

R.11435

T. 1100

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

" Aplicación de técnicas isoenzimáticas al diagnóstico de nematodes parásitos "

Memoria que presenta la Lda. en Farmacia

Pastora Arias Pérez para optar al grado de

Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla.

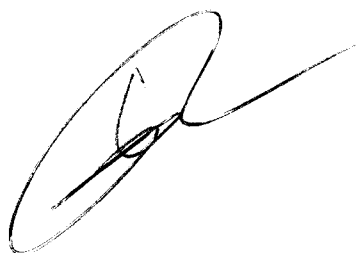
219419582

Sevilla, Enero 1996

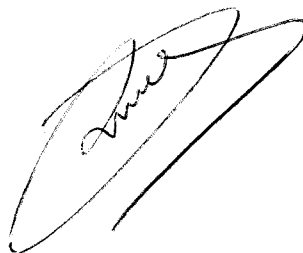
DIEGO GUEVARA BENITEZ, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA Y *CRISTINA CUTILLAS BARRIOS*, PROFESORA TITULAR DE ESTE MISMO DEPARTAMENTO DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada: "Aplicación de técnicas isoenzimáticas al diagnóstico de nematodos parásitos" presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. *PASTORA ARIAS PEREZ* para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en este Departamento bajo nuestra dirección, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Sevilla, a 29 de Noviembre de 1995.



Fdo. *Diego Guevara Benítez*



Fdo. *Cristina Cutillas Barrios*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
CENTRO DE INVESTIGACIONES PARASITARIAS

Comisión de Examen de Tesis Doctorales
El día 15 de mayo de 1996 del libro
son expedientes: 31.07.96
Sevilla,

El Jefe del Departamento de Tesis,

Alicia Raffetto

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en "Experimental Parasitology", "International Journal of Parasitology" y "Parasitology Research".

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer constar mi agradecimiento, en primer lugar a los directores de esta tesis: al Dr. D. Diego Guevara Benítez por su dirección, consiguiendo llevar a buen término este trabajo, y muy especialmente a la Dra. Dña. Cristina Cutillas Barrios, por estar siempre a mi lado, enseñándome, apoyándome y animándome en todo momento y recibiendo de ella un trato amable y amistoso.

A D. José M. Ubeda y Dña. Concha Ariza por su apoyo y colaboración.

A Paloma, Marta y Carlos por los ratos tan agradables que pasé con ellos durante mis primeros años en la realización de este trabajo.

A D. Miguel Fernández por su colaboración en el transporte de muestras parasitológicas al laboratorio.

A los Dptos. de Microbiología y Bioquímica, por su ayuda y prestaciones durante todos estos años.

También deseo hacer constar mi agradecimiento a los trabajadores de los mataderos de Almonte y del Sur, especialmente a D. José Gutierrez, veterinario del matadero del Sur y a Pepa y Juana empleadas del matadero de Almonte.

A mis compañeras actuales, Carmen, María y Rocío por su apoyo en los últimos momentos.

A todos ellos muchas gracias.

A mis padres

A mis hermanos

INDICE

I.	<i>INTRODUCCION Y ANTECEDENTES</i>	1
I.1.	Importancia actual del estudio de los parasitismos por helmintos en el ganado ovino y caprino	2
I.2.	Patología causada por los nematodos objeto de estudio al ganado ovino y caprino	11
I.2.1.	Nematodos pulmonares	11
I.2.1.a.	<i>Protostrongylus rufescens</i>	11
I.2.1.b.	<i>Dictyocaulus filaria</i>	12
I.2.2.	Nematodos intestinales	14
I.2.2.a.	<i>Oesophagostomum venulosum</i> y <i>Chabertia ovina</i>	14
I.2.2.b.	<i>Trichuris</i> sp.	16
I.3.	Encuadramiento taxonómico de las especies de nematodos parásitos objeto de estudio. Problemática de la diferenciación específica del género <i>Trichuris</i>	17
I.4.	Importancia de los estudios electroforéticos en la taxonomía de helmintos parásitos	22
I.5.	Heterogeneidad en los enzimas: concepto de isoenzima	25
I.5.a.	Principios generales de las proteínas	25
I.5.b.	Concepto de isoenzima	28
I.6.	Relación gen-enzima	33
I.7.	Frecuencias alélicas y ley de equilibrio de Hardy-Weinberg	36
II.	<i>MATERIAL Y METODOS</i>	40
II.1.	Material	41
II.1.1.	Parásitos	41
II.1.1.a.	Nematodos pulmonares	41
II.1.1.b.	Nematodos intestinales	42
II.2.	Métodos	44
II.2.1.	Criterios taxonómicos adoptados para la identificación de las distintas especies de nematodos parásitos	44

II.2.1.a.	Nematodos pulmonares: <i>Protostrongylus rufescens</i>	44
II.2.1.b.	Nematodos pulmonares: <i>Dictyocaulus filaria</i>	45
II.2.1.c.	Nematodos intestinales: <i>Oesophagostomum venulosum</i> y <i>Chabertia ovina</i>	46
II.2.1.d.	Nematodos intestinales: <i>Trichuris</i> sp.	50
II.2.2.	Técnicas electroforéticas	55
II.2.2.a.	Preparación de extractos de las especies parásitas para el estudio electroforético	55
II.2.2.b.	Técnicas electroforéticas: preparación del medio de soporte	56
	- Preparación del gel de almidón	56
	- Desarrollo electroforético	58
	- Tinción de los isoenzimas	58
II.3.	Controles	60
	- Controles utilizados para el estudio de los distintos patrones isoenzimáticos en las distintas especies objeto de estudio	60
II.4.	Reactivos	64
II.5.	Tinciones	69
II.6.	Colorantes	72
III.	RESULTADOS Y DISCUSION	76
III.1.	Nematodos pulmonares	76
III.1.1.	Distribución y determinación específica de <i>Protostrongylus rufescens</i>	76
III.1.1.a.	Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en <i>P. rufescens</i>	80
III.1.2.	Distribución y determinación específica de <i>Dictyocaulus filaria</i>	89
III.1.2.a.	Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en <i>D. filaria</i>	93
III.2.	Nematodos intestinales	109
III.2.1.	Distribución y determinación específica de <i>Oesophagostomum venulosum</i>	109

III.2.1.a.	Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en <i>O. venulosum</i>	113
III.2.2.	Distribución y determinación específica de <i>Chabertia ovina</i>	120
III.2.2.a.	Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en <i>Ch. ovina</i>	124
III.2.3.	Distribución y determinación específica del género <i>Trichuris</i>	135
III.2.3.a.	Estudio de los patrones isoenzimáticos de la G6PD, GPI, MDH y LDH en <i>Trichuris ovis</i> , <i>Trichuris globulosa</i> y <i>Trichuris skrjabini</i>	149
IV.	CONCLUSIONES	167
V.	BIBLIOGRAFIA	173

FIGURAS

FIGURA 1	Metodología de preparación de los geles de almidón	73
FIGURA 2	Morfología de <i>Protostrongylus rufescens</i>	78
FIGURA 3	Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en <i>P. rufescens</i>	87
FIGURA 4	Morfología de <i>Dictyocaulus filaria</i>	91
FIGURA 5	Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en <i>D. filaria</i>	101
FIGURA 6	Patrones isoenzimáticos comparativos de la LDH y MDH en <i>Protostrongylus rufescens</i> y <i>Dictyocaulus filaria</i>	107
FIGURA 7	Morfología de <i>Oesophagostomum venulosum</i>	111
FIGURA 8	Patrones isoenzimáticos de la MDH, G6PD y GPI en <i>O. venulosum</i>	118
FIGURA 9	Morfología de <i>Chabertia ovina</i>	122
FIGURA 10	Patrones isoenzimáticos de la MDH, G6PD y GPI en <i>Ch. ovina</i>	128
FIGURA 11	Patrones isoenzimáticos comparativos observados para la MDH, G6PD y GPI en <i>O. venulosum</i> y <i>Ch. ovina</i>	133
FIGURA 12	Morfología de <i>Trichuris skrjabini</i>	142
FIGURA 13	Aspectos de la vaina espicular observados en las distintas poblaciones de <i>Trichuris</i> sp. encontradas	145
FIGURA 14	Vulva observada en hembras de <i>T. ovis</i> y <i>T. globulosa</i>	147
FIGURA 15	Patrones isoenzimáticos de la G6PD, GPI, LDH y MDH en <i>T. ovis</i> , <i>T. globulosa</i> y <i>T. skrjabini</i>	155

TABLAS

TABLA 1	Distribución de los ejemplares de <i>P.rufescens</i> por localidad, sexo y hospedador	77
TABLA 2	Distribución de los ejemplares de <i>D.filaria</i> por localidad, sexo y hospedador	90
TABLA 3	Cálculo de las frecuencias alélicas y test de equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus de la MDH en <i>D.filaria</i>	103
TABLA 4	Cálculo de las frecuencias alélicas y test de equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus de la G6PD en <i>D.filaria</i>	104
TABLA 5	Cálculo de las frecuencias alélicas y test de equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus de la GPI en <i>D.filaria</i>	105
TABLA 6	Distribución de los ejemplares de <i>O.venulosum</i> por localidad, sexo y hospedador	110
TABLA 7	Distribución de los ejemplares de <i>Ch.ovina</i> por localidad, sexo y hospedador	121
TABLA 8	Cálculo de las frecuencias alélicas y test de Hardy-Weinberg para el locus de la G6PD en <i>Ch.ovina</i>	130
TABLA 9	Cálculo de las frecuencias alélicas y test de Hardy-Weinberg para el locus de la GPI en <i>Ch.ovina</i>	131
TABLA 10	Distribución de los ejemplares de <i>T. ovis</i> y <i>T. globulosa</i> por localidad, hospedador y sexo	139
TABLA 11	Distribución de los 57 ejemplares de <i>Trichuris skrjabini</i> por localidad, sexo y hospedador	140
TABLA 12	Datos biométricos obtenidos de 57 individuos de <i>T.skrjabini</i> recolectados a partir de <i>Capra hircus</i> en el Sur de España	141
TABLA 13	Datos biométricos obtenidos para las distintas poblaciones de <i>Trichuris</i> sp. recolectadas de <i>Ovis aries</i> y <i>Capra hircus</i>	144
TABLA 14	Cálculo de las frecuencias alélicas y test de Hardy-Weinberg para el locus de la LDH en <i>Trichuris ovis</i>	157

***INTRODUCCION Y
ANTECEDENTES***

I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

I. 1. IMPORTANCIA ACTUAL DEL ESTUDIO DE LOS PARASITISMOS POR HELMINTOS EN EL GANADO OVINO Y CAPRINO

Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos y más concretamente del ganado de abasto, presentan un gran interés desde los puntos de vista sanitario, económico y patológico.

Es un hecho evidente la ubicación del ovino en nuestro país en las zonas de secano, constituyendo un sistema de explotación que hace que la problemática del ovino no se pueda separar del conjunto agrario que representa el secano español.

En el periodo 1976-88 se muestra una tendencia creciente del censo nacional, de tal forma que nos situamos en 20.5 millones de cabezas, lo que hace que estemos en la segunda posición a nivel Comunitario detrás del Reino Unido (Ruiz-Abad, 1993).

Además, España tiene una población caprina de más de 3 millones y medio de cabezas, lo que constituye el segundo censo, detrás de Grecia, en la C.E.E (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA, 1990).

Analizando la distribución geográfica del ganado ovino y caprino, vemos como

entre las dos Castillas, Extremadura, Andalucía y Aragón se concentra el 81.3% del total nacional de efectivos, lo que corrobora lo expuesto anteriormente sobre su integración en el secano español. Andalucía representa el 9.2%, con 1.895.696 cabezas de ganado (Ruiz-Abad, 1993).

La oveja contribuye al abastecimiento proteico de la población española y sus posibilidades futuras de exportación a los países del Mercado Común parecen ser muy interesantes. Sin embargo, existe una baja rentabilidad en muchos rebaños como consecuencia de problemas patológicos, sobre todo parasitarios.

El gregarismo, la estrecha conexión con su hábitat natural, la introducción periódica de nuevos animales susceptibles y las grandes fluctuaciones nutricionales, ligadas estrechamente a las influencias climáticas, son circunstancias que han contribuido a que los ovinos, a lo largo de su evolución, hayan llegado a servir de hospedadores a unas 200 especies de animales parásitos. Las modificaciones relativamente escasas en muchos aspectos, que ha experimentado el sistema de explotación tradicional no han variado sustancialmente las condiciones que favorecen el parasitismo del ganado ovino y, en consecuencia, las parasitosis continúan siendo uno de los más graves problemas con que debe enfrentarse el ganadero.

Durante años, la mayor espectacularidad de algunas bacteriosis y virosis desviaron hacia estos agentes etiológicos el interés en el estudio de los problemas

patológicos de la especie ovina. En la actualidad, al haberse conseguido controlar tales enfermedades mediante una profilaxis racional, por un lado, y el intento de eliminar todos los factores negativos de la producción por otro, ha dado lugar a que el control de las enfermedades parasitarias sea nuevamente un objetivo prioritario en nuestras explotaciones.

Los nematodos representan un grupo cosmopolita de organismos que ocupan prácticamente todo tipo de hábitats. Muchas especies son parásitas obligadas de plantas o animales, causando una amplia variedad de problemas patológicos. La importancia económica de las infecciones por nematodos en la agricultura, veterinaria, así como en la medicina clínica, ha dado lugar a un historial rico de investigación experimental. Estas investigaciones, tradicionalmente, han tenido como principal objetivo el solucionar problemas tanto en la prevención de enfermedades, como en el tratamiento de los hospedadores infectados.

En la última década, ha surgido un interés notorio en la comprensión de la biología básica de los nematodos. Contribuyendo a estos avances, está la aplicación de la genética molecular a la investigación nematológica.

Unas sesenta especies de helmintos parasitan el tubo digestivo de los ovinos. Casi en la generalidad de los casos coexisten en un mismo hospedador varias de estas especies pertenecientes a géneros y familias diferentes, con mecanismos de acción

patógena distintos y localizadas en diversos tramos del tracto gastrointestinal. La acción patógena total de estas asociaciones parásitas es, al menos, la suma de las acciones patógenas parciales de cada una de las especies.

El parasitismo por un pequeño número de estos helmintos es perfectamente tolerado por el hospedador, carece de repercusiones clínicas, no parece modificar las producciones y su única importancia es epizootiológica, en cuanto que contribuye a la contaminación de los pastos por estadios larvarios. En el lado opuesto se sitúan las cargas de vermes de importancia suficiente para producir enfermedad.

Entre ambos extremos y con una gran variabilidad, se encuentran parasitismos que, sin llegar a producir enfermedad clínica, repercuten más o menos en la fisiología del ovino, determinando la disminución de sus producciones útiles (crecimiento, estado de carnes, leche, lana) y, en consecuencia, limitando la producción y causando una pérdida económica.

Debemos recordar, que en las explotaciones ganaderas el concepto de salud debe acompañarse de un rendimiento elevado en las producciones económicas (Tarazona Vilas, 1980).

Martínez-Gómez y col. (1973), compilaron las denuncias de nematodos parásitos de la cabra doméstica (*Capra hircus*) realizadas por diversos autores en distintas

provincias españolas, indicando las halladas por ellos en la provincia de Córdoba. Por otra parte, en el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (Cordero del Campillo y col., 1994) se recogen, denunciadas en el ganado cabrío español, un total de 27 especies de nematodos parásitos del tracto gastrointestinal, así como 5 especies de nematodos parásitos pulmonares, especies todas ellas señaladas también como parásitas de la oveja. Frente a estas denuncias, que por ser de distintas áreas geográficas y comunes con la oveja parece indicar la ubicuidad de tales nematodos en la cabra doméstica española, llama la atención el escaso número de brotes de estas parasitosis que se han descrito hasta ahora.

Díaz (1949), describió un cuadro clínico de gastroenteritis, común a rebaños de las provincias de Salamanca, Huelva y Badajoz, que afectaba al ganado lanar y "más al cabrío" e identificó, en las necropsias realizadas en animales procedentes de la última de dichas provincias, los parásitos *Haemonchus contortus* y *Nematodirus filicollis*.

Martín-Lomeña (1950) indica que Bermejo encontró *H. contortus* en cabras de la provincia de Málaga afectadas de "geluza" y dice haber obtenido buenos resultados terapéuticos con el empleo de antihelmínticos.

Sánchez-Botija (1950), estudió un brote de parasitosis en cabras de Navarra que atribuyó a *T. globulosa*, hallando también en las mismas cabras las especies *H. contortus*, *O. ostertagi*, *O. venulosum*, *Ch. ovina* y *T. ovis*.

Simón Vicente (1962), denunció varias especies de *Trichostrongylidae* en cabras, ovejas y vacas en la provincia de Salamanca afectadas de graves infestaciones mixtas.

Martínez-Gómez (1968), señaló la existencia de extensos focos de gastroenteritis parasitaria en ganado cabrío de la provincia de Sevilla (Tarazona Vilas, 1982).

Datos más recientes son los citados por García Romero y col. (1995) los cuales, durante el bienio 1993-1994, recogieron 250 muestras de aparatos digestivos de caprinos procedentes de distintas zonas geográficas de Castilla-La Mancha, explotados en régimen extensivo, empleando los procedimientos habituales para la recuperación e identificación de los vermes presentes en los animales. Identificaron, como parásitos de la cabra, 21 especies de nematodos gastrointestinales que enriquecen el conocimiento de la parasitofauna regional. Entre ellas se encontraban: *Chabertia ovina* (ciego), *Oesophagostomum venulosum* (ciego), *Trichuris ovis* (ciego), *T.globulosa* (ciego) y *T.skrjabini* (ciego) siendo esta última citada por primera vez en la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha.

La importancia de las nematodosis digestivas en los ovinos y bovinos ha sido denunciada en numerosas ocasiones. En el ganado caprino estos estudios son esporádicos y limitados normalmente a los trichostrongílidos, dejando en un segundo término a otros nematodes intestinales.

Valcárcel y col. (1995), estudiaron la incidencia y la evolución mensual de los nematodos parásitos del ciego del ganado caprino. El estudio se desarrolló desde Octubre de 1993 a Septiembre de 1994. Con una frecuencia de dos veces al mes, se recogían muestras de ciego de caprinos (n=183) procedentes de mataderos de Castilla-La Mancha. La incidencia de parasitación encontrada fue de un 47.5%, con un promedio de vermes por animal (m=11, max=312). Hallaron especies incluídas en tres géneros: *Trichuris*, *Oesophagostomum* y *Chabertia*, con un 38%, 19% y 3% de incidencia respectivamente. A nivel de especie citaron: *Trichuris ovis*, *T.skrjabini*, *T.globulosa*, *Oesophagostomum venulosum* y *Chabertia ovina*. La evolución mensual muestra como, a pesar del bajo promedio de vermes, la frecuencia es alta, apareciendo durante todos los meses del año. El género *Trichuris* fue el más abundante y frecuente a lo largo de todo el año, le siguió en importancia *Oesophagostomum* y la aparición de *Chabertia* fue reducida y esporádica.

Illescas y col. (1995), realizaron un estudio sobre la prevalencia de parasitación de estrogilidos pulmonares, agentes patógenos causantes de la bronconeumonía vermiculosa ovina y caprina en la provincia de Granada. Se estudiaron 129 explotaciones ovinas y 88 explotaciones caprinas, siendo la prevalencia de parasitación en los ovinos de 44.96% y de 69.32% en caprinos. Se identificaron tres especies de estrogilidos pulmonares: *Muellerius capillaris* (40.31%) en ovinos y (60.23%) en caprinos, *Protostrongylus rufescens* (14.73% y 22.73%) y *Dictyocaulus filaria* (2.32% y 0.77%), respectivamente.

Martínez-González y col. (1995), realizaron un estudio epidemiológico en distintas Comarcas de la provincia de León durante dos años consecutivos (1991-1993). Los resultados mostraron que la especie que presentó un porcentaje de parasitación mayor fue *P.rufescens* (85.4%), seguida por *Dictyocaulus filaria* (35.3%), mientras que *T.ovis* se encontró en un 9.7%

Meana y col. (1995), desde finales de Noviembre de 1994 a principios de Febrero de 1995, realizaron un estudio para conocer la prevalencia de las nematodosis broncopulmonares y las parasitosis gastrointestinales en el ganado ovino. Para ello, muestrearon 59 explotaciones, en régimen mixto, de varias provincias del área septentrional de la península, distribuidas de la siguiente manera: Burgos (9), Guadalajara (14), Huesca (11), León-Zamora-Palencia (16) y Zaragoza (9). *Dictyocaulus filaria* estuvo presente en un 8% de las explotaciones, todas ellas pertenecientes al área de León-Zamora-Palencia y Guadalajara. Detectaron nematodos pulmonares de la familia Protostrongilidae en el 86% de las explotaciones analizadas, apareciendo en el 100% de los rebaños de Guadalajara, Huesca y Zaragoza, en el 78% de Burgos y en el 63% de la zona de León-Zamora-Palencia. Identificaron los géneros *Muellerius*, *Protostrongylus*, *Cystocaulus* y *Neostrongylus* en todas las provincias excepto en León-Zamora-Palencia, zona en la que no se detectó *Protostrongylus*. Además, detectaron infestaciones por nematodos gastrointestinales en todas las explotaciones analizadas. De ellos, el 49% resultó pertenecer al género *Trichuris*.

Ramajo Martín y col. (1995), muestran la evolución durante nueve años (1986-94) de las prevalencias de algunos protozoos intestinales y diversos helmintos del ganado ovino de la provincia de Salamanca. La evolución general de la parasitación osciló a lo largo de los nueve años entre el 73.8% y el 95.7% de individuos afectados. Durante el período de estudio, las prevalencias medias fueron: 34.89% para *Eimeria* spp.; 72.03% para nematodos del tracto gastrointestinal (en los cuales van incluidos *Oesophagostomum*, *Chabertia* y *Trichuris*); 12.60% *Dictyocaulus filaria*; 8.37% *Protostrongylidae* (donde se encuentra *Protostrongylus*); 8.76% *Moniezia* spp. y *Stilesia*; 9.08% *Fasciola hepática* y 0.25% *Dicrocoelium dendriticum*. Los helmintos mencionados mantienen aquí sus prevalencias en los hospedadores ovinos, pese a las campañas sistemáticas de tratamientos estratégicos-preventivos que se vienen efectuando durante los últimos años, las cuales parecen solo afectar a su densidad relativa o abundancia.

En las últimas décadas, no se han encontrado datos estadísticos o citas en la bibliografía referentes al parasitismo existente en *O. aries* y *C. hircus* en nuestra región andaluza, salvo las ya expuestas por Illescas y col. (1995) sobre la provincia de Granada.

La presente Tesis Doctoral incluye un estudio epidemiológico (número de individuos, distribución por localidad, sexo y hospedadores) de nematodos pulmonares e intestinales parásitos de la cabra doméstica (*Capra hircus*) y de la oveja (*Ovis aries*).

Asimismo, se ha llevado a cabo un estudio genético, basado en patrones isoenzimáticos obtenidos mediante técnicas electroforéticas en geles de almidón de las especies parásitas encontradas.

Las especies pulmonares estudiadas han sido: *Protostrongylus rufescens* y *Dictyocaulus filaria*, mientras que de hábitat intestinal se han estudiado: *Oesophagostomum venulosum*, *Chabertia ovina*, *Trichuris ovis*, *Trichuris globulosa* y *Trichuris skrjabini*.

I. 2. PATOLOGIA CAUSADA POR LOS NEMATODES OBJETO DE ESTUDIO AL GANADO OVINO Y CAPRINO

I. 2. 1. Nematodes pulmonares

I. 2. 1. a. *Protostrongylus rufescens*

Posee un ciclo biológico indirecto, actuando como hospedadores intermediarios distintas especies de caracoles pertenecientes al género *Helicella*.

Las lesiones producidas por *P.rufescens*, a diferencia de otros géneros pertenecientes a su misma familia, comprenden un área mayor del pulmón. Estas lesiones son consecuencia de una especie de infarto por oclusión de un bronquiolo,

cuyas ramificaciones menores se encuentran taponadas por parásitos adultos, huevecillos e infiltración celular.

En una de las pocas investigaciones bien documentadas de la patogenicidad de los protostrongilinos, se encontró que afectan principalmente a la ganancia de peso (Dunn, 1983).

Los gusanos causan irritación en los bronquiolos y secreción de mucosidad viscosa. Puede presentarse después inflamación y neumonía en los tejidos próximos a los gusanos, pudiendo aparecer también pleuresía. Si son pocos los vermes, las áreas de inflamación son reducidas y no se presentan síntomas. Esto es lo que generalmente ocurre, pero las infestaciones intensas ocasionan lesiones mayores, o las alteraciones causadas por los gusanos debilitan los pulmones los cuales predisponen a la aparición de infecciones bacterianas. Las ovejas y cabras jóvenes son más susceptibles que las de mayor edad (Lapage, 1976).

I. 2. 1. b. *Dictyocaulus filaria*

Posee un ciclo de vida directo.

D. filaria causa irritación e inflamación en los bronquios de su hospedador (bronquitis). Una gran cantidad de mucosidad viscosa es secretada dentro de ellos, y

se convierte en espumosa al mezclarse con aire. Los bronquios se obstruyen entonces por la mucosidad espumosa en la cual se encuentran los gusanos y sus huevecillos, de manera que la respiración se vuelve difícil, presentándose tos áspera y frecuente, aunque esta tos no siempre existe.

La obstrucción de los bronquios va acompañada con frecuencia de obstrucción parcial o completa de los bronquiolos más pequeños, y cuando esto ocurre, los tapones formados por la mucosidad espumosa y los gusanos hacen que éstos se desplacen con los movimientos de inspiración y espiración del hospedador y ejerzan una acción como de bombeo sobre la porción de los pulmones abastecida por los bronquiolos infestados; o puede impedirse el intercambio gaseoso en estas porciones del pulmón. El resultado es el colapso (atelectasia) de dichas porciones, llegando a formarse enfisema compensatorio de las áreas adyacentes. Si se aspiran bacterias dentro de las zonas afectadas, son capaces de provocar bronconeumonía.

Además de estas alteraciones en los pulmones y vías aéreas, las larvas infestantes, cuando son numerosas, pueden ocasionar irritación del intestino y diarrea al perforar las paredes de este órgano en su ruta hacia los ganglios linfáticos mesentéricos (Lapage, 1976).

La patogénesis de *D. filaria* incluye la epitelización de los alveolos, infiltración de macrófagos, células gigantes y eosinófilos e inflamación peribronquial. Hay enfisema

pulmonar e intersticial.

Se sospecha de la infección cuando hay tos en todo el rebaño con escurrimiento de moco por la nariz (Dunn, 1983).

I. 2. 2. Nematodes intestinales

I. 2. 2. a. *Oesophagostomum venulosum* y *Chabertia ovina*

Sin lugar a dudas, los nematodes gastrointestinales son los parásitos más frecuentes hallados en todas las áreas de producción ovina del mundo.

En España, la parasitación del ganado ovino por nematodes gastrointestinales es la más habitualmente observada, habiéndose señalado en el 100% de los rebaños que practican el pastoreo. La prevalencia de parasitación en cada rebaño es, asimismo, muy elevada, estando cercana al 100% en el Valle del Guadalquivir (Martínez y col., 1985).

La intensidad de parasitación varía con la edad de los animales y, sobre todo, con el sistema de producción. En condiciones de pastoreo extensivo en zonas de secano, el promedio de vermes por animal varía entre 822 y 1406 (Cordero del Campillo y col., 1985), (Díez Baños, 1990); por el contrario, en áreas de regadío, la intensidad de parasitación puede alcanzar varias decenas de millar (Rueda y col., 1990).

Los parásitos adultos de *O. venulosum* se alimentan de la mucosa intestinal, produciendo úlceras muy pequeñas en la misma.

Las lesiones más características producidas por esta especie son la presencia de nódulos en la mucosa del intestino grueso, que con frecuencia son supurativas y pueden perforar el peritoneo provocando peritonitis con múltiples adherencias. Aunque los adultos no son hematófagos, producen un marcado engrosamiento de la pared intestinal, congestión y gran producción de mucus (Meana y col., 1993).

Paralelamente, la infección por *Ch. ovina* por lo general es ligera y los brotes clínicos son esporádicos, aunque su morbilidad y su distribución son muy amplias.

Los efectos más notorios se producen durante el periodo de latencia, entre la sexta y la octava semana de la infección, y los animales afectados presentan diarrea intensa la cual a veces es oscura por la presencia de sangre. En las heces se puede observar parásitos que expulsa el hospedador. Tras la necropsia, se nota que la pared del colon está edematosa, congestionada, engrosada y con hemorragias pequeñas debidas a la acción mecánica de los parásitos. La diarrea empieza desde la cuarta semana de infección, cuando se establecen los primeros parásitos adultos en la mucosa del colon. Además de la diarrea, hay hipoalbuminemia y pérdida de peso, por lo que la patogénesis de la chabertiasis se debe a una enteropatía en la cual se pierde proteína (Herd, 1971).

Los efectos del parasitismo gastrointestinal sobre la producción en el ganado ovino contribuyen a reducir las ganancias de peso, el crecimiento de la lana y la producción de leche.

I. 2. 2. b. *Trichuris sp.*

Poseen ciclo de vida directo.

Trichuris se observa con mayor frecuencia en los animales jóvenes y casi siempre está presente en las necropsias de rutina en casi todo el mundo. En las infecciones masivas hay diarrea, que a veces, es sanguinolenta. Tras necropsia, se observa erosión de la mucosa del ciego (Dunn, 1983).

El extremo anterior de estos nematodos se encaja dentro de la mucosa intestinal del hospedador para formar un órgano de fijación, que resiste los movimientos del intestino y permite el paso de un fermento digestivo secretado por el gusano, el cual transforma el material de la mucosa en un líquido que puede succionar el parásito (Lapage, 1976).

Los adultos hacen túneles en la mucosa intestinal con su extremo anterior, y utilizan el estilete que poseen para perforar los vasos o para lacerar los tejidos, originando charcos de sangre que es ingerida por los nematodos.

Las opiniones respecto a la patogenicidad de estas especies varían, pero hay pocas dudas respecto a que producen una inflamación aguda o crónica.

I. 3. ENCUADRAMIENTO TAXONÓMICO DE LAS ESPECIES DE NEMATODES PARASITOS OBJETO DE ESTUDIO. PROBLEMATICA DE LA DIFERENCIACION ESPECIFICA DEL GENERO TRICHURIS

La diferenciación específica de los nematodos parásitos encontrados en los pulmones de *Ovis aries* y *Capra hircus* se ha llevado a cabo de acuerdo a los datos recogidos de la bibliografía consultada, que describen características diferenciales entre las especies halladas por nosotros (*P.rufescens* y *D.filaria*). Asimismo, las características morfológicas y biométricas citadas en la bibliografía para *Oesophagostomum venulosum* y *Chabertia ovina* han permitido un correcto encuadramiento taxonómico de estas especies aisladas del intestino grueso de sus hospedadores vertebrados.

Por el contrario, la diferenciación de las especies de *Trichuris* resulta bastante complicada. Una revisión de este género fue llevada a cabo por Dujardin (1845) y citada por Sarwar (1959).

Desde Mayer (1841), Wilson (1846), Cobbold (1864) y Ransom (1911) quienes dieron una primera descripción de *Trichuris ovis*, muchos autores como: Sprehn (1927),

Chandler (1930), y Baylis (1932), han redescrito esta especie comparándola con *T.globulosa*.

La primera descripción de los órganos genitales y dibujos publicados de la espícula y la vaina de *T.ovis* fueron dadas por Mayer (1841).

Wilson (1846), describió la anatomía de *Trichuris ovis* y acompañó su descripción con dibujos de individuos hembras y machos.

Cobbold (1864), dió un dibujo detallado de la parte posterior y órganos copulatrices del macho de *Trichuris ovis*.

La descripción y dibujos de *T.ovis* por Ransom (1911) también proporcionó una información muy útil.

Sprehn (1927), revisó la literatura de *Trichuris* en rumiantes y después de un estudio con material de Alemania y del Museo Zoológico de Berlín, llegó a la conclusión que *Trichuris globulosa*, hasta entonces descrita sólo en camellos, era una especie parásita común de ovejas y cabras.

Sprehn (1927), volvió a describir ambas especies *T.globulosa* y *T.ovis*, y subrayó la importancia de las diferencias en la vaina y la espícula en estas especies.

Además, Chandler (1930), añadió que el tamaño de la espícula era la característica más importante en la diferenciación de las especies, pero que otras características morfológicas son necesarias cuando las espículas de estas dos especies son similares.

Baylis (1932), describió el aspecto y la estructura de la vaina en *T. ovis* y *T. globulosa* y encontró diferencias constantes. Sin embargo, él ni siquiera propuso una aplicación de este criterio en la diferenciación taxonómica de otras especies de este género, no teniendo ningún peso en las especies descritas más tarde.

Sarwar (1959), diferenció dos grupos: grupo "trichiura" y grupo "ovis", estando este último grupo dividido en grupo "ovis" y grupo "skrjabini". Este autor designó una nueva subfamilia (Buckleyurinae n.subfam.) para la recepción del género constituido por los grupos de "ovis" y "skrjabini" y designó el género *Buckleyuris* con la especie tipo: *B. ovis*. Además, él incluyó *T. globulosa* en este género.

La bibliografía consultada indica que son tres las especies de *Trichuris* que parasitan los ciegos de cabras y ovejas en Europa: *T. ovis* (Abildgaard 1795), *T. globulosa* (Von Linstow 1901), y *T. skrjabini* (Baskakov 1924), mientras que sólo *T. ovis* y *T. skrjabini* han sido citadas en *Ovis aries* en los Estados Unidos.

T. skrjabini fue aislada por primera vez en camellos y su diferenciación específica

la realizó Skrjabin, Shikhobalova y Ohno en 1957, atendiendo a su espícula de pequeño tamaño con punta redondeada y a unas papilas caudales cónicas, en los machos de *T.skrjabini*, mientras que en *T.ovis* la espícula es larga con el extremo puntiagudo y pequeñas papilas caudales. Además la vulva evaginada de *T.ovis* es ancha y cubierta por espinas como papilas, mientras que en *T.skrjabini* es más pequeña y está cubierta por espinas afiladas (Knight, 1971).

La diferenciación entre *T.ovis* y *T.globulosa* ha sido recopilada por Skrjabin y col. (1957). Según estos autores, ambas especies son muy similares en cuanto a la forma y tamaño del cuerpo y de los huevos. Ambas especies poseen un bulbo o abultamiento esférico en el extremo distal de la vaina espicular cuando está completamente evaginada, pero mientras que en *T.ovis* las espinas en este bulbo son más pequeñas que en el resto de la cubierta, en *T.globulosa* las espinas son mucho más largas en el bulbo y por lo general en toda la vaina espicular, así como más densas que en *T.ovis*. También se diferencian ambas especies por el tamaño de las espículas; así, mientras que en *T.ovis* la longitud es de 4.9-7.2 mm por 0.01-0.04 mm, en *T.globulosa* el tamaño de la espícula es 3.8-5.7 mm por 0.032-0.050 mm. Por lo tanto, la espícula en *T.globulosa* es marcadamente más corta y gruesa que en *T.ovis*.

A la vista de los antecedentes anteriormente citados, el estudio de los nematodos de la ganadería española, y en concreto la andaluza, ha tenido y tiene un doble interés extraordinario:

1º.- ya que dichas especies producen infestaciones, en su mayoría enzoóticas y en bastantes casos en forma epizoótica, con porcentajes que oscilan del 68% al 78%, ocasionando pérdidas económicas considerables por descenso en la producción, debido a las tasas de morbilidad y mortalidad.

2º.- porque, en algunas ocasiones, la identificación específica de muchos helmintos parásitos constituye un gran problema, bien porque los ciclos de vida, a veces complejos, dan origen a una serie de formas larvarias y adultas distintas que complican el establecimiento de relaciones entre diferentes estados de desarrollo de las diversas especies, o bien porque entre las muchas especies de nematodos descritas pueden existir sinonimias, debido a que reflejan la aceptación de una especie nueva sólo por el hecho de haber sido encontrada en un hospedador distinto al habitual. Este hecho ha sido sugerido por Knight (1984) para las especies del género *Trichuris*.

Así, la importancia del estudio de estos parásitos podría plantearse bajo diversos ángulos:

- Desde el punto de vista clínico o patológico.
- Desde el punto de vista de producción o zootécnico.
- Desde el punto de vista bromatológico.
- Desde el punto de vista sanitario.
- Desde el punto de vista de la especiación y evolución de estos nematodos parásitos.

I. 4. IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS ELECTROFORETICOS EN LA TAXONOMIA DE HELMINTOS PARASITOS

Hasta hace muy pocos años, el estudio taxonómico de los nematodos se ha basado en diferencias fenotípicas, más o menos constantes, entre las distintas especies. Así, la taxonomía, tradicionalmente, se ha basado en consideraciones morfológicas externas de los individuos como base para su clasificación. No obstante, las características morfológicas externas se encuentran sometidas a cambios de muy distinta índole que haría, en algunos casos, difícil la diferenciación de especies alejadas entre sí y cuyos rasgos fenotípicos son, aparentemente, iguales.

Así, el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones parásitas representaría un paso significativo para fijar la continuidad taxonómica entre distintos estadios dentro de los ciclos de vida, así como aportaría datos más fiables y constantes que los puramente morfológicos.

El uso de métodos bioquímicos para el análisis de relaciones genéticas entre "taxa" morfológicamente similares, está bien aceptado en Sistemática (Oxford y Rollinson, 1983).

Uno de los intentos más utilizados es el análisis de aloenzimas, particularmente para la detección de especies hermanas, las cuales están presentes en muchos grupos

de animales incluyendo los helmintos (Bullini, 1985; Nasceti y col., 1986; La Rosa y col., 1992).

El estudio electroforético de las variaciones de las proteínas en poblaciones naturales, ha iniciado una nueva era para el entendimiento de la genética básica en los procesos de especiación (Bullini, 1982).

La electroforesis, se ha convertido en un instrumento de gran valor para definir la sistemática de nematodos donde los criterios como las diferencias morfológicas, son insuficientes para diferenciar cepas genéticamente distintas dentro de una misma especie (Friedman y col., 1977; Pozdol y Noel, 1984; Mydyski y col., 1985).

Así, la electroforesis de proteínas, es la única técnica que permite el estudio simultáneo de muchos genes, dentro de un mismo individuo, de una forma rápida y relativamente barata. A priori, estos genes pueden ser considerados como muestras al azar, de la estructura génica de los organismos. Las técnicas electroforéticas (almidón, acrilamida, etc.) permiten analizar de veinte a treinta individuos al mismo tiempo (Pasteur y col., 1988) (Cutillas y col., 1992).

La electroforesis en gel, es una técnica bioquímica bien conocida, y muy utilizada para la medida de la variación genética dentro y entre poblaciones de especies (Avisé, 1975). Especies muy cercanas, pueden diferir en sus patrones electroforéticos

obtenidos mediante electroforesis en gel (Rodríguez y col., 1991).

Técnicas isoenzimáticas han sido aplicadas satisfactoriamente para la identificación de géneros y cepas de muchos helmintos parásitos, incluyendo cestodes (McManus y Smyth, 1979; Fukumoto y col., 1987; Lymbery y Thompson, 1988; Andrews y col., 1989; Novak y col., 1989; Paggi y col., 1991). Los estudios más recientes han combinado trabajos morfológicos y bioquímicos (De Vos y col., 1990; Reversat y col., 1991; Snábel y col., 1994).

En relación a los nematodos parásitos, el estudio de loci múltiples mediante electroforesis en nematodos ascaridoideos ha proporcionado importantes resultados; así, ha permitido estudiar la estructura génica de poblaciones naturales y comparar su variabilidad genética usando parámetros apropiados; evaluar la divergencia genética y filogenética existente entre géneros; detectar especies hermanas; ayudar a identificar especies por medio de llaves bioquímicas, en larvas y estados adultos, y estudiar el fenómeno de hibridación y su significado evolutivo (Paggi y col., 1985).

Para un genético, el estudio de las proteínas representa la posibilidad de estudiar funciones sencillas determinadas directamente por uno o pocos genes. De este modo, la relación entre fenotipo (proteína) y genotipo (gen proteico) se hace más clara. Para un genético de poblaciones, el estudio de la variabilidad proteica representa, además, la posibilidad de cuantificar la variabilidad genética sin estar condicionado "a priori"

por la variabilidad o no del locus a estudiar. La estructura genética de una población es un conocimiento básico para entender el mecanismo evolutivo; por esta razón la posibilidad de separar los distintos variantes de un mismo enzima (isoenzima) mediante técnicas físicas abrió a la genética evolutiva nuevas posibilidades de estudio.

Mediante el uso de proteínas enzimáticas y no enzimáticas, numerosas investigaciones se han enfocado en el estudio de la variabilidad genética de poblaciones naturales, flujo de genes, hibridación, diferenciación de especies y relaciones filogenéticas entre otros problemas. En la actualidad la frecuencia de estas investigaciones no ha decaído, por el contrario ha aumentado debido al refinamiento y desarrollo de nuevos métodos.

Dos tipos de formas proteicas pueden ser observadas simultáneamente mediante el uso de métodos electroforéticos: isoenzimas y aloenzimas.

I.5. HETEROGENEIDAD EN LOS ENZIMAS: CONCEPTO DE ISOENZIMA

I. 5. a. Principios generales de las proteínas

Las proteínas están formadas por aminoácidos unidos mediante enlaces covalentes para formar los polipéptidos. Esta secuencia, o "estructura primaria", está determinada genéticamente. Cada uno de los 20 aminoácidos diferentes poseen una

única cadena lateral, caracterizada por su aspecto, tamaño y carga. Las cadenas laterales de tres de estos aminoácidos son básicas y cargadas positivamente (NH_3^+ ; lisina, arginina e histidina), y de dos son ácidas y cargadas negativamente (COO^- ; ácido aspártico y ácido glutámico). Estas cadenas laterales cargadas, son las responsables del movimiento de las proteínas a través del gel durante la electroforesis. La carga neta de cada proteína varía con el pH; a un pH bajo, los grupos aminos están cargados positivamente, y a un pH alto, los grupos carboxilos se cargan negativamente. La mayoría de las proteínas tienen un punto en el cual las cargas positivas y negativas son iguales, es el punto isoelectrico. Las proteínas isoelectricas no se mueven en un campo eléctrico porque ellas no son atraídas ni por el ánodo (positivo), ni por el cátodo (negativo).

Todas las técnicas electroforéticas se basan en la aplicación de un campo eléctrico y tampones iónicos a una matriz soporte (gel o tiras de acetato de celulosa, gel de almidón etc.). La corriente eléctrica es aplicada en los extremos opuestos de la suspensión (tampones iónicos). Las moléculas (ej. proteínas) cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el cátodo, y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.

Después de la electroforesis, las proteínas pueden ser visualizadas utilizando distintos métodos, siendo las tinciones específicas el usado más frecuentemente. Las proteínas individuales son teñidas selectivamente.

La mayoría de las tinciones constan de un sustrato específico para el enzima, permitiendo catalizar su reacción particular y desarrollar un color que pueda distinguirse mediante luz normal o por fluorescencia mediante luz ultravioleta. Así, de cientos o miles de enzimas del extracto crudo, podrán ser identificadas aquéllas que utilicen el mismo sustrato.

Son muchos los tampones iónicos que pueden ser utilizados para electroforesis. Los tampones cumplen algunas funciones. La primera función es que el tampón evita el cambio de pH, el cual ocurre durante la electroforesis: el ácido se produce en el ánodo y la base en el cátodo. El cambio de pH es directamente proporcional a la duración de la electroforesis, al voltaje y a la corriente generada. Los tampones también establecen una conexión iónica entre el aporte eléctrico (electrodos) y el medio (gel) y reducen las interacciones entre los grupos cargados de las proteínas con los grupos cargados de la matriz y pueden modificar la carga neta de las proteínas, llevar enzimas estabilizadores (ej. disodio EDTA) y proporcionar catalizadores enzimáticos (ej. Mg^{2+}).

La secuencia de aminoácidos de las proteínas puede cambiar debido a mutaciones que se producen en el locus del ADN que las codifica. Dichas mutaciones pueden alterar el aspecto y la carga neta, así como la eficiencia catalítica y estabilidad (Shaw, 1965). La electroforesis de proteínas nos ayuda a revelar algunos de esos cambios (Murphy y col. 1990).

I. 5. b. Concepto de isoenzima

Los isoenzimas se descubrieron hace veinte años, al principio se consideraron como algo interesante pero que ocurría pocas veces. Desde entonces, se conoce mucha información sobre la heterogeneidad de las enzimas y se sabe que, al menos la mitad de ellos, existen como isoenzimas. Esto es muy importante en muchas ramas de la Biología y la Medicina. Así, los estudios isoenzimáticos proporcionan una herramienta experimental importante en Genética y Evolución. Además, los isoenzimas nos ayudan a entender la regulación del metabolismo, no sólo en animales sino también en bacterias y plantas, y su existencia nos ha provisto de ayuda para el estudio de la diferenciación y el desarrollo, así como de indicios sobre aberración en la expresión genética en carcinogénesis y otros procesos patológicos. Los isoenzimas también se están usando en el diagnóstico bioquímico clínico.

Es curioso que este fenómeno que afecta a una gran cantidad de enzimas y que es claramente importante en Bioquímica, reciba escasa atención en los libros de texto (Rider y Taylor, 1980).

Aunque puede haber ligeras diferencias físicas en un enzima determinado cuando es producido por diferentes células, estas circunstancias suelen ser poco importantes y el enzima continúa siendo el mismo, en esencia. En efecto, lo normal en enzimología desde el punto de vista práctico, es que el origen de un enzima sea, generalmente, un

asunto un tanto secundario. Para el enzimólogo, el origen de un enzima podrá merecer poca consideración, pero para el bioquímico clínico es de importancia primordial (King, 1968).

Es difícil encontrar identidad molecular o enzimática entre los enzimas funcionalmente similares pero procedentes de distintas especies, por tanto, se deduce que deben existir numerosas proteínas con funciones biológicas muy parecidas. Aunque la existencia de enzimas funcionalmente similares, pero distinguibles entre sí, había sido aceptada provisionalmente, este fenómeno no fue reconocido universalmente hasta la demostración, por Wieland y Pfeiderer (1957), de la presencia, en un mismo tejido, de varias lactato-deshidrogenasas separables físicamente.

Por medio de electroforesis en almidón, Vesell y Bearn (1957, 1958), consiguieron la separación en tres componentes cada una, de las lactato-deshidrogenasas séricas humanas y Sayre y Hill (1957) y Hill (1958), demostraron también la heterogeneidad de la lactato-deshidrogenasa sérica humana, usando electroforesis en papel con flujo continuo y elución con un gradiente constante de sulfato amónico, procedimientos gracias a los cuales consiguieron separar cuatro fracciones. Estos estudios señalan la posible existencia de formas orgánico-específicas de dichos enzimas, presentes por doquier.

Debido a que tales formas podrían ser de la mayor importancia diagnóstica, esta

posibilidad dió un considerable impulso a nuevas investigaciones. Se sabe actualmente que los tejidos humanos contienen cinco proteínas que manifiestan actividad lactato-deshidrogenasa; aunque ninguna de ellas es específica de un determinado órgano, las concentraciones relativas de estas formas varían de un órgano a otro y dan lugar a una regla órgano-específica con potencialidad diagnóstica.

Desde entonces, muchos trabajos realizados se han concentrado en el fraccionamiento de la lactato-deshidrogenasa sérica, pero el principio de la enzimo-electroforesis; es decir, la separación y localización de enzimas por procedimientos electroforéticos y la interpretación de los consiguientes zimogramas han sido ampliados a otros enzimas séricos (King, 1968).

Wieland y Pfeiderer (1957), sugirieron el nombre de heteroenzima para las proteínas de diferente origen y que ejercían la misma acción biológica, pero que diferían en sus propiedades físicas, químicas o bioquímicas y que el nombre de isoenzima o forma múltiple, se daría a los enzimas del mismo origen con propiedades muy similares pero distinguibles.

Markett y Möler (1959), propusieron el nombre de isoenzima para las diversas formas moleculares en que pueden presentarse las proteínas con la misma especificidad; pero estos investigadores señalaron que todos los isoenzimas de la LDH eran semejantes en la eficiencia catalítica relativa que presentan para estos diferentes sustratos.

Webb (1960) indicó, además, que la distinción fundamental entre aquéllos que son reconocidos como enzimas e isoenzimas diferentes (Wroblewski y Gregory, 1960) podría radicar en que los primeros son sintetizados bajo el control de genes diferentes, en tanto que los isoenzimas serían modificaciones del producto de un sólo gen. Sin embargo, en nuestro estado actual de conocimientos, no tiene repercusión práctica ni esta definición ni la dada por Augustinsson (1961), quien sugirió que el término de isoenzima o isozima fuera reservado para los enzimas cuya estructura molecular difiriera sólo en aquellas partes de la molécula que no estuvieran implicadas directamente en la reacción enzimática.

La aspartato-transaminasa (Heisher y col., 1960), (Boyd, 1961), y la malato-deshidrogenasa (Thorne, 1960), procedentes de extractos de tejidos simples, han sido separadas en dos componentes cada una por medio de procedimientos electroforéticos. Una de las formas de cada enzima está localizada en las mitocondrias celulares y probablemente se halla ligada a un componente lipóide, pero estas enzimas mitocondriales manifiestan también diferencias en el comportamiento cinético comparativamente con las formas solubles citoplasmáticas. Webb (1960), cree que tales especies enzimáticas pueden ser, razonablemente, consideradas como enzimas diferentes.

La Comisión de Nomenclatura Bioquímica exigió en 1971 que además de diferenciarse las proteínas que catalizan la misma reacción, por la carga eléctrica, las

constantes cinéticas, el pH óptimo, la termoestabilidad o incluso la acción sobre un sustrato secundario, debían ser determinadas genéticamente, de esta forma se excluía las variantes o alelos y las modificaciones post-sintéticas.

Sin embargo, los términos de formas multimoleculares, formas múltiples, isoenzimas, isozimas, han sido empleados sin reglas precisas. Según las recomendaciones de la Unión Internacional de Bioquímica en 1978, el término de formas múltiples debe reservarse para el sentido más general y el término de isoenzima para las formas múltiples que tienen por origen una modificación del genoma y que no pueden concernir a las modificaciones diversas introducidas después de la síntesis de la molécula proteica.

Cuando la acción de dos o más loci son detectados mediante tinciones enzimáticas, cada uno de los genes involucrados corresponden a diferentes enzimas, pero todos los enzimas tienen la misma función. Juntas constituyen un sistema enzimático, el cual es revelado por el mismo protocolo, por ejemplo el sistema lactato deshidrogenasa está constituido por una serie de enzimas puestas de manifiesto mediante tinciones: LDH₁, LDH₂, LDH₃...etc. Para la Comisión Enzimática cada sistema enzimático es sólo un enzima, teniendo en cuenta su actividad fisiológica. Para los genéticos, sin embargo, cada sistema es más una categoría de enzimas, que un simple enzima (Pasteur y col., 1988).

Lehninger (1991), definió los isoenzimas como formas múltiples de un enzima determinado, que puede presentarse en una sola especie de organismo e incluso en una sola célula. Puesto que están codificados por genes diferentes, los isoenzimas difieren en su composición de aminoácidos y por lo tanto, en los valores de sus pH isoeléctricos.

I. 6. RELACION GEN-ENZIMA

El soporte físico del material genético son los ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (ADN) en la mayoría de los seres vivos y ácido ribonucleico (ARN) en algunos virus. Un gen es una parte de ácido nucleico que determina, a través de un proceso complejo, el orden de los aminoácidos en la síntesis de las cadenas polipeptídicas, las cuales constituyen las proteínas. Los genes pueden dirigir también la síntesis de ARN que interviene directamente en el metabolismo celular. La función de las proteínas es básica, no sólo porque constituye un importante material estructural de los seres vivos, sino sobretodo, porque, ciertas moléculas proteicas, los enzimas, permiten que se lleven a cabo las reacciones metabólicas (Lehninger, 1988).

Para un genético, el estudio de las proteínas representa la posibilidad de estudiar funciones sencillas determinadas directamente por uno o pocos genes. De este modo, la relación entre fenotipo (proteína) y genotipo (gen) se hace más clara. Para un genético de poblaciones, el estudio de la variabilidad proteica representa, además, la

posibilidad de cuantificar la variabilidad o no del locus a estudiar (Fondevila, 1978).

La estructura genética de una población es un conocimiento básico para entender el mecanismo evolutivo, por esta razón la posibilidad de separar las distintas variantes de un mismo enzima (isoenzima) mediante técnicas físicas, abrió a la genética evolutiva nuevas posibilidades de estudio.

Las técnicas de estudio de proteínas, permiten distinguir no sólo los distintos isoenzimas producto de loci diferentes, sino también reconocer los isoenzimas determinados por alelos de un mismo locus (alozimas o aloenzimas). Mediante el estudio estadístico de las frecuencias con que aparecen las bandas alozímicas en una población, se puede hacer un recuento de la heterocigosis media para un conjunto representativo de loci alozímicos (Fondevila, 1978).

La genética molecular ha descifrado que las mutaciones genéticas determinan cambios estructurales en el ARN, que se traducen en cambios proteicos.

Muchos de estos cambios consisten en sustituciones de un aminoácido por otro. Por ejemplo, el mutante que produce la anemia falciforme en el hombre provoca en la hemoglobina la sustitución del ácido glutámico por la valina.

Las mutaciones que provocan sustituciones de aminoácidos se producen

continuamente en la evolución de los seres vivos y muchas consiguen fijarse en homocigosis.

Algunas de estas sustituciones producen cambios en la carga superficial de las proteínas que se detectan mediante las técnicas de electroforesis. Si estudiamos la secuencia de aminoácidos de una misma proteína en distintos organismos encontramos distintos números de sustituciones. Es lógico que cuanto más alejadas evolutivamente estén dos especies, mayor número de aminoácidos diferentes contendrá la misma proteína en ambas. Utilizando estas diferencias moleculares se pueden construir árboles filogenéticos (Fondevila, 1978).

La electroforesis ha sido utilizada por los genéticos desde el año 1957, en el que Hunter y col. (1957), tuvieron la idea de utilizar las propiedades catalíticas de los enzimas para revelar su presencia con métodos histoquímicos (electroforesis de zona). De esta forma, es posible identificar unas pocas moléculas con actividad catalítica a partir de un extracto sin purificar, conteniendo miles de proteínas diferentes. Tales sustancias se conocen como isoenzimas. En cada organismo, el número de isoenzimas con actividad catalítica dada, es generalmente muy pequeño, de forma que en el gel solamente aparecen unas pocas bandas coloreadas. Cada una de estas bandas corresponden a una proteína diferente, cuya síntesis está controlada por uno, dos o más genes. Los fenotipos enzimáticos observados en los geles pueden, por lo tanto, ser interpretados en términos de genotipo, o lo que es lo mismo, en términos de genes y

sus alelos.

Los genes que codifican proteínas tienen dos propiedades básicas que los hace un material de elección para los genéticos. La primera de ellas es que una importante proporción de estos genes son polimórficos, de manera que existen en la forma de uno o más alelos. Esta propiedad que fue descrita por Hubby y Lewontin (1966) en *Drosophila* y por Harris (1966) en el hombre, se ha encontrado presente prácticamente en todas las especies animales y vegetales que se han estudiado (Pasteur, 1974), (Tanskesley y Orton, 1983).

La segunda propiedad es que los alelos de los genes que codifican proteínas son generalmente codominantes, es decir que ambos alelos se expresan en los organismos heterocigóticos. Este fenómeno permite relacionar los fenotipos observados con un determinado genotipo.

I. 7. FRECUENCIAS ALELICAS Y LEY DE EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

Después que un enzima se ha teñido, aparecen un número variable de bandas. Esas bandas son llamadas isoenzimas y pueden corresponder a:

- el producto de la expresión de varios genes en varios loci.

- el producto de la expresión de varios alelos de un gen dado en un locus determinado.

- moléculas producidas por cambios conformacionales de una molécula proteica.

- moléculas sintetizadas por un gen o grupo de genes, los cuales poseen varias transformaciones post-transcripcionales.

Para caracterizar ciertas propiedades de la población, o comparar poblaciones, pueden elaborarse parámetros estadísticos, en base a las frecuencias alélicas teóricas y genotípicas observadas.

El conocimiento de las frecuencias genotípicas supuestas bajo la ley de Hardy-Weinberg es, directa o indirectamente, la base de la gran mayoría de los estudios genéticos usando electroforesis de proteínas, es decir aquellos estudios que se basan en la comparación e identificación de individuos.

Una población se define como un grupo o comunidad de individuos de la misma especie, que habitan una zona determinada. Según esta definición, las especies pueden ser asexuales. Una población Mendeliana es aquella donde los individuos también se cruzan y son fértiles entre ellos: las especies envueltas serán sexuales y biparentales.

El modelo genético al cual nos referimos para interpretar el polimorfismo, se basa en la idea de un tamaño de población infinito, dentro del cual todos los individuos

de un sexo tienen la misma probabilidad de encontrar un individuo del otro sexo (cruce al azar o panmixia). En el caso usual de un diploide, la distribución de los genes y genotipos en cada locus está gobernada por la ley de Hardy-Weinberg, excepto para mutaciones nuevas y reproducción diferencial de un alelo. Esta ley dice:

1. La población está en equilibrio genético, o sea que las frecuencias alélicas y genotípicas son estables de generación en generación.

2. La frecuencia genotípica viene dada por el cuadrado de la suma de las frecuencias alélicas. Si p = frecuencia relativa de un alelo A_1 , y q = frecuencia relativa de un alelo A_2 ; las frecuencias de los tres genotipos correspondientes vienen dadas por la ecuación:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = A_1A_1 + 2A_1A_2 + A_2A_2$$

Estas frecuencias son relativas, de forma que si el gen considerado sólo tiene dos alelos, la suma de sus frecuencias es 1.

La suma de sus frecuencias genotípicas es, por lo tanto también 1.

Si $p + q = 1$, $(p + q)^2 = 1$, por lo que $p^2 + q^2 + 2pq = 1$.

Lo mismo ocurre cuando existen muchos alelos:

$$\begin{aligned} q_1 + q_2 + q_3 + \dots + q_n &= 1 \\ &= q_1 + q_2 + q_3 + \dots + q_n + 2q_1q_2 + \dots + 2q_{n-1}q_n \end{aligned}$$

Un punto importante a recordar en el estudio de los polimorfismos de proteínas, es que la proporción de los genotipos formados por uno de los alelos con respecto al resto de todos los demás tomados como un conjunto, es la misma que si los otros alelos fueran solamente uno. De manera que es bastante frecuente agrupar los alelos raros.

La frecuencia de un alelo dado es siempre igual a la suma de las frecuencias de sus homocigotos más la mitad de la frecuencia de los heterocigotos que tienen ese alelo, para una población, esté o no en equilibrio genético en el locus estudiado.

Los tests de contingencia se utilizan para comparar las frecuencias alélicas entre poblaciones, entre generaciones, o entre cromosomas homólogos no recombinantes.

Los tests de la ley de Hardy-Weinberg se basan en frecuencias fenotípicas, y se usan más frecuentemente en el estudio genético de poblaciones naturales. Las precondiciones del equilibrio de Hardy-Weinberg son: la existencia de panmixia y la ausencia de reproducción diferencial entre alelos.

MATERIAL

Y METODOS

II. MATERIAL Y METODOS

II. 1. MATERIAL

II. 1. 1. Parásitos

II. 1. 1. a. Nematodes pulmonares

Protostrongylus rufescens (Leuckart, 1865)

Dictyocaulus filaria (Rudolphi, 1809) (Railliet y Henry, 1907)

Se han recolectado 142 individuos (machos y hembras) de *P.rufescens* procedentes de pulmones de *Capra hircus*, así como, 160 individuos de *D.filaria* a partir de *Capra hircus* y *Ovis aries*, sacrificadas en distintos mataderos de las provincias de Sevilla y Huelva (España).

Los pulmones procedentes del hospedador eran trasladados al laboratorio en bolsas herméticamente cerradas. Una vez allí, se procedía a la extracción del material parasitario con la ayuda de tijeras, pinzas y agujas enmangadas; posteriormente, los nematodes eran depositados en cajas Petri conteniendo solución salina fisiológica al 0.9% (p/v), siendo lavados repetidas veces en dicha solución, con el fin de eliminar todos los productos procedentes del hospedador. A continuación, los gusanos eran

clasificados por especie y sexo con ayuda de una lupa, para posteriormente ser almacenados individualmente en tubos Eppendorf y congelados a -80°C hasta su uso.

Para el estudio morfológico más detallado se cortaba la parte posterior del macho y la zona vulvar de la hembra, siendo introducidos en alcohol-glicerina al 4% para su transparentación.

II. 1. 1. b. Nematodes intestinales

A partir del ciego de *Ovis aries* y *Capra hircus* se han aislado las siguientes especies:

Trichuris ovis (Abilgaard, 1795)

Trichuris globulosa (Von Linstow, 1901)

Trichuris skrjabini (Baskakov, 1924)

Oesophagostomum venulosum (Rudolphi, 1809)

Chabertia ovina (Fabricius, 1794)

Los ciegos procedentes del hospedador eran transportados en bolsas herméticamente cerradas hasta el laboratorio.

Posteriormente con ayuda de pinzas, tijeras y agujas enmangadas eran extraídos los distintos nematodes del ciego y depositados en placas Petri con solución salina fisiológica al 0.9% (p/v).

Los gusanos eran lavados y desprovistos de restos procedentes del hospedador y así mismo clasificados por especie y sexo, siendo depositados individualmente en tubos Eppendorf para ser almacenados y congelados a -80°C , hasta su posterior estudio electroforético.

Algunos ejemplares eran transparentados con ayuda de alcohol-glicerina al 4% o alcohol-acético 10% caliente para su estudio morfológico. En el caso concreto de las especies de *Trichuris* y para su determinación específica, se procedió a cortar la zona caudal del macho y la zona vulvar de la hembra. Este material se conservó en tubos Eppendorf conteniendo alcohol-glicerina al 4% hasta su posterior estudio microscópico. El resto del gusano se congeló para el estudio electroforético subsiguiente. De esta forma cada patrón isoenzimático podía ser comparado con cada individuo concreto correctamente identificado.

II. 2. METODOS

II. 2. 1. Criterios taxonómicos adoptados para la identificación de las distintas especies de nematodos parásitos

II. 2. 1. a. Nematodos pulmonares: *Protostrongylus rufescens*

Es el gusano rojo del pulmón de las ovejas y cabras. Se encuentra en la tráquea, bronquios y bronquiolos de la oveja, cabra y afines por todo el mundo.

Las características taxonómicas de esta especie son las citadas por Cutillas (1984).

Macho:

- Tamaño: 2.6-4.2 (3.6) cm de longitud total.
- Apertura oral rodeada de seis peritilos: un par dorsal y dos pares ventrales.
- Esófago en forma de maza.
- Espículas delgadas, largas y muy quitinizadas.
- Longitud espicular: 242-321 (290) micras.
- Espículas con alas membranosas pectinadas formando estrías.
- Gubernáculo presente y formado por: capítulo, cuerpo y cruras.

Hembra:

- Tamaño: 4.8-7.3 (5.5) cm de longitud total.
- Parte posterior del cuerpo conoide.
- Ano subterminal.
- Vulva subterminal.

II. 2. 1. b. Nematodes pulmonares: *Dictyocaulus filaria*

Es el gran gusano pulmonar de los ovinos. Se presenta en la tráquea, bronquios y bronquiolos de la oveja, cabra y varios rumiantes silvestres de todo el mundo.

Para su identificación específica se ha seguido a Cutillas (1984).

Macho:

- Color blanquecino.
- Tamaño: 5-7.3 (6.4) cm de longitud.
- Cápsula bucal pequeña.
- Vesículas cefálicas no siempre visibles.
- Espículas robustas y muy quitinizadas unidas en su base.
- Longitud espicular: 404-603 (510) micras.
- Gubernáculo presente y poco quitinizado.

- Bolsa copulatriz no lobulada con trece radios.

Hembra:

- Tamaño: 7.5-12 (9.4) cm de longitud total.
- Sistema genital doble.
- Vulva formada por dos labios muy marcados y localizada en la región media del cuerpo.
- Ano subterminal.

II. 2. 1. c. Nematodos intestinales: *Oesophagostomum venulosum* y *Chabertia ovina*

Los estrogilados que parasitan el tracto gastrointestinal de los ovinos son nematodos de pequeño tamaño, no sobrepasando los 36 mm de longitud.

Características generales:

- Cápsula bucal, en ocasiones, bien desarrollada.
- Expansiones cuticulares en la región cefálica a veces presente.
- Aparato reproductor bien desarrollado.
- Aparato genital de la hembra doble. Vulva localizada en el tercio posterior del cuerpo.
- Bolsa copulatriz presente.

Género *Oesophagostomum*

Los miembros de este género se localizan en el intestino grueso y son de color ligeramente amarillento, presentando las siguientes características:

- Cápsula bucal cilíndrica o rectangular bien desarrollada.
- En el extremo anterior presentan papilas cervicales y un surco cervical ventral.
- Las especies de interés son : *Oesophagostomum columbianum* y *Oesophagostomum venulosum*. Las características morfológicas de esta especie son las descritas por Neveu-Lemaire (1936).
- Boca dirigida hacia adelante y rodeada por un collar bucal que sostiene a las papilas cefálicas y que se delimita posteriormente de forma marcada por un anillo profundo.
- No hay alas laterales.
- Papilas cervicales por detrás del final del esófago y situadas a 1.25 mm de la extremidad cefálica.
- Boca circular y limitada por una corona externa formada por 18 elementos con su extremo redondeado. La corona interna está formada por 36 escamas dispuestas de dos en dos en la base de cada elemento de la corona externa.
- Cápsula bucal aproximadamente cinco veces más ancha que larga.
- Embudo esofágico corto.
- Glándulas cefálicas, cervicales y esofágicas típicas.

Macho:

- Tamaño: 11-16 mm de longitud total.
- Bolsa copulatriz con radios ventrales yuxtapuestos; radios laterales que parten de un tronco común; radio lateral medio y lateral posterior unidos; teniendo el radio dorsal externo y el radio dorsal un origen común, bifurcándose a nivel de la mitad de su longitud en dos ramas, cada una de las cuales presenta una corta rama lateral.
- Longitud espicular: 1.1-1.5 mm.
- Presencia de gubernáculo.

Hembra:

- Tamaño: 13-24 mm de longitud.
- Ano situado a 150-200 micras de la extremidad caudal.
- Vulva situada a 310 micras por delante del ano.

Género *Chabertia*

La única especie es *Chabertia ovina* que se localiza en el intestino grueso de ovejas y cabras.

La diferenciación específica se ha basado en Neveu-Lemaire (1936).

Características generales:

- Color blanco.
- Cuerpo cilíndrico con la extremidad cefálica ensanchada y ligeramente curvada hacia la cara ventral.
- Anillo peribucal formado por una doble corona de numerosos dentículos triangulares y puntiagudos.
- Cápsula bucal grande y cilíndrica.

Macho:

- Tamaño: 13-14 mm de longitud total.
- Lóbulo dorsal de la bolsa copulatriz un poco más largo que los lóbulos laterales.
- Radio lateral anterior muy grueso; radios laterales medio y posterior yuxtapuestos.
- Papilas prebursales presentes.
- Espículas delicadas y aladas.
- Longitud espicular: 1.3-1.7 mm.
- Gubernáculo presente.

Hembra:

- Tamaño: 17-20 mm de longitud total.
- Extremo posterior delgado estrechándose bruscamente y acabado en punta corta

curvada dorsalmente.

- Ano y vulva subterminales.

II. 2. 1. d. Nematodes intestinales: *Trichuris sp.*

Se localizan en el ciego y con menos frecuencia en otras partes del intestino grueso. Se encuentran en distintos hospedadores dependiendo de la especie.

Características generales (Dunn, 1983):

- Extremo anterior largo y filamentososo, que mide más de dos veces lo que el extremo posterior.
- Longitud y grosor variable según la especie.
- Color blanco.
- Macho con la cola en forma de espiral muy cerrada.
- Porción posterior de la hembra doblada en forma de gancho.
- Espícula única larga y delgada, y se encuentra dentro de una vaina gruesa que puede tener espinas.
- La estructura de la vaina espicular es una de las características más específicas para su identificación.
- El extremo anterior posee una punta afilada para poder penetrar en la mucosa.

La identificación específica de *T.skrjabini* está basada en Skrjabin y col. (1957).

Macho:

- Tamaño: 45.2-65.6 mm de longitud.
- Longitud espicular: 0.84-1.50 mm.
- Papilas caudales cónicas.
- Vaina espicular normalmente cilíndrica, sin bulbo y rodeada de espinas.
- Espícula, con punta redondeada, siempre cubierta por la vaina espicular.

Hembra:

- Tamaño: 60-75.4 mm de longitud.
- Vulva situada aproximadamente a nivel del paso del esófago hacia el intestino.
- Vulva evaginada pequeña, cilíndrica, cubierta por espinas afiladas.

La diferenciación entre *T.ovis* y *T.globulosa* ha sido recopilada por Skrjabin y col. (1957). Según estos autores, ambas especies son muy similares en cuanto a la forma y tamaño del cuerpo y de los huevos. Ambas especies presentan:

- Bulbo o abultamiento esférico en el extremo distal de la vaina espicular cuando está completamente evaginada, pero, mientras que en *T.ovis* las espinas de este bulbo son más pequeñas que en el resto de la cubierta, en *T.globulosa* las espinas son mucho más

largas en el bulbo y, por lo general, en toda la vaina espicular, así como más densas que en *T. ovis*.

- Tamaño de las espículas; mientras que en *T. ovis* la longitud es de 4.9-7.2 mm por 0.01-0.04 mm, en *T. globulosa* el tamaño de la espícula es 3.8-5.7 mm por 0.032-0.050 mm. Por lo tanto, la espícula en *T. globulosa* es marcadamente más corta y gruesa que en *T. ovis*.

Por todo lo anteriormente dicho, la diferenciación de estas dos especies de *Trichuris* resulta bastante complicada.

La longitud espicular ha sido citada por los distintos autores como uno de los criterios taxonómicos más importantes para diferenciar las especies de *Trichuris*. (Ver introducción). Teniendo en cuenta que existe un solapamiento en la medida de la longitud espicular en *T. ovis* y *T. globulosa*, los criterios taxonómicos adoptados para identificar a *T. globulosa* han sido:

a) Todos aquellos machos que presentan abultamiento esférico distal en la vaina espicular, presentándose éste, todo cubierto de espinas cuya longitud es mucho más larga que en el resto de la vaina espicular. Longitud espicular menor de 4.9 mm (ya que 4.9 mm es el valor mínimo de longitud espicular citado por los distintos autores para *T. ovis*).

b) Hembras con vulva no prominente.

Asimismo, en nuestro estudio, se han considerado 2 tipos de machos como pertenecientes a *T. ovis*:

a) Machos con abultamiento esférico distal en la vaina espicular, presentando espinas más cortas o de longitud similar que las del resto de la vaina espicular. Longitud espicular superior a 6 mm (ya que los distintos autores citan esta longitud de 6 mm como el valor máximo para *T. globulosa*).

b) Machos con vaina espicular uniformemente cilíndrica (sin abultamiento esférico), y longitud espicular entre 4.7-5 mm.

c) Hembras con la vulva situada justo detrás del esófago, muy prominente y con espinas en forma de papilas.

Por último, se identificará como población *T. ovis-T. globulosa* a todos aquellos individuos que no puedan ser encuadrados taxonómicamente como *T. ovis* o *T. globulosa* según las características citadas anteriormente. Es decir, incluirá todos aquellos individuos que presentando características morfológicas diferenciales en cuanto al abultamiento esférico, sin embargo, sus valores de longitud espicular oscilan entre 5-6 mm.

Por tanto, el estudio genético del complejo **'ovis-globulosa'** se ha realizado sobre cuatro tipos distintos de poblaciones de **Trichuris**:

1. T.globulosa

2. T.ovis

- a. Vaina espicular con abultamiento esférico.
- b. Vaina espicular uniformemente cilíndrica.

3. T.ovis-globulosa

II. 2. 2. Técnicas electroforéticas

II. 2. 2. a. Preparación de extractos de las especies parásitas para el estudio electroforético

El estudio de la actividad Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, EC 1.1.1.49), Glucosa fosfato isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9), Lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27) y Malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37) mediante técnicas electroforéticas, se llevó a cabo en las especies identificadas a partir de individuos aislados, separados por sexo y conservados a -80°C para evitar la pérdida de su actividad.

En el caso de *D.filaria*, *T.ovis*, *T.skrjabini*, *T. globulosa*, *O.venulosum* y *Ch.ovina* se añadió 50 ul de Tris-HCl pH=7.1 por individuo y se procedió a su homogenización en frío. A continuación se centrifugaron a 4°C y 12.000 r.p.m. durante 10 minutos, tras lo cual se recogió el sobrenadante y se pasó a un tubo Eppendorf conteniendo 5 ul de Azul de bromofenol (ver reactivos), utilizado como indicador de la marcha de la electroforesis. Finalmente las muestras fueron colocadas en los pocillos practicados en el gel a tal efecto.

En el caso de *P.rufescens* se añadió tan sólo un volumen de 25 ul de Tris-HCl pH=7.1, debido a su pequeño tamaño.

II. 2. 2. b. Técnicas electroforéticas: preparación del medio de soporte

La puesta a punto de la técnica electroforética para el estudio del patrón isoenzimático de las distintas enzimas en nematodos parásitos, ha supuesto el ensayo de varios sistemas electroforéticos con el fin de encontrar las condiciones de resolución isoenzimática óptimas para cada enzima. Para ello, se utilizaron ejemplares de cada parásito objeto de nuestro estudio como material de trabajo, y una vez estandarizado el sistema, se ensayaron los restantes individuos.

El gel de almidón es un medio de soporte que permite una buena separación de proteínas y lipoproteínas. Resuelve fracciones que pueden ponerse de manifiesto mediante tinción e inmunodifusión, radioisótopos u otros métodos, (Lewis, 1966). Esta técnica fue descrita por primera vez por Smithies (1955).

- Preparación del gel de almidón

Gel de almidón: 7.5 g de almidón hidrolizado para electroforesis, SIGMA, en 100 ml de tampón (La solución tampón utilizada en la fabricación del gel puede variarse ampliamente en cuanto a pH y constituyentes, dependiendo de la enzima que se esté ensayando). Además el tampón puente, localizado en los compartimentos externos, puede diferir del empleado en la fabricación del gel (Sistemas discontinuos).

La cubeta empleada para la realización de una electroforesis horizontal consta, básicamente, de un recipiente con tres compartimentos, uno interior donde se coloca el almidón-gel, limitado por dos trampillas que le separan de otros dos compartimentos y se conectan directamente a una fuente de alimentación, que origina el campo eléctrico.

El sistema de cubetas utilizados en el presente trabajo es la mini-gel horizontal unit model M60-100, mientras que la fuente de alimentación es el modelo 500/1000 de Bio-Rad y 500 de Stratagene de Cultek (Fig. 1).

En un vaso de precipitado calentar con suavidad al baño María el almidón en la solución tampón hasta que gelifique y quede un gel transparente y líquido (Fig. 1a,b). Verter sobre la cubeta con las trampillas levantadas hasta conseguir una lámina de 1 cm de espesor (Fig. 1c) y colocar un peine aproximadamente a un tercio de la longitud del gel, a partir del extremo catódico, con dientes de 3 mm para la formación de pocillos (Fig. 1d), posteriormente cargar las muestras individualmente.

La solución caliente de almidón se deja en reposo durante aproximadamente 3 horas o bien se deja en el frigorífico un máximo de 24 horas, para que solidifique bien. Después de retirar las trampillas, adicionar en la cubeta de electroforesis el sistema tampón de electrodos.

Con una micropipeta Hamilton, inyectar de 5 a 10 ul de muestra en los pocillos.

- Desarrollo electroforético

Tan pronto como la muestra se coloca en el gel, comienza la electroforesis aplicando el campo eléctrico que puede ser a voltaje o a amperaje constante (Fig. 1e). La electroforesis se desarrollaba aplicando una intensidad de corriente constante de 30 mA, durante 2-3 horas para los enzimas G6PD, LDH Y GPI y de un voltaje constante de 100 voltios, para el enzima MDH. La electroforesis se detuvo cuando el colorante (Azul de bromofenol) desaparecía de la parte posterior del gel.

La movilidad electroforética dependerá, igual que en los geles de poliacrilamida, del campo eléctrico, es decir, un alto voltaje causará una electroforesis más rápida.

-Tinción de los isoenzimas

Para poner de manifiesto las proteínas, se realiza generalmente una tinción específica.

Debemos considerar una serie de puntos en la localización de las proteínas en el gel. Lo más común es usar un colorante específico, que tiña las bandas pero no el gel. La elección del colorante dependerá de una serie de variantes, tales como:

1. El colorante debe teñir las proteínas en el tipo de la electroforesis usada.
2. La tinción debe ser sensible, para detectar la mínima cantidad de proteína en el gel.

3. Si se quiere cuantificar la proteína presente, será necesario utilizar un colorante que se una cuantitativamente a la proteína.

Una vez seleccionada la tinción, verter la mezcla de ésta sobre el gel, previamente retirado de la cubeta con ayuda de una espátula y colocar en una cubeta de tinción. Dejar en estufa a 37°C hasta que aparezcan las bandas de actividad enzimática, que aproximadamente es entre 2 y 6 horas.

Finalmente, fotografiar los geles en un transiluminador.

II. 3. CONTROLES

-Controles utilizados para el estudio de los distintos patrones isoenzimáticos en las distintas especies objeto de estudio

1. Control para detectar posibles restos procedentes del hospedador

Una vez seleccionadas las condiciones ideales de electroforesis, con objeto de descartar posibles restos procedentes del hospedador, se preparan extractos de distintos órganos (intestino ó pulmón, dependiendo de la localización de los parásitos), para determinar en él el patrón isoenzimático de la enzima a ensayar.

Así, en el caso de *P.rufescens* y *D.filaria* se preparan extractos a partir de pulmones de cabras u ovejas parasitadas; en *O.venulosum*, *Ch. ovina*, *T.ovis*, *T.globulosa* y *T.skrjabini* los extractos correspondían a ciegos de ovejas o cabras parasitadas. La preparación de estos extractos se llevó a cabo por homogenización de la muestra en Tris-HCl pH: 7.1.

2. Control de especificidad de la actividad LDH, MDH, G6PD y GPI

La especificidad de la tinción fue comprobada preparando mezclas de tinción (ver reactivos) en ausencia de sus sustratos correspondientes. De esta forma los geles son teñidos sin lactato sódico, ácido málico, glucosa 6P sal disódica y fructosa 6P

respectivamente.

3. Control de actividad de enzimas magnesio dependientes

Este control se lleva a cabo para detectar la posible presencia de enzimas denominados magnesio dependientes. Esto es, utilizan el Mg^{2+} como sustrato y se tiñen mediante la utilización de la reacción de óxido-reducción que lleva a la formación de formazán (producto final precipitado) observable como bandas oscuras en el gel. De las enzimas ensayadas por nosotros sólo la GPI llevaba Cl_2Mg en la mezcla de tinción. Se realizaron algunos ensayos en los cuales la electroforesis se llevaba a cabo normalmente. Posteriormente las tinciones se prepararon en ausencia de sustrato, permaneciendo el $ClMg_2$. Este actuaría como sustrato de dichos enzimas. No se observó ninguna banda que indicara la presencia de enzimas magnesio dependientes.

4. Control de actividad superóxido dismutasa o indofenol oxidasa

Este enzima cataliza la reacción $NBT + PMS$ para dar FORMAZAN (precipitado azul). Esta reacción es la base del sistema para detectar las bandas de especificidad de muchos enzimas entre los que se encuentran las objeto de nuestro estudio, ya que nos permite visualizarlos de color azul.

Este control fue llevado a cabo debido a que el NBT y PMS se encuentran en las mezclas de tinciones utilizadas. Para ello los geles se tiñeron con estos dos sustratos

y expuestas a la luz. El resultado se da como positivo si aparecen unas manchas blancas sobre el fondo oscuro del gel. Estas manchas corresponderían a la actividad de la superóxido dismutasa.

Hay que tener en cuenta que, por lo general, las bandas de actividad de los distintos isoenzimas aparecen de color azul, por lo cual la actividad de la superóxido dismutasa no interfiere en los resultados, aunque muchas veces, y sobretodo cuando la aparición de las bandas de actividad de las enzimas se retrasa, (por tanto más exposición de oxígeno), se observan a la vez las bandas blancas y azules.

5. Control de la actividad de proteasas

Para comprobar el efecto que tenían las proteasas en nuestros ensayos, se realizaron estudios paralelos de actividad de la LDH, MDH, G6PD y GPI en ausencia y presencia de inhibidores de proteasas. Para ello, se prepararon geles simétricos con individuos homogenizados en tampón Tris-HCl pH: 7.1 e individuos homogeneizados en presencia de inhibidores de proteasas. Los métodos de preparación de los geles y las tinciones efectuadas fueron las mismas que las descritas anteriormente.

El cóctel de inhibidores utilizado fue: Tris (Hidroximetil) Aminometano, EDTA, DTT, Benzamidina, PMSF, STI, H₂O destilada y HCl c.s.p hasta pH: 7.4-7.5 la preparación de éste viene reflejada en el apartado de reactivos.

El resultado se da como válido si el gel presenta el mismo número de bandas en presencia o ausencia de los inhibidores de proteasas.

II. 4. REACTIVOS

- Sistema de tampón utilizado para la preparación de los extractos: TRIS-HCL 0.5M
pH= 7.1 (Laemmli, 1970)

Tris	6.057 g
H ₂ O	100 ml
HCl c.s.p.	pH=7.1

- Sistemas de tampones utilizados para la preparación del gel y para los electrodos:

A.- Sistema tampón TRIS-GLICINA 0.2M pH=8.8 (Laemmli, 1970)

Tampón utilizado para el estudio isoenzimático de la G6PD de todas las especies excepto *P.rufescens*, y de la GPI y LDH de todas las especies estudiadas.

Tris (Hidroximetil) Aminometano...	3 g
Glicina purísima.....	14.4 g
H ₂ O destilada c.s.p.....	1 litro

B.- Sistema tampón TRIS-BORATO-EDTA pH=9 (Boissezon y Jelnes, 1982)

Este sistema se ha utilizado para la determinación de la G6PD en *P. rufescens*.

Electrodos:

Acido bórico..... 1.62 g

EDTA..... 1.23 g

Tris 31.62 g

Gel:

Acido bórico..... 0.54 g

EDTA..... 0.41 g

Tris..... 10.54 g

Cantidades expresadas en gramos por litro.

C.- Sistema tampón TRIS-CITRATO pH=6.8 (Agatsuma y Suzuki, 1981)

Este sistema se utilizó para la determinación de la MDH en todas las especies ensayadas.

Electrodos: 0.155M Tris, 0.043M Ac.cítrico

Tris..... 18.78 g

Acido cítrico..... 8.26 g

Gel: 0.01M Tris, 0.003M Ac.cítrico

Tris..... 1.2 g

Acido cítrico..... 0.576 g

Cantidades expresadas en gramos por litro.

D. Sistema de tampón utilizado para las tinciones de GPI y MDH: TRIS-HCL 0.1M

pH=8 (Shaw y Prasad, 1970)

Tris. 1.21 g

H₂O 100 ml

HCl c.s.p pH=8

Inhibidores de proteasas:

Tris (Hidroximetil) Aminometano.....	0.093 g
EDTA.....	0.019 g
DTT.....	0.019 g
Benzamidina.....	0.0436 g
PMSF (300 mM de PMSF en etanol)..	250 ul
STI.....	0.0025 g
H ₂ O destilada.....	250 ul
HCl c.s.p	pH: 7.4-7.5

II. 5. TINCIONES

1. Tinción de la G6PD (Shaw y Prasad, 1970)

NADP+.....	30 mg
NBT	10 mg
PMS.....	1 mg
Na ₂ G6PH ₂ O.....	200 mg
Tris-HCl 0.5M pH=7.1.....	25 ml
H ₂ O.....	90 ml

Incubar a 37°C hasta que se observen las bandas, lavar y conservar. Fotografíar.

2. Tinción de la GPI (Shaw y Prasad, 1970)

NADP ⁺	10 mg
MgCl ₂	80 mg
PMS.....	1 mg
NBT.....	10 mg
G6PD.....	5 ul
Tris-HCl 0.1M pH=8.....	100 ml
Fructosa 6P.....	160 mg

Incubar a 37°C hasta que aparezcan las bandas, lavar con agua destilada y conservar en frío. Posteriormente fotografiar.

3. Tinción de la LDH (Shaw y Prasad, 1970)

NAD ⁺	50 mg
NBT.....	30 mg
PMS.....	2 mg
1M Na DL-lactato pH=7.....	10 ml
Tris-HCl 0.5M pH:7.1.....	15 ml
H ₂ O.....	70 ml

-Lactato sódico.

Acido láctico.....	10.6 ml
Carbonato disódico.....	5.19 g
H ₂ O c.s.p.....	100 ml

Incubar a 37°C durante 1-2 horas hasta que aparezcan las bandas, lavar con agua destilada y conservar en frío. Fotografiar.

4. Tinción de la MDH (Fukumoto y col., 1987, modificada)

NAD⁺ 40 mg

Acido málico..... 160 mg

NBT..... 40 mg

PMS..... 8 mg

0.1M Tris-HCl pH=8... 100 ml

Incubar a 37°C durante 1-2 h, lavar con agua destilada y conservar en frío. Fotografiar.

II. 6. COLORANTES

- Azul de bromofenol. (Maniatis y col., 1982)

Azul de bromofenol..... 0.25 %

Xileno-Cianol 0.25 %

Ficol tipo 400 en agua.... 15 %

Guardar a temperatura ambiente.

- Azul de bromofenol. (Maniatis y col., 1982)

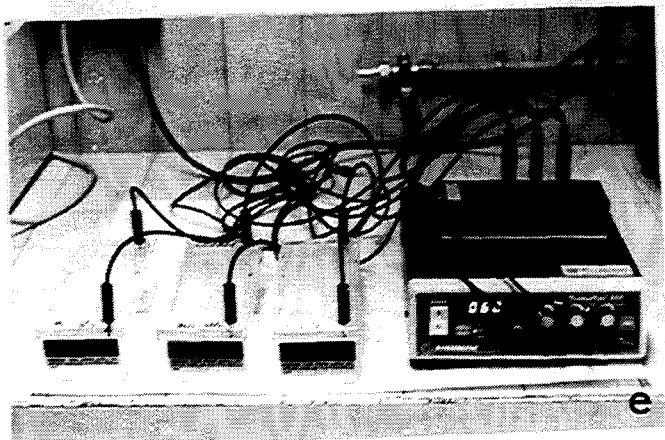
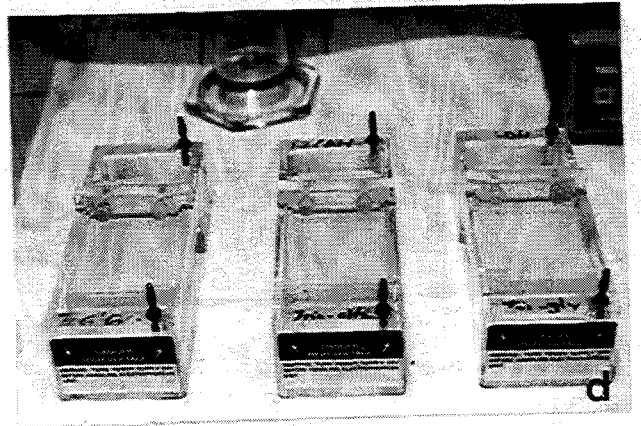
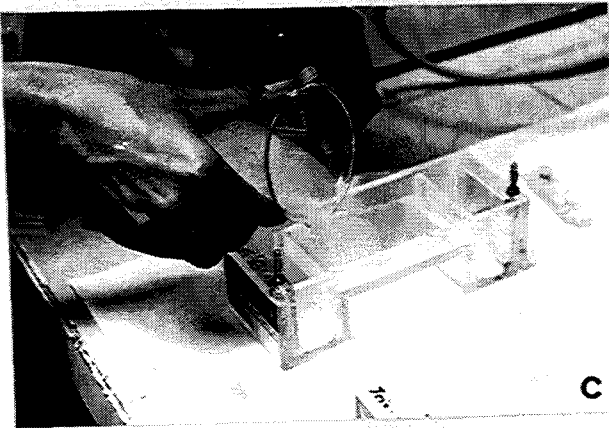
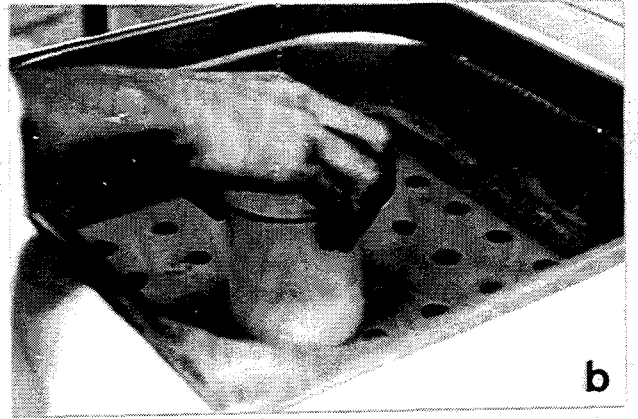
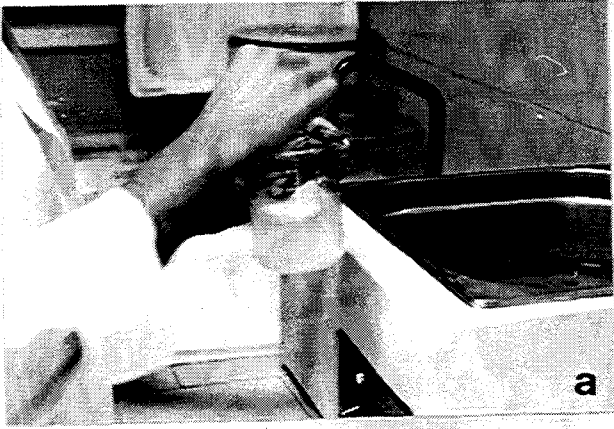
Azul de bromofenol 0.25 %

Sacarosa ultrapura 40 % W/V

Conservar a 4°C.

FIGURA 1. Metodología de preparación de los geles de almidón.

- a. Solución de almidón al 7.5%
- b. Calentar al Baño María hasta formación del gel
- c. Verter en las cubetas
- d. Poner el peine y dejar enfriar
- e. Electroforesis



RESULTADOS

Y DISCUSION

III. RESULTADOS Y DISCUSION

III. 1. Nematodes pulmonares

Las especies de nematodes pulmonares aisladas de *O.aries* y *C.hircus* han sido: *P.rufescens* y *D.filaria*.

III. 1. 1. DISTRIBUCION Y DETERMINACION ESPECIFICA DE *PROTOSTRONGYLUS RUFESCENS*

La distribución por localidad, sexo y hospedador de los individuos recolectados de *Protostrongylus rufescens* viene recogida en la tabla 1 (Pag. 77).

La determinación específica de este nematode parásito se ha basado en su característico aspecto externo en forma de hebra de hilo muy móvil. La parte anterior del cuerpo puede observarse en la figura 2 (Pag. 79) a y b. La hembra presenta una vulva localizada subterminalmente (Fig. 2c,d). La parte posterior del macho se caracteriza por la presencia de una bolsa copulatriz poco desarrollada, con espículas con alas membranosas formando estrías y presencia de gubernáculo compuesto por capítulo, cuerpo y cruras en forma de bota (Fig. 2e,f).

TABLA 1. Distribución de los ejemplares de *P.rufescens* por localidad, sexo y hospedador. M = machos; H = hembras; N.C. = no concretado.

NUMERO	LOCALIDAD	SEXO			HOSPEDADOR
		M	H	N.C	
29	Morón	8	19	2	cabra
12	Los Corrales	7	4	1	cabra
54	Paradas	11	40	3	cabra
1	-	1	-	-	cabra
46	Málaga	22	24	-	cabra
TOTAL:		49	87	6	cabra
142					

FIGURA 2. Morfología de *Protostrongylus rufescens*.

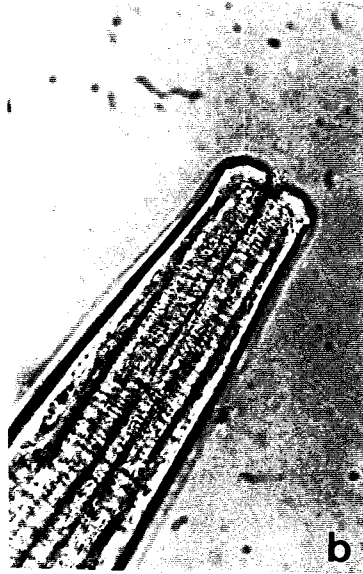
a, b: Parte anterior del cuerpo. **c, d:** Parte posterior de la hembra. La flecha señala el ano. Por encima se observa la vulva. **e, f:** Parte posterior del macho. Obsérvese las espículas con alas membranosas y el típico gubernáculo (f).

a, c, e: Escala 160 micras.

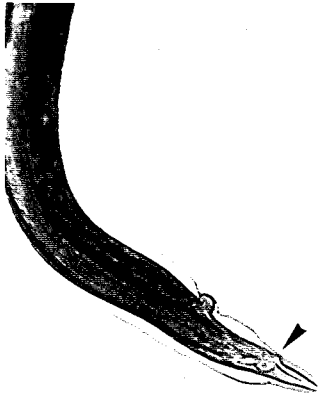
b, d, f: Escala 40 micras.



a



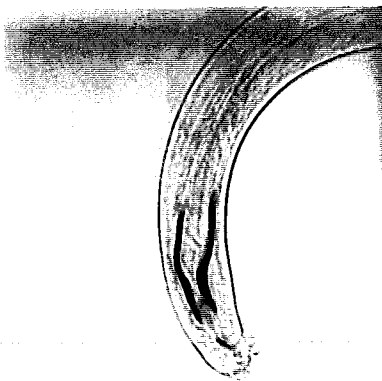
b



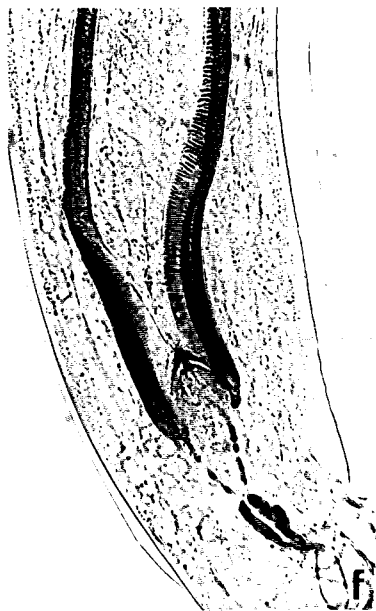
c



d



e



f

III. 1. 1. a. Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en *Protostrongylus rufescens*

- Lactato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la LDH observado en extractos formados por un sólo individuo de *P.rufescens* se caracterizó por la presencia de un solo isoenzima de migración catódica (Fig. 3A, línea 1) (Pag. 88) o bien por la presencia de esta banda catódica, más tres isoenzimas anódicos ligeramente teñidos. Este último fenotipo, se observó únicamente en los casos que se ensayaron de diez a veinte individuos conjuntamente (Fig. 3A, línea 2). El extracto de pulmón de cabra utilizado como control de posibles restos procedentes del hospedador, presentó un patrón isoenzimático caracterizado, por la presencia de 5 bandas, 4 de ellas de migración anódica y una de migración catódica con similar migración a las observadas en *P.rufescens* (Fig. 3A, línea 3).

Estos resultados fueron corroborados en geles de poliacrilamida a partir de extractos individuales, identificándose estos tres isoenzimas anódicos ligeramente teñidos y una zona fuertemente teñida en el origen del gel (Fig. 3B).

El fenómeno observado en el patrón isoenzimático de la LDH de *P.rufescens* ha sido previamente citado por Conde del Pino y col. (1966) para la LDH en *Schistosoma mansoni*; así, estos autores observaron la presencia de una zona anódica difusa

ligeramente teñida, tanto en machos como en hembras de *Schistosoma mansoni*. Esta zona podría representar isoenzimas que se encuentran en cantidades tan pequeñas que no se pueden separar por los métodos utilizados por ellos. Este hecho ha sido explicado por Fletcher y col. (1981), quienes postularon que las diferencias en la intensidad de la tinción parecen ser debidas a las bajas concentraciones de algunos enzimas en las muestras de hembras, y no necesariamente tienen que ser debidas a las diferencias en las actividades de esos enzimas. La LDH presentaba una actividad muy baja y sólo podían ser detectadas en extractos formados por muchos individuos conjuntamente (Bryant y Flockhart, 1986).

No obstante, estos resultados también podrían ser interpretados como consecuencia de una contaminación del hospedador, teniendo en cuenta que los isoenzimas anódicos en *P.rufescens* sólo se observaron cuando se preparaban extractos de muchos individuos y que estos isoenzimas coincidían en su migración con el extracto de pulmón de cabra utilizado como control.

Por lo tanto, y a la vista de los resultados obtenidos, no podemos sugerir una estructura determinada para la LDH en esta especie.

- Malato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la MDH en *P.rufescens* reveló la existencia de un único fenotipo en los 142 individuos ensayados. Este fenotipo se caracterizó por la

presencia de dos bandas: una de ellas presentando migración catódica, mientras que la segunda mostró migración anódica (Fig. 3C, línea 1).

El isoenzima catódico se observó estrechamente cercano al origen y ligeramente teñido, mientras que el isoenzima con migración anódica se observó más teñido que el de migración catódica. Es más, este isoenzima catódico, no se observaba cuando las muestras se almacenaban por un periodo de más de un mes (Fig. 3C, línea 2). Por lo tanto, este isoenzima parecía ser propenso a la inactivación.

Este fenotipo (dos bandas en todos los individuos observados en *P. rufescens*) sugiere la existencia de dos loci génicos codificando a este enzima, ya que ningún individuo presentó ni una banda sencilla en su fenotipo, ni más de las 2 bandas ya citadas anteriormente. Por lo tanto, en *P. rufescens* este patrón isoenzimático de la MDH debería interpretarse como la expresión de un estado homocigótico de dos loci génicos separados. La ausencia de heterocigotos no nos permite sugerir ninguna estructura cuaternaria para la MDH en *P. rufescens*. La degradación de isoenzimas apreciada en esta especie de nematode parásita, ha sido observada por otros autores para los isoenzimas de la LDH de *Schistosoma* spp (Ross, 1976).

Los patrones electroforéticos determinados en los isoenzimas de la MDH del parásito y del hospedador (extracto de pulmón), claramente indican que los isoenzimas de ambos son distintos (Fig. 3C, línea 3).

- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y Glucosa fosfato isomerasa

El patrón isoenzimático de la G6PD en esta especie parásita mostró la presencia de una única banda de migración anódica rápida (Fig. 3D, líneas 2,3) presentándose el control positivo utilizado (G6PD de Boehringer) con una migración anódica semejante a aquélla aunque algo más lenta (Fig. 3D, línea 1).

Asimismo, el patrón isoenzimático de la GPI en *P.rufescens* se caracterizó por la presencia de una sola banda de migración anódica en todos los individuos ensayados (Fig. 3E, líneas 1,2,3). El extracto de pulmón de cabra utilizado como control de restos procedentes del hospedador mostró una sola banda de migración anódica más lenta (Fig. 3E, línea 4). La ausencia de heterocigotos en el patrón isoenzimático de la G6PD y de la GPI nos impide sugerir la estructura cuaternaria para ambas enzimas.

No se han encontrado diferencias entre machos y hembras de *P.rufescens* en los distintos patrones isoenzimáticos obtenidos.

La baja variabilidad genética, entendiéndose como tal la ausencia de polimorfismo en los 4 loci ensayados, así como la ausencia de individuos heterocigotos en todas ellas, podría explicarse según distintas teorías:

Podría sugerirse un "efecto Wahlund" (Richardson y col., 1986), según el cual la ausencia de heterocigotos estaría justificada por el hecho de que las muestras puedan

haber sido recogidas de muy diversas zonas geográficas, de forma que este "efecto Wahlund" justificaría la ausencia de panmixia y, por lo tanto, la ausencia de heterocigotos. No obstante, y aunque las muestras fueron recogidas de distintas poblaciones caprinas locales tal y como muestra la tabla 1, la mayoría de los individuos recogidos procedían de dos grandes poblaciones (Paradas y Málaga).

Price (1980) especuló acerca de los posibles efectos del hospedador en la variabilidad genética del parásito, sugiriendo que a mayor nivel de especificidad del hospedador, o muy pocos hospedadores intermediarios, más estrecho es el rango de fenotipos y por lo tanto más bajo es el nivel de la heterocigosidad media entre los parásitos; un gran número de hospedadores puede dar lugar a la selección de una amplia gama de fenotipos, y niveles más altos de heterocigosidad.

En este sentido, en España, *P.rufescens* ha sido citado en oveja, cabra y cabra montés, siendo muy grande la gama de especies de caracoles (moluscos) que pueden actuar como hospedadores intermediarios (Cordero del Campillo y col., 1994).

La teoría neutral de la evolución molecular también propone algunas sugerencias interesantes acerca de los endoparásitos. En contraste a la teoría seleccionista, la teoría neutral propone que muchas de las sustituciones de aminoácidos que se acumulan durante la evolución proteica son neutrales con respecto a la selección natural. Esta teoría fue desarrollada, en parte, para explicar el hecho de que proteínas homólogas de organismos que divergen filogenéticamente tienen unas tasas de cambios de secuencia relativamente

constantes.

Según el punto de vista de los neutralistas (modelo neutral), se cree que las especies con una baja variabilidad genética han experimentado durante sus historias evolutivas ciertos fenómenos, que han reducido el número efectivo de individuos reproduciéndose en la población. El número de población efectiva puede también ser reducido cuando el número de machos y hembras es desigual en la población. Para los seleccionistas (modelo de selección), esta ausencia de heterocigosis se justificaría como el resultado de una selección direccional de un rango de fenotipos muy restringido (Rannala, 1992).

- Controles ensayados para los distintos isoenzimas en *P.rufescens*

Para comprobar que las bandas observadas no correspondían con productos de degradación, añadimos inhibidores de proteasas a los extractos de las muestras. Los patrones isoenzimáticos así obtenidos para la LDH, MDH, G6PD y GPI no variaron de los ya vistos anteriormente.

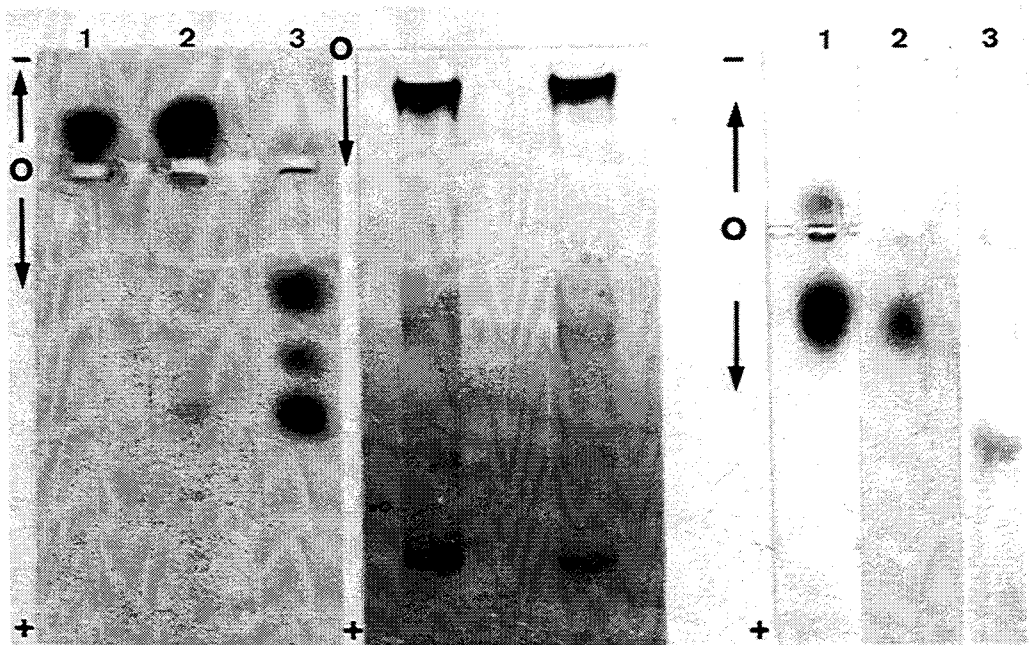
Asimismo, se han realizado diversos ensayos para comprobar la posible presencia de bandas "fantasmas" en los patrones isoenzimáticos observados, debido a "enzimas magnesio dependientes". Este ensayo se llevó a cabo para la GPI, ya que es la única enzima que incluye Cl_2Mg como reactivo de la mezcla tinción. No se detectó ninguna banda de actividad.

Los controles negativos para garantizar la especificidad de la tinción, fueron llevados a cabo para todos los enzimas ensayados tiñendo los geles sin su sustrato correspondiente (lactato sódico, ácido málico, glucosa 6P sal disódica y fructosa 6P respectivamente). En ningún caso se observó algún tipo de banda teñida.

En todos los ensayos de los distintos enzimas, excepto para la G6PD, se incluyó extracto de pulmón de cabra para descartar posibles bandas debidas a restos procedentes del hospedador. Para la G6PD se utilizó como control, G6PD de Böehringer, debido a la falta de resolución del extracto de pulmón ensayado.

FIGURA 3. Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en *Protostrongylus rufescens*.

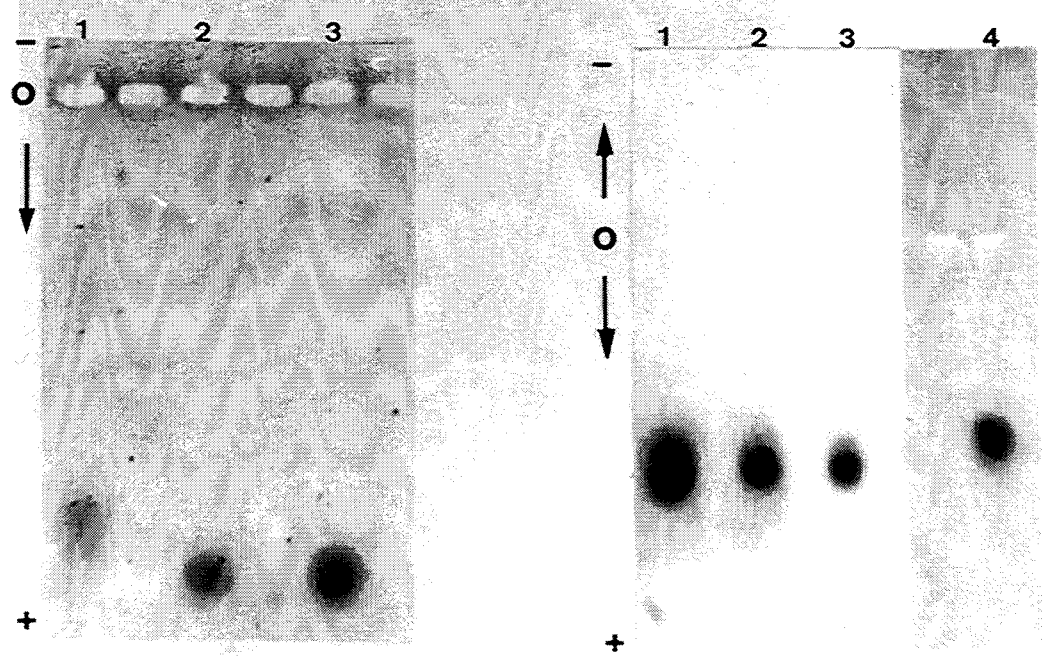
A. Patrón isoenzimático de la LDH en electroforesis en geles de almidón. Línea 1: Extracto individual. Línea 2: Extracto de diez individuos. Línea 3: Extracto de pulmón de cabra. **B.** Patrón isoenzimático de la LDH en electroforesis en geles de poliacrilamida. En ambos casos se ensayaron extractos individuales. **C.** Patrón isoenzimático de la MDH en electroforesis en geles de almidón. Línea 1: Extracto individual reciente. Línea 2: Extracto de un individuo almacenado al menos un mes. Línea 3: Extracto de pulmón de cabra. **D.** Patrón isoenzimático de la G6PD en electroforesis en geles de almidón. Línea 1: G6PD de Boehringer (control +). Línea 2: Extracto individual (macho). Línea 3: Extracto individual (hembra). **E.** Patrón isoenzimático de la GPI en electroforesis en geles de almidón. Líneas 1,2: Extracto individual (macho). Línea 3: Extracto individual (hembra). Línea 4: Extracto de pulmón de cabra.



A

B

C



D

E

III. 1. 2. DISTRIBUCION Y DETERMINACION ESPECIFICA DE *DICTYOCAULUS FILARIA*

Un total de 160 individuos de *D.filaria* se han recolectado a partir de pulmones de *O.aries* y *C.hircus*. La distribución de estos ejemplares por localidad, sexo y hospedador viene reflejada en la tabla 2 (Pag. 90).

Desde el punto de vista morfológico, *D.filaria* presenta aspecto blanquecino y gran tamaño, encontrándose normalmente varios individuos formando ovillos a nivel de los bronquios de su hospedador. La parte anterior del cuerpo se caracteriza por la presencia de un esófago largo que puede observarse en la Fig. 4a (Pag. 92) y pequeñas placas quitinizadas en la apertura oral (Fig. 4b). La hembra localiza la vulva hacia la región media del cuerpo (Fig. 4d). El ano se presenta subterminalmente (Fig. 4c). El macho presenta bolsa copulatriz característica no lobulada y con 13 radios. Las espículas son cortas, triangulares y muy quitinizadas (Fig. 4e,f).

TABLA 2. Distribución de los ejemplares de *D.filaria* por localidad, sexo y hospedador. M = machos; H = hembras; N.C. = no concretado.

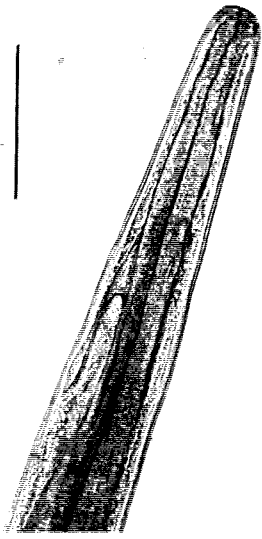
NUMERO	LOCALIDAD	SEXO			HOSPEDADOR
		M	H	N.C.	
7	Paradas	1	3	3	oveja
2	Málaga	-	1	1	oveja
2	Granada	-	2	-	oveja
80	Paradas	9	38	33	oveja
6	Almadén	-	6	-	cabra
13	Málaga	3	8	2	cabra
10	Granada	2	7	1	oveja
3	Aznalcollar	1	2	-	oveja
28	Paradas	10	12	6	oveja
4	Málaga	-	4	-	cabra
5	Granada	1	4	-	oveja
160		27	87	46	

FIGURA 4. Morfología de *Dictyocaulus filaria*.

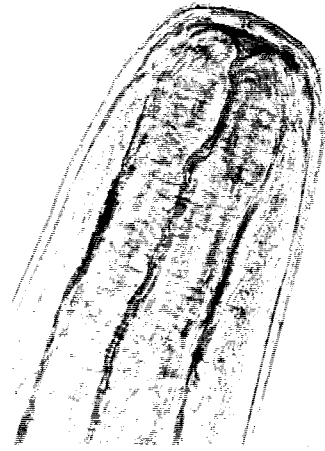
a y b: Parte anterior mostrando el esófago y placas rodeando la apertura oral. **c:** Parte posterior de la hembra. La flecha indica el ano. **d:** Vulva localizada en la región media. **e y f:** Parte posterior del macho mostrando la bolsa copulatriz y las espículas triangulares fuertemente quitinizadas.

a, c, d, e, f: Escala 286 micras.

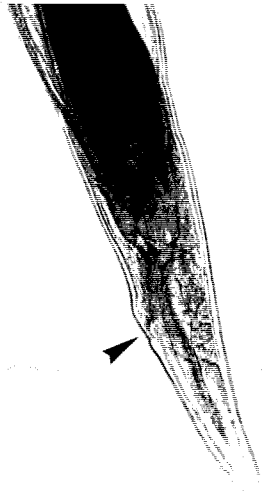
b: Escala 71.5 micras.



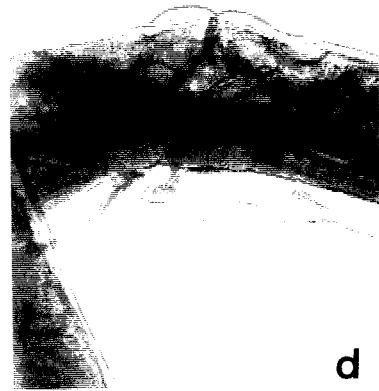
a



b



c



d



e



f

III. 1. 2. a. Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en *Dictyocaulus filaria*

- Lactato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la LDH en esta especie parásita, ha corroborado los estudios previos llevados a cabo por Espina (1993). Así, se ha observado la presencia de 4 isoenzimas de migración anódica y un isoenzima de migración catódica en todos los individuos machos y hembras ensayados (Fig. 5A, línea 1) (Pag. 102). El extracto de pulmón de cabra y oveja utilizado como control de la presencia de restos procedentes del hospedador mostró la presencia de 5 isoenzimas (Fig. 5A, línea 2).

Estos experimentos han sido llevados a cabo con muestras de individuos cuyo almacenamiento fue inferior a una semana. Cuando las muestras utilizadas tenían un almacenamiento superior, sólo 3 isoenzimas podían ser identificados (Fig. 5A, línea 3).

La presencia de 4 isoenzimas de migración anódica para la LDH en *D. filaria*, también ha sido corroborada mediante geles verticales de poliacrilamida (Fig. 5B, línea 1 y 2).

Este patrón isoenzimático sugiere la existencia de un estado homocigótico de dos loci génicos separados que encodan dos subunidades de la LDH. Las dos subunidades

asociadas al azar dan lugar a 5 formas moleculares tetraméricas las cuales pueden ser visualizadas como 5 bandas distintas mediante electroforesis en gel de almidón. Dichas isoenzimas han sido designadas como LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 y LDH-5 siendo LDH-1, LDH-2 y LDH-3 las isoenzimas de migración rápida y las más resistentes a las condiciones adversas.

También, Logan y col. (1979) postularon la presencia de dos loci codificando las subunidades LDH-A y LDH-B respectivamente para los isoenzimas de la LDH en *H. diminuta*, demostrándose la presencia de dos isoenzimas en electroforesis en geles de almidón (Bryant y Flockhart, 1986).

- Malato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la MDH en *D. filaria* se caracterizó por la presencia de 3 fenotipos distintos: a) una banda (isoenzima) anódica simple de migración rápida (Fig. 5C, línea 1); b) una banda anódica simple de migración lenta (Fig. 5C, línea 3); c) una mancha cuya migración solapa la de a) y b) (Fig. 5C, línea 2).

Estas diferencias observadas en las movilidades electroforéticas han sido comprobadas repetidas veces para excluir la posibilidad de que se debieran a distintas condiciones de electroforesis. Asimismo, en algunas ocasiones, el alelo de movilidad distinta se utilizó como control de movilidad diferente para geles sucesivos.

El patrón isoenzimático del extracto de pulmón, usado como control, presentó una banda anódica muy rápida respecto a aquéllas de *D. filaria* (Fig. 5C, línea 4).

Las frecuencias alélicas han sido calculadas para el locus de la MDH en *D. filaria* considerando el alelo 100 como el alelo más frecuente, mientras que los otros alelos han sido determinados teniendo en cuenta su velocidad de migración (movilidad) respecto al alelo 100.

La distribución de los individuos según los distintos fenotipos para la MDH y el cálculo de sus frecuencias alélicas para el locus MDH se muestra en la tabla 3.

Como muestra la tabla 3, la mayoría de los individuos (112 sobre 160) muestran fenotipo b) (banda anódica simple de migración rápida) mientras que sólo 11 individuos aparecen con fenotipo a). Asimismo, se ha llevado a cabo el cálculo de las frecuencias alélicas y se ha realizado el test de Hardy-Weinberg para este locus MDH en *D. filaria* (Tabla 3) (Pag. 103).

El cálculo de $\chi^2=8.74$ y χ^2_c (χ^2 con la corrección de Yate's) = 8.44 reveló una probabilidad de 0.004. Las diferencias observadas parecen ser significativas y la población no está en equilibrio.

Los fenotipos encontrados para la MDH en *D. filaria*, pueden ser explicados como

la existencia de un solo locus génico para la MDH en *D. filaria*. Los fenotipos a) y b) (bandas simples) son interpretados como el estado homocigótico de un gen con dos alelos distintos, mientras el tercer fenotipo corresponde al estado heterocigótico de este mismo gen.

No obstante, es sorprendente que la mayoría de los individuos presenten fenotipo b), mientras sólo unos pocos individuos (11 sobre 112) muestren el otro fenotipo. Además, el test de Hardy-Weinberg corrobora que la población ensayada no está en equilibrio.

En el terreno teórico, Price (1980) predijo una estructura genética para los parásitos comprendiendo poblaciones homocigóticas relativamente pequeñas, con poco intercambio genético, resultando la existencia de muchas razas especializadas y especies "hermanas" (o especies distintas que no se diferencian morfológicamente). Por otro lado, puede argumentarse que aquellas muestras que son tomadas de diferentes poblaciones locales, las cuales no son panmíticas, podrían dar lugar a un efecto Wahlund (Richardson y col., 1986) causado por el muestreo de diferentes poblaciones. Sin embargo, aunque las muestras fueron tomadas de diferentes localidades, la mayoría de ellas procedían de una única población local (ver tabla 2, Paradas) Además, ambos fenotipos (aunque en pequeño porcentaje) fueron observados en todas las poblaciones de las distintas localidades.

Este hecho ha sido explicado por Pasteur y col. (1988) quienes predijeron que si realmente se producía un cambio en las frecuencias alélicas de una generación a otra, y un alelo incrementaba su frecuencia en detrimento de otro u otros alelos, esto no implicaba la ausencia de panmixia. El apareamiento (y por lo tanto la unión de gametos) podía haber tenido lugar al azar, y un alelo podía aumentar su frecuencia porque el genotipo que contenía dicho alelo tenía una mayor capacidad de supervivencia. Otra posibilidad es que la mutación o inmigración haya introducido copias múltiples del alelo dentro de la población.

Las características determinadas para la MDH del parásito y del hospedador indican claramente que los isoenzimas del parásito son distintos a los del hospedador.

- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático observado para la G6PD en *D. filaria*, se caracterizó por la presencia de 3 fenotipos: uno de ellos presentado por 50 individuos, mostró una sola banda de migración anódica lenta (Fig. 5D, líneas 1 y 3); el segundo fenotipo observado en 43 individuos se caracterizó por una sola banda de migración anódica más rápida (Fig. 5D, línea 2), mientras que solo 9 individuos presentaron un tercer fenotipo híbrido entre los dos anteriores (Fig. 5D, línea 4).

El cálculo de las frecuencias alélicas y el test de equilibrio de Hardy-Weinberg

se ha realizado y puede observarse en la tabla 4 (Pag. 104). La probabilidad calculada $p < < 0.0001$ muestra que la población no se haya en equilibrio.

- Glucosa fosfato isomerasa

El patrón isoenzimático de la GPI en *D.filaria* mostró la presencia de tres fenotipos distintos: dos de ellos caracterizados por la presencia de una sola banda, de migración anódica lenta (Fig. 5E, línea 1) y de migración algo más rápida (Fig. 5E, línea 3) y un tercer fenotipo caracterizado por un patrón híbrido entre ambos fenotipos (Fig. 5E, línea 2). El extracto de pulmón utilizado para descartar posibles restos procedentes del hospedador mostró una banda de migración anódica muy rápida (Fig. 5E, línea 4). Al igual que para los enzimas de la MDH estas distintas movilidades fueron corroboradas en sucesivos ensayos, tanto para la G6PD como para la GPI.

Las frecuencias alélicas de la GPI en esta especie parásita quedan reflejadas en la tabla 5 (Pag. 105). A la vista de ésta puede deducirse que para un grado de libertad igual a 1, la χ^2_c da una probabilidad $p < < 0.0001$, indicando que la población no se encuentra en equilibrio.

El patrón isoenzimático de la G6PD y la GPI observado en *D.filaria* sugieren la existencia de un solo locus génico codificando cada una de las dos enzimas. Así, los fenotipos presentando una sola banda justificarían la expresión de un estado

homocigótico de este gen, mientras que los fenotipos híbridos (migración intermedia entre aquellos fenotipos) se interpretarían como la expresión heterocigótica de ese locus génico.

No existen diferencias en los patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI entre individuos machos y hembras de *D.filaria*; tampoco existen diferencias entre individuos procedentes de distintos hospedadores (*Ovis aries* y *Capra hircus*).

- Controles ensayados para los distintos isoenzimas en *D.filaria*

Teniendo en cuenta la existencia de los llamados "enzimas magnesio dependientes" o "nada deshidrogenasas" se realizaron distintos ensayos, con el fin de descartar la posible existencia de éstos, no observándose ningún tipo de banda.

Posteriormente, incluimos inhibidores de proteasas durante la homogenización de algunos extractos y ensayamos los cuatro enzimas, observándose los mismos patrones isoenzimáticos que sin la presencia de estos inhibidores.

Con el fin de descartar posibles bandas debidas a restos procedentes del hospedador se ha utilizado como control en todos los ensayos de los distintos enzimas pulmón de cabra u oveja.

Los controles negativos de especificidad de tinción, al igual que en *P. rufescens*, fueron llevados a cabo para todos los enzimas ensayados, tiñendo los geles sin su sustrato correspondiente (lactato sódico, ácido málico, glucosa 6P sal disódica y fructosa 6P respectivamente). En ningún caso se observó algún tipo de banda teñida.

FIGURA 5. Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en *Dictyocaulus filaria*.

A. Patrón isoenzimático de la LDH en geles de almidón. Línea 1: Extracto individual almacenado por un periodo inferior a una semana. Línea 2: Extracto de pulmón de cabra utilizado como control. Línea 3: Extracto individual con un periodo de almacenamiento superior a una semana. **B.** Patrón isoenzimático de la LDH en geles de poliacrilamida. Línea 1: Un individuo macho. Línea 2: Un individuo hembra. **C.** Patrón isoenzimático de la MDH en geles de almidón. Línea 1: Banda anódica simple de migración rápida. Línea 2: Fenotipo heterocigoto. Línea 3: Banda anódica simple de migración lenta. Línea 4: Extracto de pulmón. **D.** Patrón isoenzimático de la G6PD en geles de almidón. Líneas 1,3: Banda de migración anódica lenta. Línea 2: Banda de migración más rápida. Línea 4: fenotipo híbrido de los dos anteriores. **E.** Patrón isoenzimático de la GPI en geles de almidón. Línea 1: Isoenzima de migración lenta. Línea 2: Fenotipo heterocigoto. Línea 3: Isoenzima de migración rápida. Línea 4: Extracto de pulmón.

TABLA 3. Cálculo de las frecuencias alélicas y test de equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus de la MDH en *Dictyocaulus filaria*. p= probabilidad; df= grados de libertad.

GENOTIPOS	INDIVIDUOS		X ²	X ² _c
	ENCONTRADOS	ESPERADOS		
100/100	112	104.98	0.47	0.40
105/105	11	5.42	5.75	5.74
100/105	37	47.98	2.52	2.30
TOTAL	160	158.38	8.74	8.44

FRECUENCIAS ALELICAS:

Alelo 100: $X_{100} = 0.815$

Alelo 105: $X_{105} = 0.184$

d.f. = 1; p < 0.004

TABLA 4. Cálculo de las frecuencias alélicas y test de equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus de la G6PD en *D.filaria*. p= probabilidad; d.f. = grados de libertad.

GENOTIPOS	INDIVIDUOS		X_2	X^2_c
	ENCONTRADOS	ESPERADOS		
100/100	50	29.08	15.05	14.35
105/105	43	22.15	19.63	18.69
100/105	9	50.77	34.36	33.55
TOTAL	102	102	69.04	66.59

FRECUENCIAS ALELICAS:

Alelo 100: $X_{100} = 0.534$

Alelo 105: $X_{105} = 0.466$

d.f. = 1;

$p << 0.0001$

TABLA 5. Cálculo de las frecuencias alélicas y test de equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus de la GPI en *D.filaria*. p= probabilidad; d.f.= grados de libertad.

GENOTIPOS	INDIVIDUOS		X ²	X ² _c
	ENCONTRADOS	ESPERADOS		
100/100	47	30.82	8.49	7.98
105/105	32	15.90	16.30	15.30
100/105	12	44.28	23.53	22.81
TOTAL	91	91	48.32	46.09

FRECUENCIAS ALELICAS:

Alelo 100: $X_{100} = 0.582$

Alelo 105: $X_{105} = 0.418$

d.f. = 1; $p << 0.0001$

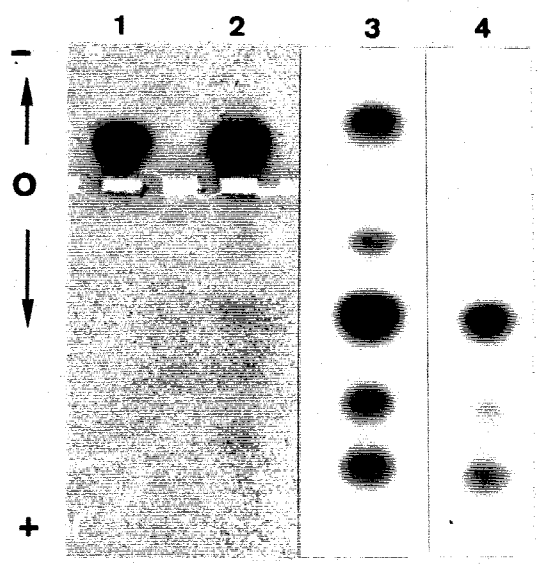
El estudio comparativo de los patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI observado en *P.rufescens* y *D.filaria* nos permiten deducir que estas enzimas pueden considerarse de valor diagnóstico para ambas especies y teniendo en cuenta los diferentes patrones isoenzimáticos observados entre ellos. Particularmente, la LDH mostró patrones isoenzimáticos muy diferenciales entre ambas especies (Fig. 6A) (Pag. 108), si bien, para *Dictyocaulus filaria* se sugiere una estructura cuaternaria tetramérica. Asimismo, el patrón isoenzimático de la MDH en *P.rufescens* reveló la presencia de un isoenzima de migración catódica con carácter diagnóstico respecto de *D.filaria* pues la banda anódica observada en *P.rufescens* coincidía en su migración con el isoenzima anódico más lento de *D.filaria* (Fig. 6B).

FIGURA 6. Patrones isoenzimáticos comparativos de la LDH y MDH en *P.rufescens* y *D.filaria*.

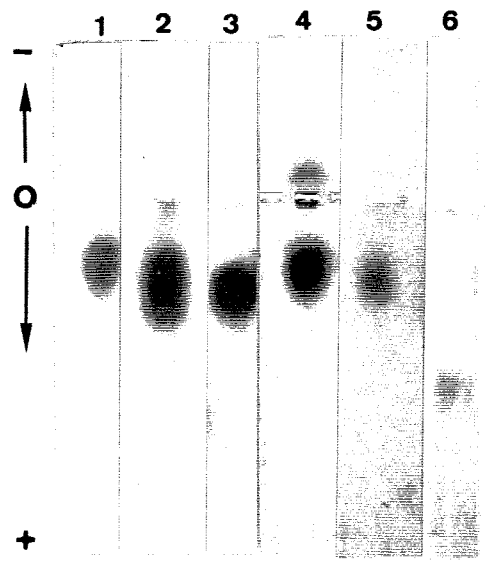
A. Patrón isoenzimático de la LDH en electroforesis en geles de almidón. Línea 1: Extracto individual de *P.rufescens*. Línea 2: Extracto de diez individuos de *P.rufescens*. Línea 3: Extracto individual de *D.filaria* almacenado por un periodo inferior a una semana. Línea 4: Extracto de pulmón de cabra.

B. Patrón isoenzimático de la MDH en electroforesis en geles de almidón. Línea 1: Banda anódica simple de migración lenta en *D.filaria*. Línea 2: Fenotipo heterocigoto de *D.filaria*. Línea 3: Banda anódica simple de migración rápida en *D.filaria*. Línea 4: Extracto individual de *P.rufescens* reciente. Línea 5: Extracto de un individuo de *P.rufescens* almacenado al menos un mes. Línea 6: Extracto de pulmón de cabra.

~~Fujita~~



A



B

II. 2. Nematodes intestinales

Las especies de nematodes intestinales aisladas a partir de *O.aries* y *C.hircus* han sido: *Oesophagostomum venulosum*, *Chabertia ovina*, *Trichuris ovis*, *T.globulosa* y *T.skrjabini*.

III. 2. 1. DISTRIBUCION Y DETERMINACION ESPECIFICA DE *OESOPHAGOSTOMUM VENULOSUM*

La distribución por localidad, sexo y hospedador de los individuos recolectados de *Oesophagostomum venulosum* viene expuesta en la tabla 6 (Pag. 110).

Las características morfológicas en las que nos hemos basado para la identificación específica de *Oesophagostomum venulosum* han sido: la presencia de un surco cervical característico y ausencia de alas cervicales laterales (Fig. 7a) (Pag. 112). Boca circular limitada por una corona de elementos en la parte anterior del cuerpo (Fig. 7b). El macho presenta bolsa copulatriz característica. Las espículas son largas y unidas en el extremo distal (Fig. 7c). La hembra presenta la parte posterior aguzada estando la vulva localizada subterminalmente (Fig. 7d).

TABLA 6. Distribución de los ejemplares de *Oesophagostomum venulosum* por localidad, sexo y hospedador. N = número de individuos; H = hospedador; M = macho; H = hembra; N.C. = no concretado.

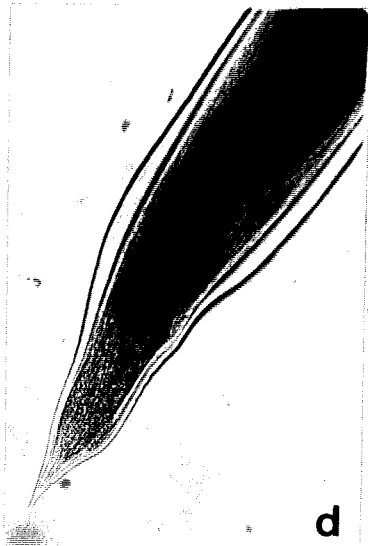
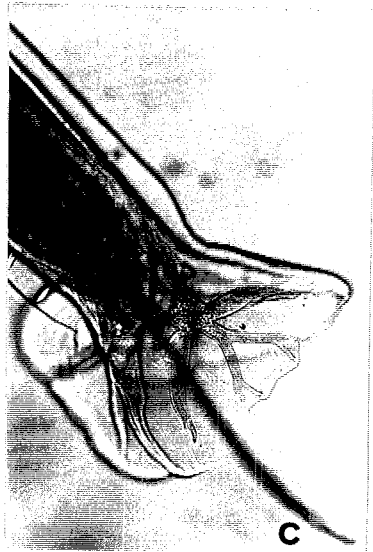
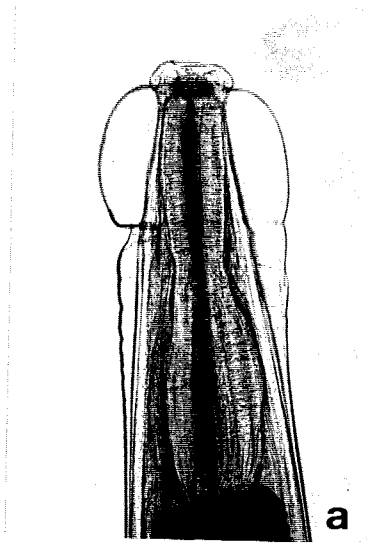
NUMERO	LOCALIDAD	H	SEXO		
			M	H	N.C
26	Almadén	oveja	7	19	-
38	-	cabra	8	20	10
5	-	-	1	4	-
32	-	-	3	29	-
14	Granada	oveja	9	5	-
5	Morón	cabra	3	2	-
1	Paradas	oveja	-	1	-
1	Los Corrales	cabra	-	1	-
48	Sevilla	cabra	39	9	-
2	Osuna	oveja	1	1	-
14	Almonte	cabra	5	9	-
TOTAL:186			76	100	10

FIGURA 7. Morfología de *Oesophagostimum venulosum*.

a: Parte anterior del cuerpo con surco cervical característico y esófago en forma de maza. **b:** Boca rodeada de una corona de elementos. **c:** Parte posterior del macho presentando la bolsa copulatriz y la espícula. **d:** Ano y vulva en la parte posterior de la hembra. La flecha indica la vulva.

a, c, y d: Escala 200 micras.

b: Escala 50 micras.



III. 2. 1. a. Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en *Oesophagostomum venulosum*

- Lactato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la LDH para *O.venulosum* fue ensayado en distintos tampones (Tris-glicina, Tris-citrato, Tris-Borato-Edta) a distintas concentraciones y a distintos valores de pH. Tras la electroforesis y tinción específica, en ninguno de los casos se observó algún tipo de actividad enzimática. Por ello deducimos que esta enzima en *O.venulosum* posee una actividad tan escasa que no podemos detectarla mediante esta técnica de electroforesis en geles de almidón.

-Malato deshidrogenasa

El estudio del patrón isoenzimático de la MDH en *O.venulosum* reveló la presencia de dos fenotipos: uno de ellos (fenotipo 1) caracterizado por dos bandas: una de migración anódica y otra de migración catódica (Fig. 8A, línea 1) (Pag. 119). El segundo fenotipo (fenotipo 2) (Fig. 8A, línea 2) se caracterizó por la presencia de una banda de migración catódica y tres de migración anódica características, estando de estas tres bandas la intermedia más fuertemente teñida. Este segundo fenotipo fue observado en 2 ó 3 individuos de los 220 ensayados y se ha interpretado como el estado heterocigótico de un gen codificando este isoenzima.

La existencia de estos dos fenotipos, nos confirman la existencia de 2 loci génicos codificando a esta proteína: MDH-1 (migración anódica) y MDH-2 (migración catódica), ya que el enzima anódico se presenta heterocigoto independientemente del isoenzima catódico que es homocigoto.

Como patrón se ha utilizado intestino de cabra, observándose una banda anódica de migración muy rápida (Fig. 8A, línea 3).

-Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la G6PD en *O. venulosum*, se caracterizó por la presencia de tres fenotipos: un fenotipo exhibiendo una sola banda de migración anódica rápida que fue observado en el 96% de la población (Fig. 8B, línea 1, 2); un segundo fenotipo mostrando una sola banda de migración anódica ligeramente más lenta que la observada en el fenotipo 1 (Fig. 8B, línea 3) y un tercer fenotipo correspondiente al patrón híbrido entre ambos fenotipos que fue observado en un solo individuo (Fig. 8B, Línea 4). El extracto de intestino utilizado como control de la posible presencia de restos del hospedador mostró una mancha de migración más lenta respecto a las observadas para *O. venulosum*. Esta mancha no presenta buena resolución (Fig. 8B, Línea 5)

Los patrones isoenzimáticos observados para la G6PD en *O. venulosum*, una vez más confirman la tendencia tan estricta que existe en los endoparásitos hacia la

homocigosis. En un principio, los resultados obtenidos nos podrían hacer sospechar que las bandas detectadas con distinta movilidad electroforética podrían pertenecer a otra especie intestinal que hubiera pasado desapercibida en la determinación taxonómica. No obstante, esto no es posible debido a que, tal y como se ha comentado en Material y Métodos, cada individuo era estudiado y caracterizado bajo lupa anteriormente al estudio electroforético.

El cálculo de las frecuencias alélicas y el test de Hardy-Weinberg no se ha realizado, por no creerlo oportuno, puesto que los resultados indican claramente que no existe equilibrio en la población ensayada.

-Glucosa fosfato isomerasa

El patrón isoenzimático de la GPI en esta especie parásita se mostró muy semejante al ya observado para la G6PD, pues si bien la mayoría de los individuos mostraron un sólo fenotipo caracterizado por una banda anódica simple de migración rápida (Fig. 8C, línea 2), cuatro o cinco individuos mostraron una banda isoenzimática ligeramente más lenta que la observada para el resto de los individuos (Fig. 8C, línea 1). No se detectaron patrones isoenzimáticos híbridos entre ambos fenotipos.

El patrón isoenzimático del extracto de intestino, usado como control de posibles restos procedentes del hospedador presentó una banda anódica muy lenta respecto a

aquellas de *O. venulosum* (Fig. 8C, línea 3).

Los fenotipos encontrados para la GPI en *O. venulosum* pueden interpretarse como la expresión de un estado homocigótico para los alelos de un mismo gen codificando esta enzima.

No se han encontrado diferencias significativas entre individuos machos y hembras de *O. venulosum*, ni entre individuos procedentes de distintos hospedadores (*Ovis aries* y *Capra hircus*).

- Controles ensayados para los distintos isoenzimas en *O. venulosum*

Los controles que confirman la especificidad de la tinción fueron llevados a cabo para todos los enzimas ensayados, tiñendo los geles sin su sustrato correspondiente (ácido málico, glucosa 6P sal disódica y fructosa 6P respectivamente) no hallándose ningún tipo de bandas teñidas y por tanto confirmando la especificidad de las bandas observadas tras la administración del sustrato correspondiente.

Asimismo, y al igual que se ha hecho en las otras especies, se comprobó que las bandas o isoenzimas observados no correspondían con productos de degradación añadiendo inhibidores de proteasas como tampón de la muestra a la hora de preparar el extracto. No se observó ninguna variación en los patrones isoenzimáticos tras la

administración de éstos para ninguno de los isoenzimas ensayados.

La existencia de Cl_2Mg en la tinción de la GPI, nos exige controlar la posible expresión de enzimas Magnesio dependientes. No obstante, no se detectó la presencia de ninguna banda de actividad tras el control.

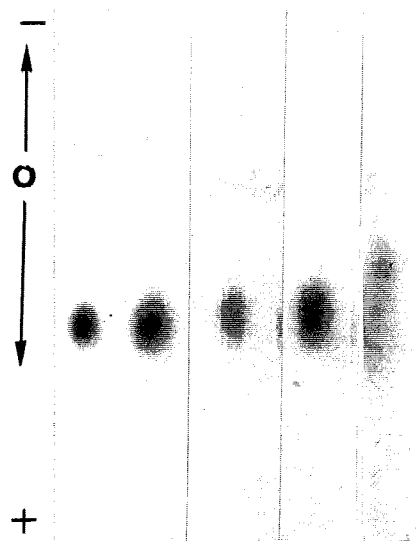
En todos los enzimas se utilizó extracto de intestino de cabra u oveja, como control de la presencia de posibles restos procedentes del hospedador.

FIGURA 8. Patrones isoenzimáticos de la MDH, G6PD y GPI en *Oesophagostomum venulosum*.

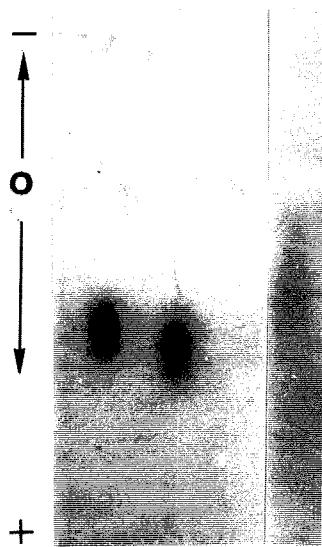
A. Patrón isoenzimático de la MDH. Línea 1: Fenotipo 1. Línea 2: Fenotipo 2. Línea 3: Extracto de intestino de cabra. **B.** Patrón isoenzimático de la G6PD. Línea 1 y 2: Fenotipo de migración rápida (macho y hembra respectivamente). Línea 3: Fenotipo de migración lenta. Línea 4: Fenotipo híbrido. Línea 5: Extracto de intestino de cabra. **C.** Patrón isoenzimático de la GPI. Línea 1: Fenotipo de migración anódica más lenta. Línea 2: Fenotipo de migración anódica rápida. Línea 3: Extracto de intestino.



A



B



C

III. 2. 2. DISTRIBUCION Y DETERMINACION ESPECIFICA DE *CHABERTIA* *OVINA*

La distribución por localidad, sexo y hospedador de los individuos recolectados de *Chabertia ovina* se muestra en la tabla 7 (Pag. 121).

Las características morfológicas que definen a la especie son: la presencia de una gran cápsula bucal (Fig. 9a) (Pag. 123) rodeada en su interior por finos elementos triangulares dispuestos en una doble corona (Fig. 9b). La determinación del sexo se ha basado en la presencia en el macho de una bolsa copulatriz característica y espículas largas y delgadas (Fig. 9c). La hembra presenta la vulva y el ano subterminalmente.

TABLA 7. Distribución de los ejemplares de *Chabertia ovina* por localidad, sexo y hospedador. N = número de individuos; H = hospedador; M = macho; H = hembra; N.C. = no concretado

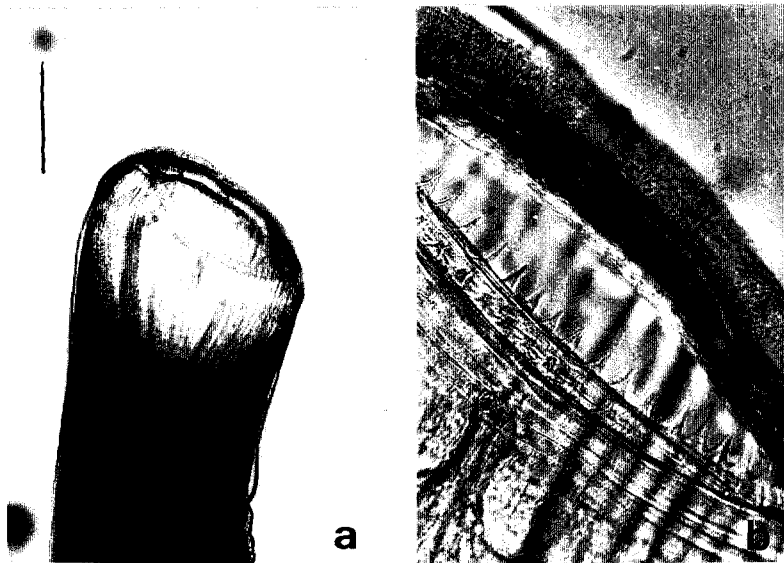
N	LOCALIDAD	H	SEXO		
			M	H	D
21	Almonte	cabra	10	11	-
17	Málaga	cabra	1	3	13
3	Bollullos	cabra	0	3	0
6	Palma del Condado	cabra	2	4	0
47			13	21	13

FIGURA 9. Morfología de *Chabertia ovina*.

a. Cápsula bucal. **b.** Elementos característicos dispuestos en doble corona rodeando la abertura oral. **c.** Bolsa copulatriz del macho y espículas.

a y c. Escala = 214 micras.

b. Escala = 53.5 micras.



III. 2. 2. a. Patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en *Chabertia ovina*

- Lactato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la LDH en *Ch.ovina*, al igual que en el caso de *O.venulosum*, no pudo ser resuelto en los distintos sistemas de tampones utilizados. (Tris-glicina, Tris-citrato, Tris-borato-edta). Por lo cual, deducimos, al igual que en *O.venulosum*, la escasa actividad de esta enzima en estos nematodes parásitos.

- Malato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la MDH en *Ch.ovina* se caracterizó por la presencia de una banda de migración catódica, así como una banda de migración anódica en todos los individuos ensayados (Fig.10 A) (Pag. 129). No se ha observado ningún patrón heterocigoto. No obstante, a la vista de los resultados obtenidos proponemos la existencia de 2 loci génicos codificando a esta enzima, siendo denominados MDH-1 (isoenzima de migración anódica) y MDH-2 (isoenzima de migración catódica).

El patrón isoenzimático de intestino de cabra, mostró una banda anódica de migración mucho más rápida, respecto a aquéllas observadas para *Ch. ovina*.

- Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

Los estudios sobre el patrón isoenzimático de la G6PD en esta especie parásita reveló la presencia de tres fenotipos distintos: a) una banda anódica simple de migración lenta (Fig. 10 B, línea 1); b) una banda anódica simple de migración rápida (Fig. 10 B, línea 2) y c) una banda de mayor tamaño y cuya migración coincide con las anteriores (Fig. 10 B, línea 3).

El patrón isoenzimático del extracto de intestino, usado como control de la presencia de posibles restos del hospedador presentó una banda anódica muy lenta respecto a aquéllas de *Chabertia ovina* (Fig. 10 B, línea 4).

Las frecuencias alélicas han sido calculadas para el locus de la G6PD en *Chabertia ovina* considerando el alelo 100 como el alelo más frecuente y el alelo 80 como el otro alelo. Se muestran en la tabla 8 (Pag. 130).

- Glucosa fosfato isomerasa

El patrón isoenzimático de la GPI en *Ch. ovina* se caracterizó por la presencia de tres fenotipos distintos: a) una banda anódica simple de migración lenta (Fig. 10 C línea 1), b) una banda anódica simple de migración rápida (Fig. 10 C, línea 2) y c) una banda de mayor tamaño y cuya migración coincide con la migración de la banda rápida

y lenta (Fig. 10 C, línea 3).

Las diferentes movilidades de las bandas observadas en los patrones isoenzimáticos de la G6PD y GPI en *Chabertia ovina*, han sido comprobadas introduciendo dichos extractos en otros geles para excluir cualquier tipo de duda que pudiese surgir por creer que el ensayo se hubiera realizado en condiciones diferentes o ajenas a nosotros, corroborando o eliminando el dato obtenido.

Las frecuencias alélicas han sido calculadas para el locus de la GPI en *Ch.ovina* considerando el alelo 100 como el alelo más frecuente mientras que el alelo 80 correspondería a la banda de migración más lenta y menos frecuente (Tabla 9) (Pag. 131). A la vista de los resultados obtenidos hay que destacar la tendencia, como ya se ha observado en otras especies de nematodes parásitos e isoenzimas, el carácter monomórfico de la enzima.

El patrón isoenzimático del extracto de intestino, usado como control de contaminación por el hospedador presentó una banda anódica muy lenta respecto a aquéllas de *Ch.ovina* (Fig. 10 C, línea 4).

Los fenotipos encontrados para la G6PD y GPI en *Ch.ovina* pueden explicarse como la existencia de un locus génico codificando esta enzima. Los fenotipos exhibiendo una sola banda isoenzimática serían la expresión del estado homocigótico de ambos

alelos, mientras que el tercer fenotipo expresaría el estado heterocigótico de este mismo gen.

No se han encontrado diferencias entre individuos machos y hembras de *Chabertia ovina* en ninguno de los patrones isoenzimáticos obtenidos.

-Controles ensayados para los distintos isoenzimas de *Chabertia ovina*

Al igual que en anteriores nematodos, se realizaron ensayos para descartar la posible existencia de "enzimas magnesio dependientes" y se incluyeron inhibidores de proteasas en algunos extractos, no observándose ninguna interferencia de bandas ajenas a la actividad de los enzimas estudiados (MDH, G6PD y GPI).

Los controles negativos de especificidad de tinción, fueron llevados a cabo para todos los enzimas ensayados tiñendo los geles sin su sustrato correspondiente (ácido málico, glucosa 6P sal disódica y fructosa 6P respectivamente) no hallándose ningún tipo de bandas teñidas.

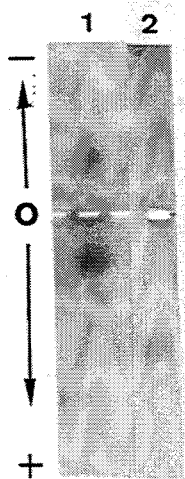
En todos los ensayos fueron incluidos extractos de intestino de cabra u oveja como control de posibles restos procedentes del hospedador.

FIGURA 10. Patrones isoenzimáticos de la MDH, G6PD y GPI observados en *Chabertia ovina*.

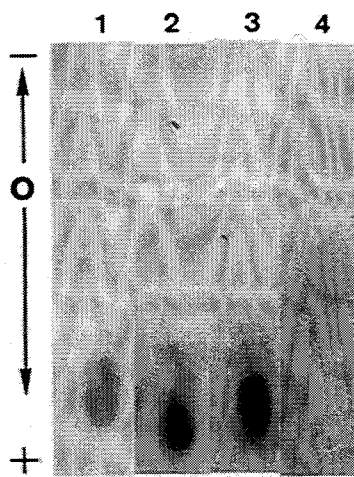
A. MDH. Línea 1: *Ch. ovina*. Línea 2: Extracto de intestino.

B. G6PD. Línea 1: Fenotipo de migración lenta. Línea 2: Fenotipo de migración rápida.
Línea 3: Fenotipo heterocigoto. Línea 4: Extracto de intestino.

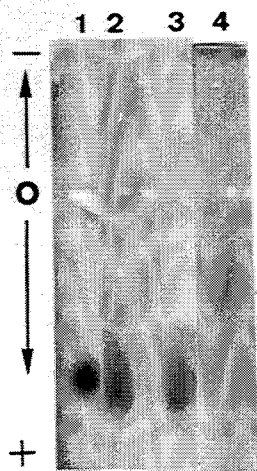
C. GPI. Línea 1: Fenotipo de migración lenta. Línea 2: Fenotipo de migración rápida.
Línea 3: Fenotipo heterocigoto. Línea 4: Extracto de intestino.



A



B



C

TABLA 8. Cálculo de las frecuencias alélicas y test de Hardy-Weinberg para el locus de la GP6D en *Chabertia ovina*. p = probabilidad; df = grados de libertad.

GENOTIPOS	INDIVIDUOS		X ²	X ² _c
	ENCONTRADOS	ESPERADOS		
100/100	31	28.39	0.240	0.157
80/80	5	2.35	2.988	1.967
100/80	11	16.26	1.702	2.040
TOTAL	47	47	4.93	4.164

FRECUENCIAS ALELICAS:

Alelo 100: $X_{100} = 0.777$

Alelo 80: $X_{80} = 0.223$ d.f. = 1; p < 0.05

TABLA 9. Cálculo de las frecuencias alélicas y test de Hardy-Weinberg para el locus de la GPI en *Chabertia ovina*. p = probabilidad; df = grados de libertad.

GENOTIPOS	INDIVIDUOS		X ²	X ² _c
	ENCONTRADOS	ESPERADOS		
100/100	31	29.09	0.125	0.068
80/80	4	2.11	1.680	0.907
100/80	12	15.8	0.891	1.144
TOTAL	47	47	2.696	2.199

FRECUENCIAS ALELICAS:

Alelo 100: $X_{100} = 0.787$

Alelo 80 : $X_{80} = 0.213$ d.f = 1; p < 0.05

El estudio comparativo de los patrones isoenzimáticos de la MDH, G6PD y GPI observados en *O. venulosum* y *Ch. ovina* nos permiten confirmar, al igual que para *P. rufescens* y *D. filaria*, el carácter diagnóstico que estas enzimas presentan para ambas especies. Así, el patrón isoenzimático de la MDH mostró en ambas especies el mismo isoenzima de migración catódica, mientras que el isoenzima anódico presentó una migración más rápida en el caso de *Chabertia ovina* (Fig. 11 A, línea 2) (Pag. 134) que en el caso de *Oesophagostomum venulosum* (Fig. 11A, línea 3). En ambos casos, este fenotipo (dos bandas en todos los individuos ensayados) se explicaría como la expresión de dos loci génicos homocigóticos codificando esta enzima.

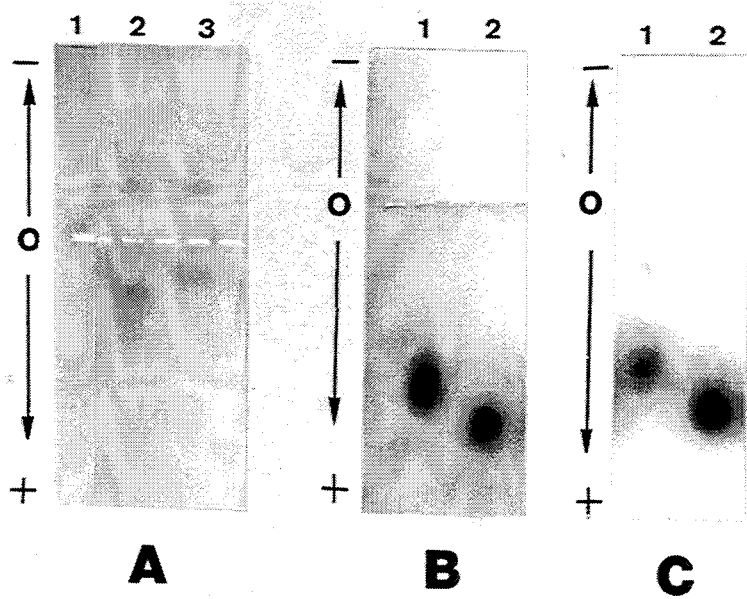
Los patrones isoenzimáticos de la G6PD y GPI fueron distintos permitiendo la diferenciación de ambas especies. La movilidad que presentó *O. venulosum* para ambas enzimas fue más lenta (Fig. 11B, línea 1) (Fig. 11C, línea 1) que la presentada por *Ch. ovina* (Fig. 11B, línea 2) (Fig. 11C, línea 2)).

FIGURA 11. Patrones isoenzimáticos comparativos observados para la MDH, G6PD y GPI en *O. venulosum* y *Ch. ovina*.

A. MDH. Línea 1: Extracto de intestino. Línea 2: *Ch. ovina*. Línea 3: *O. venulosum*.

B. G6PD. Línea 1: *O. venulosum*. Línea 2: *Ch. ovina*.

C. GPI. Línea 1: *O. venulosum*. Línea 2: *Ch. ovina*.



III. 2. 3. DISTRIBUCION Y DETERMINACION ESPECIFICA DEL GENERO *TRICHURIS*

La diferenciación entre los individuos de algunas especies de *Trichuris* resulta bastante difícil, y como se ha citado en el apartado de Material y Métodos, han sido muchos los autores que han tratado de discernir las especies de este género basándose en datos estrictamente morfológicos y biométricos.

Knight (1984), propuso su convicción de que muchas especies actualmente descritas del género *Trichuris* podrían ser sinónimas. Estas habrían surgido como consecuencia de la aceptación de una especie nueva por el simple hecho de haber sido encontrada en un hospedador distinto, cuando la influencia de los hospedadores en las especies puede dar como resultado poblaciones con distintas dimensiones morfológicas. Además, las variaciones morfológicas solamente reflejan adaptaciones fenotípicas de un parásito al medio ambiente, independientemente de cualquier tipo de diferencia o cambio genético (Thompson 1982).

Precisamente, y basándonos en estos autores, los ejemplares del género *Trichuris* aislados por nosotros a partir de *O. aries* y *C. hircus* cuya distribución por localidad, sexo y hospedador viene recogida en las tablas 10 y 11 (Pags. 139 y 140) podrían ser identificados como pertenecientes a tres especies: *Trichuris ovis*, *Trichuris globulosa* y *Trichuris skrjabini*.

La separación de los individuos pertenecientes a *T.skrjabini*, no planteó ningún problema, pues los caracteres morfológicos asignados a esta especie por los distintos autores, la hace claramente distinta a *T.ovis* y *T.globulosa*.

Un total de 57 individuos (19 machos y 38 hembras) de *T.skrjabini* han sido identificados morfológica y biométricamente.

La distribución de los distintos individuos por localidad, sexo y hospedador viene recogida en la tabla 11.

Los machos de *T.skrjabini* presentan una espícula corta (0.49-1.17, $X = 0.82$ mm) (Tabla 12) (Pag. 141), con punta redondeada, siempre cubierta por la vaina espicular y la espícula nunca se encuentra fuera de ésta (Fig. 12a) (Pag. 143). También se observaron grandes papilas caudales cónicas (Fig. 12b). Las hembras de *T.skrjabini* presentaron una vulva no prominente cubierta por espinas finas y afiladas (Fig. 12 c,d,e). Los huevos de esta especie se observan en la Figura 12f.

El problema se plantea, tanto a nivel de machos como de hembras, en lo que podríamos definir "complejo *ovis-globulosa*".

A nivel de machos, sobre todo considerando el valor predominante que en la literatura se da a las características de la vaina espicular y a la longitud de la espículas,

nuestros ejemplares, del denominado aquí complejo *ovis-globulosa*, podrían ser agrupados en cuatro tipos de poblaciones (Tabla 13) (Pag. 144).

Población 1: 70 individuos clasificados como *T.ovis*. Esta población incluye 6 machos de esta especie (Fig. 13 a-f) (Pag. 146) y 64 hembras (Fig. 14a) (Pag. 148). Los 6 machos se subdividieron en: Población 1a: 2 machos que presentaban espinas en la vaina espicular más cortas o de longitud similar a las del resto de la vaina y longitud espicular superior a 6mm (Fig. 13 a,b,c) y población 1b: 4 machos con vaina espicular uniformemente cilíndrica (Fig.13 d,e,f). Estos 4 machos presentaban todas las espinas de la vaina espicular de longitud similar (Fig. 13 e,f) y espículas de 4.7-5 mm de longitud.

Población 2: 13 individuos (8 machos y 5 hembras) clasificados como *T.globulosa* (Fig. 13 g,h; 14 b,c,d). Los machos con bulbo en la vaina espicular, presentando espinas largas y densas en el bulbo y en general en toda la vaina espicular, con una longitud espicular de 4.5-4.9 mm.

Población 3: 31 individuos (machos) clasificados como *T.ovis-T.globulosa*. La gran mayoría de ellos presentaron espinas en la protrusión más largas que en el resto de la vaina espicular (*T.globulosa*), pero la longitud espicular fue mayor de 5 mm.

A la vista de los resultados obtenidos, la diferenciación entre los machos de

T. ovis y los de *T. globulosa* no puede ser claramente realizada debido a que algunos machos de ambas especies presentan longitudes espiculares que se solapan, encontrándose dentro de los rangos citados por distintos autores para ambas especies. En estos casos (Población 3), cuando la longitud espicular de los individuos se solapa con la citada para ambas especies, son necesarios otros criterios para la correcta diferenciación.

Si consideramos como criterio taxonómico para diferenciar ambas especies únicamente las características morfológicas, siendo los machos de *T. globulosa* aquéllos que presentan vaina espicular con espinas cubriendo la protrusión más largas que en el resto de la vaina, y, por lo tanto, excluimos los datos biométricos debido al solapamiento de la longitud espicular, el rango de la longitud espicular obtenido para *T. globulosa* es: 4.74-6.60 (5.56) el cual resulta mayor al citado por Skrjabin y col. (1957) para esta especie, pero incluye el rango citado por Martínez y col. (1973).

La diferenciación de las hembras de *T. ovis* y *T. globulosa*, se llevó a cabo teniendo en cuenta la presencia de vulva evertida (*T. ovis*) o vulva no evertida (*T. globulosa*). Así, los ejemplares hembras de *Trichuris* recolectados a partir de *O. aries* y *C. hircus* pudieron ser agrupados en dos poblaciones (Tabla 13).

Las distintas poblaciones, así obtenidas para el complejo "*ovis-globulosa*" han sido estudiadas independientemente desde el punto de vista genético.

TABLA 10.- Distribución de los ejemplares de *Trichuris ovis* y *T. globulosa* por localidad, hospedador y sexo. M = machos; H = hembras; Hosp = hospedador.

HOSP.	POBLACION 1 <i>T. OVIS</i>		POBLACION 2 <i>T. GLOBULOSA</i>		POBLACION 3 <i>T. OVIS</i> - <i>T. GLOBULOSA</i>		LOCALIDAD
	CABRA	M	H	M	H	M	
1	-	-	-	2	-	-	desconocida
2	-	1	-	-	-	-	desconocida
3	-	1	-	-	1	-	desconocida
4	-	5	-	-	-	-	desconocida
5	-	4	-	-	1	-	Almonte
6	-	1	-	-	3	-	Zahara Sierra
7	-	2	-	1	4	-	Zahara Sierra
8	-	1	-	1	-	-	Almonte
9	-	1	-	-	-	-	Almonte
10	-	1	-	-	-	-	Almonte
11	-	2	-	-	-	-	Antequera
12	-	6	-	-	-	-	Almonte
13	-	3	-	-	-	-	Almonte
14	1	6	-	-	3	-	Palma Condado
15	1	7	-	-	-	-	desconocida
16	-	1	-	-	2	-	desconocida
17	-	3	1	-	1	-	desconocida
18	-	-	1	-	1	-	desconocida
19	-	-	2	-	-	-	desconocida
20	-	3	-	-	1	-	desconocida
21	-	-	-	-	2	-	desconocida
22	-	-	-	1	-	-	desconocida
23	-	2	-	-	4	-	desconocida
24	-	9	2	-	7	-	Los Corrales
25	2	-	1	-	-	-	desconocida
26	1	1	-	-	-	-	Almadén Mora
27	-	2	-	-	-	-	desconocida
OVEJA							
28	-	1	1	-	-	-	Huelva
29	-	1	-	-	1	-	Morón
30	1	-	-	-	-	-	desconocida

TABLA 11. Distribución de los 57 ejemplares de *Trichuris skrjabini* por localidad, sexo y hospedador. N = número de individuos.

N	LOCALIDAD	SEXO		HOSPEDADOR
		MACHO	HEMBRA	
5	desconocida	4	1	desconocido
2	Paradas	-	2	cabra
10	Los Corrales	4	6	cabra
1	Puebla de Cazalla	1	-	cabra
2	Sevilla	1	1	cabra
36	Almonte	9	27	cabra
1	Antequera	-	1	cabra

TABLA 12. Datos biométricos obtenidos de 57 individuos de *T. skrjabini* recolectados a partir de *Capra hircus* en el Sur de España. Todas las medidas están en mm.

NUMERO DE INDIVIDUOS		57: 19 machos + 38 hembras	
Características morfológicas: machos		Rango	Media
Longitud total		37-64	49.5
Porción esofágica		27-47	36.7
Porción posterior del cuerpo		8-17	12.9
Longitud espicular		0.49-1.17	0.82
Características morfológicas: hembras		Rango	Media
Longitud total		35-76	53.0
Porción esofágica		25-59	41.0
Porción posterior del cuerpo		9-17	13.0

FIGURA 12. Morfología de *Trichuris skrjabini*.

a: Vaina espicular del macho de *T.skrjabini*.

b: Papilas caudales del macho.

c: Vulva de la hembra.

d: Vulva rodeada de espinas agudas características de la especie.

e, f: Huevo saliendo a través de la vulva y en el medio externo.

a, d, e, f: Escala = 60 micras.

b: Escala = 15 micras.

c: Escala = 240 micras.

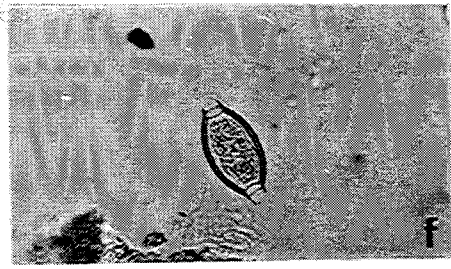
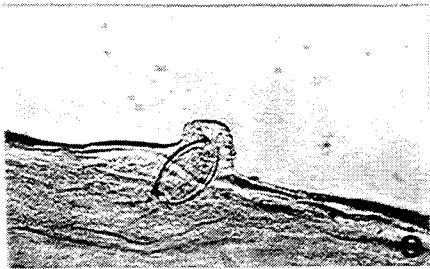
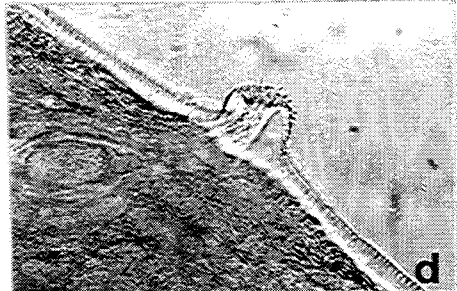
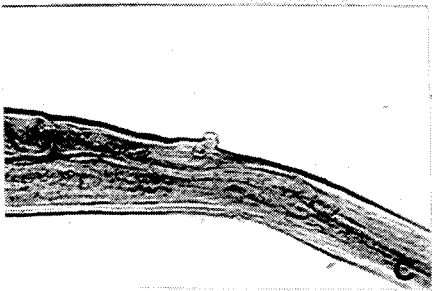
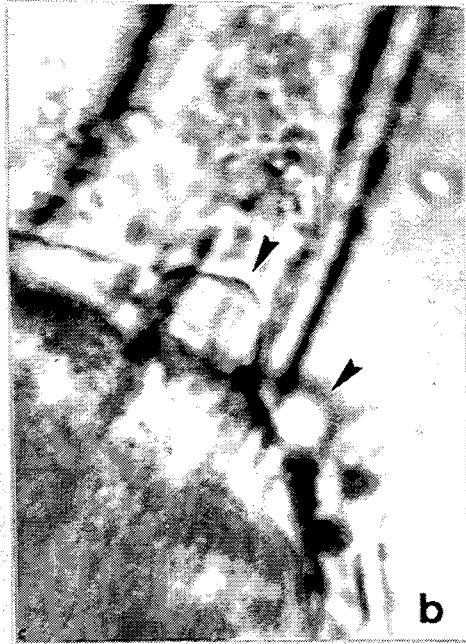
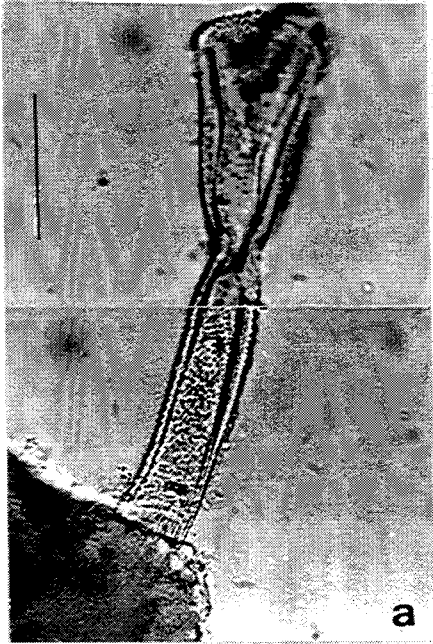


TABLA 13.- Datos biométricos obtenidos para las distintas poblaciones de *Trichuris* sp. recolectadas de *Ovis aries* y *Capra hircus*. Todas las medidas están dadas en mm. a = machos con protuberancia en la vaina espicular. b = machos con vaina espicular uniformemente cilíndrica (ver Material y Métodos).

	POBLACION 1: <i>T. OVIS</i>				POBLACION 2: <i>T. GLOBULOSA</i>		POBLACION 3: <i>T. OVIS-</i> <i>T. GLOBULOSA</i>	
Número de individuos	70: 6 machos + 64 hembras				13: 8 machos + 5 hembras		31 machos	
	a		b					
MACHOS	rango	media	rango	media	rango	media	rango	media
Longitud total	70-75	72.5	32-52	44.7	44-74	59.7	45-85	61.9
Porción esófago	55-55	55	22-44	35.3	30-60	44.8	25-65	44.9
Porción posterior	15-20	17.5	10-15	12.8	12-23	14.9	11-22	16.8
Longitud espicular	6-6.23	6.12	4.7-5	4.86	4.5-4.9	4.79	5.2-6.6	5.61
HEMBRAS	rango		media		rango	media	rango	media
Longitud total	32-87		67		60-68	63.8	-	-
Porción esófago	20-66		54.2		50-56	52.8	-	-
Porción posterior	8-16		12.3		7-12	10.2	-	-

FIGURA 13. Aspectos de la vaina espicular observados en las distintas poblaciones de *Trichuris* sp. encontradas.

a, b, c: Vaina espicular observada en la población 1a (*T. ovis*)

d, e, f: Vaina espicular observada en la población 1b.

g: Parte proximal de la vaina espicular en la población 2 (*T. globulosa*)

h: Bulbo esférico de la vaina espicular en la población 2.

a, d: Escala 253 micras.

b, c, f: Escala 63 micras.

e, g, h: Escala 40 micras.

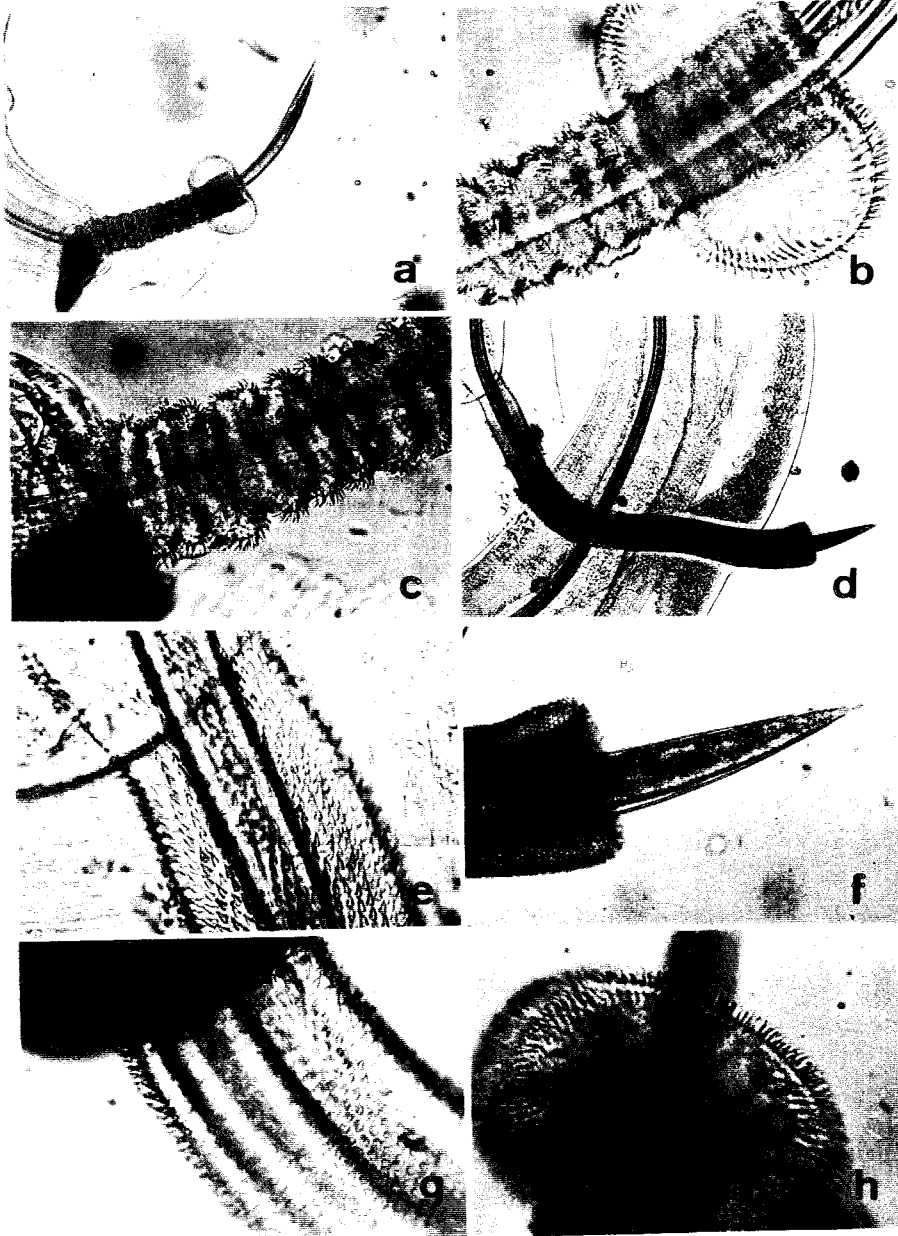


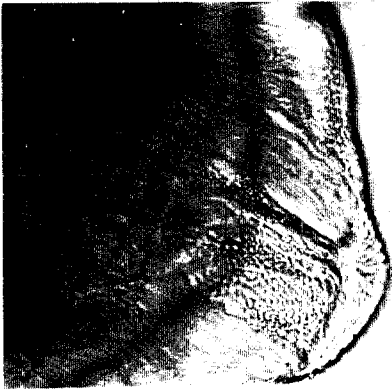
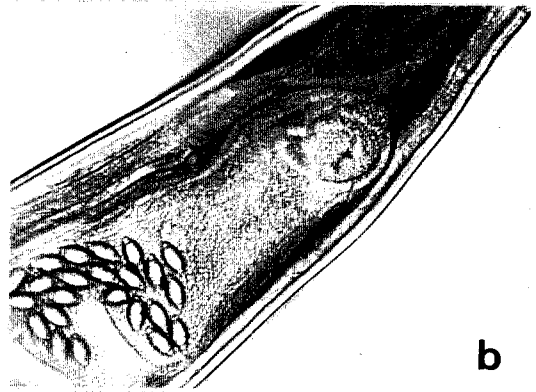
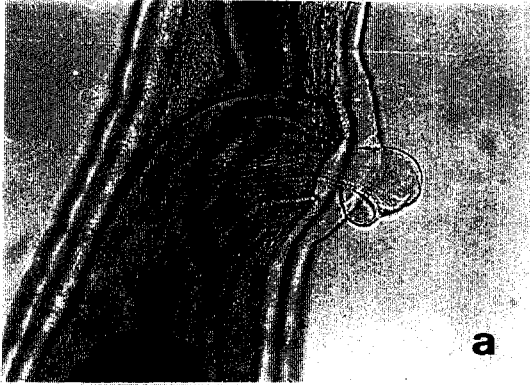
FIGURA 14. Vulva observada en hembras de *T.ovis* y *T.globulosa*.

a: Vulva evertida de las hembras pertenecientes a la población 1 (*T.ovis*).

b, c, d: Vulva observada en las hembras de la población 2 (*T.globulosa*).

a y b: Escala 255 micras.

c, d: Escala 85 micras.



III. 2. 3. a. Estudio de los patrones isoenzimáticos de la G6PD, GPI, MDH y LDH en *Trichuris ovis*, *Trichuris globulosa* y *Trichuris skrjabini*

-Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa

Se han identificado dos fenotipos distintos de la G6PD en *Trichuris sp.* (Fig. 15A) (Pag. 156). Estos dos fenotipos se caracterizaron por una banda anódica de migración rápida (Fenotipo 1=P1) (Fig. 15A, línea 2,3,4) y una banda anódica lenta (Fenotipo 2=P2) (Fig. 15A, línea 1). Estos dos fenotipos pudieron también ser identificados por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). El fenotipo 1 (P1) mostró una banda anódica de actividad simple (Fig. 15B, línea 1) mientras el fenotipo 2 (P2) se caracterizó por dos bandas anódicas (Fig. 15B, línea 2). Este fenotipo 1 fue encontrado en las tres poblaciones *T. ovis*, *T. globulosa* y *T. ovis-T. globulosa* (Población 1, 2 y 3), mientras que el fenotipo 2 fue exclusivamente encontrado para *T. skrjabini*. No se han observado patrones híbridos en ninguno de los individuos ensayados.

La existencia de dos bandas en el patrón isoenzimático de la G6PD en todos los individuos de *T. skrjabini* han sido interpretados como la existencia de dos loci génicos codificando esta enzima.

-Glucosa fosfato isomerasa

Dos fenotipos distintos también pudieron ser distinguidos en el patrón isoenzimático de la GPI de *Trichuris sp.* (Fig. 15C). Estos dos fenotipos se caracterizaron por la presencia de una banda anódica simple de migración rápida (Fenotipo A) (Fig. 15C, línea 2,3,4) y una banda anódica más lenta (Fenotipo B) (Fig. 15C, línea 1). Todos los individuos con fenotipo A para la GPI pertenecían a la población 1, 2 y 3 mientras que el fenotipo B para la GPI sólo fue observado en *T.skrjabini*. Por consiguiente, todos los individuos que presentaron una banda simple (Fenotipo 1) para la G6PD también mostraron fenotipo A para el patrón isoenzimático de la GPI. No se detectaron fenotipos híbridos.

Por lo tanto, no se observaron diferencias entre los patrones isoenzimáticos de la G6PD y GPI en el complejo *ovis-globulosa*, pero sí entre los patrones de éste y los observados en *T.skrjabini*, permitiendo la separación de los individuos de ambas especies.

La ausencia de heterocigotos en los patrones isoenzimáticos de la G6PD y GPI de *T.ovis-globulosa* y *T.skrjabini* puede sugerir un "efecto Wahlund" (Richardson y col., 1986) ya que las muestras fueron recolectadas de distintas poblaciones locales; este "efecto Wahlund" podría justificar la ausencia de panmixia y, por lo tanto la ausencia de heterocigotos. No obstante, ambas especies fueron recolectadas no sólo de ovejas y

cabras de la misma localidad sino también procedentes del mismo ciego (tablas 11 y 12).

-Lactato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la LDH se caracterizó por la presencia de cuatro fenotipos distintos: uno de ellos mostró una banda catódica de migración lenta (Fig. 15D, línea 1), un segundo fenotipo una banda catódica de migración más rápida (Fig. 15D, línea 2), un tercer fenotipo caracterizado por posibles múltiples bandas (isoenzimas) con una migración intermedia entre el fenotipo A y B (Fig. 15D, línea 3). Los tres fenotipos los presentaron tanto individuos de la población 1, como de la 2 y, asimismo, de la 3. El cuarto fenotipo correspondió a una banda catódica simple de migración muy rápida observado para el patrón isoenzimático de *T.skrjabini*. (Fig. 15D, línea 4).

Las movilidades diferentes fueron comprobadas en sucesivos ensayos usando algunas de ellas incluso como control de dicha movilidad ante los restantes extractos a ensayar.

Los fenotipos observados en el patrón isoenzimático de la LDH en *T.ovis* caracterizados por la presencia de una banda rápida o lenta puede ser interpretado como el estado homocigótico de un gen codificando esta enzima, mientras el tercer fenotipo podría corresponder con un estado heterocigótico de este mismo gen. El Test de Hardy-

Weinberg indica que las diferencias entre las frecuencias observadas y teóricas es debido al azar porque Pasteur y col. (1988) determinaron que la probabilidad debe ser menor de 0.05 (preferentemente mucho menor) antes de que podamos decir que la población no está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El cálculo de las frecuencias alélicas y el Test de Hardy-Weinberg para el locus de la LDH se ha realizado independientemente en la población 1 ($\chi^2=4.48$, $df=1$, $p=0.04$), en la población 2 ($\chi^2=1.32$, $df=1$, $p=0.28$) y en la población 3 ($\chi^2=4.47$, $df=1$, $p=0.035$). No obstante y puesto que los patrones isoenzimáticos de la LDH observados para estas poblaciones fueron idénticos, nosotros consideramos las tres poblaciones del complejo *ovis-globulosa*, como pertenecientes a una misma especie. Así, el cálculo de las frecuencias alélicas lo hemos llevado a cabo considerando el alelo más común como LDH-100 y determinando al resto de los alelos de acuerdo a sus movilidades relativas respecto a LDH-100. La distribución de los individuos con diferentes fenotipos para la LDH fue: 43 individuos presentaron el fenotipo 100/100, 18 individuos presentaron el fenotipo 80/80 mientras que 31 individuos presentaron un patrón híbrido 100/80. Así, para esta población $\chi^2=6.95$, $df=1$, $p=0.013$ (Tabla 14) (Pag. 157).

El fenotipo observado en *T.skrjabini* mostrando una banda catódica simple muy rápida puede ser explicado como la expresión homocigótica de un locus para la LDH en *T.skrjabini*.

-Malato deshidrogenasa

El patrón isoenzimático de la MDH también ha sido determinado para *Trichuris sp.* (Fig. 15E). Los individuos pertenecientes a las poblaciones 1, 2 y 3 mostraron el mismo patrón isoenzimático. Este se caracterizó por la presencia de tres fenotipos distintos: dos de ellos presentaron una banda catódica simple con migración rápida (Fig. 15E, línea 1) o lenta (Fig. 15E, línea 3) respectivamente, y un tercer fenotipo que correspondió a un patrón híbrido de ambos fenotipos. (Fig. 15E, línea 4). El patrón isoenzimático en *T.skrijabini* se caracterizó por una banda catódica simple de migración muy lenta. (Fig. 15E, línea 2).

No se han encontrado diferencias significativas entre individuos machos y hembras y entre individuos procedentes de distintos hospedadores (*Ovis aries* y *Capra hircus*).

-Controles ensayados para los distintos isoenzimas en *Trichuris sp.*

Se podría sugerir que los dos fenotipos observados para la G6PD y GPI, e incluso los observados para la LDH y MDH, fueran debidos a artefactos de la preparación, tales como productos de degradación, tiempo de almacenamiento de las muestras, etc. Sin embargo, esto no parece ser el caso porque en las muestras son incluidos inhibidores de proteasas y además, diferentes patrones, se observaron usando

muestras frescas y muestras congeladas (-80°C). Los patrones isoenzimáticos así obtenidos para la LDH, MDH, G6PD y GPI no variaron de los ya vistos anteriormente.

Asimismo, se han realizado diversos ensayos para comprobar la posible presencia de bandas "fantasmas" en los patrones isoenzimáticos observados, debido a "enzimas magnesio dependientes". Este ensayo se llevó a cabo para la GPI, ya que es la única enzima que incluye Cl_2Mg como reactivo de la mezcla de tinción. No se detectó ninguna banda de actividad.

Los controles negativos para garantizar la especificidad de la tinción, fueron llevados a cabo para todos los enzimas ensayados tiñendo los geles sin su sustrato correspondiente (glucosa 6P sal disódica, fructosa 6P, lactato sódico y ácido málico respectivamente). En ningún caso se observó algún tipo de banda teñida.

Por consiguiente, todos los individuos ensayados, tanto machos como hembras, pertenecientes a la población 1 (*T. ovis*), población 2 (*T. globulosa*) y población 3 (*T. ovis-T. globulosa*) tienen idénticos patrones isoenzimáticos para la G6PD, GPI, LDH y MDH mientras que *T. skrjabini* posee patrones isoenzimáticos característicos y distintos para estas cuatro enzimas estudiadas.

FIGURA 15. Patrones isoenzimáticos de la G6PD, GPI, LDH y MDH en *T.ovis*, *T.globulosa* y *T.skrjabini*.

A. Patrón isoenzimático de la G6PD en geles de almidón. Línea 1: Fenotipo 2=P2. Líneas 2, 3, 4: Fenotipo 1=P1. **B.** Patrón isoenzimático de la G6PD en geles de poliacrilamida. Línea 1: Fenotipo 1 (P1). Línea 2: Fenotipo 2 (P2). **C.** Patrón isoenzimático de la GPI en geles de almidón. Línea 1: Fenotipo B. Líneas 2, 3, 4: Fenotipo A. **D.** Patrón isoenzimático de la LDH en geles de almidón. Línea 1: Banda catódica de migración lenta (Fenotipo A). Línea 2: Banda catódica de migración más rápida (Fenotipo B). Línea 3: Posibles múltiples bandas con una migración intermedia entre el fenotipo A y B. Línea 4: Banda catódica simple de migración muy rápida. **E.** Patrón isoenzimático de la MDH en geles de almidón. Línea 1: Banda catódica simple de migración rápida. Línea 2: Banda catódica simple de migración muy lenta. Línea 3: Banda catódica simple de migración lenta. Línea 4: Patrón híbrido de los fenotipos 1 y 3.

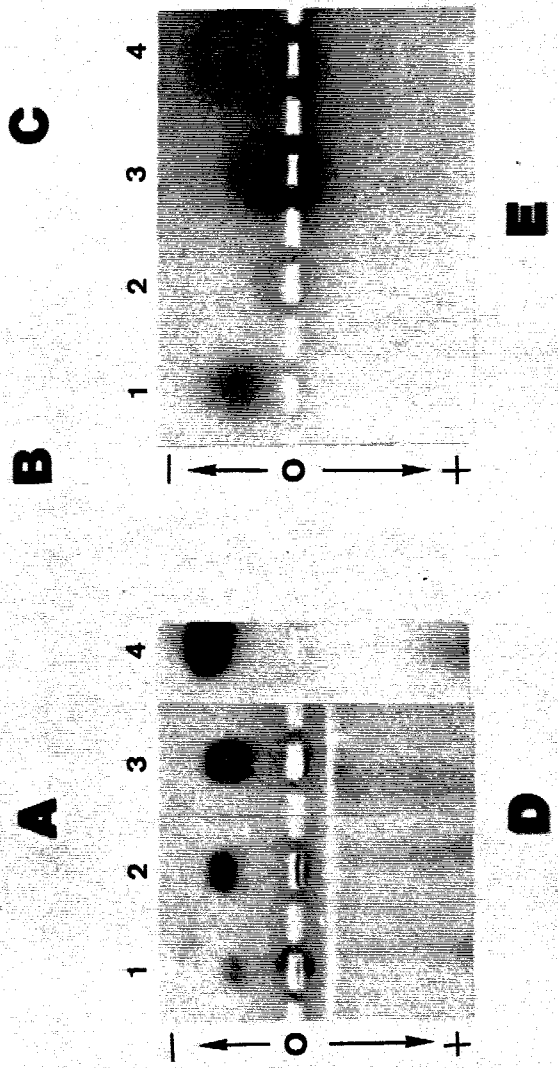
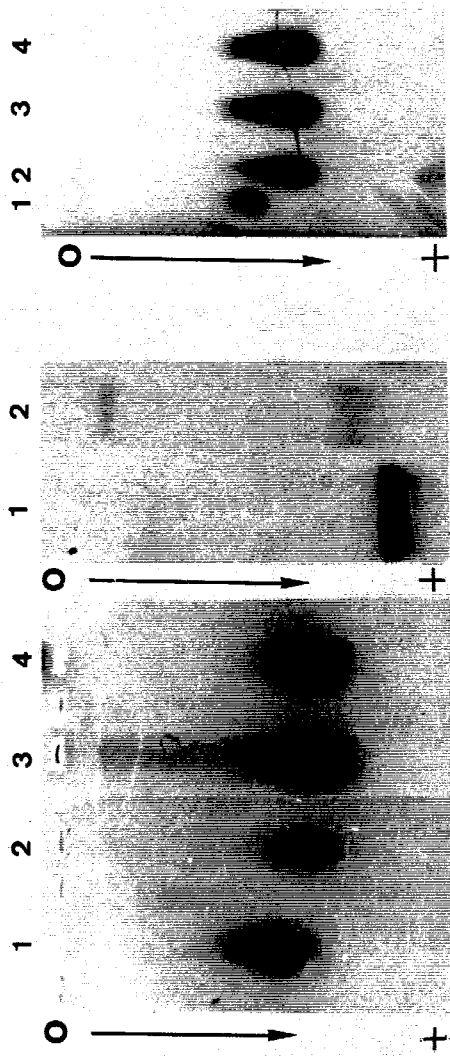


TABLA 14. Cálculo de las frecuencias alélicas y test de Hardy-Weinberg para el locus de la LDH en *Trichuris ovis*. p = probabilidad; d.f. = grados de libertad.

GENOTIPOS	INDIVIDUOS		X ²	X ² _c
	ENCONTRADOS	ESPERADOS		
100/100	43	37.7	0.75	0.61
80/80	18	11.9	3.13	2.64
100/80	31	42.4	3.07	2.80
TOTAL	92	92	6.95	6.05

FRECUENCIAS ALELICAS:

Alelo 100: $X_{100} = 0.64$

Alelo 80: $X_{80} = 0.36$

d.f. = 1; $p > 0.013$

En resumen, los estudios morfológicos, biométricos y genéticos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral en especies de *Trichuris* aisladas de *O.aries* y *C.hircus* nos permiten discriminar 2 tipos de especies: *T.ovis* y *T.skrjabini*.

Por lo tanto, consideramos a *T.ovis* como especie válida y proponemos el paso a sinonimia de *T.globulosa*, basándonos para ello en:

1. Los estudios biométricos confirman el solapamiento del valor de la longitud espicular en ambas especies.
2. Las diferencias en el aspecto vulvar no son significativas
3. La existencia, en algunos casos, en el mismo hospedador, de poblaciones compuestas por machos de *T.globulosa* y hembras de *T.ovis*, indican la existencia de reproducción sexual (panmixia).
4. Los patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI son idénticos en ambas poblaciones y en ambos sexos.
5. El test de Hardy-Weinberg indica que la población está en equilibrio.

Basados en estas consideraciones, los datos morfológicos y biométricos de *T. ovis* deberían incluir:

MACHOS:

1. Individuos con presencia de bulbo esférico en la vaina espicular y cubierta con espinas que, a veces, son más largas en el bulbo que en el resto de la vaina. Muy ocasionalmente, algunos ejemplares presentan vaina cilíndrica; en estos casos, los individuos son de menor talla media.

- Longitud total: 32-85 mm
- Longitud espicular: 3.8-7.65 mm
- Porción esofágica: 22-65 mm
- Porción posterior del cuerpo: 10-28 mm

HEMBRAS:

- Longitud total: 32-87 mm
- Vulva localizada en el final de la zona esofágica.
- Vulva generalmente evertida; ocasionalmente vulva no evertida en individuos o formas jóvenes.
- Vulva con espinas siempre en forma de papilas.
- Porción esofágica: 20-66 mm
- Porción posterior: 7-16 mm

Actualmente, y según Cordero del Campillo y col. (1994), las especies de *Trichuris* citadas en España, en *Capra hircus* y *Ovis aries*, han sido: *T. ovis*, *T. globulosa* y *T. skrjabini*, no habiéndose especificado las especies de *Trichuris* presentes en vaca o camello.

Sin embargo, en ciervo, Martínez y col. (1979), proponen una nueva especie de *Trichuris*: *T. guevarai*.

La diferencia de los machos de *T. ovis* y *T. guevarai*, no puede ser posible atendiéndonos a los datos dados por estos autores, ya que tanto la longitud total de los machos (40-56.8 mm), como la longitud espicular (5.8-7.22 mm), estarían dentro de los valores dados por nosotros para *T. ovis*, así como la forma de la vaina espicular que se presenta uniformemente cilíndrica en *T. guevarai*. No obstante, las hembras de *T. guevarai*, presentarían una longitud total de 28.9-38.5 mm, que es ligeramente más pequeña que la dada para las hembras de *T. ovis*, estando la vulva en *T. guevarai* no evertida (sería de tipo *globulosa*).

Knight, 1974, señala la existencia de al menos 25 especies de *Trichuris*, descritas en rumiantes, con la posible existencia de sinonimias entre algunas de ellas, y da una clasificación basándose en el tamaño de la longitud espicular.

Agrupando los datos dados por estos autores y los obtenidos por nosotros,

podemos llevar a cabo la siguiente clasificación:

- Machos con vaina espicular presentando bulbo en su extremo distal 1
- Machos con vaina espicular uniformemente cilíndrica (igual diámetro a lo largo de su longitud) 2
- Machos con vaina espicular sin bulbo, pero ligeramente expandido en su extremo distal 3

- 1 - Longitud espicular menor 3.8 mm ***T. capreoli***
- Longitud espicular mayor 3.8 mm 4
- 2 - Longitud espicular menor 3.8 mm ***T. giraffae***
- Longitud espicular mayor 3.8 mm 5
- 3 - Longitud espicular menor 3.8 mm 10
- Longitud espicular mayor 3.8 mm 9
- 4 - Con papilas caudales bien visibles ***T. orearnos***
- Con papilas caudales imperceptibles o ausentes ***T. antidorchi***
- T. ovis***

5	- Espinas dispuestas a lo largo de toda la vaina espicular	6
	- Espinas ausentes en la parte distal	7
6	- Espícula en forma de sable con punta afilada	<i>T. ovis</i>
	- Espícula con la punta redondeada	<i>T. lani</i>
7	- Longitud espicular menor 5.5 mm	8
	- Longitud espicular mayor 5.5 mm	<i>T. barbetonensis</i>
8	- Espícula retraída con punta redondeada	<i>T. tenuis</i>
	- Espícula sobresaliendo de la vaina espicular y muy afilada	<i>T. cervicaprae</i>
9	- Con espinas en toda la vaina espicular	11
	- Sin espinas en la parte distal de la vaina	<i>T. gazellae</i>
10	- Espinas presentes en toda la vaina espicular	12
	- Espinas ausentes en la parte distal de la vaina espicular	13

11	- Con papilas caudales grandes	<i>T.indicus</i>
	- Papilas caudales ausentes o casi imperceptibles	<i>T.longispicularis</i>
12	- Espícula con punta afilada	<i>T.longispicularis</i>
	- Espícula con punta redondeada	14
13	- Longitud espicular 1 mm	<i>T.spiricollis</i>
	- Longitud espicular 2.13-3.08 mm	<i>T.schumatovitschi</i>
	- Longitud espicular 1.68-1.76 mm	<i>T.baeri</i>
14	- Longitud espicular menor 1 mm	<i>T.parvispiculum</i>
	- Longitud espicular mayor 1.5 mm	<i>T.discolor</i>
	- Longitud espicular 1-1.5 mm	<i>T.ovina</i>

De la tabla se desprende que la diferenciación de los machos de *T. ovis* que presentan bulbo en la vaina espicular vendría dada por el valor de la longitud espicular (> 3.8) y la ausencia de papilas caudales. No obstante con estas características también quedaría incluida *T. antidorchi* parásito del antílope en Sudáfrica. Esta especie, según Skrzabin y col. (1957) no difiere en tamaño y aspecto externo de *T. globulosa* habiéndose encontrado algunas diferencias en los órganos internos. También este autor, confirma la similitud de *T. antidorchi* con *T. ovis* pero difiere de ésta por presentar espícula ligeramente cuticularizada, por no tener expansión distal y por el peculiar pliegue de la parte distal de la vagina.

Por otra parte, en los individuos machos que presentan vaina uniformemente cilíndrica nos encontramos las siguientes especies parásitas de rumiantes: *T. giraffae*, *T. ovis*, *T. lani*, *T. barbetonensis*, *T. tenuis* y *T. cervicaprae*.

T. giraffae queda caracterizada por presentar longitud espicular > 3.8 mm. *T. barbetonensis*, *T. tenuis* y *T. cervicaprae* carecen de espinas en la parte distal de la vaina espicular, característica que no se ha observado en ningún individuo de *T. ovis*. Por último, la diferenciación de *T. ovis* y *T. lani* es clara teniendo en cuenta la espícula en forma de sable con punta afilada de *T. ovis* y la espícula de punta redondeada de *T. lani*.

El mismo estudio diferencial se ha llevada a cabo con las hembras de *Trichuris* parásitas de rumiantes, teniendo en cuenta las siguientes características:

- Vulva claramente evertida	1	
- Vulva no evertida	2	
- Vulva ligeramente evertida	3	
1 - Espinas de la vulva a manera de papilas	4	
- Espinas de la vulva agudas	5	
- Ausencia de espinas		<i>T. barbetonensis</i>
- Sin datos bibliográficos		<i>T. cervicaprae</i>

2	- Vulva con espinas	6
	- Vulva sin espinas	7
3	- Vulva ligeramente evertida con espinas cuticulares finas y expansión presente en el final proximal de la vagina	<i>T.oreamnos</i>
	- Vulva sin espinas o proyecciones	<i>T.gazellae</i>
	- Vulva con espinas semejantes a papilas	<i>T.ovis</i>
4	- Presencia de expansión recubierta de espinas después de los 2° y 3° pliegues de la vagina	<i>T.ovina</i>
	- Sin estas características	<i>T.ovis</i>
5	- Vagina con cámara de huevos característica , aproximadamente a mitad de la longitud seguida de ligeras curvas hacia el útero	<i>T.schumacovitschi</i>
	- Vagina sin cámara de huevos característica, llegando a estar expandida hacia la mitad de la longitud hacia el útero	<i>T.skrjabini</i>
6	- Vagina en forma de tubo	<i>T.lani</i>
	- Vagina forman tres pliegues en su mitad distal retrayéndose uno en otro	<i>T.antidorchi</i>

- 7 - Vagina con muchas convoluciones y cámara de huevos presente a la mitad de la longitud *T.tenuis*
- Vagina con dos o tres curvas sencillas, cubiertas con espinas grandes semejantes a papilas a 3/4 de su longitud *T.discolor*

A la vista de la tabla de clasificación, llama la atención el reducido número de especies, teniendo en cuenta las citadas en el caso de los machos. Este hecho, se explica debido a la falta de información bibliográfica obtenida para las hembras de estas especies.

La diferenciación de las hembras de *T.ovis*, respecto de las hembras de otras especies, es clara teniendo en cuenta la forma de las espinas vulvares a manera de papilas, presentes en esta especie. No obstante, no hemos encontrado características diferenciales entre *T.ovis* y *T.ovina*, excepto la citada por Skrjabin y col. (1957), que se basa en la presencia de una expansión, recubierta de espinas, posterior a las primeras convoluciones vaginales y la existencia de una convolución distal cubierta de espinas siguiendo a esta expansión.

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos tras los ensayos realizados, permiten determinar que el patrón isoenzimático de la LDH en *Protostrongylus rufescens*, se caracteriza por la presencia de un isoenzima de migración catódica.
2. La existencia de un solo fenotipo para la MDH, en machos y hembras de *P.rufescens*, caracterizado por un solo isoenzima de migración catódica y otro de migración anódica, permite concluir que este enzima es codificado por dos loci génicos que expresan un estado homocigótico de ambos genes.
3. Los patrones isoenzimáticos de la G6PD y GPI, en machos y hembras de *P.rufescens*, están caracterizados, en ambos casos, por la presencia de un solo isoenzima de migración anódica, lo que, como en el caso anterior sugiere un estado de homocigosis de un solo gen, para codificar a cada uno de los dos enzimas mencionados.
4. Nuestros resultados en el estudio genético de la LDH en *Dictyocaulus filaria*, que coincide con los obtenidos por otros autores, confirma que el patrón isoenzimático correspondiente a este enzima, se caracteriza por la existencia de cinco isoenzimas, en todos los individuos ensayados: LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 y LDH-5. Lo que permite concluir que este enzima estaría codificado por dos loci génicos en estado homocigótico.

5. El patrón isoenzimático de la MDH en *D.filaria*, revela la existencia de tres fenotipos que sería la expresión de un solo locus génico, en estado homocigótico (a y b) y heterocigótico (c). La aplicación del test de Hardy-Weinberg a los resultados obtenidos en el estudio de la MDH en *D.filaria*, nos permite concluir que la población no está en equilibrio.

6. Nuestros resultados demuestran la existencia de tres fenotipos, para el patrón isoenzimático de la G6PD y GPI, y de un solo locus génico codificando cada uno de los enzimas. La aplicación del test de Hardy-Weinberg a ambos enzimas, nos permite concluir que la población no está en equilibrio.

7. Los resultados obtenidos para la MDH en *Oesophagostomum venulosum*, muestran la existencia de dos fenotipos. Las características mostradas por estos dos fenotipos, nos permite concluir que existen dos loci génicos, MDH-1 y MDH-2, codificando este enzima.

8. La existencia de tres fenotipos observados en la G6PD de *O.venulosum*, nos permite concluir que éstos resultarían de la expresión del estado homocigótico/heterocigótico de un solo locus génico codificando este enzima. La frecuencia con que cada uno de los fenotipos de la G6PD, aparecen en la población de *O.venulosum* estudiada, nos indica una clara tendencia hacia la homocigosis.

9. Aunque los resultados obtenidos para la GPI en *O. venulosum*, indican la existencia de solo dos fenotipos, las frecuencias de cada uno de ellos muestran la polarización hacia uno de ellos.

10. Los estudios llevados a cabo para la MDH en *Chabertia ovina*, nos permiten concluir la existencia de dos loci génicos (MDH-1 y MDH-2) codificando esta enzima.

11. La existencia de tres fenotipos distintos en el patrón isoenzimático de la G6PD y GPI en *Chabertia ovina* nos permiten concluir la existencia de un solo locus génico codificando cada uno de estas enzimas.

12. Tras los estudios morfológicos y biométricos llevados a cabo en las especies de *Trichuris*, aisladas de *Ovis aries* y *Capra hircus*, concluimos que existen tres poblaciones de *Trichuris* incluídas dentro del complejo aquí llamado "*ovis-globulosa*", y una cuarta población claramente diferenciada de las anteriores: *T. skrjabini*.

13. Los estudios del patrón isoenzimático de la G6PD en *Trichuris* sp, nos permiten concluir la existencia de un solo fenotipo observado en las tres poblaciones pertenecientes al complejo "*ovis-globulosa*", así como la presencia de dos isoenzimas de distinta migración anódica en *T. skrjabini*.

14. Los estudios del patrón isoenzimático llevados a cabo para la GPI en las tres poblaciones pertenecientes al complejo "*ovis-globulosa*" dieron como resultado la existencia de un solo fenotipo claramente distinto al observado en *T.skrjabini*.

15. Tres fenotipos distintos, pudieron ser observados en el patrón isoenzimático de la LDH y MDH de las poblaciones ensayadas del complejo "*ovis-globulosa*". Estos fenotipos, nos permiten concluir la existencia de un solo locus génico codificando esta enzima. *T.skrjabini* presentó un cuarto fenotipo distinto a los tres anteriores.

16. Los estudios genéticos realizados en las tres poblaciones incluídas dentro del complejo "*ovis-globulosa*", nos permiten concluir que las tres poblaciones presentan idénticos patrones isoenzimáticos para la G6PD, GPI, LDH y MDH, mientras que *T.skrjabini*, posee patrones isoenzimáticos característicos y distintos para estas cuatro enzimas. Por lo tanto, los estudios morfológicos-biométricos y genéticos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral, nos permiten concluir la existencia de dos especies procedentes de *Ovis aries* y *Capra hircus*: *T.ovis* y *T.skrjabini*, proponiendo el paso de *T.globulosa* como sinonimia de *T.ovis*.

17. A la vista de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, las características morfológicas y biométricas que definen a la especie *T.ovis* sería: machos con presencia de bulbo esférico en la vaina espicular y cubierta con espinas que, a veces, son más largas en el bulbo que en el resto de la vaina y ocasionalmente, algunos ejemplares presentan vaina cilíndrica, siendo éstos de menor talla media; longitud total: 32-85 mm, longitud espicular:

3.8-7.65 mm, porción esofágica: 22-65 mm, porción posterior del cuerpo: 10-28 mm; y hembras de longitud total: 32-87 mm, porción esofágica: 20-66 mm, porción posterior: 7-16 mm y vulva localizada en el final de la zona esofágica, generalmente evertida y ocasionalmente no evertida, en individuos o formas jóvenes, con espinas siempre en forma de papilas.

18. Las diferencias detectadas en nuestro estudio entre los patrones isoenzimáticos de la LDH, MDH, G6PD y GPI en *P.rufescens* y *D.filaria*, *O.venulosum* y *Ch. ovina*, así como en *Trichuris* sp. aisladas de *Ovis aries* y *Capra hircus* nos permiten concluir que estas enzimas pueden utilizarse para diferenciar estas especies y por lo tanto, presentan carácter diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

1. AGATSUMA, T. y SUZUKI, N. 1981. Electrophoretic studies on enzymes in *Paragonimus sp.* I. Comparison of isozyme patterns between *Paragonimus ohirai* and *Paragonimus miyazakii*. Jpn. J. Parasitol. **30**: 37-43.

2. ANDREWS, R.H., BEVERIDGE, I., ADAMS, M. y BAVERSTOCK, P.R. 1989. Genetic characterization of three species of *Onchocerca* at 23 enzyme loci. J. Helminthol. **63**: 87-92.

3. AUGUSTINSSON, K.B. 1961. Ann. N. Y. Acad. Sci. **94**: 884-860. (Citado por King 1968).

4. AVISE, J.C. 1975. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zoo. **23**: 465-481.

5. BADANIN, M.V. 1939. Helminthiases of camels. Doctoral thesis.

6. BAYLIS, H.A. 1930. Three notes on parasitic nematodes. Ann. Mag. Nat. Hist. Serie **10**: 497-502.

7. BOISSEZON, B. y JELNES, J.E. 1982. Isozyme studies on cercariae from monoinfections and adults worms of *Schistosoma mansoni* (10 isolates) and *S. rodhaini* (one isolate) by horizontal polyacrylamide gel electrophoresis and staining of eight

enzymes. *Parasitenkd.* **67**: 185-196.

8. BOYD, J.W. 1961. *Biochem. J.* **81**: 434-441. (Citado por King 1968).

9. BRYANT, C. y FLOCKHART, H.A. 1986. Biochemical strain variation in parasitic helminths. *Advances in Parasitology*. Vol **25**: 276-319.

10. BULLINI, L. 1982. Genetic, ecological and ethological aspects of the speciation process. *Mechanisms of Speciation*, pp: 241-246.

11. BULLINI, L. 1985. The electrophoretic approach to the study of parasites and vectors. *Parassitología*. **27**: 1-11.

12. CHANDLER, A.C. 1930. Specific characters in the genus *Trichuris* with a description of a new species *Trichuris tenuis* from a camel. *J. Parasitol.* **16**: 198-206.

13. COBBOLD, T.S. 1864. *Entozoa*. London.

14. CONDE DEL PINO, E., PEREZ-VILAR, M., CINTRON-RIVERA, A.A. y SEÑERIZ, R. 1966. Studies in *Schistosoma mansoni*. I. Malic and lactic dehydrogenase of adult worms and cercariae. *Exp. Parasitol.* **18**: 320-326.

15. CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1985). Aspectos geográficos y climáticos, y problemas parasitarios del ganado ovino de la provincia de León. Comun. INIA; Ser. Hig. San. Anim. **11**: 21-35. (Citado en OVIS, 1993, n° 25: 11-19)
16. CORDERO DEL CAMPILLO, M., CASTAÑÓN ORDOÑEZ, L. y REGUERA FEO, A. 1994. Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. 2ª Edición. Universidad de León. Secretariado de publicaciones.
17. CUTILLAS, C. 1984. Diferenciación de nematodos parásitos atendiendo a criterios morfológicos y cariológicos. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Sevilla.
18. CUTILLAS, C., RODRIGUEZ, B. y GUEVARA, D.C. 1992. Isoenzymatic pattern and structure of glutamate dehydrogenase from *Ascaris suum*. J. Helminthol. **66**: 310-312.
19. DE VOS, T., SZALAI, A.J. y DICK, T.A. 1990. Genetic and morphological variability in a population of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824). Syst. Parasitol. **16**: 99-105.
20. DIAZ, E. 1949. Epizootia de trichostrongilosis o verminosis gastrointestinales de los pequeños rumiantes. Cienc. Vet. **10**: 531-539.

21. DIEZ BAÑOS, N. (1990). Estudio epidemiológico sobre los nematodos gástricos ovinos en la provincia de León, con especial referencia a *Ostertagia spp.* Tesis doctoral. Fac. Vet. León. (Citado en OVIS, 1993, nº 25: 11-19).
22. DUJARDIN, F. 1845. Histoire naturelle des helminthes ou vers intestinaux. Paris. 654 pp.
23. DUNN, A.M. (1983). Helmintología veterinaria. Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V.
24. ESPINA, C. 1993. Diferenciación inter e intra específica de nematodos pulmonares parásitos de la ganadería española mediante técnicas electroforéticas. Tesina. Facultad de Farmacia. Sevilla.
25. FLETCHER, M. y LOVERDE, P.T. 1981. *Schistosoma mansoni*: electrophoretic characterization of strain selected for different levels of infectivity to snails. Exp. Parasitol. **52**: 362-370.
26. FONDEVILA, A. 1978. El mantenimiento de la variabilidad genética de las poblaciones. Investigación y Ciencia. **1**: 94-103.
27. FRIEDMAN, P.A., PLATZER, E.M. y EBY, J.E. 1977. Species differentiation in *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*. J. Nematol. **9**: 197-203.

28. FUKUMOTO, S., TAKECHI, M., KAMO, H. y YAMAGUCHI, T. 1987. Comparative studies on soluble protein profiles and isozyme patterns of seven *Trichinella* isolates. *Parasitol. Res.* **73**: 352-357.
29. GARCIA ROMERO, C., MIRO, G., MEANA, A. y VALCARCEL, F. 1995. Contribución al mapa parasitológico de Castilla-La Mancha: Especies de nematodos gastrointestinales en el ganado caprino. IV. Congreso Ibérico de Parasitología. Libro de Resúmenes. Editado por la Secretaría del IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela. España.
30. HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Roy. Soc. London* **164B**: 298.
31. HERD, R.P. 1971. The pathogenic importance of *Chabertia ovina* (Fabricius, 1788) in experimentally infected sheep. *Int. J. Parasit.* **1**: 251-263.
32. HILL, B.R. 1958. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**: 304-310. (Citado por King 1968).
33. HUBBY, J.L. y LEWONTIN, R.E. 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudobscura*. *Genetics* **54**: 577-594.

34. HUNTER, R.L y MARKERT, C.L. 1957. Histo-chemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* **125**: 1294-1295.
35. ILLESCAS, P., LLAMAS, R., ARDOY, L., LLAMAS, A. y LARA, A. 1995. Bronconeumonía vermiculosa ovina y caprina en la provincia de Granada. IV. Congreso Ibérico de Parasitología. Libro de Resúmenes. Editado por la Secretaría de IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela. España.
36. KING, J. 1968. Enzimología clínica práctica. Editorial Acribia. Zaragoza.
37. KNIGHT, R.A. 1971. Redescription of *Trichuris discolor* (Von Linstow, 1906) and *T.skrjabini* (Baskakov, 1924) from domestic ruminants in the United States and comparisons with *T.ovis* (Abilgaard, 1795). *J. Parasitol.* **57**: 302-310.
38. KNIGHT, R.A. 1984. Morphological differences in *Trichuris ovis* associated with different host species. *J. Parasitol.* **70**: 842-843.
39. LA ROSA, G., POZIO, E., ROSSI, P. y MURRELL, K.D. 1992. Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J. Parasitol.* **78**: 641-646.
40. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* **227**: 680-685.

41. LAPAGE, G. 1976. Parasitología veterinaria. Compañía Editorial Continental, S.A., Mexico.
42. LEHNINGER, A.L. 1988. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. España.
43. LEHNINGER, A.L. 1991. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. España.
44. LEWIS, L.A. 1966. Thin-layer starch-gel electrophoresis. A simple accurate method for characterization and quantitation of protein components. Clin. Chem. **12**: 596.
45. LOGAN, J., UBELAKER, J.E y VRIJENHOEK, R.C. 1979. Isozymes of L(+) LDH in *Hymenolepis diminuta*. Comp. Biochem. Physiol. **57B**: 51-53.
46. LYMBERY, A.J. y THOMPSON, R.C.A. 1988. Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. Int. J. Parasitol. **18**: 803-811.
47. MANIATIS, T., FISTSCH, E.F. y SAMBROOK, J. 1982. Gel electrophoresis. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

48. MARKERT, C.L. y MOLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. **45**: 753-763.
49. MARTIN LOMEÑA, S. 1950. Parásitos internos del ganado. Min. Agric. Man. Tecn. Serie H, 12.
50. MARTINEZ-GOMEZ, F. 1968. Experiencias con el tartrato de Pirantel en el tratamiento de las parasitosis gastrointestinales de la cabra. Rev. Iber. Parasitol. **28**: 473-477.
51. MARTINEZ-GOMEZ, F.P. 1985. Problemas parasitarios de los rumiantes en régimen extensivo en el Valle del Guadalquivir. Comun. INIA, Ser. Hig. San. Anim., **11**: 93-105. (Citado en OVIS, 1993, nº 25: 11-19).
52. MARTINEZ GOMEZ, F., HERNANDEZ RODRIGUEZ, S. y ACOSTA GARCIA, I. 1979. Parásitos del ciervo *Cervus elaphus*. II. Descripción de *Trichuris guevarai* n. sp. Homenaje de los autores al Prof. DR. D. Diego Guevara Pozo. Rev. Iber. Parasitol. **39**: 19-28.
53. MARTINEZ GOMEZ, F., HERNANDEZ RODRIGUEZ, S y CALERO CARRETERO, R. 1973. Helmintos parásitos de la cabra (*Capra hircus*) en Córdoba. Rev. Iber. Parasitol. **33**: 625-631.

54. MARTINEZ-GONZALEZ, B., DIEZ-BAÑOS, N y ROJO-VAZQUEZ, F.A. 1995. Prevalencia de parasitosis gastrointestinales y pulmonares del ganado ovino en el S.E de la provincia de León. IV. Congreso Ibérico de Parasitología. Libro de Resúmenes. Editado por Secretaría del IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela. España.
55. MAYER. 1841. (Citado por Dujardin).
56. Mc MANUS, D.P. y SMYTH, J.D. 1979. Isoelectric focusing of some enymes from *Echinococcus granulosus* (horse and sheep strains) and *E.multilocularis*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 73: 259-265.
57. MEANA, A., MIRO, L. y ROJO VAZQUEZ, F.A. 1993. Gastroenteritis parasitaria. Patología y clínica. OVIS 25: 53-60.
58. MEANA, A., CERRADA, C., ASTIZ, S., LUZON, M. y GOMEZ-BAUTISTA, M. 1995. Prevalencia de las nematodosis broncopulmonares en ovino en la zona septentrional de España. IV. Congreso Ibérico de Parasitología. Libro de Resúmenes. Editado por la Secretaría del IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela. España.

59. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION (MAPA). 1990. Encuestas ganaderas, 1989. Boletín Mensual de Estadística, 62-83.
60. MURPHY, R.W., SITES, J.W., DONALD, J.R., BUTH, G y HAUFLER, C.H. 1990. Molecular Systematics. Protein I: Isozyme electroforesis pp: 45-126. Ed. Sinauer Associates, Inc Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
61. MYDINSKI, L.J. y DICK, T.A. 1985. The use of enzyme polymorphisms to identify genetic differences in the genus *Trichinella*. J. Parasitol. **71**: 671-677.
62. NASCETTI, G., PAGGI, L., ORECCHIA, P., SMITH, J.W., MATTIUCCI, S. y BULLINI, L. 1986. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex complex* (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. Int. J. Parasitol. **16**: 633-640.
63. NEVEU-LEMAIRE, M. 1936. Traité D'Helminthologie Médicale et Vétérinaire. Vigot Frères, Editeurs Paris.
64. NOVAK, M., TAYLOR, W.R. y PIP, E. 1989. Interspecific variation of isoenzyme patterns in four *Hymenolepis* species (Cestoda). Can. J. Zool. **67**: 2052-2055.

65. OXFORD, G.S y ROLLINSON, D 1983. Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance. In: Systematics Association Special Volume, Vol. 24. Academic Press, London.
66. PAGGI, L., NASCETTI, G., ORECCHIA, P., MATTIUCCI, S y BULLINI, L. 1985. Biochemical taxonomy of ascaridoid nematodes. *Parassitologia* **27**: 105.
67. PAGGI, L., NASCETTI, G., CIANCHI, R., ORECCHIA, P., MATTIUCCI, S., D'AMELIO, S., BERLAND, B., BRATTEY, J., SMITH, J.W. y BULLINI, L. 1991. Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and barents seas. *Int. J. Parasitol.* **21**:195-212.
68. PASTEUR, G. 1974. Génétique biochimique et populations, ou: pour quoi sommes-nous polymorphes?. In La motte, L. (ed.) *Le polymorphisme dans le régime animal*. Société zoologique de France, Paris 473-531.
69. PASTEUR, N., PASTEUR, G., BOHOMME, F., CATALAN, J. y BRITTON-DAVIDIAN, J. 1988. *Practical isozyme genetics*. Ellis Horwood Limited. England.
70. POZDOL, R.E. y NOEL, G.R. 1984. Comparative electrophoretic analyses of soluble proteins from *Heterodera glycines* races 1-4 and three other *Heterodera* species. *J. Nematol.* **16**: 332-340.

71. PRICE, P.W. 1980. Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press, Princeton, N.J.
72. RAMAJO MARTIN, V., LOPEZ, A.J., OLEAGA, A., MATIAS, F.J., CASANUEVA, F. y MURO, A. 1995. Prevalencia media durante el periodo 1986-94 de parásitos gastrointestinales, hepáticos y pulmonares en el ganado de la provincia de Salamanca (España). II. Ovinos. IV. Congreso Ibérico de Parasitología. Libro de Resúmenes. Editado por la Secretaría del IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela. España.
73. RANNALA, B.H. 1992. Comparative evolutionary genetics of trematode parasites (Plagiorchiidae) and their anuran hosts. *Can. J. Zool.* **70**: 993-1000.
74. RANSOM, B.H. 1911. The nematodes parasitic in the alimentary tract of cattle, sheep, and other ruminants. U.S. Department of Agriculture. Bureau of Animal Industry, Bull. 127, Washington.
75. REVERSAT, J., MAILLARD, C. y SILAN, P. 1991. Phenotypic and enzymatic polymorphism: use and limitations in the description of species of *Helicometra*, mesoparasites of marine teleosts. *Syst. Parasitol.* **19**: 147-158.

76. RICHARDSON, B.J., BAVERSTOCK, P.R. y ADAMS, M. 1986. Allozyme electrophoresis: a handbook for animal systematics and population studies. Academic Press. Sydney. Australia.
77. RICKARD, L. D. y BISHOP, J.K. 1991. Redescription of *Trichuris tenuis* (Chandler, 1930) from llamas (*Lama Glama*) in Oregon with a key to the species of *Trichuris* present in North american ruminants. J. Parasitol. 77: 70-75.
78. RIDER, C.C. y TAYLOR, C.B. 1980. Isoenzymes. Chapman and Hall. London and New York.
79. RODRIGUEZ, B., CUTILLAS, C., GERMAN, P. y GUEVARA, D.C. 1991. Glucose 6-phosphate dehydrogenase: isoenzymatic pattern in *Oesophagostomum venulosum*, *Trichuris ovis* and *Trichuris suis*. J. Helminthol. 65: 289-295.
80. ROSS, G.C. 1976. Isoenzymes in *Schistosoma spp.*; LDH, MDH and acid phosphatases separated by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. Comp. Biochem. Physiol. 55B: 343-346.
81. RUEDA E. 1990. Evolución del parasitismo gastrointestinal en un ensayo de sistemas de ovino en praderas de regadío. ITEA, 86A: 15-29. (Citado en OVIS, 1993, nº 25: 11-19).

82. RUIZ ABAD, L. y ROUCO YAÑEZ, A. 1993. Análisis económico de las producciones ovinas. Producción de carne. OVIS 24: 9-19.
83. SANCHEZ BOTIJA, R. 1950. Sobre la presencia de *Trichuris globulosa* en las cabras de España. Trab. Inst. Biol. Anim. 9: 269-272.
84. SARWAR, M.M. 1959. Reconstruction of the genus *Trichuris*, and a short review of its taxonomy and morphology. Biología (Lahore) 5: 19-35.
85. SAYRE, F.W. y HILL, B.R. 1957. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96: 695-697 (Citado por King 1968).
86. SHAW, C.R. 1965. Electrophoretic variation in enzymes. Science 149: 936-943.
87. SHAW, C.R. y PRASSAD, R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. Biochem. Genet. 4: 297-320.
88. SIMON VICENTE, F. 1962. Nematodos Trichostrongylidae en los rumiantes españoles. Rev. Iber. Parasitol. 22: 97-101.
89. SKRJABIN, K.I., SHIKHOBALOVA, N.P. y ORLOW, I.V. 1957. Tricocephalidae and Capillariidae of animals and man and the diseases caused by them. Izd. Akademii Nauk SSSR. Moskva, 587.

90. SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *J. Biochem.* **61**: 629.
91. SNABEL, V., HANZELOVA, V. y FAGERHOLM, H.P. 1994. Morphological and genetic comparison of two *Proteocephalus* species (Cestoda: Proteocephalidae). *Parasitol. Res.* **80**: 141-146.
92. SPREHN, V.C. 1927. Einige bemerkungen über die Tricocephalen der Wiederkäuer. *Zoologischen Anz.* **70**: 83-93.
93. TANSKESLEY, S.D y ORTON, T.J. (eds) 1983. Polymorphysme biochemique de la palourde, *Venerupis decussata*, de l'étang du Prévost (France). *Oceanol. Acta* **5**: 395-397.
94. TARAZONA VILAS, J.M. 1980. Etiopatogenia y control de la gastroenteritis parasitaria ovina. Discurso de ingreso en la Academia de Ciencias Veterinarias de Madrid.
95. TARAZONA VILAS, J.M, SANZ PASTOR, A., BABIN, M.M., DOMINGUEZ, T., PARRA, I. y JUNCOSA, A. 1982. Tricostrongilidosis caprina. I. Especies parásitas de la cabra y comparación de su incidencia en cabras y ovejas. *An. INIA. Ser. Ganadera.* n° 14.

96. THOMPSON, R.C.A. 1982. Intraspecific variation and parasite epidemiology. Edited by D.F. Mettrick and S.S. Desser. Elsevier Biomedical Press, New York. 369-378.
97. THORNE, C.J.R. 1960. *Biochem. Biophys. Acta* **42**: 175-176. (Citado por King 1968).
98. VALCARCEL, F., MIRO, G., ASTIZ, S., MEANA, A. y GARCIA ROMERO, C. 1995. Estudio de nematodes cecales del ganado caprino en Castilla-La Mancha. I. Eliminación de huevos. IV. Congreso Ibérico de Parasitología. Libro de Resúmenes. Editado por la Secretaría del IV Congreso Ibérico de Parasitología. Santiago de Compostela.
99. VESELL, E.S. y BEARN, A.G. 1957. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **94**: 96-99 (Citado por King 1968).
100. VESELL, E.S y BEARN, A.G. 1958. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**: 286-291 (Citado por King 1968).
101. VON LINSTOW, O. 1906. Helminthes from the collection of the Colombo Museum. *Spolia Zeylanica* **3**: 163-188.

102. WEBB, E.C. 1960. Proceedings of the Fourth International Congress on Clinical Chemistry. 89-90. Livingstone, Edinburgh. (Citado por King 1968).

103. WIELAND, T. y PFEIDERER, G. 1957. Biochem. Z. **329**: 112-116. (Citado por King 1968).

104. WILSON. 1846. (Citado por Dujardin).

105. WROBLEWSKI, F. y GREGORY, K. 1960. Proceedings of the Fourth International Congress on Clinical Chemistry. 62-76. Livingstone, Edimburgh. (Citado por King 1968).

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los señores Circantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. PASTORA ARIAS PEREZ

titulada APLICACION DE TECNICAS ISO-
ENZIMATICAS AL DIAGNOSTICO DE
NEMATODES PARASITOS

acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE
POR UNANIMIDAD

Sevilla, 19 de MARZO

1996

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]