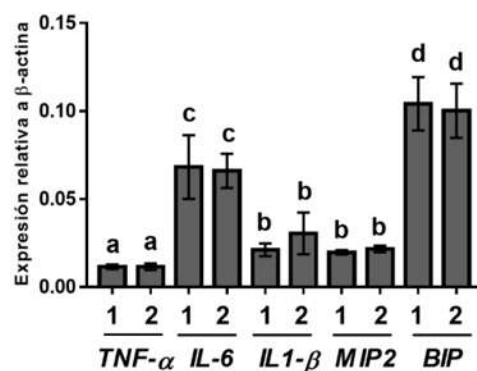


Figura 18. Determinación de niveles de transcrito de marcadores de inflamación en tejidos de ratón. Se extrajo RNA total proveniente de colon (A) y estómago (B) de ratones a los cuales les fueron administradas oralmente 40 millones de esporas de las cepas silvestre (1) y *Δarf3* (2). Se evaluaron a los siguientes genes: *TNF-α*, *IL-6*, *IL1-β*, *MIP2* y *BIP*, el gen normalizador empleado fue β -actina. Las barras representan la desviación estándar y las letras denotan diferencias estadísticamente significativas, ANOVA, Fisher $p < 0.05$.

11.3 Análisis histopatológico de estómago y colon de *Mus musculus* de la administración por vía oral de las cepas silvestre MU402 y $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*.

Con la finalidad de conocer el efecto sobre el tracto digestivo de *mus musculus* sobre la administración por vía oral de la cepa silvestre Mu402 ó $\Delta arf3$, se realizó un análisis sobre cortes histológicos de estómago y colon para identificar infiltrado inflamatorio.

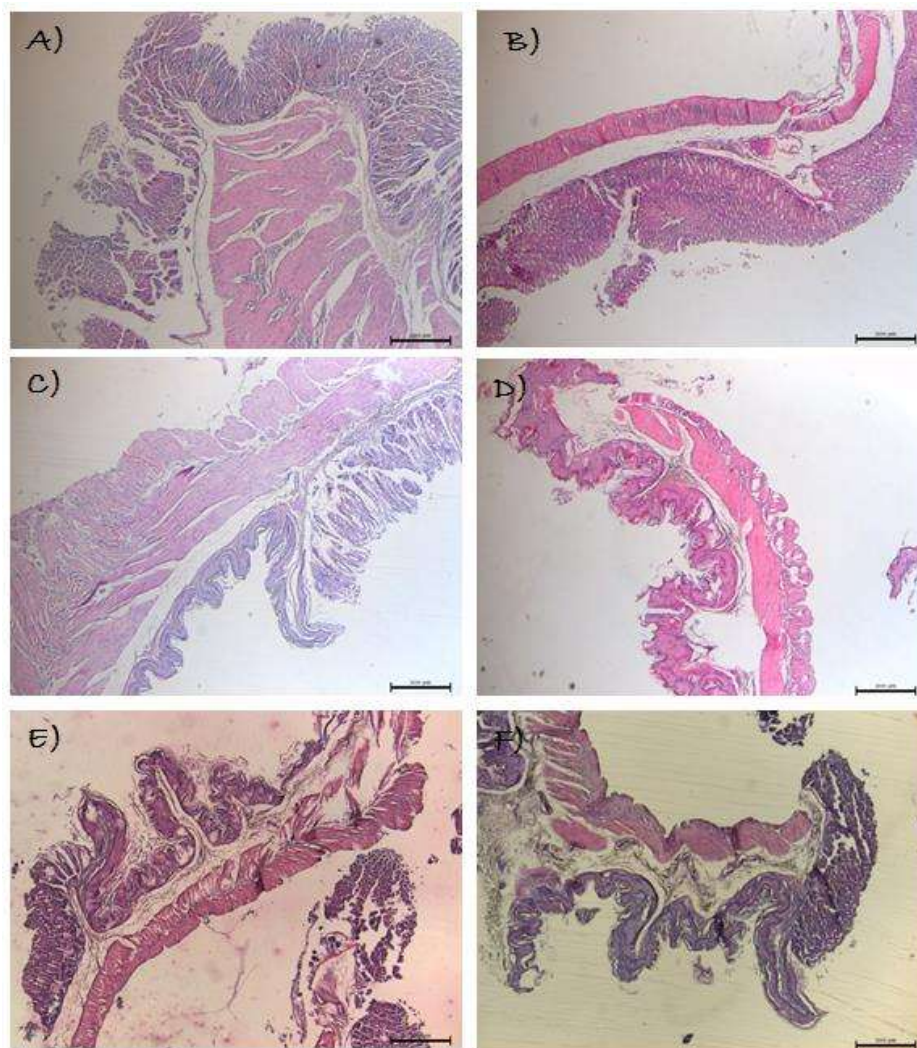


Figura 19. Corte histológico de estómago de ratón de la primera fase. A) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 1 primera fase, con tratamiento 1 millón de esporas de la cepa Mu402.

B) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 2 primera fase, con tratamiento 5 millones de esporas de la cepa Mu402. C) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 2 primera fase, con tratamiento 10 millones de esporas de la cepa Mu402. D) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 1 primera fase, con tratamiento 1 millón de esporas de la cepa $\Delta arf3$. E) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 2 primera fase, con tratamiento 5 millones de esporas de la cepa $\Delta arf3$. F) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 2 primera fase, con tratamiento 10 millones de esporas de la cepa $\Delta arf3$.

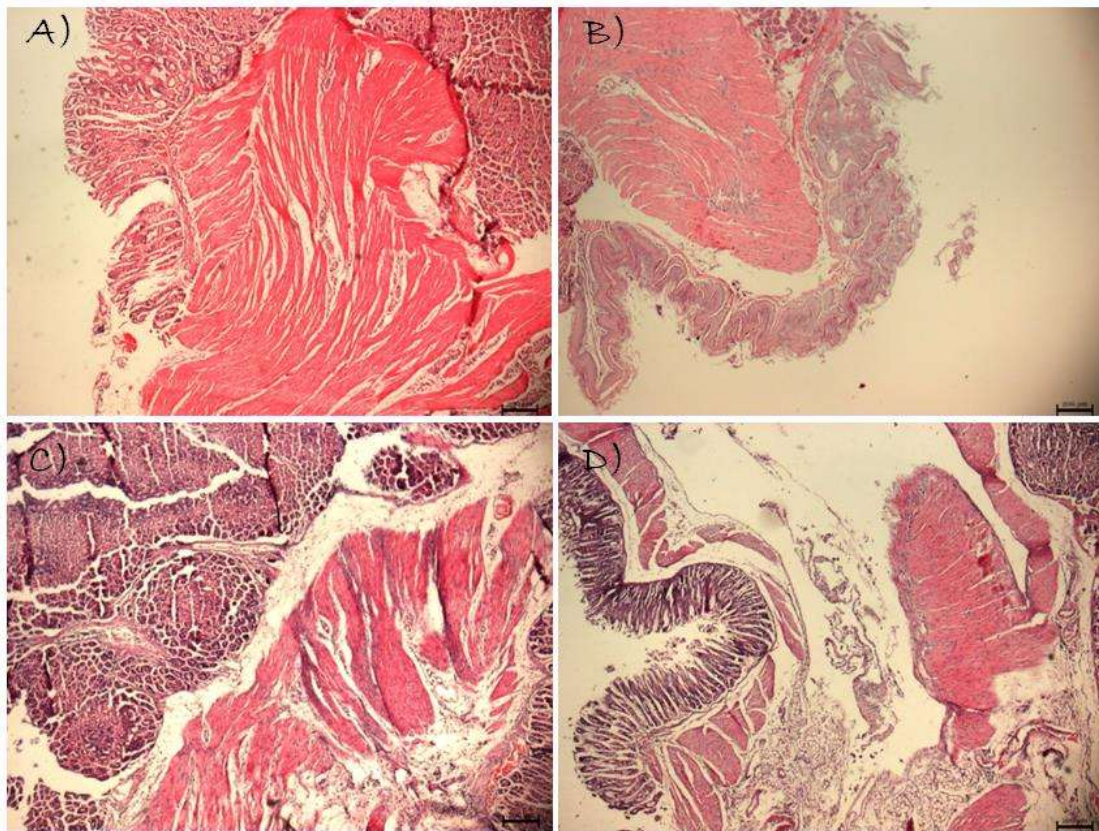


Figura 20. Corte histológico de estómago de ratón de la segunda fase. A) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 1 segunda fase, con tratamiento 20 millones de esporas de la cepa Mu402. B) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 2 segunda fase, con tratamiento 40 millones de esporas de la cepa Mu402. C) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 3 segunda fase, con tratamiento 20 millones de esporas de la cepa $\Delta arf3$. D) Foto tomada de corte histológico de estómago de ratón con lente 10x, de la caja 4 segunda fase, con tratamiento 40 millones de esporas de la cepa $\Delta arf3$.

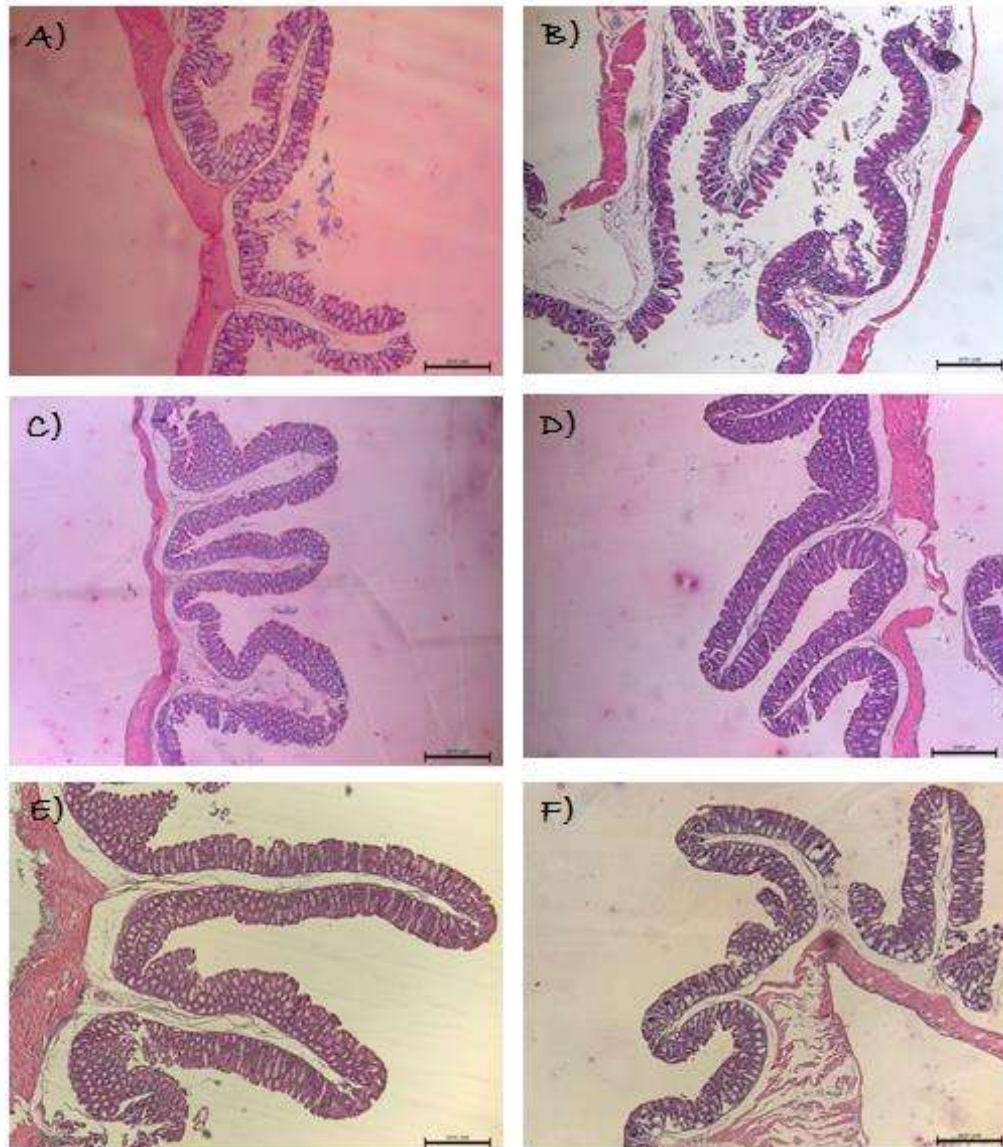


Figura 21. Corte histológico de colón de ratón de la primera fase. A) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 1 primera fase, con tratamiento 1 millón de esporas de la cepa Mu402. B) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 2 primera fase, con tratamiento 5 millones de esporas de la cepa Mu402. C) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 2 primera fase, con tratamiento 10 millones de esporas de la cepa Mu402. D) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 1 primera fase, con tratamiento 1 millón de esporas de la cepa $\Delta arf3$. E) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 2 primera fase, con tratamiento 5 millones de esporas de la cepa $\Delta arf3$. F) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 2 primera fase, con tratamiento 10 millones de esporas de la cepa $\Delta arf3$.

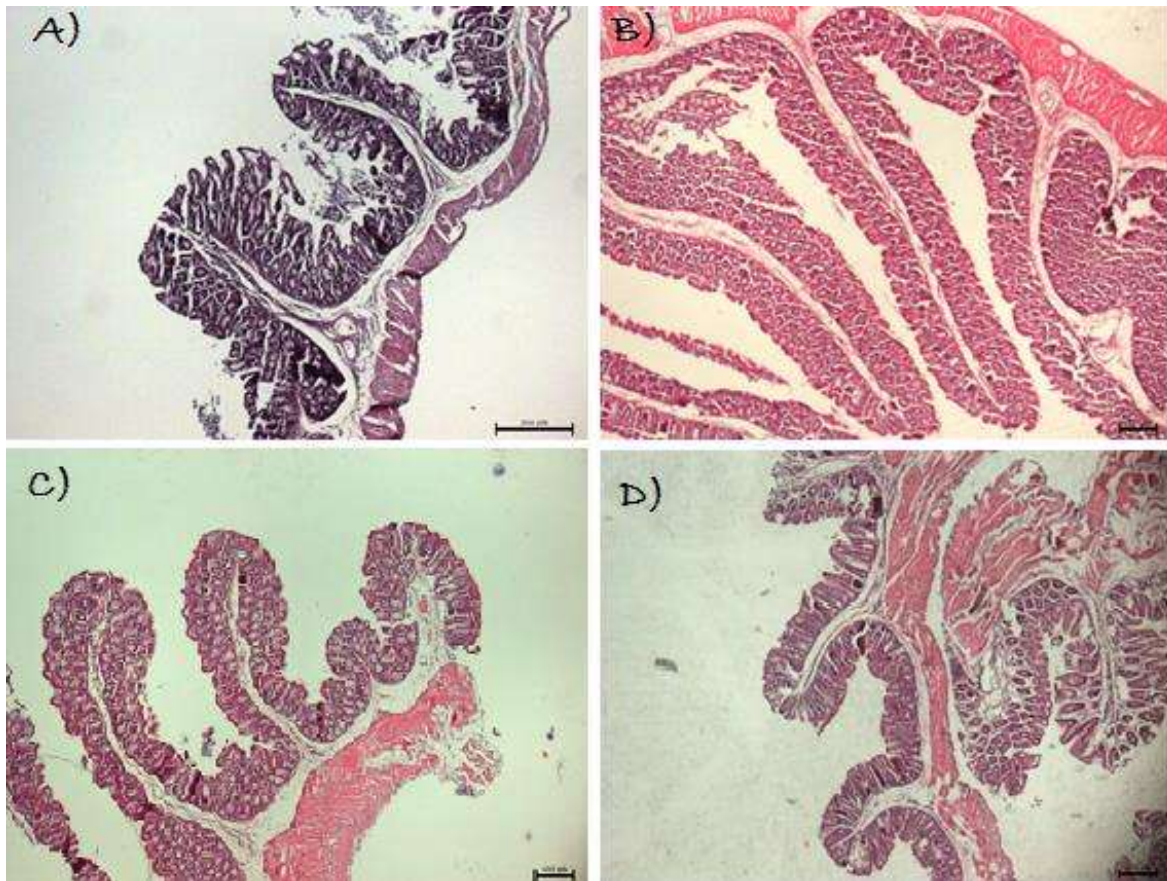


Figura 22. Corte histológico de colon de ratón de la segunda fase. A) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 1 segunda fase, con tratamiento 20 millones de esporas de la cepa Mu402. B) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 2 segunda fase, con tratamiento 40 millones de esporas de la cepa Mu402. C) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 3 segunda fase, con tratamiento 20 millones de esporas de la cepa $\Delta arf3$. D) Foto tomada de corte histológico de colon de ratón con lente 10x, de la caja 4 segunda fase, con tratamiento 40 millones de esporas de la cepa $\Delta arf3$.

XII. DISCUSIÓN

A fin de determinar el efecto de la inoculación oral de esporas de *M. circinelloides* (cepa silvestre o mutante $\Delta arf3$) sobre el peso de ratones sanos de la línea BALB/c se realizaron dos tipos de tratamientos. Durante el primer tratamiento se emplearon diferentes cantidades de esporas (1, 5 ó 10 millones), las cuales fueron administradas oralmente a los ratones cada 48 horas con el objetivo de suministrar tres dosis. De igual manera, de forma independiente, se llevó a cabo un segundo tratamiento en el cual fueron administradas oralmente a los ratones 20 ó 40 millones esporas de las cepas silvestre o mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*, que fueron suministradas en tres dosis cada tercer día, y se registraron los pesos de los ratones durante un mes.

Para la totalidad de los ensayos, se emplearon la cepa silvestre MU402 de *M. circinelloides*, la cual es una cepa auxotrófa a leucina y uracilo (*leuA*⁻, *pyrG*⁻) y la cepa $\Delta arf3$ (*leuA*⁻, *pyrG*⁺). Existe un reporte en la literatura que muestra que la mutante $\Delta arf3$ fue caracterizada fenotípicamente con anterioridad (**Patiño-Medina et al., 2018**). La interrupción de dicho gen condujo a las siguientes alteraciones: disminución del tamaño de la espora, aumento significativo de la virulencia en contra del modelo diabético de *M. musculus*, además el sobrenadante del crecimiento aeróbico de 12 h en medio YPG de la mutante $\Delta arf3$ tiene un efecto virulento en contra del nematodo *C. elegans* a diferencia de la cepa silvestre. Se decidió usar dichas cantidades de esporas debido a que se han reportado el uso de cantidades similares de esporas de *Mucor circinelloides*, 1 ó 20 millones, por diversos autores al evaluar la capacidad virulencia de *M. circinelloides* en contra del modelo murino diabético (**Li et al., 2011; Patiño-Medina et al., 2018**).

Los resultados del presente estudio indican que para ambos tratamientos, independientemente de la cantidad inicial de esporas administradas o la cepa de *M. circinelloides*, no existe mortalidad en los ratones sanos ni disminución el peso de los ratones durante un mes posterior a la inoculación. Es importante mencionar que los ratones evaluados pertenecieron a las líneas consanguíneas BALB/c y dichos

ratones mantuvieron sus pesos entre el rango reportado en la literatura (**Bronsart et al., 2016**). Es importante resaltar que la disminución en el peso de los ratones es un signo de diversas patologías (**Muhammed et al., 2012**), entre ellas procesos de infección crónicos.

De manera similar a lo que se encontro, existen reportes donde al ser administradas esporas de hongos entomopatógenos a ratones y cerdos de Guinea, no se presenta mortalidad en contra de dichos mamíferos (**Mier et al., 1994**). Así mismo, los resultados obtenidos son concordantes con Mancebo et al., 2009, en dicho reporte se inoculó al ascomiceto *Beauveria bassiana* en ratas y no se presentó mortalidad ni variación en los pesos en dichos roedores. Cabe mencionar que existen reportes del uso de este hongo como biocontrolador de insectos (**Erler et al., 2015**).

Estos resultados permiten concluir que tanto la cepa silvestre o mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides* resultaron ser inocuas y no afectaron los pesos de los ratones al haberse inoculado diferentes cantidades de esporas. Estos resultados pueden ser relevantes debido a que representan un antecedente sólido para ensayos futuros de *M. circinelloides* como un posible agente de biocontrol.

El uso de técnicas moleculares ha permitido la identificación de los géneros fúngicos presentes en heces de mamíferos (**Foster et al., 2013**). Diversas especies del género *Mucor* han sido identificadas en heces de pacientes humanos obesos y no obesos, de manera concreta se encontraron las siguientes especies: *M. fuscus*, *M. circinelloides*, *M. velotinosus* y *M. racemosus*. Es importante mencionar que la abundancia de cada una de estas especies varía de acuerdo a la condición corporal del paciente. En el caso de *M. circinelloides*, se encuentran mayores niveles de DNA en heces de pacientes obesos en comparación a pacientes no obesos (**Rodríguez et al., 2015**). Similarmente, existen reportes que indican una correlación directa entre la diversidad fúngica presente en intestinos o heces de mamíferos con el estado general de salud de estos animales (**Zuo et al., 2018**). Partiendo de estos antecedentes, fue de nuestro interés de evaluar la abundancia de DNA de *M. circinelloides* en heces de ratones a los cuales fueron administradas oralmente esporas de las cepas silvestre o mutante $\Delta arf3$.

Haciendo uso de ensayos moleculares, específicamente qPCR, se cuantifico la presencia de *M. circinelloides* mediante la identificación del gen nuclear *tfc-1* (**Valle-Maldonado et al., 2015**), usando como templado extracciones de DNA total proveniente de heces de ratones BALB/c. A dichos animales les habían sido administradas esporas oralmente de las cepas silvestre o mutante $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*, en cantidades previamente descritas. Las muestras extraídas tuvieron concentraciones entre 30 y 150 ng/uL y relaciones A_{260}/A_{280} entre 1.8 y 2.0.

Lo que hace las muestras aptas para los ensayos de qPCR (**Bergkvist et al., 2013**). Los resultados de niveles de DNA de *M. circinelloides*, muestran que no existen diferencias entre los grupos de ratones ni entre las cepas estudiadas. Sin embargo si existen mayores niveles de DNA de *M. circinelloides* cuando fueron suministradas las dosis más numerosas de esporas (20 ó 40 millones) en comparación con las dosis menos numerosas (1, 5 ó 10). El hecho que no existan diferencias cuantitativas entre la abundancia de DNA de *M. circinelloides* entre la cepa silvestre o la mutante $\Delta arf3$ puede ser parte de la explicación del porqué no existen diferencias entre los pesos de los ratones ni en su mortalidad. Esto debido a que, se ha reportado que, en modelos de infección fúngica en ratones, mayores niveles de DNA de *Candida albicans*, el cual es un hongo patógeno, presente en las heces, está asociado a mayores niveles de daño celular e histológico en dichos ratones (**Jawhara et al., 2007**). Con lo anterior podemos concluir que al administrar oralmente esporas de las cepas silvestres ó $\Delta arf3$, fue posible detectar material genético de *M. circinelloides* en las heces de dichos ratones, sin embargo, no existen diferencias cuantitativas entre la abundancia de dichas cepas.

Múltiples reportes han mostrado la importancia de las técnicas histológicas y de ensayos moleculares (qPCR) a fin de evaluar alteraciones en los tejidos de los ratones y cuantificar la propagación del hongo presente en dichos tejidos, respectivamente (**Havaux et al., 2005; Hartigan et al., 2009; Grahl et al., 2011**).

Se ha demostrado que existe una asociación directa de mayores niveles de DNA fúngico en tejidos de ratón con la infectividad, mortalidad y daño celulares en contra del modelo murino. De tal manera, fue de nuestro interés medir la abundancia de

material genético de *M. circinelloides* en estómago y colon de ratones a los cuales fueron administradas oralmente esporas de este hongo. La estrategia involucró el sacrificio de los ratones y posterior recolección de tejidos. A dichos tejidos se les realizó una extracción de DNA total y fueron cuantificados mediante qPCR los marcadores moleculares β -actina y *tfc-1* que corresponden a *M. musculus* y *M. circinelloides*, respectivamente. No encontramos diferencias significativas en los valores de amplificación (Cq) del gen β -actina detectados tanto en estómago como en colon de los ratones a los que se les administraron oralmente las esporas del hongo. Interesantemente, pudimos detectar DNA correspondiente al gen *tfc-1* en las muestras de estómago y colon de ratones inoculados con ambas cepas, indicando de esta manera la presencia de *M. circinelloides* en ambos grupos. Además de ello, es importante mencionar que los niveles de amplificación (Cq) son similares entre ambos grupos. Al realizar una revisión en la literatura, **Díaz-Pérez en el año 2016** reportó que en *M. circinelloides* los niveles de DNA de la mutante M5, están aumentados significativamente en los tejidos de ratón que fueron inoculados peritonealmente con esporas del hongo en comparación a la cepa silvestre. Dicha cepa es una mutante espontánea en el gen *adh1*, el cual codifica para un alcohol deshidrogenasa (**Rangel-Porras et al., 2019**). Tomando en cuenta este antecedente y comparándolo con nuestros hallazgos, podemos llegar a la conclusión de que a pesar de que *M. circinelloides* está presente en los tejidos de estómago y colon de los ratones, cuando las esporas fueron administradas oralmente los niveles de infectividad son mucho menores y no existiendo mortalidad, a diferencia a los encontrados en otras cepas virulentas de *M. circinelloides* administradas intraperitonealmente.

El estudio de los niveles de transcrito de marcadores moleculares asociados a inflamación o daño celular está muy extendido en el modelo murino. Esto se ha realizado mediante qRT-PCR. Dicho enfoque se ha empleado para parte de la explicación para entender diferencias a nivel celular de cortes histológicos, mortalidad, pérdida de peso, entre otros aspectos fisiológicos del ratón (**Jawhara et al., 2007**). Los marcadores que evaluamos mediante qRT-PCR fueron: TNF- α , IL-6,

IL1 β , MIP2, BIP. TNF- α es una citosina que estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria. Al ser inoculadas conidias de *Aspergillus fumigatus* vía intraqueal a ratones, se ha demostrado que los niveles de TNF- α presentes en pulmón del modelo murino son modulados positivamente de manera dependiente del tiempo, y esto correlaciona con daño celular (**Mehrad et al., 1999**). IL-6 es una citosina reguladora de procesos inflamatorios. Se ha reportado que tanto TNF- α como IL-6 son producidas sistémicamente durante la infección por el ascomiceto dimórfico *Candida albicans* en el modelo de ratón (**Steinshamn et al., 1992**). La interleucina 1 beta (IL1 β) es una citosina proinflamatoria con múltiples funciones en la respuesta inmune. Se ha comprobado que en ratones los niveles de IL1 β se elevan cuando se inoculan intratraquealmente esporas del ascomiceto *Histoplasma capsulatum*, así mismo existe evidencia experimental de la participación de dicha citosina en el control de infecciones fúngicas (**Deepe et al., 2006**). La proteína MIP2, proteína inflamatoria de macrófagos-2, tiene como función ser una potente quimioatrayente de neutrofilos, y está involucrada en diversas respuestas inmunes. Ha sido reportado que los niveles de MIP2 se encuentran aumentados en el líquido cefalorraquídeo de un paciente que desarrolló meningitis provocada por *C. albicans* en comparación con una persona sana (**Drummond et al., 2015**). BIP también conocida como GRP78/BiP es una chaperona del retículo endoplásmico, la cual se une a proteínas que recientemente se han sintetizado, y las mantiene en un estado competente de plegamiento y oligomerización. Se ha correlacionado en el modelo de ratón diabético, que existen mayores niveles de esta proteína en pulmones y cerebros de ratones que fueron infectados con el mucoral *Rhizopus oryzae* en comparación al grupo control (**Liu et al., 2010**).

Los niveles de RNAm de estos marcadores moleculares se compararon con los niveles de transcrito del gen β -actina. Empleando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 5. Los resultados obtenidos nos indican que no existen diferencias en los niveles acumulados de transcrito en muestras de estómago ni de colon de ratones que fueron administrados con la cepa silvestre o $\Delta arf3$ de *M. circinelloides*. Existen múltiples reportes que indican que un aumento de dichos marcadores está asociado con mayor daño celular y/o mortalidad en los ratones (**Jawhara et al., 2007, Díaz-**

Pérez, 2016). La administración oral de esporas de la cepa silvestre o $\Delta arf3$ de *M. circinelloides* en diferentes dosis en ratones sanos no causó mortalidad de los mismos. Parte de la explicación de dicha observación es que los niveles de carga fúngica y de los marcadores moleculares asociados a inflamación o daño celular son menores en los ensayos probados en este trabajo en comparación con lo reportado por **Díaz-Pérez en el 2016**. En dicho trabajo, donde la cepa virulenta M5 genera mayor invasividad y mortalidad, correspondientemente se cuantificaron mayores niveles de transcrito de los marcadores moleculares de inflamación. De esta manera podemos concluir que la administración oral de esporas de *M. circinelloides* no ocasiona mortalidad. Así mismo, los niveles de transcrito de marcadores de inflamación o daño celular son significativamente menores en relación a lo reportado con otros modelos virulentos de este mucoral.

A fin de evaluar el grado de inflamación en los tejidos de ratones de los diferentes tratamientos, se colectaron muestras de colon y estómago, las cuales fueron teñidas con HYE. Posteriormente fueron observadas mediante un microscopio óptico, empleando el objetivo de 10X, 40X, y 100X. Dicha estrategia ha sido empleada múltiples veces para evaluar el efecto de la infección fúngica en el modelo murino (**Grahl et al., 2011, Jawhara et al., 2007**). Consistentemente con los datos de expresión de los marcadores de inflamación y estrés celular ya descritos, los resultados de histopatológicos de los tejidos de colon y estómago, mostraron indicadores de inflamación (abundancia de infiltrado inflamatorio).

Para la interpretación de la presencia de infiltrado inflamatorio presente los cortes histológicos de estómago y colon se tomaron 6 rangos, los cuales se describen posteriormente: Grado 1, infiltrado inflamatorio Nulo –Leve; Grado 2, infiltrado inflamatorio Leve; Grado 3, infiltrado inflamatorio Leve – Moderado; Grado 4, infiltrado inflamatorio Moderado; Grado 5, infiltrado inflamatorio Moderado-Abundante; Grado 6; infiltrado inflamatorio Abundante.

Los tratamientos inoculados de la cepa silvestre Mu402, dieron como resultado en los cortes histológicos de estómago los siguientes resultados, en las diferentes concentraciones 1, 5 y 10 millones de esporas, mostraron infiltrado inflamatorio

Grado 2, mientras las concentraciones en 20 y 40 millones de esporas, mostraron un infiltrado inflamatorio Grado 4, por otro lado los tratamientos con la cepa $\Delta arf3$, en las concentraciones 1, 5 y 10 millones de esporas, mostraron un infiltrado inflamatorio Grado 4 y las concentraciones de 20 y 40 millones mostraron un infiltrado inflamatorio Grado 5.

En colon los resultados fueron los siguientes; en los tratamientos de MU402 en concentraciones de 1, 5 y 10 millones, se observó un infiltrado inflamatorio Grado 1, las concentraciones de 20 y 40 millones de esptas, mostraron un infiltrado Grado 2, en comparación con los tratamientos inoculados por la cepa $\Delta arf3$ en 1, 5 y 10 millones de esporas, los cuales mostraron un infiltrado inflamatorio Grado 2 y en los tratamientos de 20 y 40 millones, mostraron un infiltrado inflamatorio Grado 3.

Dichos resultados resultan prometedores como alternativa para implementar en praderas, debido a que no representan una amenaza para los organismos de los cuales no son blancos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, coinciden con diversos autores (**Grahl et al., 2011, Jawhara et al., 2007, Mehrad et al., 1999**), donde se reportó presencia de infiltrado inflamatorio en rangos similares a los descritos anteriormente.

XIII. CONCLUSIÓN

Actualmente y de manera global se ha adoptado una tendencia hacia el control biológico, el cual resulta ser un tema prometedor, conocer las nuevas e innovadoras medidas empleadas para realizar dicha práctica, con las mínimas consecuencias, garantizando un resultado favorable hacia la producción y el consumidor resulta ser un tema de ganar- ganar.

Debido al avance acelerado y desmedido de diversas áreas de la medicina y la investigación, durante años se han utilizado antihelmínticos que se han empleado indiscriminadamente, lo cual ha traído como consecuencia la resistencia de microorganismos a diversos fármacos utilizados, mismos que causan un gran impacto en la salud pública. Es por esta razón que la utilización de hongos nematofagos como medida de control biológico hacia la producción y crianza de animales destinados a consumo humano es considerada una alternativa eficiente.

En la presente investigación se comprobó la viabilidad de la administración por vía oral de la cepa *Δarf3* en el modelo biológico *mus musculus*, misma que al ser administrada intraperitonealmente en pacientes inmunocomprometidos ha causado alta mortalidad, sin embargo, la presente investigación denota que existe una inflamación caracterizada en un rango leve-moderada en respuesta a la presencia de dicha cepa de *M. circinelloides*, sin llegar a ser mortal para el hospedero, lo que resulta prometedor como alternativo en el desarrollo de nuevas técnicas de control biológico con el mínimo de consecuencias hacia la salud pública.

XIV. BIBLIOGRAFIA

1. Acuña G. A. 2009. “Estudio de la diversidad de hongos y bacterias asociados al intestino de larvas de coleópteros y determinación de sus propiedades lignocelulíticas”. Instituto Nacional de Biodiversidad. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
2. Ackema KB, Hench J, Böckler S, Wang SC, Sauder U, MergentalerH, Westermann B, Bard F, Frank S, Spang A (2014) The small GTPase Arf1 modulates mitochondrial morphology and function.EMBO J 33:2659–2675.

3. Agrawal G, Subramani S (2013) Emerging role of the endoplasmicreticulum in peroxisome biogenesis. *Front Physiol* 4:286
4. Almada A. 2015. Parasitosis: perdidas productivas e impacto económico. BoehringerIngelheim.
5. Alves M.H.; Campos –Takaki G. M.; Okada K.; Ferreira P. I. H. y Ivo M. A. 2005. Detection of extracelular protease in *Mucor* species. Vol.22, p 114-117. Brasil.
6. Arias V. M. S.; Cazapal M. C.; Miguélez R. S.; Hernández M. J.A.; Sánchez A. R. y Paz S. A. 2016. El control biológico de los parásitos en la ganadería bovina, fundamentos y posibilidades reales. Facultad de veterinaria de Lugo. Universidad de Santiago de Compostela. España.
7. Arronis D.V. 2010. Manuela de recomendaciones sobre Sistemas Intensivos de Producción de Carne. Instituto Nacional de Innovacion y Transferencia en Tecnologia Agropecuaria (INTA). Costa Rica.
8. Arroyo F. L.; Cazapal-Monteiro C.; Hernández J. A.; Sanchís J.; Miguélez S.; Bonilla R.; Piñeiro P.; Paz S. P.; Sánchez-Andrade R. y Arias M. S. 2015. Prevención de Parafistomosis bovina Mediante La Vinculación de esporas de Hongos en Concentrado alimentario. Universidad de Lugo, España. AIDA, XVI Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I, 185-187.
9. Barrera Bassols, Narciso. 1996. Los orígenes de la ganadería en México. *Ciencias*, núm. 44, octubre-diciembre, pp. 14-27.
10. Bartnicki-García S. (1968) Control of dimorphism in *Mucor* by hexoses: inhibition of hyphal morphogenesis. *Journal of Bacteriology* 96: 1586-1594.

11. Bautista-Garfías CR, Martínez-Ibañez F. Experiences on the control of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Mexico. In: Ticks: Disease, management and control. MogesWoldemeskel editor. Nova Science Publishers, Inc. 2012:205-216
12. Bergkvist A., Burns M., Sanders R., Redshaw N. y Wilkes T. 2013. Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR).
13. Bertalanffy, L. V. 1950. La teoría de los sistemas abiertos en la física y en la biología. Science III, pags 23-29.
14. Bronsart L.L. y Contag C.H. 2016. A role of adaptive system in glucose homeostasis. 4(1): e000136.
15. Castro H. J. A., González W. M. y Mezo M. 2015. principales parasitosis en el ganado vacuno lechero: pautas racionales de control. Laboratorio de Parasitología, Departamento de Producción Animal, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-Xunta de Galicia. No. 1847. P.
16. Carrera C.B., Gómez C.M.A y Schwentesius R.R. 2014. La Ganadería Bovina de Carne en México: Un Recuento Necesario Después de la Apertura Comerial. Primera edición. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México.
17. Cazapal M. C.; Arias V. M. S.; Hernández M. J.A.; Fernández M. M.; Valderrabano C.E.; Rois L. J. L.; Andrade F. R. S. y Madeira de C. L. M. 2013. Control ecológico de parásitos en herbívoros salvajes pastoreo. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Lisboa. España. Volumen 34. P. 22- 33.
18. Chaparro P. A. P. 2010. Aislamiento e identificación de metablitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de *Mucor circinelloides* y

evaluación de su actividad. Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Tesis de posgrado. Bogotá, Colombia.

19. Chiericatti A.A.C. 2013. Control del desarrollo de hongos contaminantes de alimentos mediante iones dosificados por material microporoso. Tesis de maestría. Universidad Nacional del Litoral.
20. Clavijo, L. A.M. 2006. El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico de estudios tóxico-moleculares para la evaluación de la calidad de aguas. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires.
21. Contreras J.R., Albarrán P.B y García M.A. 2018. La ganadería en condiciones de trópico seco. El caso del sur del Estado de México. Condiciones actuales y perspectivas de desarrollo. Capítulo 1: Situación actual de la ganadería de bovinos en el municipio de Tejupico. Centro Universitario UAEM. Universidad Autónoma del Estado de México. México.
22. Cordero del Campillo M, Rojo F, Martínez Av Sánchez C, Hernández S, Navarrete I, Díez P, et al. 1999. Parasitología veterinaria. Madrid, España: Ed McGraw-Hill Interamericana. 935 p.
23. Consejo mexicano de la carne, 2017. Compendio Estadístico 2017
24. Cortiñas P. F. J. (2015) “Desarrollo de la ganadería ecológica e inclusión social”. Universidad de Santiago de Compostela. (Tesis doctoral). Facultad de Veterinaria. Departamento de patología Animal. Lugo, España.
25. Cortiñas P. F. J.; Cazapal-Monteiro C. F.; Hernández J. A.; Arroyo F. L.; Miguélez S.; Suárez J.; López de Arellano M. E.; Sánchez- Andrade R.; Mendoza de Gives P. Paz-Silva A. y Arias M. S. (2015) Potencial use of *Mucor circinelloides* for the biological control of certain helminths affecting

- livestock reared in a care farm. Journal Biocontrol Science and Technology.Volumen 25.Pp. 1443- 1452.España.
26. Deepe G.S. y McGuinness M. 2006. Interleukin-1 and Host Control of Pulmonary Histoplasmosis.
27. Deschiens R. Innocuité des Hyphomycètesprédateurs de nématodespourlavégétation des paturageset pour le bétail. Comp Rend SéanSoc Biol.1939;135:830–2
28. Díaz de Ramírez A, Hernández A, García A, Ramírez-Iglesia LN. 2001. Excretion of oocysts of Eimeriaspp during the first three months of lice in calves from dairy farms in western Venezuela. Rev Cien FCV-LUZ 11: 207-212
29. Dufour J. 2010. Produccion de biodiesel utilizando el hongo Mucor circinelloides. España.
30. Fernández F.A.; Arieta R.R.; Graillet J.E; Romero F.M. y Felipe A.I. 2015. Prevalencia de nematodos gastroentéricos en bovinos doble propósito en 10 ranchos de Hidalgotitlán Veracruz, México. Abanico Veterinario. 5(2).
31. FIRA. 2017. Panorama Agroalimentario. Carne de bovino 2017. Dirección de investigación y Evaluación Económica y Sectorial. México.
32. Fiel C.A., Steffan P.E. y Ferreyra D.A. 2011. Diagnóstico de las parasitosis más frecuentes de los rumiantes: técnicas de diagnóstico e interpretación de resultados. Técnicas de laboratorio e interpretación de resultados. Primera edición. Argentina.
33. Flores C. D. C. 2016. Evaluación del potencial nematófago de los hongos *Arthrobotrys musiformis* y *Arthrobotrys oligospora* en bovinos. Trabajo de Grado. Universidad de La Salle. Colombia.

34. Foster M. L.; Dowd S.E.; Stephenson C; Steiner J. M.; y Suchodolski J.S. 2013. Characterization of the Fungal Microbiome (Mycobiome) in Fecal Samples from Dogs. Volumen 2013, Article ID 658373, 8 pages. Veterinary Medicine International.
35. Fremond, A. (1967): *L'élevage en Normandie. Etude Géographique*, Caen, Association des Publications de la Faculté des Lettres et Sciences Humaines de l'Université de Caen, 2 vol., 626 y 316 pp.
36. Girard, de K. R. 2003. Manual de parasitología. Métodos para laboratorios de atención primaria de salud. 2da.edicion. Honduras.
37. Grahl N, Puttikamonkul S, Macdonald JM, Gamcsik MP, Ngo LY, Hohl TM, et al. (2011) In vivo Hypoxia and a Fungal Alcohol Dehydrogenase Influence the Pathogenesis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. PLoS Pathog 7(7): e1002145.
38. Grønvold J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Wolstrup J, Bresciani J, et al. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. J Helminthol. 1996;70:291–7.
39. Hartigan A. J.; Westwick J.; Jarai G. y Hogaboam C.M. 2009. CCR7 Deficiency on Dendritic Cells Enhances Fungal Clearance in a Murine Model of Pulmonary Invasive Aspergillosis. 183: 5171-5179. The Journal of Immunology.
40. Havaux X.; Zeine A.; Dits A.; y Denis O. 2005. A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. 139(2): 179-188.

41. Hernandez J.A.; Cortiñas, F. J.; Arroyo F.L; Francisco I.; Miguélez S.; Suárez J. L.; Ramasanta A.; Paz S. A.; Sánchez-Andrade R. y Arias M. S. 2015. Empleo de esporas de *Mucor circinelloides* como aditivo alimentario para evitar la infección de suidos por *Ascaris* sum. Universidad de Lugo, España. AIDA , XVI Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I, p.188-190.
42. Huerta C. C y Cruz R. M. 2016. Hacia una Ganadería Sustentable y Amigable con la Biodiversidad. Estudio de Caso: Xico, Veracruz. Primera edición. México.
43. Jawhara S. y Poulain D. 2007. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Medical Mycology* 45(8):691-700.
44. Jordán de P. A. 2013. Búsqueda de mutantes de *Mucor Circinelloides* alterados en el dimorfismo mediante el transposón *sleeping beauty*. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca. España.
45. Lanternier F., Dannaoui E., Morizot G., Elie C., Garcia-Hermoso D., et al., 2012a A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo study (2005–2007). *Clin. Infect. Dis.* 54: S35–S4.
46. Larsen M. Biological control of helminths. *Int J Parasitol.* 1999;29:139–
47. Larsen M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology.* 2000;120:121–31.
48. Lee SC, Schmidtke SN, Dangott LJ, Shaw BD (2008a) *Aspergillus nidulans* ArfB plays a role in endocytosis and polarized growth. *Eukaryot Cell* 7:1278–1288
49. Li C. H., Cervantes M., Springer D. J., Boekhout T., Ruiz- Vazquez R. M., Torres-Martinez S., Heitman J., Lee S. C. (2011) Sporangiospore Size Is Linked to Virulence of *Mucor circinelloides*. USA. *PLoS Pathog* 7(6): e1002086. doi:10.1371/journal.ppat.1002086.

50. Li, J., Hyde, K., Zhang, K. 2014. Methodology for Studying Nematophagous Fungi. En K. Zhang, Nematode Trapping-Fungi. pp. 13-40. Springer.
51. López G. S. (2015) Análisis genómico-funcional de la regulación de la expresión génica por luz en el hongo *Mucor Circinelloides*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España.
52. Lübbenhüsen T.L.; Nielsen J. y McIntyre M. 2003. Characterization of *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. Journal of Applied Microbiology. Technical University of Denmark. p. 1152-1160.
53. Luo H., Liu Y.; Fang L.; Li X.; Tang N. y Zhang K. 2007. *Coprinus comatus*: Damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. Applied and Environmental Microbiology, 72, 3916–3923.
54. Mancebo A., González F., Aldana L., González Y., Lugo S., González B., Fuentes D., Arteaga M.E., González Y. y Bada A.M. 2009. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* 9205 in rats using different routes of exposition. Volumen 91. 99-108.
55. Marín S. G. L. 2011. Sistemas de producción animal I. Primera Edición. Colombia. P. 18- 20.
56. Martín B.M., Escribano S.M., Mesías D.F.J. Rodríguez de Ledesma V.A. y Pulido G. F. 2001. Extensive systems in animal production. Dirección General de Producción, Investigación y Formación Agrarias de la Junta de Extremadura. España. 5:465-489.

57. Martín T. D. 2009. Optimización del proceso de obtención de biodiesel a partir del microorganismo *Mucor circinelloides* mediante catálisis ácida. Universidad Rey Juan Carlos URJC, España. Tesis de Licenciatura.
58. Mehrad B.; Strieter R.M. y Standiford T.J. 1999. Role of TNF- α in Pulmonary Host Defense in Murine Invasive Aspergillosis. 162(3) 1633-1640.
59. Miller, C.M., Waghorn, T.S., Leathwick, D.M., Candy, P.M., Oliver, A-M.B., Watson, T.G. 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. Veterinary Parasitology.186, 376-381. The Journal of Immunology.
60. Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, Suzuki T. 2014. Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011.
61. Nari A, Eddi C, Martins JR y Benavides E. Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina no. 157. Roma: Estudio FAO Producción y Sanidad Animal; 2003.
62. Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, Suzuki T. 2014. Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011.
63. Mier T., Rivera F., Rodríguez P.M.P., Carrillo F.J. y Toriello C. 1994. Infectivity of the entomophogenic fungus *Verticillium lecanii* in mice and guinea pigs.36(2): 107-11
64. Muhammed M.; Feldmesser M.; Shubitz L. F.; Lionakis M.S.; Sil A.; Wang Y.; Glavis-Bloom J.; Lewis R.E.; Galgiani J.N. ; Casadevall A.;

- Kontoyiannis D.P.; y Mylonakis E. 2012. Mouse models for the study of fungal pneumonia. A collection of detailed experimental protocols for the study of coccidioides, Cryptococcus, Fusarium, Histoplasma and combined infecciones due to Aspergillus-Rhizopus. 3(3): 329-338.
65. Nicolás F. E., de Haro J. P., Torres-Martínez S., Ruiz-Vázquez R. M. (2007) Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. Fungal Genetics and Biology 44: 504–516. México.
66. Nordbring-Hertz B, Jansson HB, Tunlid A. Nematophagous Fungi. En: Encyclopedia of Life Science(c). Weinheim: Macmillan Publishers Ltd, NaturePublishing; 2006. p. 1-11. Disponible en: www.els.net
67. OIE. 2012. Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE. Capítulo 7.9. Bienestar animal y Sistemas de Producción de Ganado Vacuno de Carne.
68. Orozco A.M., Alvarez C.V., Jimenez R.A, y Acuña N.O. 2009. *In vitro* assessment of nematophagus fungi for biological control of gastrointestinal nematodes of ruminants. Rev.MVZcordoba vol.14 no.3 Córdoba.
69. Osvaldo C.A. 2003. Caracterización de los sistemas de producción bovina (invernada) en el nordeste de la provincia de la pampa (Argentina). Modelos de gestión. Tesis de doctorado. Universidad de Córdoba. Facultad de veterinaria.
70. Palma G.J.M. 2014. Escenarios de sistemas de producción de carne de bovino en México. Universidad de Colima. CUIDA-FMVZ. Vol. 18. P. 53-62.

71. Patiño Medina J.A. 2017. Participación de los productos de los genes arf1 y arf2 en el crecimiento y virulencia de *Mucor circinelloides*. Instituto de investigaciones Químico-Biológicas. México.
72. Rangel-Porras R,A.; Díaz-Pérez S.P.; Mendoza-Hernández J.M.; Romo-Rodríguez P.; Alejandre-Castañeda V.; Valle-Maldonado M.I.; Torres-Guzmán J.C.; González-Hernández G.A.; Campos-García J.; Arnau J.; Meza-Carmen V. y Gutiérrez-Corona J.F. Alcohol dehydrogenase 1 participates in the Crabtree effect and connects fermentative and oxidative metabolism in the Zygomycete *Mucor circinelloides*. Journal of microbiology.
73. Peraza P. W., Orzco A. M. y Esquivel H. A. 2014. Evaluación in vitro de hongos nematófagos en zonas arroceras de Costa Rica contra el nematodo agallador *Meloidogyne javanica*. Agronomía Costarricense 38(2):19-32.
74. Plumb, Donald C. y Mangieri J. 2010. Plumb. Manual de Farmacología veterinaria. Inter- Medic. Farmacología. MONOGRAFIA.6ª.Ed. 1239p. Buenos Aires.
75. Ribes, J.A., Vanover-Sams C.L., Barker D.J. (2000). «Zygomycetes in human disease.» ClinMicrobiol Rev 13(2): 236-301.
76. Riojas I., Badii M.H., Guillen A., García M. y Abreu J.L. 2018. Animal husbandary and sustainable development).International Journal of Good Conscience. 13(2) 77-102.

77. Roden M. M., Zaoutis T. E., Buchanan W. L., Knudsen T. A., Sarkisova T. A., et al. , 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. Clin. Infect. Dis.41: 634–653
78. Rodríguez-Vivas RI, Quiñones AF, Ramírez CG. 2005. Epidemiología, prevención y control de la babesiosis bovina. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rodríguez-Vivas RI editor. México DF: McGraw-Hill-UADY; pp. 205-225
79. Rodríguez, V.R.I., Cob G.L.A. y Domínguez A.J.A. 2001. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México. RevBiomed; Vol.12:19-25.
80. Rodríguez-Vivas RI, Ojeda-Chi MM, Pérez-Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA, Ramírez-Cruz GT, Guemes-Ceballos AA. 2011. Epidemiología, diagnóstico y control de la coccidiosis bovina. Capítulo 4. Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Quiroz RH, *et al*, editores. México, DF: AMPAVE;52-66.
81. Rodríguez V.R.I.; Grisi L.; Perez de Leon A.A.; Silva V.H.; Torres A.J.F.J.; Fragoso S.H.; Romero S. D.; Rosario C.R.; Saldierna F. y García C.D. 2017. Potencial economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Vol. 8 no.1 México.
82. Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R.B. 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. Parasit Vectors 6, 153.
83. Rojas D. y Cartín J. J. 2016. Prevalencia de Fasciola hepatica y pérdidas económicas asociadas al decomiso de hígados en tres mataderos de clase A de Costa Rica. Agronomía Costarricense, vol. 40, No.2: 53-62.
84. Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R.B. 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. Parasit Vectors 6, 153.

85. Rubio L.M. L., Braña V.D., Méndez M.R.D y Delgado Suárez. 2013. Sistemas de Producción y Calidad de carne Bovina. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México. Primera Edición.
86. SAGARPA. 2008. Situación del sector pecuario en México. Taller sobre captura y aprovechamiento de metano proveniente de residuos agropecuarios. México.
87. Sagüés M.F., Purslow P., Fernández S., Fúse L., Iglesias L. y Samuel C. 2011. Nematophagous fungi used for the biological control of gastrointestinal nematodes in livestock and administration routes. Vol. 28. Núm. 4. Revista iberoamericana de Microbiología. Pp. 143-147.
88. SIAP. Servicio de información Agroalimentaria y pesquera. 2019. Producción ganadera. Gob.mx
89. Silva F. F. 2013. Regulación de las respuestas a la luz en el hongo *Mucorcircineloides*. Universidad de Murcia.
90. Silvina F.A. 1999. Hongos nematófagos para el control biológico de nematodos parásitos de rumiantes. Revista de Medicina Veterinaria 81: 270-273.
91. Scupham A. J.; Presley L. L.; Wei B.; Bent E.; Grififith N.; McPherson M.; Zhu F.; Oluwadara O.; Rao N.; Braun J y Borneman J. 2006. Abundant and Diverse Fungal Microbiota in the Murine Intestine. American Society for Microbiology. Vol 72, No. 1. P. 793-801. California, USA.

92. Steffan, P.E., Fiel C.A. 2018. Parasitosis gastrointestinales en bovinos de carne. “Enfoque bioecológico para un control integrado y sustentable. Cuadernillo Técnico No. 16. Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva. Facultad de ciencias Veterinarias. Argentina.
93. Solera J. F., Rodríguez V. A. y Soto V. B. 2010. Evaluación de la producción de proteasas en dos cepas de *Mucor* sp. por fermentación sumergida empleando dos tipos de medio de cultivo. Pp. 63- 68. Costa Rica.
94. Sousa A. V.; Asfora S.; Fukushima K.; Miyaji M.; Nishimura K. y Maria de Campos- Takaki G. (2002) Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/ substrate. Brazilian Journal of Microbiology. 33(2): 106-110.
95. Tsegaye, B; Abebaw, H; Girma, S. 2012. Study on coprological prevalence of bovine fasciolosis in and around Woreta, Northwestern Ethiopia. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health 4(7):89-92
96. Valle-Maldonado M.I., Jácome-Galarza I.E., Gutiérrez-Corona F., Ramírez-Díaz M.I., Campos-García J., Meza-Carmen V. 2015. Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. Mol Biol Rep 42(3):705-711.
97. Vicente, G., Bautista, L. F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F. J., Sadaba, I., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S., Garre, V. 2009. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. Biochem. Eng. J. 48, p. 22-27.
98. Yamanaka, T. 2003. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi in vitro. Mycologia. 95(4): 584-589.

99. Yudiarti T.; Yunianto B. I. V. D.; Murwani R. y Kusdiyantini E. 2012. Isolation of fungi from the gastrointestinal tract of indigenous chicken. *Diponegoro University*, 37: 2. Pág. 115 - 120.
100. Villegas Durán, G., A. Bolaños Medina y L. Olguín Prado. 2001. La ganadería en México, Colec. Temas Selectos de Geografía de México (I.51), Instituto de Geografía-UNAM, Plaza y Valdés Editores, México, pp. 45-47.
101. Yamaguchi M., Dieffenbach C.W., Connolly R., Cruess D.F., Baur W., Sharefkin J.B. 1992. Effect of different laboratory techniques for guanidium-phenol-chloroform RNA extraction on A260/A280 and on accuracy of mRNA quantitation by reverse transcriptase-PCR. *Genome Research* **1**: 286-290.
102. Yochem, J.K., 2006. Nomarski images for learning the anatomy, with tips for mosaic analysis. Department of Genetics. University of Minnesota, Minneapolis. USA.
103. Zhang K. Q., Liu X. Z., Li T.F. 2001. Biology of nematophagous fungi. Chinese Scientific & Technological Publication, Beijing, China
104. Zuo T., Wong S.H.; Cheung C. P.; Lam K.; Lui R.; Cheung K.; Zhang F.; Tang W.; Ching J.Y.L.; Wu J.C.Y.; Chan P.K.S.; Sung J.J.Y.; Yu J.; Chan F.K.L. y Ng S.C.. 2018. Gut fungal dysbiosis correlates with reduced efficacy of fecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection. 3363(2018). *Nature Communications* 9.