

**Tesis Doctoral: «Interacción biológica de las enzimas producidas por hongos nematófagos saprófitos de suelo, contra huevos de *Toxocara canis*».**  
**María Viviana Bojanich- 2018**

*Universidad Nacional de La Plata*

Facultad de Ciencias Médicas

Carrera de Doctorado en Ciencias Médicas

TESIS DE DOCTORADO

***“Interacción biológica de las enzimas producidas por hongos nematófagos saprófitos de suelo, contra huevos de *Toxocara canis*”.***

DOCTORANDO

**Maria Viviana I. Bojanich**

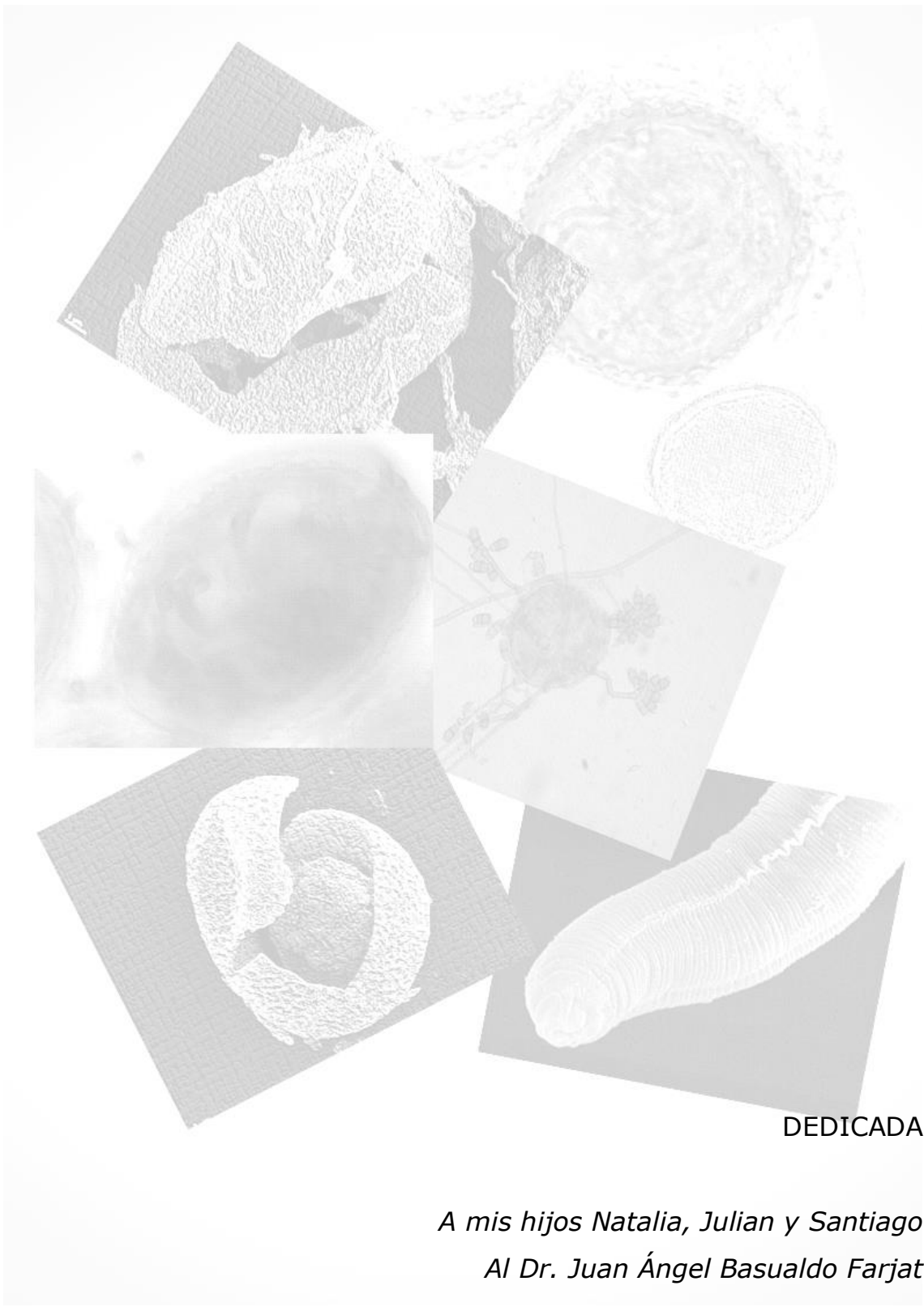
DIRECTOR

**Prof. Dr. JUAN ÁNGEL BASUALDO FARJAT**

CODIRECTOR

**Prof. Dr. GUSTAVO EMILIO GIUSIANO**

**2018**



DEDICADA

*A mis hijos Natalia, Julian y Santiago  
Al Dr. Juan Ángel Basualdo Farjat*

## AGRADECIMIENTOS

*A mi director, Dr. Juan Angel Basualdo, por creer en mí y brindarme su constante estímulo ya que sin él este trabajo no se habría terminado.*

*A mi codirector, Dr. Gustavo Giusisano, por brindarme sus conocimientos para que fuera posible este trabajo de tesis.*

*Al Dr. Luis Merino por permitirme realizar este trabajo en el Instituto de Medicina Regional.*

*A mi compañera y amiga, María de los Ángeles López, por soportar mi humor todos estos años y sobre todo por ayudarme en partes del trabajo.*

*A Laura Píccoli y a María de los Ángeles Sosa.  
A Magdalena Mangiaterra y al Dr. Mario Alonso.*

*A María Mercedes Sarmiento, por su ayuda invaluable en el aislamiento de los hongos.*

*A Nadina Caraballo por su colaboración en el trabajo de tierras y recuperación de huevos del suelo.*

*A Liliana Alegre, por su colaboración en la preparación de los medios de cultivo.*

*A Cristina Salgado y Cecilia Galindez del Servicio de Microscopía Electrónica de la UNNE por los momentos compartidos en los turnos de microscopía.*

*A los Med. Vet. Martín García y Nelson Maurenzig por su predisposición en la búsqueda de los parásitos adultos.*

*A mis hijos Santiago, Julian y Natalia.*

*A mi mamá.*

*A Horacio por su amor infinito y por elegirme todos los días.*

*A mis hermanos, Juan Horacio y Ariel.*

*A mis sobrinos Guillermina, Juan Ignacio y Juan Eduardo.*

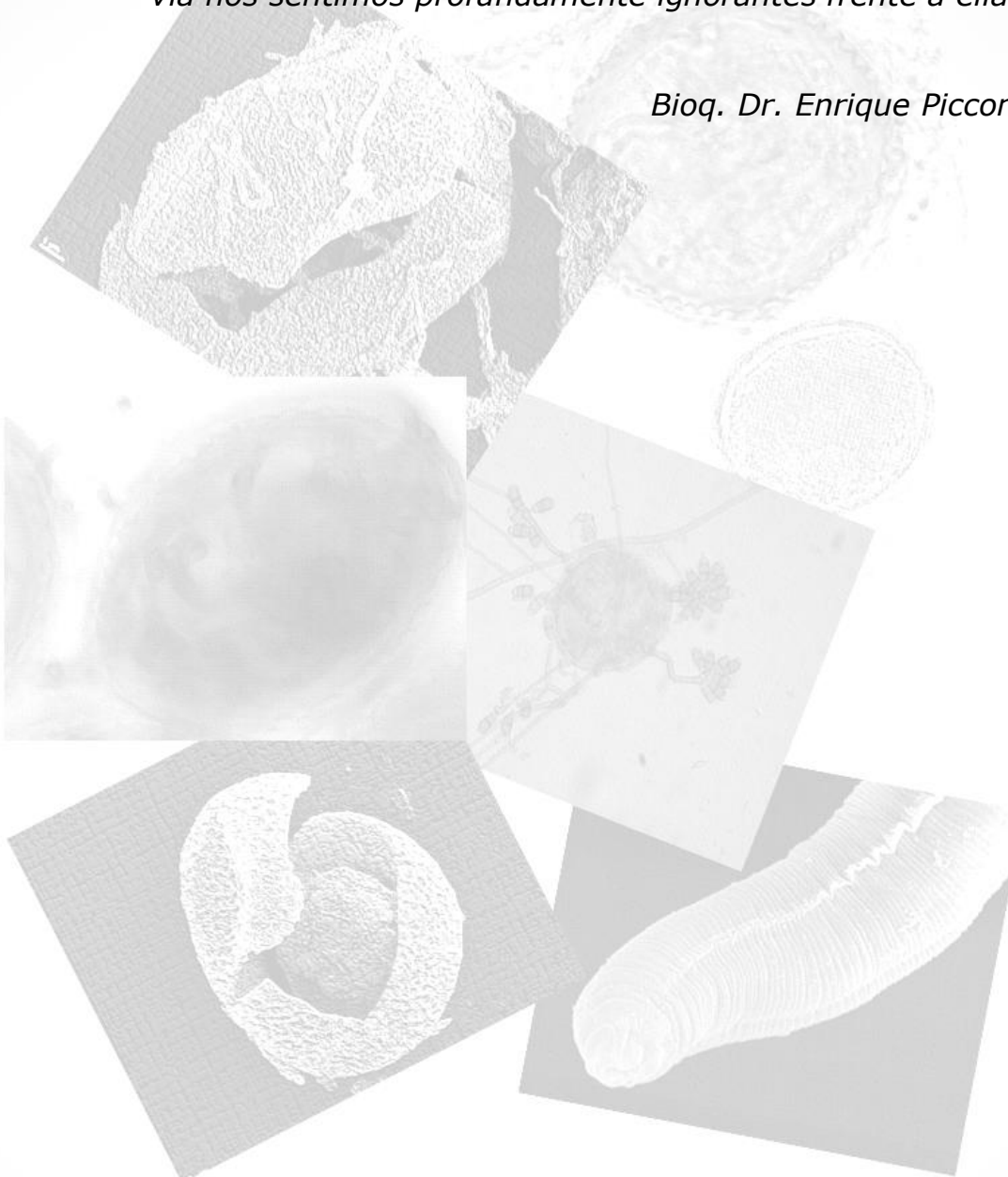
*A Isabel por estar siempre.*

*A mis amigas.*

*A Mindy.*

*...“ La ciencia no es más que un diálogo entre el hombre y la naturaleza, y a pesar del tiempo transcurrido que llevamos hablando, todavía nos sentimos profundamente ignorantes frente a ella.”*

*Bioq. Dr. Enrique Piccone*



*Copyright © 2018 por María Viviana I. Bojanich*

*Todos los derechos reservados*

*Todas las fotografías son propiedad del autor y podrán ser utilizadas sin autorización mencionando la fuente.*

## INDICE GENERAL

PÁGINAS

	<b>RESUMEN</b>	
	<b>ABSTRACT</b>	
1	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
2	<b>ESTADO DEL CONOCIMIENTO</b>	3
	2.1. El suelo como hábitat para los microorganismos	3
	2.2. Hongos del suelo. Aislamiento y cuantificación.	4
	2.3. Importancia ecológica de los hongos del suelo.	5
3	<b>HONGOS NEMATOFAGOS</b>	5
	3.1. Primeros trabajos	6
	3.2. Estrategias de crecimiento.	7
	3.2.1. Nutrición	7
	3.2.2. Crecimiento en laboratorio	8
	3.2.3. Nematodos como nutrientes	9
4	<b>ECOLOGÍA DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS EN EL SUELO</b>	10
	4.1. El ambiente	10
5	<b>ADAPTACIONES MORFOLÓGICAS</b>	11
	5.1. Inducción de trampas.	12
6	<b>MORFOLOGÍA DE LOS DISPOSITIVOS TRAMPA</b>	13
	6.1. Trampas adhesivas.	13
	6.2. Cuerpos densos.	13
	6.3. Trampas mecánicas.	13
	6.4. Endoparásitos.	14
7	<b>LOS NEMATODOS COMO "BLANCO" DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS</b>	14
8	<b>Clasificación DE LOS HONGOS NEMATOFAGOS</b>	14
	8.1. Hongos "trampa o predadores"	15
	8.2. Hongos endoparasitos	17
	8.3. Hongos productores de toxinas	19
	8.4. Hongos ovícidias u oportunistas	20
9	<b>CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS NEMATOFAGOS SEGÚN SU ACTIVIDAD OVICIDA</b>	22
10	<b>PROCESOS QUÍMICOS</b>	24
	10.1. Toxinas	24
	10.2. Enzimas extracelulares	24
	10.2.1. Enzimas hidrolíticas	25
	10.2.2. Serin-proteasas	26

	10.2.3. Quitinasas	26
11	<b>QUITINA Y QUITINASAS</b>	28
	11.1. Purificación y caracterización de quitinas de hongos	29
12	<b>PROTEASAS</b>	30
	12.1. Funciones de las proteasas microbianas	31
13	<b>ANTECEDENTES</b>	31
	13.1. Ensayos sobre huevos de nematodos	31
	13.2. Ensayos sobre huevos de <i>T. canis</i>	33
14	<b>TOXOCARA CANIS</b>	37
	14.1. Taxonomía y morfología.	38
	14.2. Ciclo biológico en el perro.	40
	14.3. Ciclo en hospedadores accidentales	42
15	<b>TOXOCARIASIS HUMANA</b>	42
	15.1. Ciclo biológico en el hombre	43
16	<b>PATOGÉNESIS DE LA TOXOCARIASIS HUMANA</b>	44
17	<b>MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b>	45
	17.1. Larva migrans visceral	45
	17.2. Larva migrans ocular	47
	17.3. Síndromes más recientemente reconocidos	48
	17.3.1. Toxocariasis encubierta	48
	17.3.2. Toxocariasis neurológica	49
	17.3.3. Toxocariasis asmatiforme	49
	17.3.4. Toxocariasis neurofisiológica	49
	17.3.5. Toxocariasis subclínica	50
18	<b>EPIDEMIOLOGÍA</b>	50
19	<b>Diseminación ambiental de los huevos de <i>Toxocara</i></b>	52
20	<b>CONTROL BIOLÓGICO DE NEMATODOS</b>	54
	20.1. Control biológico de huevos de nematodos	55
21	<b>TENDENCIAS FUTURAS</b>	55
22	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	57
23	<b>OBJETIVOS</b>	59
	Objetivos generales	59
	Objetivos específicos	59
24	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	60
	1. Determinar la flora fúngica saprófita de suelos de espacios públicos de la ciudad de Corrientes.	60
	1. a. Aislar los hongos saprófitos de suelo de parques y plazas de la ciudad de Corrientes.	60



1. a. 1. Área de estudio	60
1. a. 2. Muestras de tierra para aislamiento fúngico.	67
1. b. Recuperar huevos de <i>T. canis</i> de suelos.	68
1. b. 1. Obtención de las muestras de suelo para recuperación de huevos de <i>T. canis</i> .	68
1. b. 2. Recuperación de huevos de <i>Toxocara</i> spp. a partir de suelos.	68
1. c. Tipificar y conservar las especies fúngicas aisladas.	70
1. c. 1. Aislamiento fúngico.	70
1. c. 2. Clasificación e identificación de los hongos aislados.	71
2. Seleccionar una especie fúngica que muestre actividad ovicida	72
2. a. Enfrentar <i>in vitro</i> hongo saprófito y huevos de <i>T. canis</i> .	72
3. a. 1. Obtención de huevos de <i>T. canis</i> y preparación de la suspensión de trabajo.	72
2. a. 2. Incubación de huevos de <i>T. canis</i> en presencia del hongo.	73
2. b. Observar la acción mecánica por microscopía óptica (MO)	74
2. c. Observar la acción mecánica por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	75
2. d. Evaluación de la acción mecánica de los hongos sobre los huevos.	76
3. Determinar la acción enzimática extracelular de los hongos con actividad ovicida.	77
3. a. Establecer un "screening enzimático" por cultivo en medio sólido	77
3.a. 1. Actividades enzimáticas extracelulares	77
3.a. 1. 1. Preparación de quitina coloidal para ser usada en los ensayos enzimáticos.	77
3.a. 1. 2. Cultivos sólidos para determinar actividades enzimáticas extracelulares.	80
3.b. Producir un extracto enzimático crudo a partir de cultivos líquidos de los hongos.	81
3.b. 1. Cultivos líquidos para determinar actividades enzimáticas extracelulares	81
3.b. 2. Obtención de los extractos crudos.	83
3.c. Analizar el extracto enzimático para identificar los componentes proteicos mayoritarios.	86
3.c. 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-Page)	86

3.c. 2. Preparación de las muestras y del marcador de peso molecular.	87
3.c. 3. Electroforesis	88
4. Experimentar <i>in vitro</i> la acción del extracto enzimático crudo sobre la viabilidad del huevo de <i>T. canis</i>	89
<b>25 RESULTADOS</b>	<b>91</b>
<b>26 DISCUSIÓN</b>	<b>156</b>
<b>27 CONCLUSIONES</b>	<b>178</b>
<b>28 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>181</b>
<b>29 ANEXO</b>	<b>197</b>
TABLAS	197
GRÁFICOS	198
FIGURAS	199
PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS	203

## RESUMEN.

Existen investigaciones que parten de la hipótesis de que en la naturaleza debe haber microorganismos capaces de destruir los huevos de los geohelminintos del suelo. Esta hipótesis está basada en que se sabe que en algunas regiones del mundo se padecen helmintiasis en un alto grado, tanto en el hombre como en los animales y, que la cantidad de huevos que llegan al suelo es enorme, pero, cuando se buscan esos huevos en los suelos, la cantidad o porcentaje que se recupera, no se acerca a lo que se supone debería haber. Así surge la pregunta, ¿qué sucede con los huevos restantes? La respuesta más acertada es que debe suceder un fenómeno natural y ecológico de destrucción biológica de los mismos en el suelo. Surgen así los ensayos para tratar de corroborar la respuesta y comprobar la existencia real de microorganismos capaces de influir negativamente sobre el desarrollo y la persistencia de los huevos de geohelminintos en la tierra, y conocer también las condiciones biológicas que pudieran eliminar o por lo menos paralizar el desarrollo de los huevos y así disminuir su capacidad infectiva, haciendo que perdieran su importancia epidemiológica. Entre los microorganismos que regulan las densidades de nematodos en el suelo, los hongos tienen una posición importante, debido a su comportamiento parasitario, antagónico y depredador.

Los hongos nematófagos son enemigos naturales de los nematodos ya que pueden atacar nematodos vivos o sus huevos y utilizarlos como nutrientes. Para ello se valen de adaptaciones morfológicas de su micelio, como por ejemplo apresorios, anillos compresores, entre otros. Pueden ser encontrados en diversos ambientes y se ha demostrado su efectividad como agentes de control biológico. Estos microorganismos comprenden diferentes tipos de hongos, los cuales son cosmopolitas y pueden existir en suelos naturales, agrícolas y en todo tipo de materia orgánica en descomposición.

Los huevos de *Toxocaracanis* tienen gran capacidad de resistencia a las condiciones ambientales. El ciclo del parásito nos indica la importancia que tiene el suelo, ya que allí se efectúa obligatoriamente la maduración de los huevos hasta el desarrollo de la larva 2 infectante. La elevada reproductividad de *Toxocara* spp. y la extrema resistencia de sus huevos a condiciones ambientales adversas, contribuyen a la acumulación de los estados infectantes en el suelo.

La presencia de huevos de *Toxocara* en los suelos y la extensión de la contaminación de los espacios de uso público y privado son muy variables y ha sido estudiado en casi todos los países. Los porcentajes de contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* spp. en areneros y lugares de recreación varían entre 0,3 y 50 % de huevos. La toxocariosis tiene una distribución cosmopolita en el mundo, considerándose

endémica en la mayor parte de los países de América, y Argentina no escapa de esa situación. Las cifras de prevalencia de huevos en suelo y de seroprevalencia tanto en niños como en adultos, muestran que esta parasitosis está presente en todo el mundo, aunque con amplias variaciones de acuerdo a las características sanitarias de cada país e inclusive de cada región dentro de un mismo país. Las tasas de seroprevalencia en América Latina van desde 1,8 a 66,6 %. En Argentina, estudios epidemiológicos publicados muestran que la misma se mueve en un rango de entre 10,6 a 67,8 %, y la región nordeste argentina no escapa a esta situación. Los estudios sobre los procesos naturales de destrucción de huevos de geohelmin- tos están en sus etapas iniciales, pero representan una alternativa interesante que, usada en combinación con otras medidas profilácticas, puede contribuir al control de especies de importancia epidemiológica. Es por ello, que el conocimiento de la relación, bioquímica de acción hongo saprófito de suelo –huevo de *T. canis*, permitiría explicar las diferencias existentes en cuanto a prevalencia de la toxocariosis según las diferentes regiones geográficas y, por otro lado, aportaría una información muy importante para el desarrollo de biocontroladores de esta parasitosis, lo cual sería de suma importancia para la Salud Pública.

El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar la interacción biológica *in vitro* de hongos saprófitos de suelo con huevos de *Toxocaracanis* hallados en parques y plazas de la ciudad de Corrientes, observando la actividad mecánica y determinando la actividad enzimática entre hongos saprófitos y huevo de *T. canis*.

Para ello se aislaron los hongos saprófitos de suelos de plazas y parques de la ciudad de Corrientes, utilizando las técnicas del "anzuelo queratínico" y técnica selectiva de espolvoreado (tierra rociada). El número de muestras de suelo colectadas fue de 60 y fueron identificados 40 géneros y 69 especies fúngicas.

Para la recuperación de huevos de *Toxocara* spp. de plazas y parques de la misma ciudad, fueron colectadas 67 muestras utilizando cloruro de sodio saturado y sulfato de cinc saturado como soluciones de flotación. El resultado de frecuencia de huevos en suelos fue de 13,43%, valor que se mantuvo en el rango de los valores ya publicados para la zona.

Se eligieron cuatro especies de hongos, *Ch. indicum*, *Ch. keratinophylum*, *C. lunatay T. ajelloi*, para realizar los ensayos de interacción con huevos de *T. canis*, obedeciendo esa elección a: frecuencia de recuperación en los suelos, antecedentes de antagonismo con huevos de nematodos tanto positivo como negativo y actividad quitinolítica. Dichos ensayos fueron realizados enfrentando por duplicado huevos de *T. canis* con un cultivo en agar agua al 2% de los hongos mencionados y un grupo control. Tanto en el grupo control como para los ensayos de interacción, para cada uno de los duplicados y para cada día establecido de observación, una placa de ca-

da hongo y de cada día fue evaluada por microscopía óptica y el duplicado fue usado para la preparación del material para ser observado por microscopía electrónica de barrido. Al cabo de 4, 7, 14, 21 y 28 días de incubación se procedió a la observación de 100 huevos por triplicado a través de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Como resultado de la interacción aparece *Ch. indicum* ejerciendo una acción mecánica, afectando el 72,7% de huevos, presentando un efecto ovicida alto (nivel 4: 50-79% de huevos afectados); *Ch. keratinophylum* posee una actividad ovicida alta, con un 74 % de huevos afectados; *C. lunata* muestra también una acción ovicida alta (78,7%, nivel 4); en tanto que *T. ajelloi*, lo hace en muy bajo porcentaje, 18%, por lo que tiene actividad ovicida baja (nivel 2: entre 15 y 20% de afectación). Las interacciones observadas al microscopio óptico sobre los huevos de *T. canis* fueron: para *Ch. indicum*: hifas rodeando o penetrando los huevos, cambios en la membrana del huevo, como ser cubierta adelgazada y sin la trama fosemada característica, y larvas vacuoladas. Para *Ch. keratinophylum*: cubierta adelgazada, embrión vacuolado e hifas penetrando y rodeando el huevo. *C. lunata*: afecta sobre todo el embrión y evita el desarrollo a larva de estadio 2. Se observa también el adelgazamiento de la cubierta con el consiguiente aumento de la permeabilidad. Las hifas pueden penetrar y desarrollarse en el interior del huevo. Para *T. ajelloi*: la cubierta adelgazada, el crecimiento hifal en el interior del huevo y la vacuolización del contenido. Las observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido revelaron que los 3 géneros fúngicos ensayados, ejercen un efecto Tipo 3, según la clasificación de Lýsek, sobre los huevos de *T. canis*.

Se realizó un "screening enzimático" en medio sólido de los hongos estudiados para determinar actividad quitinolítica, proteolítica y lipolítica, de acuerdo a la degradación o precipitación de cada sustrato. Fueron realizados también cultivos líquidos con el fin de obtener extractos enzimáticos crudos de quitinasas y proteinasas para ser enfrentados con huevos de *T. canis* y experimentar la viabilidad y evaluar los efectos sobre dichos huevos. Los extractos obtenidos fueron sometidos a electroforesis por SDS-Page para la identificación de los componentes proteicos mayoritarios. Como resultado los enfrentamientos extractos enzimáticos - huevos de *T. canis* revelan que: los extractos enzimáticos de proteasa y quitinasa de *Ch. indicum* afectan a los huevos tanto a los 7 como a los 14 días, y que se mantiene sin haber sinergismo al combinar ambas enzimas. El valor promedio de 65% de huevos afectados indica que, aunque no se afecten el 100% de los huevos, la actividad ovicida del hongo es alta (nivel 4) y concuerda con el nivel de actividad ovicida cuando lo que se enfrentaba era el hongo propiamente dicho. Los extractos enzimáticos de *Ch. keratinophylum* también afectan considerablemente a los huevos de *T. canis*, con un porcentaje promedio para las dos enzimas de 66% de afectación, lo que se con-

dice con el nivel alto de actividad ovicida que muestra este hongo. La incubación de los huevos de *T. canis* en presencia de extractos enzimáticos crudos de *C. lunata*, arrojó que el nivel de afectación es alto (65%), coincidente con el nivel 4 observado en el ensayo de incubación directa hongo-huevo. Con este grupo experimental tampoco se observa un aumento de la interacción al combinar ambas enzimas, manteniendo el 65% de afectación. Los ensayos realizados con los extractos enzimáticos de *T. ajelloi* son compatibles con los ensayos de incubación huevo de *T. canis*-hongo, cuya actividad ovicida era baja (18%). El porcentaje de afectación al experimentar con los extractos enzimáticos también resultó bajo (34% en promedio), y por lo tanto su actividad ovicida es baja. Las alteraciones o afectaciones observadas en todos los enfrentamientos huevo-extracto enzimático crudo fueron: para ambos *Chrysosporium* se observaron cambios en las características de la cubierta, entre ellos, adelgazamiento, permeabilidad, vacuolización del embrión, interior del huevo desorganizado y larvas L1 sin movimiento. Para *C. lunata* fueron: desorganización y vacuolización interna del embrión, adelgazamiento de la cubierta pero en mucha menor medida respecto al género *Chrysosporium*, y ese adelgazamiento se observa mejor cuando los huevos son enfrentados a ambas enzimas. Para *T. ajelloi* se pueden resumir en: cambios en el interior de los huevos y aumento de la permeabilidad de la cubierta para alcanzar y destruir al embrión.

Concluyendo, este trabajo es el **primero** que muestra la interacción entre huevos de *T. canis* y los hongos saprófitos *Ch. indicum*, *Ch. keratinophylum*, *C. lunata* y *T. ajelloi*, y se enfrenta por **primera** vez extractos enzimáticos crudos (proteasa y quitinasa) de dichos hongos con los huevos de *T. canis*. Es importante mencionar que la existencia de *Ch. indicum*, *Ch. keratinophylum* y *C. lunata* en los suelos afecta la viabilidad de los huevos de *T. canis* y por lo tanto la presencia de los mismos en el medio ambiente se ve disminuida. Es acertado decir que estos hongos ejercen su acción sobre los huevos en el ambiente, dato que se relaciona con el bajo porcentaje de recuperación de huevos de los suelos independientemente de la técnica empleada para ello. Se describe por primera vez la interacción de los hongos saprófitos *Ch. indicum*, *Ch. keratinophylum*, *C. lunata* y *T. ajelloi* con huevos de *T. canis*, mostrando que esa interacción incluye acciones mecánicas, demostradas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, y acciones enzimáticas, demostradas con los ensayos realizados con extracto crudo de las enzimas proteasa y quitinasa de cada uno de los hongos.

## ABSTRACT

Many investigations support the hypothesis that in nature there may be microorganisms capable of destroying soil geohelminth eggs. This hypothesis is based on the fact that in some regions of the world both humans and animals are highly affected by helminthiasis, and the number of eggs that reaches the ground is enormous, but when looking for these eggs in the soil, the amount or percentage that is actually recovered, is not close to what is supposed to be. Then, the question arises, what happens to the missing eggs? The most accurate answer is that a natural and ecological phenomenon of biological destruction in the soil may occur. Several trials trying to corroborate the real existence of microorganisms capable of negatively influencing the development and persistence of geohelminth eggs in the soil have arisen. These trials are also investigating the biological conditions that could eliminate or at least, paralyze the development of the eggs and thus diminish their infective capacity, lowering their epidemiological importance. Among the microorganisms that regulate the densities of nematodes in soil, fungi have an important position, due to their parasitic, antagonistic and predatory behavior.

Nematophagous fungi are natural enemies of nematodes because they can attack live nematodes or their eggs using them as nutrients, through morphological adaptations of their mycelium, such as appressories, compressor rings, among others. They can be found in different environments and their effectiveness as biological control agents has been demonstrated. These microorganisms include different types of fungi, which are cosmopolitan and can exist in natural, agricultural soils and in all types of decaying organic matter.

*Toxocara canis* eggs have a great capacity of resistance to environmental conditions. The high reproductivity of *Toxocara* spp. and the extreme resistance of their eggs to adverse environmental conditions, contribute to the accumulation of infectious states in soil.

The presence of *Toxocara* eggs in soil and the extent of contamination of spaces for public and private use are very variable and it has been studied in almost all countries. The percentages of soil contamination with eggs of *Toxocara* spp. in sandboxes and places of recreation varies between 0.3 and 50%. The toxocarosis has a cosmopolitan distribution in the world, being considered endemic in most of the countries of America, and Argentina does not escape from this situation. The prevalence figures of eggs in soil and seroprevalence in both children and adults show that this parasitism is present throughout the world, although with wide variations according to the sanitary characteristics of each country and even of each region in the same country. Seroprevalence rates in Latin America range from 1.8 to 66.6%.

In Argentina, published epidemiological studies show that it moves in a range between 10.6 to 67.8%, and the northeastern region of Argentina does not escape this situation.

Studies on the natural processes of geohelminths egg destruction are in their initial stages, but they represent an interesting alternative that, used in combination with other prophylactic measures, can contribute to the control of species with epidemiological importance. The knowledge of the relationship, biochemistry of action soil saprophytic fungus - *T. canis* egg, would explain the existing differences in the prevalence of toxocarosis according to different geographical regions and, also, would provide very important information in the development of biocontrollers of this parasitosis, which would be very important for Public Health.

The objective of this research was to determine the *in vitro* biological interaction of soil saprophytic fungi with *Toxocara canis* eggs found in parks and squares of the city of Corrientes, observing the mechanical activity and determining the enzymatic activity between saprophytic fungi and *T. canis* eggs.

To this aim, saprophytic fungi were isolated from squares and parks in the city of Corrientes, Argentina, using the techniques of "keratin hook" and selective technique of sprinkling. The number of soil samples collected was 60 and 40 genera and 69 fungal species were identified.

For the recovery of *Toxocara* spp eggs, 67 samples of soil from squares and parks of the same city were collected using saturated sodium chloride and saturated zinc sulfate as flotation solutions. The result of egg frequency in soil was 13.43%, percentage according to published data.

Four species of fungi, *Ch. indicum*, *Ch. keratinophylum*, *C. lunata* and *T. ajelloi*, were chosen to perform the interaction tests with *T. canis* eggs, obeying to the following: frequency of recovery in soil, history of antagonism with nematode eggs both positive and negative and chitinolytic activity. Such trials were carried out by duplicating *T. canis* eggs with a 2% water agar culture with the mentioned fungi and a control group. In both, the control group and the experimental group, for each of the duplicates and for each established day of observation, a plate of each fungus and each day was evaluated by optical microscopy and the duplicate was used for the preparation of the material to be observed by scanning electron microscopy. After 4, 7, 14, 21 and 28 days of incubation, 100 eggs were observed in triplicate through optical microscopy and scanning electron microscopy. As a result of the interaction *Ch. indicum* appears, exerting a mechanical action, affecting 72.7% of eggs, presenting a high ovicidal effect (level 4: 50-79% of affected eggs);



*Ch. keratinophylum* possesses a high ovicidal activity, with 74% affected eggs; *C. lunata* also shows a high ovicidal action (78.7%, level 4); while *T. ajelloi* affected a very low percentage of eggs, 18%, so it has low ovicidal activity (level 2: between 15 and 20% of affectation). The interactions observed under the optical microscope on the eggs of *T. canis* were: For *Ch. indicum*: hyphae surrounding or penetrating the eggs, changes in the egg membrane, such as being thinned and without the characteristic shell, and vacuolated larvae. For *Ch. keratinophylum*: thinned and soft shell, vacuolated embryo and hyphae penetrating and surrounding the egg. *C. lunata*: mainly affected the embryo and prevented the development of stage 2 larva. It was also observed thinning of the cover with the consequent increase in permeability. Hyphae were able to penetrate and develop inside the egg. For *T. ajelloi*: thinned shell, hyphal growth inside the egg and vacuolization of the contents. The observations to the Scanning Electron Microscope revealed that the 3 fungal genera tested exert a Type 3 effect, according to the Lýsek classification, on *T. canis* eggs.

An enzymatic screening test was carried out on solid media of the fungi studied to determine chitinolytic, proteolytic and lipolytic activity, according to the degradation or precipitation of each substrate. Liquid cultures were also carried out in order to obtain crude enzymatic extracts of chitinases and proteinases to be confronted with *T. canis* eggs and to test the viability and evaluate the effects on eggs. The raw extracts obtained were subjected to electrophoresis by SDS-Page to identify the major protein components. As a result, the confrontations enzymatic extracts - eggs of *T. canis* revealed that: the enzymatic protease and chitinase extracts of *Ch. indicum* affected the eggs at both 7 and 14 days, and there was no synergism when combining both enzymes. The average value of 65% of affected eggs indicates that, the ovicidal activity of the fungus is high (level 4). The enzymatic extracts of *Ch. keratinophylum* also considerably affected the eggs of *T. canis*, with an average percentage for the two enzymes of 66% affectation, which is consistent with the high level of ovicidal activity shown by this fungus. The incubation of *T. canis* eggs in the presence of crude enzymatic extracts of *C. lunata* showed that the level of affectation was high (65%), coinciding with level 4 observed in the direct incubation fungus-egg test. With this experimental group, an increase in the interaction was not observed when combining both enzymes, maintaining 65% of affectation. The test carried out with the enzymatic extracts of *T. ajelloi* was compatible with the egg incubation tests of *T. canis*-fungus, whose ovicidal activity was low (18%). The percentage of affectation when experimenting with the enzymatic extracts was also low (34% on average), and therefore, their ovicidal activity was low. The alterations or affectations observed in all the egg-enzyme enzymatic crude confrontations were: for both *Chrysosporium*: changes in the characteristics of the shell, among

them, thinning, permeability, vacuolization of the embryo, disorganized interior of the egg and larvae L1 without movement. For *C. lunata* were: disorganization and internal vacuolization of the embryo, thinning shell but to a much lesser extent with respect to the genus *Chrysosporium*, and this thinning is best observed when the eggs are faced with both enzymes. For *T. ajelloi* can be summarized as: changes in the interior of the eggs and increase in the permeability of the cover to reach and destroy the embryo.

Concluding, this work is the first that shows the interaction between *T. canis* eggs and the saprophytic fungi *Ch. indicum*, *Ch. keratinophylum*, *C. lunata* and *T. ajelloi*, and faces for the first time raw enzymatic extracts (protease and chitinase) of those fungi with *T. canis* eggs. It is important to mention that the existence of *Ch. indicum*, *Ch. keratinophylum* and *C. lunata* in soil affects the viability of *T. canis* eggs and, therefore, their presence in the environment is diminished. It is accurate to say that these fungi exert their action on eggs in the environment, a fact that is related to the low percentage of egg recovery from soil regardless of the technique used. The interaction of the saprophytic fungi *Ch. indicum*, *Ch. keratinophylum*, *C. lunata* and *T. ajelloi* with *T. canis* eggs is described for the first time, showing that this interaction includes mechanical actions, demonstrated by optical microscopy and scanning electron microscopy, and enzymatic actions, demonstrated with the tests carried out with crude extract of the enzymes protease and chitinase of each fungi.



## 1. INTRODUCCIÓN

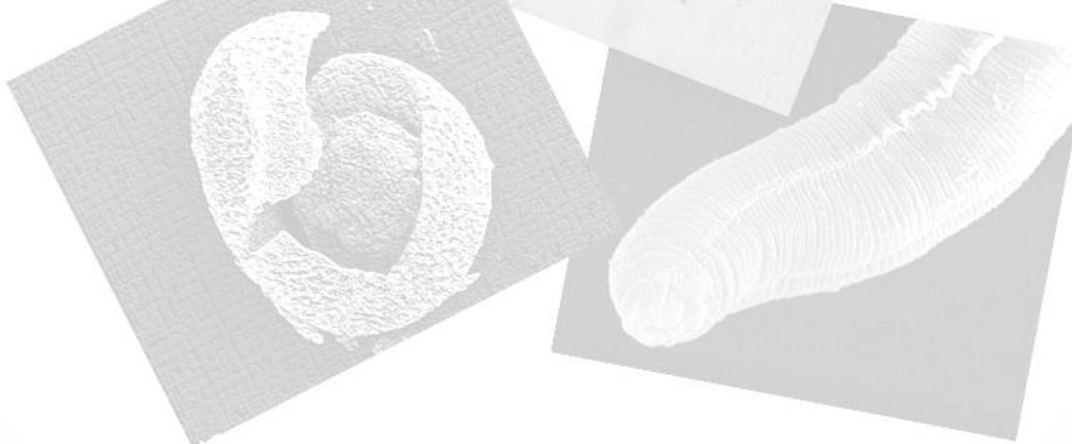
Los geohelminos, parásitos intestinales del hombre y los animales que tienen un pasaje obligado por tierra para cumplir su ciclo de vida, entre ellos el género *Toxocara*, son parásitos cosmopolitas. La presencia de ellos depende de que co-existan una fuente de helmintos, sus hospederos definitivos, un complejo de condiciones climáticas y biológicas que garanticen el transcurso de la fase extrahospedadora o ambiental del parásito. Es necesario conocer las condiciones físicas, químicas y biológicas del ambiente, ya que permiten que los huevos desarrollen larvas y sean capaces de infectar a su hospedero. Cabe recordar que un suelo con huevos invasivos es la fuente principal para nuevas infecciones provocadas por geohelminos tanto en el hombre como en los animales. Lysek y Nigenda expresan que "existen numerosos estudios sobre las condiciones que hacen posible el desarrollo de los huevos en el suelo así como sus posibilidades de subsistencia, y es a través de esos estudios, que se ha establecido que tales condiciones climáticas varían entre los distintos países y dentro de las regiones de un mismo país". Es de suponer entonces, que la continuidad y la persistencia de los huevos de geohelminos en el suelo sean muy diferentes de acuerdo a la región geográfica de que se trate<sup>1</sup>.

La mayoría de los investigadores en este tema parten de la hipótesis de que en la naturaleza debe haber microorganismos capaces de destruir los huevos de los geohelminos en el suelo. Esta hipótesis está basada en que se sabe que en algunas regiones del mundo se padecen helmintiasis en un alto grado, tanto en el hombre como en los animales<sup>1</sup> y, que la cantidad de huevos que llegan al suelo es enorme, por no decir casi infinita. Pero, cuando se buscan esos huevos en suelos, cualquiera sean sus características, la cantidad o porcentaje que se recupera, no se acerca a lo que se supone debería haber. Así surge la pregunta, ¿qué sucede con los huevos restantes? La respuesta más acertada es que debe suceder un fenómeno natural y ecológico de destrucción biológica de los mismos en el suelo<sup>1</sup>. Surgen así los ensayos para tratar de corroborar la respuesta y comprobar la existencia real de microorganismos capaces de influir negativamente sobre el desarrollo y la persistencia de los huevos de geohelminos en la tierra, y conocer también las condiciones biológicas que pudieran eliminar o por lo menos paralizar el desarrollo de los huevos y así disminuir su capacidad infectiva, haciendo que perdieran su importancia epidemiológica<sup>1</sup>.

Entre los microorganismos que regulan las densidades de nematodos en el suelo, los hongos tienen una posición importante, debido a su comportamiento parasitario, antagónico y depredador<sup>2</sup>.

Los hongos nematófagos son enemigos naturales de los nematodos ya que pueden atacar nematodos vivos o sus huevos y utilizarlos como nutrientes. Para ello se valen de adaptaciones morfológicas de su micelio, como por ejemplo apresorios, anillos compresores, entre otros<sup>3</sup>. Pueden ser encontrados en diversos ambientes y se ha demostrado su efectividad como agentes de control biológico<sup>4</sup>. Estos microorganismos comprenden diferentes tipos de hongos, los cuales son cosmopolitas y pueden existir en suelos naturales, agrícolas y en todo tipo de materia orgánica en descomposición. En el ambiente, estos hongos son biológicamente importantes ya que juegan un papel en el reciclaje de carbono, nitrógeno y otros elementos que se originan de la degradación de los nematodos. Además, los hongos nematófagos pueden existir en el ambiente de dos maneras: como saprófitos o como parásitos<sup>4</sup>.

Se estima que cerca de dos millones de personas están actualmente infectados por geohelminths, principalmente por el contacto con el suelo, indicando que éste es una fuente importante de infecciones en el hombre. Además, estudios sobre los parásitos que infectan animales domésticos, han provocado un creciente interés debido a la íntima relación que existe entre los animales y el hombre y esto es un problema de la salud pública<sup>5</sup>.



## **2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO**

### **2.1. El suelo como hábitat para los microorganismos.**

El suelo es la parte más externa de la corteza terrestre, y puede ser considerado como un sistema de interacción entre fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia orgánica y mineral, una fase líquida y una fase gaseosa o atmósfera del suelo. La materia orgánica procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo, y su composición y cantidad es variable. La atmósfera del suelo se encuentra enriquecida en dióxido de carbono y empobrecida de oxígeno, como resultado de la respiración de raíces de plantas, animales y microorganismos, y su composición, como el contenido de agua, son factores que fluctúan ampliamente<sup>6</sup>.

El suelo, en general, constituye un complejo sistema que alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. Es un ambiente apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, protozoos, hongos) como procariotas (bacterias y arqueas). Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas<sup>6</sup>.

Existen, según Ramos y Zuñiga, diversos factores involucrados en la actividad microbiana, tales como temperatura, pH, humedad, disponibilidad de oxígeno, nutrientes inorgánicos y la accesibilidad al sustrato, los cuales influyen en la descomposición de la materia orgánica. Así también, han señalado que la actividad y estabilidad de las enzimas en el suelo es regulada por muchos factores como pH, biomasa microbiana, vegetación entre otros<sup>7</sup>.

Los parámetros considerados clave para determinar la calidad del suelo, son: aquellos de naturaleza física y físico-química (estabilidad de agregados, pH, conductividad eléctrica), química (parámetros nutricionales y fracciones de carbono), como del tipo microbiológico y bioquímico (carbono de biomasa microbiana, respiración microbiana o diversas actividades enzimáticas). El componente microbiológico puede servir como indicador del estado general del suelo, pues una buena actividad microbiana en suelo es reflejo de condiciones fisicoquímicas óptimas para el desarrollo de los procesos metabólicos de microorganismos (bacterias, hongos, algas, actinomicetos). Es muy importante en el desarrollo y funcionamiento de los ecosistemas y su fertilidad, pues interviene tanto en el establecimiento de los ciclos biogeoquímicos, como en la formación de la estructura de los suelos<sup>7</sup>.

Los microorganismos del suelo no se distribuyen al azar, sino que siguen patrones especiales de agregación, esto es, distribuidos heterogéneamente en el microam-

biente a diferentes escalas que se superponen y a lo largo de los perfiles de profundidad<sup>6, 8</sup>.

Los hongos del suelo juegan un papel clave en los procesos de descomposición, ya que mineralizan y reciclan nutrientes de plantas y juegan un papel en el reciclaje de carbono, nitrógeno y otros elementos que se originan de la degradación de la materia orgánica. En este ambiente, los hongos interactúan con una compleja comunidad microbiana que incluye: bacterias, actinomicetos e invertebrados. Los hongos son una parte importante de la cadena alimenticia del suelo, principalmente para la mesofauna que lo habita<sup>9</sup>.

## **2.2. Hongos del suelo. Aislamiento y cuantificación.**

Los procedimientos microbiológicos clásicos para estudiar los hongos del suelo se basan en cultivos que implican el aislamiento de conidias o hifas activas que crecen en el suelo, y su crecimiento en un medio de cultivo axénico para su posterior identificación y cuantificación. Se ha progresado considerablemente utilizando técnicas de lavado, medios de cultivo parcialmente selectivos y adictivos que reducen el crecimiento de ciertos grupos de hongos<sup>9</sup>.

El análisis de la abundancia relativa de especies cultivables recuperadas del suelo, puede no ser representativo de la dinámica de las comunidades del suelo, debido a que los medios de cultivo imponen nuevas condiciones selectivas y pueden introducir un sesgo en los análisis. Una medida confiable de las comunidades de hongos en el suelo requiere del seguimiento de un laborioso programa de aislamiento sistemático, con diferentes medios de cultivos y estrategias de aislamiento, que cubran las diferentes idiosincrasias de la diversidad taxonómica y grupos fisiológicos de hongos presentes en los ecosistemas del suelo<sup>9</sup>.

La mayoría de los hongos que habitan en el suelo pueden ser considerados saprófitos, por lo tanto, deben ser capaces de crecer en cultivos axénicos<sup>9</sup>.

Otras metodologías se enfocan en el análisis de la actividad de los hongos y su papel en los procesos biogeoquímicos que ocurren en el suelo. Con estos fines, se han aplicado métodos que dependen del análisis de la biomasa microbiana del suelo, respiración del suelo, reciclaje de nitrógeno y contenido de ácidos grasos del hongo o de observaciones directas del crecimiento del micelio en partículas de suelo. No obstante, estos métodos proporcionan por sí solos poca información acerca de las especies de hongos involucrados en dichos procesos, por lo tanto, para un mejor

entendimiento de la estructura y función de las comunidades de hongos del suelo, se requiere de los procesos de aislamiento e identificación tradicionales<sup>9</sup>.

### **2.3. Importancia ecológica de los hongos del suelo**

El suelo es un hábitat o ecosistema, no un sustrato; esta característica complica las definiciones y la metodología, porque el suelo representa una mezcla compleja de fracciones orgánicas e inorgánicas con agua y organismos vivos. Las fracciones orgánicas se componen de material de plantas en diferentes fases de descomposición, raíces vivas, exudados, microorganismos, pequeños invertebrados y contenidos intestinales. Por esta razón, el suelo alberga una parte considerable de la biodiversidad total de hongos, y no existe ninguna estimación fidedigna del número de especies de hongos del suelo<sup>9</sup>.

Los hongos saprófitos tienen una especificidad limitada por sustratos; por ejemplo, los zygomycetes usan carbohidratos simples, mientras los ascomicetos descomponen principalmente celulosa y hemicelulosa, y como organismos descomponedores, los hongos son responsables de la degradación de contaminantes orgánicos introducidos en el suelo<sup>9</sup>.

### **3. HONGOS NEMATÓFAGOS.**

Los hongos nematófagos comprenden un grupo heterogéneo de más de 2000 especies taxonómicas. Son hongos saprófitos de suelo y algunos utilizan al nematodo o a sus huevos, como fuente nutricional<sup>10</sup>.

Los hongos nematófagos tienen la capacidad de capturar, parasitar o paralizar nematodos en todos los estados de su ciclo de vida. Se los divide en grupos dependiendo de su modo de infección: hongos trampa, endoparásitos, parásitos de huevos y hembras y hongos productores de toxinas<sup>11</sup>. Otros autores los dividen en tres grupos: Endoparásitos, predadores y oportunistas u ovidas<sup>4, 12</sup>.

Los hongos nematófagos muestran una especificidad variable respecto a las especies de nematodos que infectan, pero en general sólo infectan nematodos vermiformes o sus huevos. Como muchos otros microorganismos patógenos, estos hongos, han desarrollado métodos de reconocimiento de sus huéspedes<sup>10, 13</sup>. La presencia de lectinas en hongos atrapadores de nematodos se ha relacionado con su papel en el reconocimiento de residuos glucídicos en la superficie de los mismos. Además de ello, los hongos nematófagos atraen nematodos dependiendo de sus capacidades parasíticas/saprobíóticas. La intensidad de la atracción es proporcional al grado de parasitismo del hongo implicado. Las estructuras infecciosas de los hongos

gos nematófagos varían con el tipo de hongo: los atrapadores de nematodos forman órganos de captura en sus hifas, los endoparásitos tienen esporas adhesivas, y los parásitos de huevos forman *apresorios*. Todas esas estructuras son vitales para la infección de los hospedadores. La unión al hospedador, principalmente por adhesinas extracelulares o por interacciones hidrofóbicas inespecíficas, es un evento inicial en la patogénesis. Posteriormente tiene lugar la penetración (mecánico-enzimática) del hospedador. Las enzimas probablemente implicadas en la penetración del hospedador son proteasas, ya que la cutícula y la cubierta del huevo de los nematodos están formadas fundamentalmente por proteínas<sup>13</sup>.

Las proteasas extracelulares de hongos parásitos de plantas y animales han sido implicadas en la penetración y digestión de los tejidos del hospedador. Durante la infección de nematodos, los hongos deben penetrar la cutícula de los gusanos, la cual es un esqueleto rígido pero a la vez flexible, compuesto principalmente por proteínas, y constituye una barrera muy efectiva de defensa. A pesar de ello, los hongos pueden vencerla usando sus enzimas<sup>14</sup>.

Cada especie fúngica de un mismo género, puede tener un mecanismo antagónico diferente, incluso pueden atacar diferentes nematodos, muchas veces con diferentes mecanismos. Por ejemplo, en el género *Arthrobotrys*, el grupo más estudiado, algunas especies son antagonistas por ser parásitos de huevos, otras por producción de toxinas, y algunas otras por hongos trampa<sup>11</sup>.

A causa del papel que pueden desempeñar estos hongos en el control biológico natural de nematodos, y debido a la interesante biología y bioquímica de la infección asociados a la captura, penetración de la cutícula y el proceso de colonización, los hongos nematófagos han despertado un considerable interés<sup>14</sup>. Durante el proceso de infección, la penetración de la cutícula de nematodos o de sus huevos se cree que son el resultado de la acción enzimática y mecánica del hongo<sup>12</sup>.

### **3.1. Primeros trabajos.**

Dijksterhuis y cols. en el año 1994, hacen una recopilación y análisis de cómo empezaron los estudios en el campo de los hongos nematófagos<sup>3</sup>.

Así relatan que a pesar de que uno de los hongos nematófagos más conocidos, *Arthrobotrys oligospora*, fue aislado en la mitad del siglo XIX, su habilidad como "atrapador de nematodos" fue descrita recién hacia finales del siglo por Zopf, 1888. El taxónomo Charles Drechsler, durante un período de casi 50 años, aisló y describió un gran número de hongos nematófagos. Desde entonces el interés por



diferentes aspectos de la biología de estos hongos ha ido en aumento. Mencionan a Duddington, que realizó estudios de laboratorio y de campo, especialmente desde el control biológico, y que fue David Pramer, quien allanó el camino para posteriores estudios fisiológicos y bioquímicos, quien se preguntó: "¿Cómo los nematodos son capaces de inducir la formación de "trampas" en los hongos nematófagos?" Pramer purificó parcialmente una sustancia de los nematodos a la que llamó *nemin*, la cual podía inducir la formación de trampas en ausencia de nematodos, y fue este investigador quien puso énfasis en la importancia de tener una visión más clara de la nutrición y la fisiología de estos hongos, de manera de poder entender su función en los suelos y sobre todo su rol como antagonistas de nematodos. En los años 60, aparece Cooke, quien inició los estudios ecológicos sobre estos hongos, los cuales fueron la base para las posteriores consideraciones ecológicas sobre el tema. Más tarde, esas consideraciones ecológicas llevaron a una visión bastante pesimista de las posibilidades que presentaban los hongos para ser utilizados como reguladores de la población de nematodos del suelo en el control biológico. La razón de este punto de vista fue una falta de conocimiento de la ecología de los hongos. Luego en 1977, Barron resumió elegantemente todo el conocimiento existente sobre la biología de los hongos nematófagos y logró ampliar el conocimiento de los hongos endoparásitos por la detección y la descripción continua de nuevas especies<sup>3</sup>.

### **3.2. Estrategias de crecimiento**

#### **3.2.1. Nutrición**

En el suelo, donde en ocasiones prevalecen condiciones de alimentación deficiente, la habilidad de atacar nematodos vivos y utilizarlos como fuente de nutrientes, coloca a los hongos nematófagos con una ventaja para sobrevivir. Los hongos que poseen esta habilidad, difieren en la dependencia de los nematodos como hospedadores. La necesidad de nematodos es más evidente en aquellos hongos que son parásitos obligados y desarrollan el micelio vegetativo sólo dentro del hospedador. Por otro lado, los hongos predadores o "atrapadores", pueden crecer y vivir como saprófitos en el suelo. Para ambos tipos de hongos, que los nematodos estén vivos y en movimiento es muy importante, ya que esos movimientos le permiten ponerse en contacto con las esporas o los órganos trampa, lo que conduce a la captura e invasión de los nematodos. Sumado a esto, los nematodos vivos inducen la formación de "trampas" en los hongos, aumentando de ese modo las chances de encuentro entre el hongo y el nematodo<sup>3</sup>.

Tanto, hongos predadores como endoparásitos, comparten la propiedad de producir estructuras que los habilita a atacar a los nematodos vivos. Algunos de los predadores solo forman las estructuras especiales cuando tienen un estímulo externo,

por ejemplo, la presencia de nematodos vivos, y otros desarrollan esas estructuras espontáneamente. Debido a estas propiedades, estos últimos se consideran más independientes de nematodos como fuente de nutrientes<sup>3</sup>.

Gray observó que aquellos hongos que producen "trampas" espontáneamente, son más abundantes en los suelos, y sugiere que esa habilidad le ofrece al hongo una ventaja sobre los que forman trampas no espontáneamente<sup>15</sup>.

En los microambientes con una proporción carbono:nitrógeno elevada, los nematodos pueden servir como una fuente importante de nitrógeno. Esto surgió de observaciones de los hongos descomponedores de la madera, que utilizan a los nematodos como fuente de nitrógeno para compensar los bajos niveles del mismo en la madera. Las especies saprófitas que pueden crecer en celulosa, también pueden utilizar nematodos en primera instancia como fuente de nitrógeno, mientras que los hongos endoparásitos, carentes de actividad de celulasa, son dependientes de los nematodos como fuente de carbono y nitrógeno<sup>3</sup>.

### **3.2.2. Crecimiento en laboratorio**

Para entender el comportamiento de los hongos como antagonistas de los nematodos, fueron desarrollados métodos de crecimiento en el laboratorio. Los hongos atrapadores crecen fácilmente, en tanto que los endoparásitos lo hacen pobremente. Los investigadores Blackburn y Hayes (1966) evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en las fases saprofítica y predadora de *A. oligospora* y *A. robusta*, indicando que la actividad predadora no necesariamente se correlaciona con la longitud de la hifa, ya que solo ciertas adaptaciones del micelio son responsables de la actividad predadora<sup>16</sup>. Al variar la fuente de energía, estos investigadores demostraron que los requerimientos de nutrientes para la extensión del micelio pueden diferir de aquellos para la expresión de la predacidad. Hay una mayor reducción en la actividad de *A. oligospora* cuando el nitrógeno se suministra en forma de amonio que cuando se presenta como nitrato o nitrito. La predacidad de *A. robusta* es mayor en medios deficientes en biotina y con nitrito como fuente de nitrógeno<sup>16</sup>.

El crecimiento rápido y la producción de micelio abundante son dos factores importantes para la propagación y supervivencia de los hongos predadores en la naturaleza, así como el desarrollo de estructuras infectantes. En efecto, el grado de crecimiento varía considerablemente de una especie fúngica a otra, y generalmente los hongos que no forman trampas espontáneamente, crecen con más rapidez que aquellos que sí lo hacen<sup>3</sup>.

### 3.2.3. Nematodos como nutrientes

El papel de los nematodos en la nutrición del hongo no está del todo claro. Por ejemplo, la respuesta de crecimiento luego del agregado de un número sustancial de los nematodos muertos como única fuente de nutrientes a dos especies de hongos atrapadores y a un hongo del suelo no predador, no reveló diferencias significativas en comparación con los controles<sup>3</sup>. Las tres especies tuvieron la habilidad de invadir y utilizar las carcasas de los nematodos. Sin embargo, se vio que los nematodos muertos eran invadidos por la hifa vegetativa solo por sus orificios naturales, proceso que se desarrolla mucho más lentamente que la invasión a nematodos vivos. Además, colocar nematodos muertos cerca de las estructuras adaptativas de diferentes hongos nematófagos, causa el crecimiento de la hifa y la formación del micelio alrededor del gusano muerto. Sin embargo, para la explotación de nematodos como fuente de nutrientes, un nematodo vivo es probablemente más útil, en particular si, durante la penetración, se puede prevenir la fuga del contenido del nematodo al entorno<sup>3</sup>.

Dijksterhuis y cols. mencionan los estudios realizados por Jaffee y cols. (1992), quienes estudiaron el crecimiento de cuatro hongos atrapadores sobre nematodos en extractos de diferentes suelos, y observaron que no solo los hongos *Monacrosporium elliposporum* y *M. cionopagum* formaron trampas espontáneamente, sino que los hongos *A. oligospora* y *A. dactyloides*, carentes de esa habilidad, fueron capaces de crecer a expensas del nematodo y formar un micelio lleno de trampas. Como control utilizaron nematodos en cloruro de potasio y vieron que se forman trampas pero en mucho menor grado, por lo que sugieren que en el suelo no hay necesidad de inducir la formación de trampas como en los medios de laboratorio o artificiales. Probablemente, el estrato de suelo contiene nutrientes y/o compuestos inductores de trampas, especialmente efectivos sobre los micelios jóvenes<sup>3</sup>.

Los hongos predadores producen estructuras miceliales especiales, adhesivas o no, para atrapar al nematodo. Además, existen hongos endoparásitos que utilizan esporas, adhesivas y no adhesivas, para adherirse a la superficie del nematodo o son ingeridas por ellos, respectivamente. Finalmente, hay hongos que atacan a huevos o hembras de los nematodos, a través de una estructura en la hifa vegetativa llamada "apresorio"<sup>3</sup>. Estos hongos difieren en su dependencia de los nematodos como hospedadores, y generalmente, los hongos predadores tienen capacidad saprofítica, mientras que los endoparásitos son parásitos obligados. Entre los hongos parásitos de huevos, existen tanto hongos predadores como endoparásitos<sup>3</sup>.

#### **4. ECOLOGÍA DE HONGOS NEMATÓFAGOS EN EL SUELO.**

Los hongos nematófagos y los nematodos son organismos ubicuos que se encuentran en suelos agrícolas, hortícolas y forestales, y fundamentalmente, en los primeros 30 cm de la superficie. Aunque se han detectado desde los trópicos a las regiones polares, son raros en ambientes acuáticos. Las observaciones directas en suelo de hongos nematófagos, y en general de cualquier microorganismo, resultan complejas. Mediante microscopía de barrido a baja temperatura ha sido posible recientemente el estudio *in situ* en suelo, del crecimiento, formación de trampas, captura y digestión de nematodos por hongos nematófagos<sup>13</sup>.

##### **4.1. El Ambiente.**

Como ambiente se incluyen el clima y los factores edáficos. Entre todas las condiciones climáticas, las radiaciones UV son el factor más reportado como causa de inactivación de esporas en el ambiente. Así por ejemplo, Dong y Zhang, relatan que en un estudio realizado por Friman (1993), en el cual la irradiación con UV por 5 minutos a los hongos *A. oligospora* y *Dactylarya candida*, provoca la inhibición de los procesos infectivos de dichos hongos<sup>11</sup>.

Por otro lado, es importante el efecto de los factores edáficos en el desarrollo de los agentes de control microbianos (ACM). Las características químicas y físicas como humedad, temperatura, salinidad, pH, tipo de suelo, la capacidad de retención de agua, concentración de metales y presencia de hojarasca, afectan el desempeño de los ACM. La población microbiana en el suelo es muy diversa y su biomasa cuantiosa: en suelo templado la biomasa de bacterias y hongos es de aproximadamente 1 a 2 y 2 a 5 t /ha<sup>-1</sup> respectivamente. En el suelo, los ACM están sujetos al antagonismo impuesto por diferentes organismos. Los reportes de Chen y Chen (2003) explican que la colonización de hembras y quistes por hongos saprófitos pueden inhibir a los hongos parásitos de huevos, y por consiguiente, protegen a los huevos de nematodos de ser destruidos por los hongos<sup>11</sup>.

La actividad microbiana y la densidad de nematodos en particular, están asociadas con altos niveles de materia orgánica en los suelos. Mientras que el contenido de agua, importante en términos de la movilidad de las esporas, tiene un valor mucho menor al evaluar el efecto del agua en la distribución de los hongos del suelo<sup>15</sup>.

Los hongos endoparásitos pueden ser clasificados en tres grupos principales de acuerdo al método en que parasitan: enquistamiento, conidia adhesiva y conidia ingerida. Estos tres grupos están asociados con un gran número de nematodos, mientras que las conidias adhesivas e ingeridas se asocian también a contenidos

elevados de materia orgánica, como a suelos con relativamente bajo pH. Los hongos endoparásitos que se reproducen por enquistamiento aparecen en suelos con bajo contenido de materia orgánica<sup>15</sup>.

Los hongos predadores fueron aislados de suelos con bajo pH. Los predadores formadores de hifas adhesivas, ramas y perillas adhesivas, son independientes de la humedad y la materia orgánica presente en el suelo, mientras que los hongos predadores formadores de redes adhesivas y anillos constrictores si se relacionan con esos dos factores. Y de estos dos últimos, los formadores de redes están asociados con suelos con bajo contenido de agua y materia orgánica. A su vez, los formadores de redes o perillas adhesivas son aislados de suelos con bajo pH, mientras que los formadores de hifas adhesivas están asociados a un rango de pH mucho más elevado<sup>15</sup>.

## 5. ADAPTACIONES MORFOLÓGICAS

Los hongos parásitos de nematodos se encuentran entre los principales grupos taxonómicos. Los géneros, su modo de nutrición y modo de captura se puede ver en la Tabla 1<sup>3</sup>.

**Tabla 1.** Ubicación taxonómica de hongos nematófagos; Phylum y Géneros Representativos (Dijksterhuis, 1994)<sup>3</sup>.

Phylum	Género	Interacción	Estructura Infecciosa
Chytridiomycota	<i>Catenaria</i>	endoparásito	zoosporas
Zygomycota	<i>Stylopage</i>	trampa	Hifas adhesivas
	<i>Cystopage</i>	trampa	Hifas adhesivas
Anamorfos de Ascomycota (fungi imperfecti)	<i>Arthrobotrys</i>	trampa	Trampas no adhesivas
	<i>Monacrosporium</i>	trampa	Trampas adhesivas
	<i>Dactylaria</i>	trampa	Trampas no adhesivas
		trampa	Trampas adhesivas
	<i>Dactylella</i>	trampa	Trampas adhesivas
		Parásito de huevos	Extremos hifales
	<i>Nematoctonus</i>	trampa	Trampas adhesivas
		endoparásito	Conidias adhesivas
	<i>Harposporium</i>	endoparásito	Conidias no adhesivas
	<i>Drechmeria</i>	endoparásito	Conidias adhesivas
	<i>Hirsutella</i>	endoparásito	Conidias adhesivas
	<i>Verticillium</i>	endoparásito	Conidias adhesivas
		Parásito de huevos	Extremos hifales
<i>Paecilomyces</i>	Parásito de huevos	Extremos hifales	
<i>Cylindrocarpon</i>	Parásito de huevos	Extremos hifales	
<i>Fusarium</i>	Parásito de huevos	Extremos hifales	

Basidiomycota	<i>Hohembuhelia</i> (teleomorfo de <i>Nematoctonus</i> )	Trampa Endoparásito	Trampas adhesivas
	<i>Pleurotus</i>	Trampa Toxina	Trampa adhesiva Toxina
Ascomycota	<i>Atricordyceps</i> (teleomorfo de <i>Harposporium</i> )	Endoparásito	Conidias adhesivas

La mayoría de las estructuras infectantes producidas por estos hongos poseen una capa adhesiva que le permite una unión firme a la superficie del nematodo. Estas estructuras son: *redes, perillas y ramas hifales, hifas no-modificadas*. Otras estructuras son los *anillos constrictores*. Las esporas de los hongos endoparásitos muestran adaptaciones morfológicas sofisticadas que las habilitan a interactuar con los nematodos. A pesar de las diferencias morfológicas entre las diferentes especies con respecto a sus estructuras infectantes, hay que remarcar la similitud que existe en el proceso de captura, penetración y digestión de los nematodos. Esto sugiere que los hongos poseen soluciones básicas que los habilitan para alimentarse de los nematodos y sobrevivir en el suelo<sup>3</sup>.

### 5.1. Inducción de "trampas".

Para la mayoría de los hongos predadores, el desarrollo de dispositivos que los habilite a interactuar con los nematodos, es un prerrequisito para poder alimentarse de ellos. El investigador Nordbring-Hertz (1973)<sup>17</sup> dice que un prerrequisito para la formación de trampas en el laboratorio, es que el hongo crezca en un medio mineral bajo en nutrientes, lo que indicaría que esa limitación sea en favor de la formación del sistema de trampas. Estos investigadores trabajaron en diferentes condiciones de laboratorio para estudiar la inducción y/o inhibición de la formación de trampas en los hongos nematófagos predadores, encontrando, por ejemplo, que la inclusión de fosfatos o de metales pesados (cadmio, zinc, plomo) inhiben la producción de trampas y, por el otro lado, la presencia de péptidos o de aminoácidos como valina, leucina e isoleucina, favorecen la formación de las estructuras. Sin embargo, otros factores diferentes a la presencia de péptidos o las condiciones ambientales adversas, están involucrados en el proceso de inducción, y uno de ellos es la presencia de nematodos vivos, que es, sin dudas, el más poderoso inductor de trampas adhesivas, especialmente en *A. oligospora* por ejemplo<sup>17</sup>. Cabe mencionar que en la mayoría de los hongos, la capacidad de formación de trampas se correlaciona con la inhibición del crecimiento. Sin embargo, está claro que existe un cambio sutil entre la forma saprofitica y la predadora y que ese proceso depende de

una serie de parámetros y muy probablemente dependa también de la especie o de una cepa dentro de la misma especie<sup>3</sup>.

## **6. MORFOLOGÍA DE LOS DISPOSITIVOS TRAMPA.**

Todos los dispositivos que median la interacción hongo-nematodo son estructuras hifales especializadas o células diferenciadas como las conidias. Estas estructuras están "equipadas" para establecer un contacto firme con su presa para luego, poder penetrar la cutícula.

### **6.1. Trampas adhesivas.**

Un modo de establecer la interacción hongo-nematodo es el uso de *capas adhesivas* que se localizan por fuera de la pared celular fúngica. Esta capa no se preserva para poder ser observada por microscopía electrónica de transmisión, excepto en el sitio de contacto hongo-nematodo. En tinciones negativas, las capas adhesivas en trampas de *A. oligospora* pueden ser visibles, así como en microscopía electrónica de barrido de nematodos capturados y en trampas vacías. Esto estaría indicando que la formación de parte de estas estructuras sucede antes del contacto con la presa. La estructura y composición de la capa adhesiva es bastante compleja. Por ejemplo, en *A. oligospora*, se presenta como una capa de fibrillas electrodenso conteniendo residuos de azúcares, ácido urónico y proteínas<sup>3, 18</sup>.

### **6.2. Cuerpos densos.**

Una característica común observada en todos los órganos trampa, es la presencia de numerosas organelas citosólicas llamadas *cuerpos densos*, las que se encuentran rodeadas por una membrana simple. Tanto las perillas adhesivas como las ramas y redes hifales, tiene la misma estructura subcelular. La biogénesis de estas organelas ha sido estudiada en *A. oligospora*. En este hongo, los cuerpos densos ya están presentes al iniciar el desarrollo de trampas y pueden ser detectados en la primera célula trampa a formarse. Es interesante destacar que esta célula ya muestra todas las propiedades de una trampa madura y es capaz de capturar y penetrar nematodos de manera efectiva<sup>3</sup>.

### **6.3. Trampas mecánicas.**

En contraste con las trampas adhesivas, los *anillos constrictores*, tales como los formados en los micelios de *A. dactyloides*, poseen una ultraestructura muy ordenada. Esto se cree refleja la capacidad de las células a expandirse, lo que resulta en una captura irreversible de un nematodo. Estos anillos consisten en tres células conectadas al micelio vegetativo por un tallo. Desde la luz hacia el lado exterior del

anillo se describen 4 zonas: 1- una pegajosa y fibrosa pared celular; 2- cuerpos densos que constituyen la matriz; 3- una zona vacuolada que contiene organelas; y 4- una pared celular de apariencia normal<sup>3</sup>.

#### **6.4. Endoparásitos.**

En contraste con los hongos predadores, las conidias de los hongos endoparásitos no contienen cuerpos densos, y están formadas por las organelas celulares usuales y por dispositivos de almacenamiento como gotitas de lípidos y glucógeno. Algunas de las especies endoparásitas forman conidias con capas adhesivas en toda la espora o solo en un lado de la misma<sup>3</sup>.

### **7. LOS NEMATODOS COMO *BLANCO* DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS.**

Entre los factores asociados al hospedador, la especie de nematodo y sus diferentes estadios evolutivos son factores que afectan su susceptibilidad, por lo que es importante conocer y entender las características del hospedador para el desarrollo de tácticas de control y permitir la optimización del impacto de los agentes de control biológico. La patogenicidad del hongo varía dependiendo de la especie de nematodo. Se ha demostrado que los huevos en los primeros estadios o menos evolucionados, son más susceptibles a la infección fúngica, lo que no fue observado en huevos ya larvados<sup>19</sup>. Además, algunos estudios han demostrado que existe un umbral límite para la infección por hongos endoparásitos. Entre todos los hongos nematófagos, los hongos *trampa* tienen especificidad de huésped, viven en diferentes grados de saprofitismo en el suelo, y su nutrición no depende solamente del nematodo. Por el contrario, los hongos *endoparásitos*, que no forman órganos trampa, usan sus esporas para infectar a su nematodo huésped. Muchos de estos hongos son parásitos obligados de nematodos y pasan su vida vegetativa dentro de los nematodos infectados, formando solo esporas fuera del cuerpo de la víctima. En el suelo sólo existen como esporas y poseen un rango más reducido de huéspedes que los hongos trampa. Un incremento en el número de nematodos puede resultar en un aumento de chances de que el nematodo se ponga en contacto con las esporas<sup>11</sup>.

### **8. CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS NEMATÓFAGOS.**

Yang y cols. (2007)<sup>10</sup>, agrupan a los hongos nematófagos de acuerdo a los diferentes mecanismos patogénicos que presentan en:



### 8.1. Hongos trampa o predadores.

En este grupo se incluyen las principales especies de hongos nematófagos. Su característica principal es la producción de *trampas* que pueden ser diferenciadas en seis tipos: a) hifas adhesivas no diferenciadas, b) ramificaciones hifales que forman una red tridimensional adhesiva, c) ramificaciones adhesivas que pueden unirse formando una red hifal adhesiva, d) nódulos adhesivos, e) anillos constrictores y f) anillos no constrictores. De todas ellas, la más común de encontrar es la red adhesiva. Yang y cols (2007)<sup>10</sup> estudiaron la evolución de estos organismos, y explican que el desarrollo de los dispositivos de captura es una prueba de la evolución adaptativa. El evento de captura, y la subsecuente muerte de los nematodos, es realizado a través de las redes tridimensionales adhesivas<sup>4</sup>.

Como modelo de este grupo se utilizó a *A. oligospora* identificándose una serie de eventos en el proceso de infección de su huésped<sup>10</sup>.

1) Reconocimiento y adhesión: son los primeros pasos en la infección del hongo al nematodo, pero poco se conoce sobre los mecanismos y procesos moleculares que ocurren (hasta el momento sólo se han informado a lectinas como involucradas en el reconocimiento).

2) Proceso de penetración: se produce a través de la degradación enzimática y la presión mecánica. En este proceso fueron detectadas e identificadas varias enzimas hidrolíticas extracelulares como serin-proteasas y colagenasas.

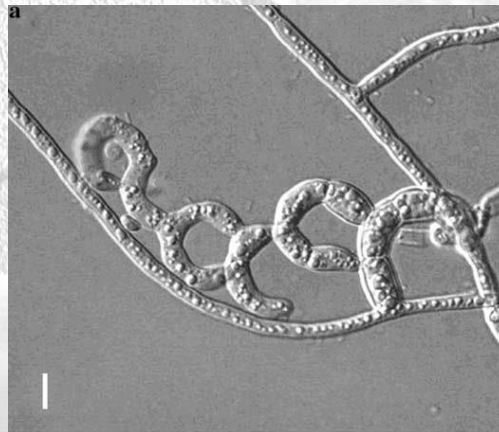
3) Invasión del huésped: a partir de esto el hongo obtiene nutrientes del nematodo para su crecimiento y reproducción.

Los hongos trampa capturan nematodos móviles con sus órganos trampa especializados a lo largo de la hifa vegetativa. La estructura morfológica de las trampas depende de la especie, y pueden ser divididas en: redes adhesivas (Figura 1), botones o perillas o nódulos adhesivos (Figura 2), ramas adhesivas (Figura 3), anillos constrictores (Figura 4) y anillos no constrictores (Figura 5)<sup>10</sup>.

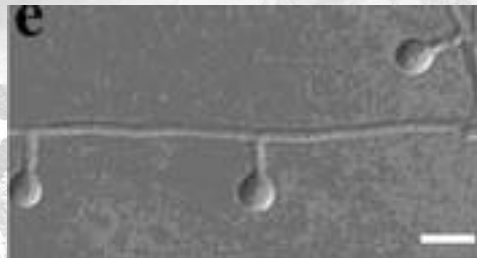
Los hongos trampa parecen tener alguna especificidad de huésped y también viven con diversos grados de saprofitismo en el suelo<sup>11</sup>.

Los Deuteromycetes forman trampas adhesivas como las redes de *A. oligospora*, los pedúnculos de *Monacrosporium haptotylum* o las ramas de *Monacrosporium gephyropagum*. Los Zygomycetes nematófagos capturan nematodos directamente sobre sus hifas (*Stylopaga hadra*). Las trampas mecánicas son anillos constreñibles como los de *Arthrobotrys dactyloides*, o no constreñibles como en *M. haptophylum*<sup>13</sup>.

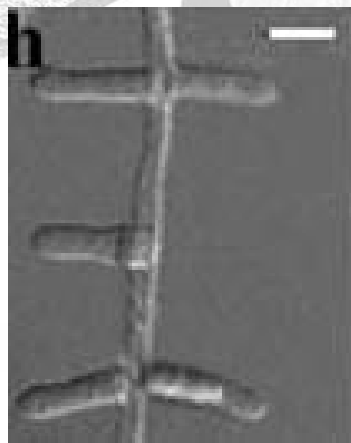
Los hongos atrapadores de nematodos, excepto los Zygomycetes, son parásitos facultativos. Por ejemplo, *A. oligospora*, es capaz de atacar las hifas de otros hongos para obtener nutrientes (micoparasitismo). Las fases sexuales de *Arthrobotrys* spp. y del hongo productor de toxinas *Pleurotus ostreatus*, son descomponedores de madera. Por ello se piensa que algunos hongos nematófagos obtienen carbono y energía de la descomposición de madera y, el nitrógeno, de los nematodos que parasitan<sup>13</sup>.



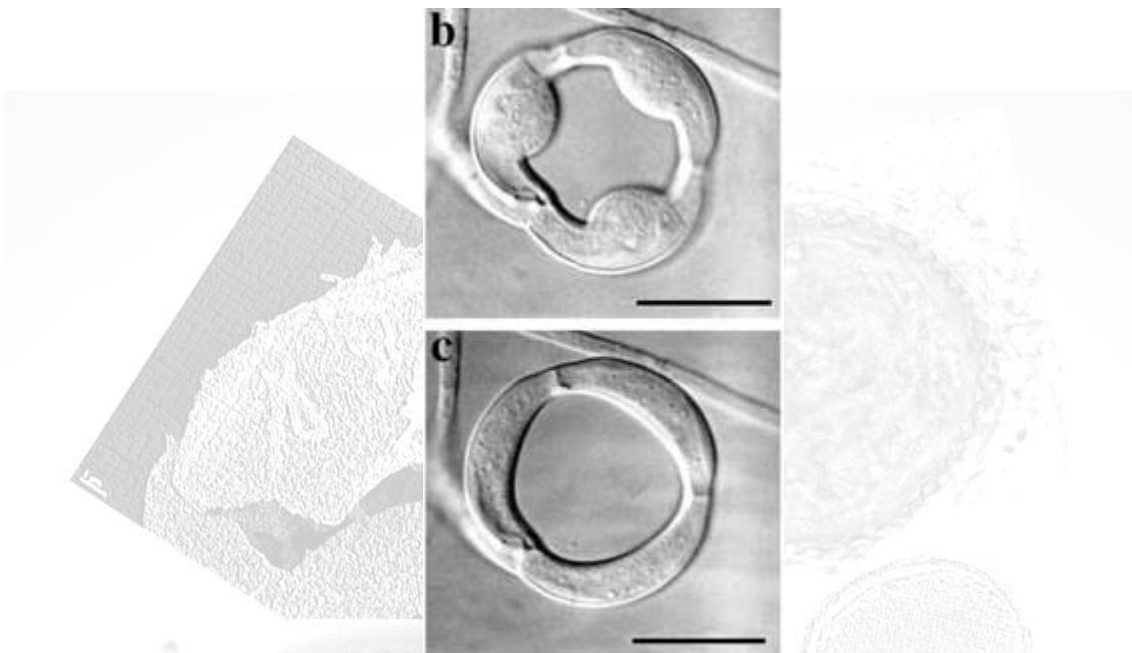
**Fig. 1.** Red adhesiva de *Dactylella dianchiensis*<sup>10</sup>



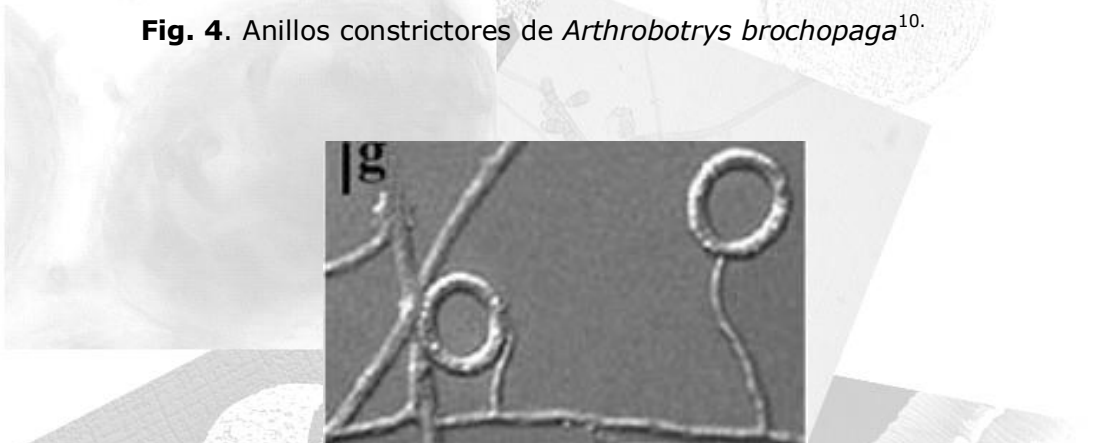
**Fig. 2.** Nódulos adhesivos de *Monacrosporium elliposporum*<sup>10</sup>



**Fig. 3.** Ramas adhesivas de *M. cyanopagum*<sup>10</sup>.



**Fig. 4.** Anillos constrictores de *Arthrobotrys brochopaga*<sup>10</sup>.



**Fig. 5.** Anillos no constrictores de *M. candidum*<sup>10</sup>

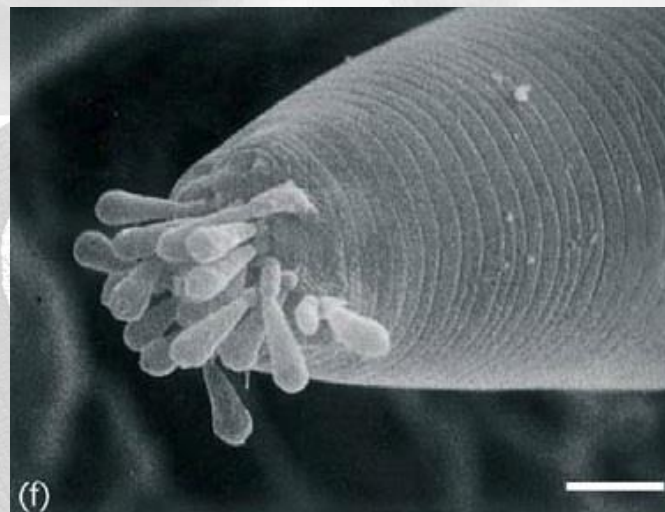
### 8.2. Hongos endoparásitos.

Los hongos endoparásitos no forman órganos trampa, pero utilizan sus esporas para infectar al nematodo. Las esporas pueden ser o no móviles (Figura 6). Muchos de estos hongos son parásitos obligados y pasan su vida vegetativa en el interior de los nematodos, formando esporas fuera del cuerpo de su víctima (Figura 7). En el suelo, estos hongos endoparásitos existen principalmente como esporas y tiene un rango de huéspedes más estricto que los hongos trampa<sup>11</sup>.



**Fig. 6.** Esporas de *D. coniospora* con brotes adhesivos<sup>20</sup>.

Las esporas pueden ser móviles, como las zoosporas de *Catenaria anguillulae*, o inmóviles y adhesivas como los conidios de *Drechmeria coniospora* o de *Hirsutella rhossiliensis*. Muchos de los hongos endoparásitos son parásitos obligados de nematodos, que sólo forman esporóforos y esporas fuera del huésped infectado. Además de ello, los hongos endoparásitos poseen un rango de huéspedes más restringido que los hongos trampa<sup>13</sup>.



**Fig. 7.** Nematodo infectado por conidiosporas de *D. coniospora*<sup>20</sup>.

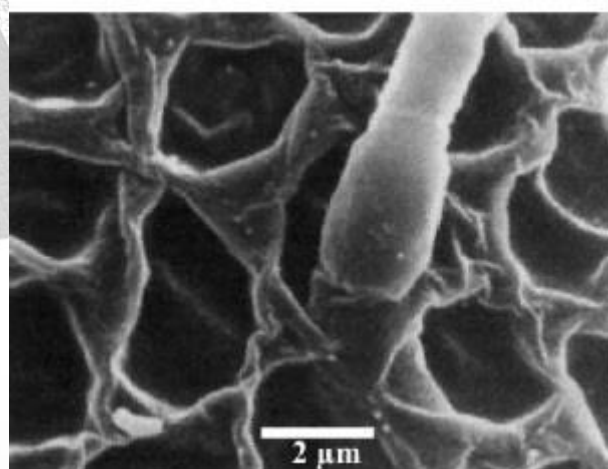
A los hongos endoparásitos se los observa principalmente como esporas, o como clamidosporas, las que son liberadas en el momento que se desintegra el nematodo. No producen micelios muy extensos pero tienen gran capacidad infectiva, y esos pocos micelios proveen tubos para liberar las esporas, las que, una vez ingeridas, se transforman en las hifas responsables de la absorción del contenido interno del nematodo. La mayoría de los hongos endoparásitos son parásitos obligados y

por lo tanto, tienen un rango restringido de huéspedes. Más aun, no son capaces de crecer en el suelo, lo que hace imposible proponer a esta clase de hongos como control en el ambiente. Otro punto muy importante, es su dependencia de agua libre, lo cual es un factor limitante para su uso bajo condiciones de laboratorio como control biológico de organismos<sup>4</sup>.

### 8.3. Hongos productores de toxinas

Estos hongos producen toxinas nematocidas que pueden atacar a nematodos parásitos de las plantas. Estudios con *Coprinus comatus* y *Stropharia rugosoannulata*, mostraron la presencia de un dispositivo especial de ataque, *acantocito*. Las observaciones microscópicas de los mismos asemejan una *espada afilada* que puede causar daño a la cutícula del nematodo, resultando en una fuga del material interno del parásito. Estos resultados sugieren que la fuerza mecánica es un importante factor de virulencia de estos hongos<sup>13</sup>. El hongo más estudiado es *Pleurotus ostreatus*, que inmoviliza con su toxina a los nematodos antes de infectarlos<sup>13</sup>.

Estos hongos, no pueden formar los dispositivos trampas antes descritos y la cubierta de los huevos son una importante barrera que evita la infección. Para poder penetrar, el hongo forma unas estructuras de penetración llamadas *apresorios*, que es un bulto terminal de la hifa que le permite penetrar el huevo del helminto (Figura 8). López-Llorca y cols., al estudiar por microscopía electrónica en *Verticillium suchlasporium*, encontraron un material mucilaginoso entre la superficie del apresorio y la cubierta del huevo, material que los autores sugieren podría funcionar como un adhesivo para ayudar a la penetración del mismo. Estas estructuras son formadas como resultado de un proceso de adaptación para concentrar los mecanismos físicos y enzimáticos de degradación en una sola y pequeña área, y así facilitar la penetración<sup>13, 21</sup>.



**Fig. 8.** Obsérvese el *apresorio*, órgano formado para penetrar la cubierta. Microscopía electrónica de barrido<sup>22</sup>.

#### **8.4. Hongos ovicidas u oportunistas (parásitos de huevos, quistes y hembras de nematodos).**

Los hongos ovicidas son hongos filamentosos del suelo que atacan los huevos de los helmintos parásitos durante su fase de vida libre y de desarrollo en el suelo<sup>19</sup>.

Los nematodos endoparásitos son infectados por multitud de patógenos fúngicos. Sus estadios móviles (fundamentalmente juveniles de 2º estadio) como los nematodos vermiformes, son parasitados tanto por hongos atrapadores de nematodos como endoparásitos. Las hembras de nematodos sedentarios (fundamentalmente nematodos de quistes) son infectadas, incluso cuando son inmaduras y no poseen huevos, por hongos zoospóricos como *Catenaria auxiliaris* y *Lagenidium* spp. Muchos son parásitos obligados como *Nematophthora gynophila*, y son responsables (junto con parásitos facultativos de huevos como *Verticillium chlamyosporium*) de la supresividad en suelos de nematodos fitopatógenos como *Heterodera avenae*<sup>13</sup>.

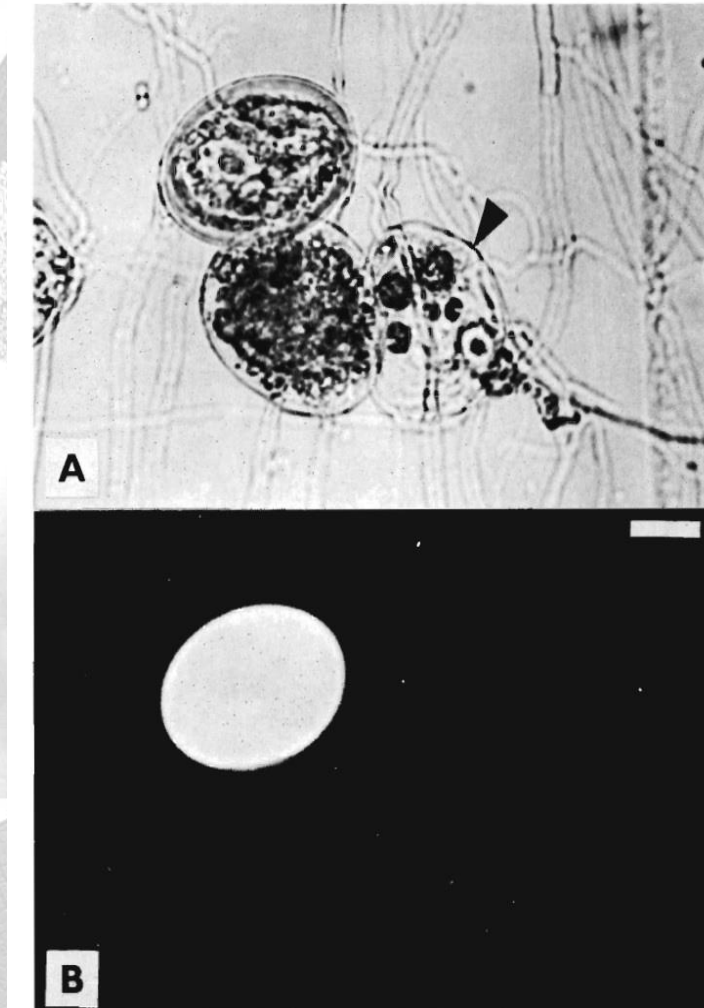
Tanto huevos como hembras son estadios sedentarios en el ciclo de vida de los nematodos, pero son vulnerables también a la infección por hongos<sup>11</sup>.

Los hongos ovicidas son saprofitos, por lo que no dependen de la presencia de huevos de nematodos en el suelo, y pueden sobrevivir mucho tiempo en el suelo sin los parásitos o sus huevos. Lýsek y Stěrba, 1991, haciendo referencia a otras investigaciones, refieren que solo un número limitado de hongos están especializados para parasitar huevos de nematodos, tal es el caso de *Verticillium chlamyosporium*, *Paecilomyces lilacinus* y *Dactylella oviparasitica*<sup>23</sup>.

Las propiedades ovicidas de los hongos difieren en la forma que destruyen los huevos, en la cantidad de huevos que pueden atacar en un determinado período y en el grado de destrucción de los mismos. El curso y las condiciones de estos procesos juegan un rol importante en la actividad ovicida total<sup>23</sup>.

Los hongos ovicidas atacan los huevos solo durante los primeros 7 a 10 días, y en algunas especies, como por ejemplo en *Penicillium lanosum*, la cantidad de huevos atacados se incrementa gradualmente en el transcurso de tres semanas<sup>19</sup>. En todos los casos, los hongos penetran las cubiertas, frecuentemente en un lugar, y matan y digieren gradualmente el embrión dejando una pequeña cantidad de desechos, y simultáneamente, la cubierta se desintegra. La capa de quitina de la cubierta se vuelve más fina y finalmente desaparece. Con la mayoría de las cepas fúngicas, las

capas pegajosas iniciales cambian a capas membranosas finas, desinfladas y arrugadas, reteniendo una forma aproximada de huevo (*huevo fantasma*), las que no son disueltas ni morfológicamente alteradas aunque pasen 4 semanas en contacto con el hongo (Figura 9)<sup>19</sup>.



**Fig. 9.** Se observa la acción de *Verticillium chlamydosporium* sobre *Ascaris lumbricoides*. (A) Arriba se observa un huevo intacto, la flecha negra indica la falta de quitina de la membrana. (B) Última fase de descomposición: "Huevo fantasma". De Kunert, 1992<sup>19</sup>.

## 9. CLASIFICACIÓN DE LOS HONGOS NEMATOFAGOS SEGÚN SU ACTIVIDAD OVICIDA.

Lysek y Nigenda<sup>1</sup> clasificaron a los hongos ovicidas en tres tipos de acuerdo al grado de ovicidad:

1er. Tipo: Hongos que con sus metabolitos detienen, paralizan o alteran el desarrollo de los embriones en los huevos, sin modificar el aspecto morfológico de sus cubiertas. Esta paralización puede ser temporal (efecto ovistático) o permanente (efecto ovicida).

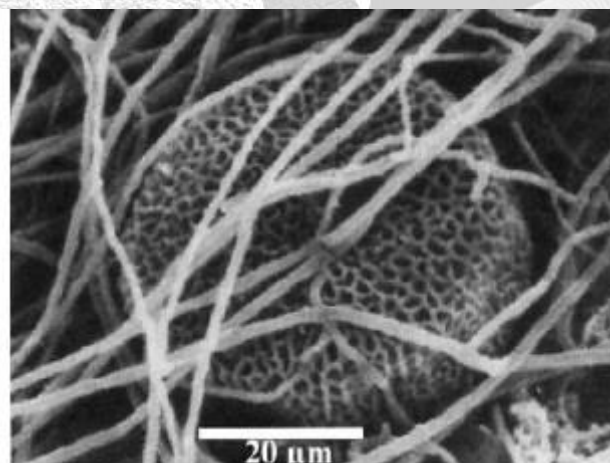
2do. Tipo: hongos que con sus metabolitos destruyen la cubierta de los huevos. Una vez que las cubiertas son degradadas el embrión queda a expensas de la acción de los hongos y es destruido.

3er. Tipo: el hongo penetra activamente a través de las cubiertas del huevo. Ataca al embrión cualquiera sea su estadio de desarrollo y crece dentro del huevo.

Este proceso ovicida es el más complejo y puede dividirse en 5 fases:

1. Fase de contacto: la hifa del hongo entra en contacto con las cubiertas del huevo.

2. Fase de adherencia: se adhiere a las cubiertas de los huevos. Durante esta fase algunos hongos forman un órgano de penetración que amplía la extensión del área de adhesión. Además, en el lugar de contacto el hongo produce enzimas que degradan las cubiertas de los huevos (Figura 10)<sup>24</sup>.

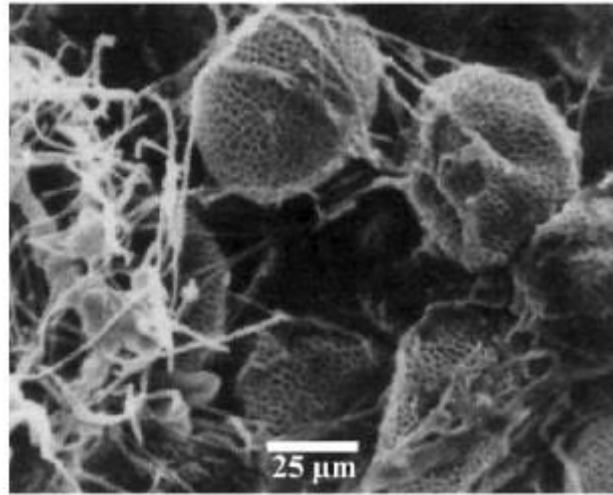


**Fig. 10.** Se observan las hifas de *Fusarium pallidoserum* alrededor del huevo de *T. canis*. Microscopía electrónica de barrido<sup>22</sup>.



3. Fase de penetración: el hongo penetra por las cubiertas de los huevos y por efecto de sus enzimas los destruyen. Algunas especies forman apresorios que perforan la cubierta y penetran al huevo, ej. *Paecilomyces lilacinus*<sup>25</sup>.

4. Fase de consumación: al penetrar por lo menos una hifa, el hongo comienza a ramificarse. Inicia la formación de una red que inmoviliza al embrión y lo mata. Simultáneamente se degradan los restos de cubiertas de los huevos (Figura 11).



**Fig. 11.** Se observan los huevos de *T. canis* destruidos por *F. pallidoserum*, al día 14 post incubación. Microscopía electrónica de barrido<sup>22</sup>.

5. Fase de liberación: al consumir todos los sustratos nutritivos en el huevo, el micelio fúngico regresa al medio externo.

Durante la infección de los nematodos los hongos parásitos de quistes y huevos penetran la superficie y digieren sus tejidos internos. Los mecanismos fundamentales de la penetración se desconocen pero se han propuesto procesos mecánicos y enzimáticos<sup>31</sup>.

## 10. Procesos químicos

### 10.1. Toxinas

Diversos estudios sugieren que la causa de la inmovilización de nematodos puede ser la acción de metabolitos tóxicos. Hans-Börje Jansson y cols. hacen referencia a investigadores que cuestionan la presencia de toxinas, ya que ningún compuesto con actividad nematocida ha sido aislado y caracterizado<sup>26</sup>.

### 10.2. Enzimas extracelulares.

Las enzimas producidas por patógenos de invertebrados son parcialmente responsables de la penetración del huésped. Esto se sustenta con la evidencia de producción de proteasas y quitinasas a partir de hongos entomopatógenos. En ellos, las proteasas son producidas rápidamente y en altas concentraciones, en conjunto con otras enzimas de degradación como son las quitinasas. Las proteasas son producidas en el primer paso de la infección, seguidas por la producción de quitinasas<sup>21</sup>.

*V. suchlasporium* y otros hongos endoparásitos de huevos de nematodos, deben penetrar su cáscara durante la infección. La composición de estas barreras extracelulares es algo relevante para la degradación de las mismas por hongos. Las proteínas parecerían ser la barrera más importante del esqueleto de invertebrados y de la cubierta de huevos de insectos y nematodos<sup>21</sup>.

Para los hongos que infectan plantas e insectos, estos hechos involucran la actividad de enzimas hidrolíticas que solubilizan las macromoléculas de la superficie<sup>17</sup>. La evidencia de la producción de enzimas que degradan la cubierta de los huevos proviene de estudios ultraestructurales. Los huevos de nematodos infectados muestran áreas de baja densidad electrónica alrededor de las estructuras de infección (*apre-sorios*) y penetración de las hifas, lo que sugiere la acción de enzimas hidrolíticas<sup>21</sup>.

Está demostrado que la composición de la barrera extracelular del hospedador es importante en relación al tipo de enzimas que son producidas durante la infección fúngica. La cubierta de los huevos de los nematodos es una estructura multilaminar compuesta de proteínas, lípidos y carbohidratos, pero a diferencia de la cutícula, estos presentan una capa media de microfibrillas de quitina, la capa quitinosa, embebida en una matriz proteica. Esta capa es la más gruesa y probablemente la barrera más importante contra la infección<sup>27</sup>.

Kunert (1992) estudió la actividad enzimática de hongos nematofagos *in vitro*. La actividad quitinolítica, proteolítica y lipolítica de las especies fúngicas evaluadas por Kunert, sobre huevos de *Ascaris lumbricoides* se resumen en la Tabla 2, la cual muestra las pruebas de efecto ovicida e hidrólisis de varios sustratos, en: fuerte, media, débil y muy débil actividad ovicida o enzimática. Ninguno de los hongos estudiados fue capaz de degradar enzimáticamente la capa glicolípida (ascarosida) de la cubierta del huevo la cual permaneció intacta luego de la digestión de los demás componentes del huevo<sup>19</sup>.

**Tabla 2.** Actividad enzimática de hongos nematofagos (Kunert, 1992)<sup>19</sup>

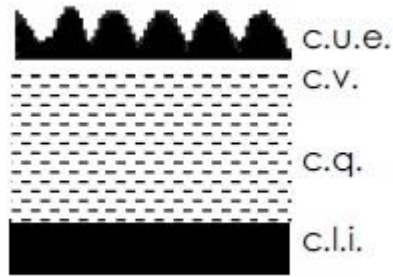
Especies	Efecto ovicida	Actividad quitinolítica	Actividad proteolítica	Actividad lipolítica
<i>Verticillium chlamydosporium</i>	+++	+++	+++	+++
<i>Acremonium</i> sp	++	+++	+++	+++
<i>Mortierella nana</i>	+++	+++	++	(+)
<i>Paecilomyces marquandii</i>	++	+++	+++	(+)
<i>Fusarium moniliforme</i>	++	(+)	+	+++
<i>Penicillium lanosum</i>	++	+	+	+
<i>V. bulbosum</i>	++	(+)	+	+

Efecto ovicida y/o actividad enzimática: +++ fuerte, ++ media, + débil, (+) muy débil

### 10.3. Enzimas hidrolíticas.

Durante la infección de nematodos, los hongos penetran la superficie del gusano y digieren sus tejidos internos. Estos mecanismos ocurren por actividad enzimática y mecánica. Para los hongos patógenos de plantas e insectos, estos pasos probablemente involucren tanto actividad de enzimas hidrolíticas que solubilizan las macromoléculas de la superficie, como así también la presión mecánica ocasionada por la penetración y crecimiento de la hifa<sup>28</sup>.

La cubierta de los huevos de nematodos es un tejido de varias capas compuesto por proteínas, lípidos y carbohidratos<sup>29</sup>, y ésta cubierta contiene microfibrillas de quitina incrustadas en una matriz proteica (Figura 12). Este material constituye una capa media y pegajosa en la estructura de la cubierta. Distal a esta capa, existe una capa compuesta principalmente por lipoproteínas vitelinas, y basal a la capa de quitina, está la capa lipídica en la mayoría de las cubiertas de los huevos<sup>28</sup>.



**Fig. 12.** Estructura de la cubierta del huevo de *T. canis*.  
 c.u.e.: capa uterina extrema  
 c.v.: capa vitelina  
 c.q.: capa de quitina  
 c.l.i.: capa lipídica interna  
 Imagen tomada de Wharton (1980)<sup>29</sup>

#### 10.4. Serin-proteasas

Varias proteasas extracelulares aisladas de hongos nematófagos pertenecen a la familia de serin-proteasas. La producción de las mismas puede ser estimulada por la presencia en cultivo, de cutícula de nematodos o las cáscaras de sus huevos<sup>14</sup>.

Estas enzimas llevan a cabo una amplia gama de funciones fisiológicas y fueron reportadas como factores de patogenicidad en bacterias u hongos contra insectos, nematodos e incluso humanos. Recientemente se informaron serin-proteasas como pSP-3, Aozl, Ver112, Mlx, PrC y Ds 1, las cuales fueron identificadas de hongos nematófagos como *P. lilacinus*, *A. oligospora*, *Lecanicillium psalliotae*, *Monacrosporium microscaphoides*, *Clonostachys rosea* (syn *Gliocladium rosea*) y *Dactylella shizhanna* respectivamente<sup>10</sup>.

Las propiedades bioquímicas de estas enzimas son conocidas, tienen pesos moleculares que van de 32 a 39 kDa y comparten una amplia gama de sustratos que incluyen caseína, gelatina, cutícula de nematodo, cubierta de huevos, etc.<sup>10</sup>.

Las proteasas P11, Aozl, Mlx y Ds1, tienen propiedades similares, comparten un bajo punto isoeléctrico (pI) y todas fueron aisladas de hongos trampa. De igual manera, las propiedades bioquímicas de las proteasas P32, VCP1, pSP-3, Ver112 y PrC son semejantes, excepto en que muestran un pI elevado y fueron aisladas de hongos parásitos. Estas serine-proteasas mostraron diferente actividad nematocida, resultado que sugiere que el sustrato de reconocimiento de las proteasas podría diferir entre los distintos hongos con diversas preferencias de huésped<sup>10</sup>.

Han sido purificadas y caracterizadas proteasas extracelulares en hongos nematófagos que hidrolizan las proteínas de la cutícula y de la cubierta de los huevos. Los primeros informes de la existencia de estas enzimas provienen de especies de hongos trampa.

La primera proteasa (P32) purificada y caracterizada es producida por un hongo nematófago parásito de huevos, *V. suchlasporium*<sup>21</sup>. Proteasas similares fueron detectadas y caracterizadas en el hongo trampa *A. oligospora*. Todas las proteasas son serin-proteasas, la mayoría con un pH bajo y tienen efecto sobre la degradación de las cutículas y cubiertas de los huevos de nematodos. Estas proteasas son similares a las proteasas de los hongos entomopatógenos y por lo tanto comparten secuencias homólogas. La producción enzimática puede ser estimulada en presencia de cutículas de nematodos o cubiertas de huevos<sup>30</sup>.

Las proteasas son las únicas enzimas producidas en grandes cantidades, son elaboradas en los primeros pasos de la infección seguidas normalmente por las quitinasas<sup>31</sup>.

El hecho de que la producción de las serin-proteasas extracelulares caracterizadas por hongos nematófagos puedan ser inducidas no solo por elementos estructurales de los nematodos sino también por otras fuentes de proteínas (solubles e insolubles), demuestra que éstas no solo tienen un rol en la infección de los nematodos sino, también, en el desarrollo saprotrófico de los hongos<sup>17</sup>.

### **10.5. Quitinasas**

Las quitinasas de hongos son importantes enzimas requeridas para el crecimiento de las hifas, pero son también producidas por hongos antagonistas de otros hongos y por hongos entomopatógenos y nematófagos<sup>27</sup>.

La quitina es un importante componente de la capa media de la cubierta de los huevos de nematodos. Hongos parásitos como *V. suchlasporium* (syn *Pochonia rubescens*) y *Pochonia chlamydosporia* deben primero penetrar la cubierta del huevo para causar infección. En ambas especies, el crecimiento en presencia de quitina coloidal, produce un complejo sistema de enzimas quitinolíticas y proteolíticas, siendo las más abundantes una endoquitinasa y una proteasa. La endoquitinasa CHI43 fue la responsable del 50-60% de la actividad quitinolítica respecto a las otras enzimas reportadas que degradan quitina<sup>27</sup>.

En el sobrenadante de un cultivo de *P. lilacinus* cepa 251, en un medio mínimo con quitina, y luego de la separación por isoelectroenfoque, fueron detectadas seis proteínas con actividad quitinolítica. Estudios en *P. lilacinus* revelaron que la aplicación individual o en combinación de proteasas y quitinasas alteran drásticamente la estructura de la cubierta del huevo<sup>10</sup>.

Wharton<sup>29</sup> publicó un trabajo acerca de la importancia de la quitinasa fúngica y su potencial rol en la infección de los huevos de nematodos. La actividad de quitinasa fue detectada por ensayos enzimáticos en *Verticillium* spp. aislado de huevos de nematodos infectados en estudios de monitoreo sobre medio sólido con quitina coloidal y en medios líquidos mediante ensayos enzimáticos<sup>21</sup>. También ha sido demostrado que la proporción de huevos de nematodos infectados aumenta a medida que se acelera la actividad quitinolítica<sup>32</sup>.

Muchas especies de bacterias, hongos y plantas producen enzimas quitinolíticas que están clasificadas en tres tipos: exoquitinasas, endoquitinasas y quitobiosas, las que varían entre cada especie, dependiendo del número, tipo y posición de los dominios catalíticos y de unión al sustrato<sup>33</sup>.

## **11. QUITINA Y QUITINASAS.**

La quitina, un homopolímero no ramificado de 1,4- $\beta$ -linked *N*-acetil-D-glucosamina, es ampliamente distribuida en la naturaleza, particularmente como polisacárido estructural de la pared de los hongos, en el exoesqueleto de artrópodos, en la cáscara externa de crustáceos, nematodos, etc. Se cree que es el segundo polímero más abundante en la tierra junto a la celulosa<sup>34</sup>.

Estudios de difracción de rayos X revelaron que la quitina aparece en la naturaleza en tres formas poliméricas,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , las que difieren en el ordenamiento molecular de las cadenas dentro del cristal. En la  $\alpha$ -quitina, las cadenas se arman en sentido antiparalelo mientras que en la  $\beta$ , las cadenas son paralelas. Las cadenas de la  $\gamma$ -quitina tienen ordenamiento mixto. Entre estas, la forma  $\alpha$ , es la más abundante de las tres<sup>34</sup>.

La quitina es sintetizada a partir del precursor activado uridine difosfato *N*-acetil *D*-glucosamina por la enzima quitin-sintetasa. Desde que la quitina es importante en el crecimiento fúngico, lo más probable es que exista un sistema por el cual pueda ser "remodelada" por descomposición y re-construcción, que le permita un cierto grado de plasticidad en la pared, lo cual es importante en la elongación de la hifa<sup>34</sup>.

Las quitinasas son enzimas que degradan la quitina e hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4. Estas enzimas se encuentran en un amplio rango de organismos que incluyen virus, bacterias, hongos, insectos, animales y plantas. El rol de las quitinasas en los organismos es diverso, así por ejemplo, en los hongos tienen un rol en la autólisis, nutrición y morfogénesis, así como están relacionadas al micoparasitismo, en las bacterias juegan un papel en la digestión de quitina como fuente de carbono, de energía y para reciclar la quitina en la naturaleza. En los hongos filamentosos estas enzimas tienen importancia y juegan un papel determinado durante la esporulación, la germinación de la espora, el crecimiento y la autólisis de la hifa<sup>35</sup>. En los hongos filamentosos y en los basidiomicetes la quitina comprende el 16% de su peso seco, en los mucorales está asociada a quitosano, en tanto que en levaduras la cantidad en su pared es muy baja aunque la cicatriz del brote en estos organismos, está compuesta de quitina<sup>34</sup>.

Las quitinasas se clasifican en dos categorías principales: endoquitinasas y exoquitinasas. Las primeras clivan quitina al azar en sitios internos, y las segundas pueden ser divididas a su vez, en dos categorías: quitobiosidasas y  $\beta$ -(1,4) *N*-acetil glucosaminasa<sup>34</sup>.

La producción de quitinasas extracelulares se ve influenciado por los componentes del medio como la fuente de carbono y nitrógeno, y los factores físicos tales como aireación, pH, temperatura de incubación afectan la producción enzimática. En cambio, el agregado de aminoácidos y sus análogos como tirosina, triptófano, glutamina, arginina, al medio de cultivo, estimulan la producción<sup>34</sup>. Es importante destacar que las quitinasas producidas por microorganismos pueden ser inducidas en la naturaleza, en tanto que a nivel industrial, las quitinasas microbianas pueden ser producidas a partir de fermentación líquida, en lote o continua, por fermentación de alimentación discontinua, por fermentación sólida y por sistema celular bifásico.

### **11.1. Purificación y caracterización de quitinasas de hongos.**

A pesar de que existen muchos reportes sobre la producción de quitinasas fúngicas, los datos sobre la purificación y caracterización de las mismas son muy escasos o limitados a unos pocos hongos<sup>35</sup>. En los hongos micoparasíticos, varias enzimas de *Trichoderma harzianum* han sido purificadas, incluyendo endoquitinasas, quitobiosidasas y *N*-acetil glucosamidasa. También fueron purificadas y reportadas las quitinasas de *Fusarium chlamydosporum*, *Gliocladium virens*, *Trichotecium roseum*, *Talaromyces flavus*, entre otros. En los hongos entomopatógenos, las exo y endo qui-

tininasas de *Beauveria bassiana* fueron purificadas y caracterizadas. De los hongos nematófagos solo dos quitinasas de *Verticillium chlamydosporum* y *V. suchlasporium*, fueron purificadas y caracterizadas. Más recientemente, las quitinasas de hongos termofílicos como *Thermomyces lanuginosus*, han recibido atención por estabilidad térmica<sup>35</sup>.

La purificación de las enzimas se realiza por diferentes métodos, como ser precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografías de intercambio iónico, de afinidad, de interacción hidrofóbica y por isoelectroenfoque. La purificación reduce la actividad enzimática de la enzima, lo que puede deberse a que, en el extracto crudo existe un sinergismo entre las isoformas, el cual se pierde al durante el proceso de purificación<sup>35</sup>.

La mayoría de los hongos quitinolíticos producen más de una clase de enzima. Así por ejemplo, *T. harzianum* puede producir 7 quitinasas, tres de ellas muestran acción sinérgica en la degradación de la pared celular, y la combinación de las actividades de endoquitinasa y quitobiosidasa resulta en un aumento de la actividad antifúngica<sup>35</sup>.

## **12. PROTEASAS.**

Las proteasas pueden ser clasificadas de acuerdo a varios criterios, que incluyen el tipo de reacción que catalizan, el sitio activo funcional y la estructura molecular de la enzima. Una de las formas de clasificarlas es en exo y endopeptidasas. Las exopeptidasas catalizan la hidrólisis del extremo amino terminal de las cadenas polipeptídicas actuando tanto en el extremo C- como N- terminal, en tanto que las endopeptidasas catalizan la hidrólisis de los péptidos internos y se las reconoce de acuerdo a la naturaleza química de los grupos responsables de la actividad catalítica<sup>36</sup>.

Las proteasas en el suelo se originan a partir de diferentes fuentes, las que incluyen microorganismos, plantas, excrementos de animales (secos y húmedos) y la descomposición. El significado de estas diferentes fuentes varía de acuerdo al tipo del ecosistema. La actividad proteolítica se ve afectada por factores ambientales, como el tipo y aspecto del suelo, la concentración elevada de CO<sub>2</sub> y la existencia de contaminantes, y se ve disminuida al aumentar la profundidad del suelo, ya que disminuyen la carga microbiana y los nutrientes<sup>36</sup>.

La mayoría de los microorganismos en el suelo expresan actividad proteolítica. Las proteasas microbianas más importantes o claves incluyen serin-endopeptidasas



como serin-peptidasas alcalinas, peptidasas tipo subtilisina y subtilisinas bacterianas y fúngicas<sup>36</sup>.

### **12.1. Funciones de las proteasas microbianas.**

Los microorganismos en el suelo producen proteasas para reciclaje de materia orgánica, asegurando así la nutrición microbiana. Estas enzimas juegan un rol en la interacción de los microorganismos del suelo por clivaje de las proteínas de pared. Esa interacción incluye las proteasas bacterianas antifúngicas y las serin proteasas alcalinas de los hongos nematófagos y entomopatógenos. También tienen un importante rol las serin-proteasas queratinolíticas para reciclar residuos queratínicos en el suelo<sup>36</sup>.

## **13. ANTECEDENTES**

### **13.1 Ensayos sobre huevos de nematodos y purificación de enzimas fúngicas.**

En 1990, López-Llorca purificó las proteasas extracelulares de *V. suchlasporium*, enzimas que son producidas cuando el hongo crece en medio líquido con gelatina como fuente de carbono y nitrógeno<sup>21</sup>.

En 1994, Tunlid y cols., purificaron y caracterizaron una serin-proteasa extracelular a partir del hongo trampa *A. oligospora*<sup>18, 30, 37</sup>.

Bonants y cols., 1995 estudiaron, aislaron y secuenciaron las proteasas de *P. lilacinus* frente a huevos de *Meloidogyne hapla* y demostraron el efecto deletéreo de las mismas sobre los huevos<sup>31</sup>.

Jesús de la Cruz y cols., 1995, logran la purificación, clonado y caracterización de una endo- $\beta$ -1,3-glucanasa a partir del hongo parásito *T. harzianum*<sup>38</sup>.

En 1998, Bedelu y cols., reportaron la relación positiva entre la producción de proteasas extracelulares y su eficiencia en degradar nematodos de dos especies de *Arthrobotrys*. Sugieren que las proteasas juegan un rol importante en la patogénesis y que su elevada producción permite a los hongos trampa comportarse como potenciales agentes de control de nematodos<sup>12</sup>.

Olivares-Bernabeu y López-Llorca 2002, investigaron la presencia de hongos oviparásitos en suelos españoles con nematodos fitopatógenos endoparásitos<sup>39</sup>.

Tikhonov y col., 2002, purificaron y caracterizaron quitinasas de *V. chlamydosporium* y *V. suchlasporium*. Los autores sugieren que quitinasas y proteasas están involucradas en la destrucción de la cubierta de huevos de nematodos por los hongos parásitos<sup>27</sup>.

Khan y cols. 2003, purificaron y caracterizaron serin-proteasas y quitinasas de *P. lilacineus*<sup>40</sup>.

Trabajando con el hongo trampa *A. oligospora*, Minglian y cols 2004, caracterizaron una serin-proteasa (Aoz1) y su cDNA<sup>14</sup>.

En el año 2004 Huang y cols., publican una revisión acerca de las enzimas extracelulares que sirven como factores de virulencia en hongos nematófagos y su relación con el huésped. Entre las conclusiones, remarcan que debido a la naturaleza compleja de la cubierta de los huevos y la cutícula de los nematodos, la penetración de las mismas requiere la acción sinérgica de varias y diferentes enzimas<sup>32</sup>.

Yang y cols., en 2005 aislaron e identificaron una serin-proteasa a partir del hongo nematófago *L. psalliotae*, demostrando que el extracto enzimático crudo es más efectivo para degradar el nematodo y sugiriendo que otras enzimas y factores deben jugar un rol en el proceso de infección. En el año 2007, purifican y clonan una serin-proteasa del hongo trampa *Dactylellina varietas*, y en el año 2008, lo hacen a partir de *Monacrosporium cystosporium*<sup>10, 41, 42, 43</sup>.

En 2006, Wang y cols., purifican y caracterizan una serin-proteasa a partir del hongo trampa *Dactylla shizishanna*, y describen nuevamente que la actividad nematocida es superior con el extracto enzimático crudo que con la enzima pura, lo que sugiere que la penetración es un proceso que requiere de la acción sinérgica de varias enzimas debido a la compleja composición de la cutícula de los nematodos o la envoltura de sus huevos<sup>44</sup>.

En cuanto a los ensayos realizados sobre huevos y quistes de otros geohelminths, podemos mencionar a: los ensayos del efecto de *P. lilacinus* sobre la viabilidad de oncocercas de *Taenia hydatigena*<sup>45</sup>; la observación *in vitro* de los efectos de los hongos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* y *Verticillium chlamydosporium* sobre huevos de *Ascaris lumbricoides*<sup>46</sup>; la actividad ovicida del extracto enzimático crudo de *P. chlamydosporia* sobre los huevos de *Ancylostoma* spp.<sup>47</sup>; la evaluación *in vitro* de la interacción entre hongos del suelo y el desarro-

llo evolutivo de los huevos de *Ascaris suum*<sup>48</sup>, y más recientemente, la evaluación de los efectos ovistáticos u ovidas de hongos filamentosos aislados del suelo sobre huevos de *A. suum*<sup>49</sup>.

### **13.2. Ensayos realizados sobre huevos de *T. canis*.**

En el año 1995 Araújo y cols, estudiaron *in vitro* el efecto de hongos nematófagos sobre huevos embrionados de *T. canis*. Los hongos eran: *P. lilacinus*, *A. robusta* y *A. conoides*, presentándose *P. lilacinus* como el que mayor efecto presentaba con hifas colonizando el interior de los huevos<sup>50</sup>.

Braga FR y cols. (2010) y Carvalho RO y cols. (2010), usando el hongo *Pochonia chlamydosporia*, parásito facultativo de huevos de helmintos, evaluaron la actividad ovidas *in vitro* sobre huevos de *T. vitulorum* y *T. canis*, respectivamente. La acción de estos hongos se basa en la formación de apresorios desde hifas no diferenciadas, que permiten la colonización de la superficie del huevo y la penetración del mismo a través de acción mecánica y enzimática<sup>51, 52</sup>. Por el mismo año, Frassy y cols, demostraron *in vitro* la destrucción de huevos de *T. canis* por *P. chlamydosporia*<sup>53</sup>.

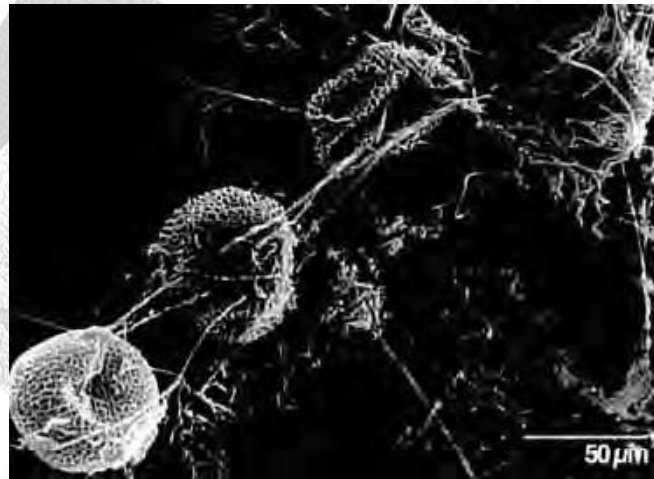
En el año 2013, Araujo y cols, ensayaron la actividad predatora de las clamidosporas de dos cepas de *P. chlamydosporia* bajo condiciones de laboratorio sobre huevos de *T. canis* en un ensayo de 15 días, encontrándose que con la mayor concentración de clamidosporas ensayada se logra entre un 68,5 y 70,5% de destrucción de los huevos<sup>54</sup>.

En un estudio realizado en Rio Grande do Sul, Brasil, investigadores evaluaron la actividad ovidas de hongos aislados de suelo de lugares públicos de la zona sobre huevos de *T. canis*<sup>55</sup>.

Más recientemente, en Polonia, compararon el efecto de diferentes especies de hongos saprófitos en el desarrollo de huevos de *T. canis* y *A. suum*, encontrando que los huevos de *T. canis* son más sensibles a la acción antagonista de las cepas de hongos estudiadas que los de *A. suum*<sup>56</sup>.

En Argentina, podemos mencionar los estudios de Basualdo y cols. (2000), quienes observaron que los huevos de *T. canis* parasitados por *P. lilacinus* no completan su desarrollo (Figura 13), en tanto que frente a *P. marquandii* la actividad ovidas es intermedia (Figura 14). Estos autores, consideran que es necesario estudiar los

factores asociados a este fenómeno, como ser características físico-químicas de los suelos, condiciones de temperatura y humedad, presencia de otros microorganismos, etc., que puedan influenciar la actividad ovicida<sup>25</sup>.

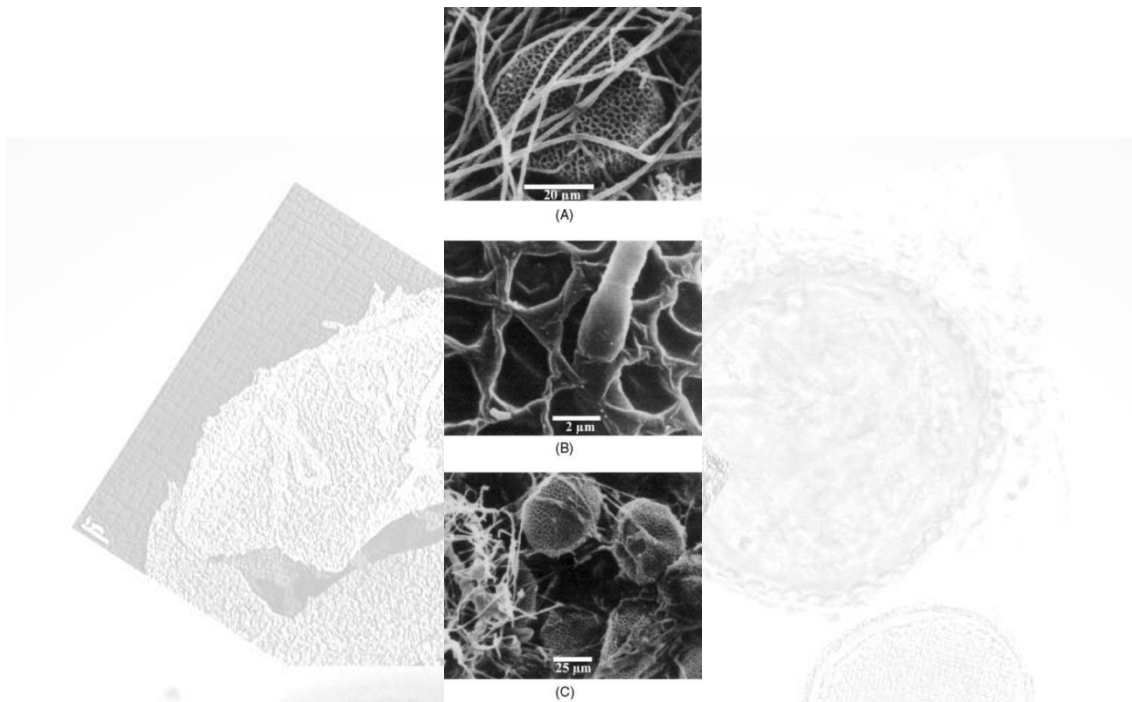


**Fig. 13.** Microscopía electrónica de barrido mostrando huevos de *T. canis* destruidos por la actividad de *P. lilacinus*<sup>25</sup>.

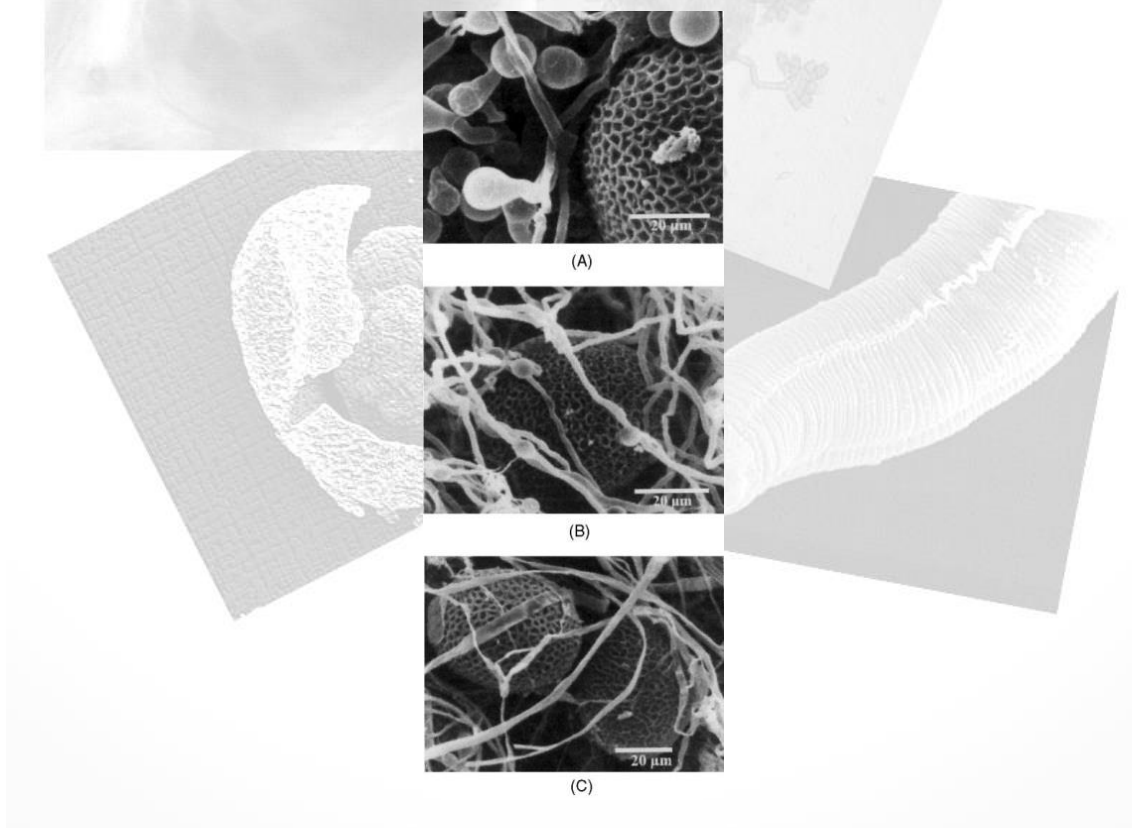


**Fig. 14.** Microscopía electrónica de barrido. Larva emergiendo de huevo de *T. canis* rodeado por *P. marquandii*, día 14 de incubación<sup>25</sup>.

Ciarmela y cols. (2002), en estudios de suelos de áreas públicas de La Plata, aislaron dos especies fúngicas, *Fusarium pallidoroseum* (Figura 15) y *Mucor hiemalis* (Figura 16), los que en co-cultivo con huevos de *T. canis*, mostraron actividad ovicida<sup>22</sup>.



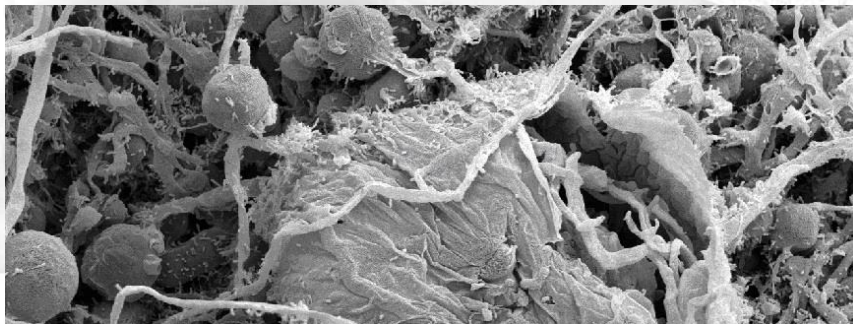
**Fig. 15.** A) MEB de huevo de *T. canis* rodeado de *F. pallidoroseum* día 4 de incubación. B) MEB de una hifa penetrando la cubierta del huevo, día 7 de incubación. C) MEB de huevos destruidos por *F. pallidoroseum*, día 14 de incubación<sup>22</sup>.



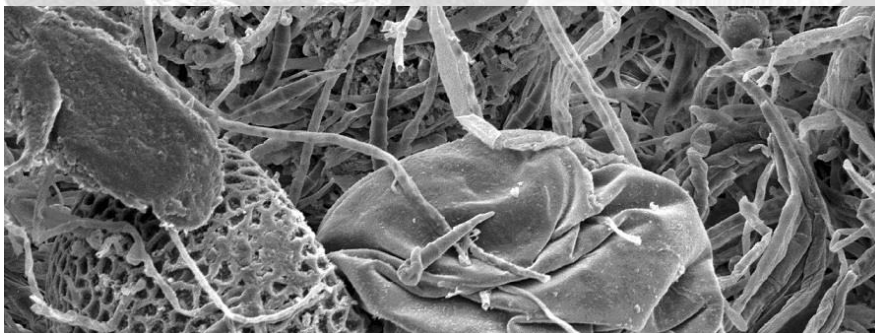
**Fig. 16.** A) MEB de las conidias de *M. hiemalis*. B) MEB de huevos de *T. canis* y cuerpos de fructificación del hongo, día 7 de incubación. C) MEB de huevos rodeados por una red hifal de *M. hiemalis*, día 14 de incubación<sup>22</sup>.

Gortari y cols., 2007, demuestran la presencia de hongos con actividad antagónica sobre huevos de *Toxocara* spp. en un parque de la ciudad de La Plata, relacionando con factores bióticos y abióticos del suelo<sup>57</sup>.

Ciarmela, 2008, en su trabajo de Tesis "Efecto ovicida de hongos del suelo sobre huevos de *Toxocara canis* (Werner) Johnston", hace una clasificación de los diferentes grados de actividad ovicida en las diferentes especies de hongos saprofitos de suelo. Entre los que ejercieron una "muy alta" y "alta" actividad ovicida se pueden mencionar a *Cryosporium merdarium* (Figura 17), *Fusarium oxysporum* (Figura 18), *F. sulphureum* y *F. aff. semitectum*. Actividad ovicida "intermedia" presentaron *F. moniliforme*, *Sporothrix alba*, *F. aff. acuminatum*, *F. fusaroides*. Entre los que exhibieron actividad ovicida "baja" nombra a *Penicillium canescens*, *Monilia sp.*, *Aspergillus flavus*, en tanto que sin actividad ovicida señala a *F. dimerum*, *Mucor minutus*, *Trichoderma harzianum*, *A. Níger*<sup>58</sup>. Estos hallazgos fueron publicados en el año 2010<sup>59</sup>.



**Fig. 17.** MEB. Día 28 de incubación. Huevo de *T. canis* colonizado y destruido por *C. merdarium*<sup>59</sup>.



**Fig. 18.** MEB. Día 28 de incubación. Huevo de *T. canis* deformado y destruido por *F. oxysporum*, con su cubierta lisa y la red hifal a su alrededor<sup>59</sup>.

Gortari y cols. (2008), compararon la actividad biológica de dos cepas salvajes de *P. lilacinus* aisladas de área contaminada y no contaminada, como antagonistas contra huevos de *T. canis*, encontrando actividad proteolítica y de quitinasas en ambas cepas<sup>60</sup>.

#### **14. *Toxocara canis*.**

La Toxocariosis es una zoonosis de distribución universal que fue descrita por primera vez por Beaver en 1956 bajo el nombre de *Larva Migrans Visceral*, y que está causada principalmente por *Toxocara canis*, helminto propio del perro. Es una de las infecciones helmintozoonóticas más comúnmente informada en el mundo y detectada con mayor frecuencia en niños, ya que por sus hábitos higiénicos y su contacto con animales constituyen el grupo más expuesto<sup>61</sup>.

*T. canis* es un ascárido que, en estado adulto, vive en el intestino delgado del perro y de otros cánidos silvestres. La infección en el ser humano es accidental, en éste no se desarrolla normalmente el parásito, sólo sobrevive su estadio larvario por ser un hospedador paraténico o accidental de esta parasitosis<sup>62</sup>.

El ciclo del parásito muestra la importancia que tiene el suelo en su curso vital, ya que allí se efectúa obligatoriamente la maduración de los huevos hasta el desarrollo de la larva infectante. Los huevos deben permanecer en el suelo entre 10 y 14 días para su maduración, pudiendo perdurar viables por más de dos años si las condiciones de temperatura y humedad son adecuadas. Según algunos autores, la embrionación completa podría alcanzarse en cuatro días cuando la temperatura es de 30°C<sup>62</sup>.

Sin embargo, los huevos muestran una gran capacidad de resistencia a las condiciones ambientales adversas, son extremadamente resistentes a diversas sustancias químicas y a los cambios de temperatura. Por esto pueden sobrevivir fuera del huésped por largos períodos de tiempo<sup>52</sup>, aunque se destruyen rápidamente si se hallan expuestos a las radiaciones solares directas con altas temperaturas y a la desecación<sup>63</sup>. Estas características explican porqué la presencia de huevos viables en las capas superficiales de los suelos signifique un riesgo potencial para la salud humana<sup>52</sup>.

Este comportamiento se debe a que los huevos de *Toxocara spp*, así como los de otros geohelminths, poseen una compleja y gruesa cubierta que lo protege<sup>64</sup>. En la

mayoría de los nematodos, esa cubierta consiste en tres membranas o capas, una externa o capa vitelina, una membrana media de quitina y una membrana interna lipídica<sup>65</sup>. La capa de quitina esta compuesta por una matriz proteica (50-60% de su composición) que contiene a las microfibrillas de quitina. Esta capa es considerada la más gruesa y probablemente la mayor barrera a la infección por los microorganismos presentes en el suelo y a los hongos nematófagos, especialmente aquellos que se comportan como ovicidas<sup>32</sup>.

#### 14.1 Taxonomía y morfología.

Desde el punto de vista taxonómico, *Toxocara canis* es un helminto que se ubica en<sup>63</sup>:

Reino	<i>Animalia</i>
Subreino	<i>Metazoa</i>
Phylum	<i>Nematoda</i>
Clase	<i>Secernentea</i>
Orden	<i>Ascaridida</i>
Superfamilia	<i>Ascaridoidea</i>
Familia	<i>Ascarididae</i>
Subfamilia	<i>Toxocarinae</i>
Género	<i>Toxocara</i>

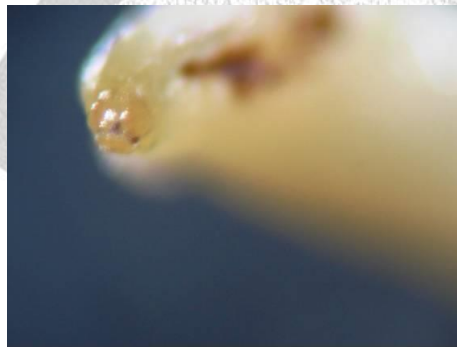
El género *Toxocara* incluye nematodos de cuerpo grueso y estriado, recubierto con una cutícula que presenta estriaciones transversales a intervalos de 16-22  $\mu\text{m}$  y de color blanco o blanco pardo<sup>63</sup>.

Los adultos miden hasta 10 cm de largo; en el extremo anterior presentan alas cervicales mucho más largas que anchas (2,4 mm x 0,2 mm) que se van estrechando hacia atrás, lo que les da un aspecto de lanza (Figura 19). En el extremo cefálico se hallan los labios, que algunas veces tiene protuberancias dentiformes (Figuras 20); sin interlabios<sup>66</sup>. El esófago, musculoso, se ensancha gradualmente hacia su extremo posterior. Los individuos inmaduros tienen un ventrículo intercalado entre el esófago y el intestino, solo visible en ejemplares transparentados. Este ventrículo persiste en el adulto de *Toxocara* pero para su demostración se requiere la disección del parásito<sup>63</sup>.





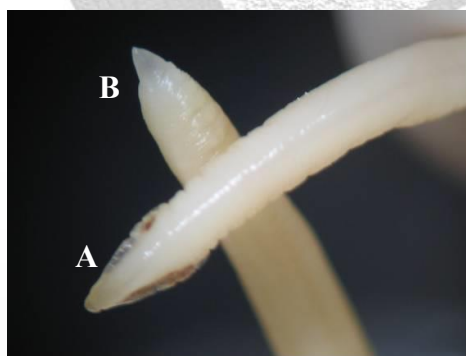
**Fig. 19.** Fotografía del extremo anterior de *T. canis* mostrando las alas cervicales<sup>66</sup>.



**Fig. 20.** Fotografía del extremo cefálico de *T. canis* en la cual se aprecian los labios y las protuberancias dentiformes<sup>66</sup>.

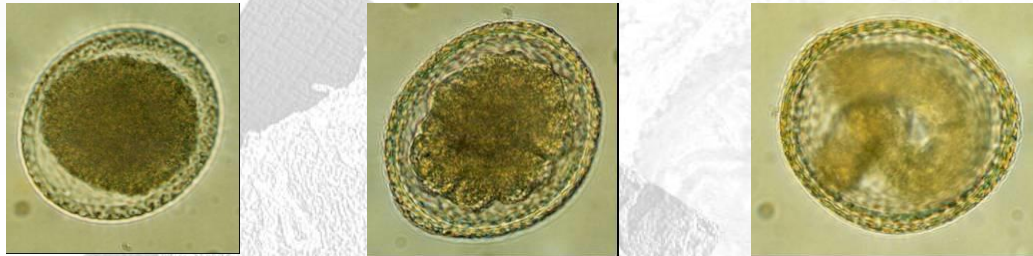
Los machos suelen medir de 4 a 6 cm de largo por 2,0-2,5 mm de ancho. El extremo posterior tiene una forma característica de enrollado en espiral. Su calibre sufre una notable reducción de la parte final, inmediatamente por detrás del ano, formando un apéndice digitiforme. Presenta un par de espículas desiguales aladas y 20 a 30 pares de papilas preanales, 5 postanales y 2 perianales<sup>63</sup>.

Las hembras miden de 6,5-10,0 cm de largo por 2,5-3,0 mm de ancho (Figura 21, derecha). Los conductos genitales se hallan extendidos por casi toda la longitud del cuerpo a un lado y otro de la vulva, la que se halla situada en el cuarto anterior del cuerpo. A diferencia con el macho, el extremo posterior es romo (Figura 21, izquierda)<sup>63, 66</sup>.



**Fig. 21.** Izquierda, fotografía del extremo anterior de *T. canis* mostrando las alas cervicales (A) y del extremo posterior romo (B). Derecha, adultos macho y hembra<sup>66</sup>.

Los huevos son subsféricos, miden 80-85  $\mu\text{m}$  de largo por 75  $\mu\text{m}$  de ancho. Tienen una cubierta lisa, envuelta por una membrana albuminosa finamente punteada (Figura 22 A, B y C) <sup>67</sup>.



**Fig. 22.** Huevo de *T. canis* recién eliminado (A), en estado de mórula (B) y larvado (C)<sup>67</sup>

El primer estadio larvario se desarrolla en el interior del huevo (Figura 22 C), el cual al eclosionar, libera la segunda fase larvaria (Figura 23). Esta mide 290-350  $\mu\text{m}$  de largo por 14-20  $\mu\text{m}$  de ancho <sup>63</sup>. El cuarto anterior del cuerpo está uniformemente atenuado terminado en 3 labios<sup>68, 69</sup>.



**Fig. 23.** Imagen al microscopio electrónico de larva L2 de *T. canis*. Obsérvese las estriaciones del cuerpo y las protuberancias dentiformes (Imagen no publicada, derecho de autor de Bojanich, María Viviana).

#### 14.2. Ciclo biológico en el perro

Los adultos de *T. canis* viven en el intestino delgado de perros y zorros. Los huevos embrionados producidos por las hembras fecundadas son eliminados junto con las heces de los perros y son extremadamente resistentes a las condiciones ambientales<sup>70</sup>. El desarrollo de embrión a larva infectante (larva 2), requiere de 9 a 11 días a

24° C o de 3 a 5 días a 30° C, con una adecuada concentración de oxígeno y una humedad relativa mínima de 75%<sup>64</sup>.

Cuando los huevos infectantes son ingeridos por otro perro, eclosionan en el intestino delgado a las 2-4 horas y se liberan las larvas infectantes. Estas pueden utilizar tres vías para desplazarse y alcanzar diferentes tejidos:

- a) Por medio de los vasos sanguíneos y vena porta llegan al hígado. Allí un pequeño número son retenidas por el filtro capilar hepático, pero la mayoría atraviesan estos capilares y por las venas sub-hepáticas y luego la vena cava posterior llegan al corazón derecho, salen de él por la arteria pulmonar y llegan a los pulmones.
- b) A través de la cavidad peritoneal, donde la mayoría se extravían, aunque algunas consiguen llegar al hígado por la cápsula de Glisson. En el parénquima hepático migran, y mediante los capilares sub-hepáticos, llegan a la vena cava posterior y de allí al corazón derecho y pulmones.
- c) Transportadas por vía linfática hasta el corazón derecho y de allí a los pulmones por la arteria pulmonar<sup>63</sup>.

A partir de este momento, la migración y el desarrollo posterior de las larvas varía según que el perro sea joven o adulto<sup>71</sup>. En el primer caso y cualquiera que sea la forma de migración, todas las larvas llegan a los pulmones. Una vez allí, las larvas L2 se detienen en los capilares pulmonares y sufren una muda pasando a larva 3 (L3), que tienen una longitud de aproximadamente 430 µm. Las L3 rompen los capilares pulmonares y pasan a los alvéolos donde efectúan una nueva muda pasando a larva 4 (800-900 µm de longitud) y continúan su migración a través de bronquiolos, bronquios, tráquea y faringe donde son deglutidas. Las L4 pueden subsistir a la acidez del estómago y así llegar al intestino delgado, donde alcanzan el estadio preadulto (adulto joven inmaduro). Una vez lograda la madurez sexual, proceso que se sucede en el intestino, se inicia la puesta de un gran número de huevos que se eliminan con las heces. Este ciclo se presenta en hospedadores muy jóvenes, principalmente en cachorros menores de 3 meses<sup>71</sup>.

Si el perro es adulto (mayor de 6 meses) y fundamentalmente si posee inmunidad pasiva adquirida, las larvas 2 no son capaces de completar la migración pulmonar, al no poder alcanzar los alvéolos pulmonares. En esos casos atraviesan el lecho vascular, llegan al corazón izquierdo, de donde pasan a la circulación general distribuyéndose por diversos tejidos corporales. Estas larvas 2 se acumulan en las vísceras

ras y músculos esqueléticos donde *permanecen inactivas pero vivas* durante largos períodos de tiempo<sup>63</sup>.

En perras gestantes, las larvas 2 quiescentes incluidas en los tejidos son reactivadas por efectos de los cambios hormonales, ingresan nuevamente en el sistema circulatorio, atraviesan la placenta y alcanzan el sistema circulatorio del feto, localizándose primeramente en el hígado. Se afirma que durante los últimos períodos de gestación, las larvas abandonan el hígado y, pasando por el corazón, llegan a los pulmones donde realizan una muda de larvas 2 a larvas 3. Después del nacimiento del cachorro y durante los días siguientes, las larvas permanecen en los pulmones pero aproximadamente al cuarto día, algunas larvas 4 aparecen en el intestino. Transcurridas dos semanas, tiene lugar la muda final y los gusanos alcanzan la madurez sexual. Esta es la vía por la que se infectan la mayoría de cachorros intrauterinamente<sup>63</sup>.

También está comprobado que las perras pueden transmitir las larvas 2 a sus cachorros por medio de la leche. La transmisión se realiza rápidamente después del parto y alcanza un máximo durante la segunda semana de lactancia<sup>72</sup>.

### **14.3. Ciclo en hospedadores accidentales.**

Una tercera vía de infección tiene lugar a través de los hospedadores paraténicos. En 1958 Sprent<sup>63</sup> demostró que los huevos de *Toxocara canis* pueden eclosionar y sus larvas 2 permanecer viables en los tejidos de una amplia gama de animales incluido el hombre, sin llegar a completar el ciclo hasta gusano adulto<sup>73</sup>. En el hombre, así como en ratas, cabras, monos, aves, bovinos, cucarachas, etc., el parásito no desarrolla hasta la forma adulta, por lo que se los denomina huéspedes *accidentales* o *paraténicos*. Esta circunstancia perpetúa al parásito en la naturaleza, y estos huéspedes paraténicos pueden ser nuevamente fuente de contaminación para los perros<sup>74</sup>.

## **15. TOXOCARIASIS HUMANA**

El hombre se infecta con *T. canis* mediante la ingestión de huevos que contienen el estadio larval infectivo (L 2). El huevo se desprende de sus envolturas en el intestino delgado proximal y al liberarse la larva ésta penetra la mucosa, migra hacia el hígado por la circulación portal y continuando por el sistema venoso, penetra en el pulmón y, posteriormente en la circulación sistémica<sup>72</sup>. Las larvas se distribuyen

por todo el organismo y han sido descritas en hígado, pulmones, cerebro y corazón.

Tanto las larvas de *Toxocara canis* como las de *Toxocara cati* son capaces de producir en el hombre el denominado síndrome de la "larva migrans". Sin embargo, la mayoría de los casos descritos de este síndrome se refieren a *Toxocara canis*<sup>63</sup>.

Diversos estudios llevados a cabo en hospedadores paraténicos muestran la mayor habilidad que posee *T. canis* para sobrevivir en sus hospedadores accidentales, así como su mayor capacidad para la diseminación por los diferentes tejidos del huésped. Por el contrario, las larvas de *T. cati* suelen ser poco invasivas, especialmente en órganos como cerebro y ojos<sup>63</sup>. A estas variaciones de comportamiento de las larvas en el hospedador, hay que añadir un mayor riesgo de infección por *T. canis* que por *T. cati*, debido a la gran dispersión de sus huevos en el ambiente y a la diferencia poblacional entre gatos y perros. También influye el hecho de que la infección prenatal por *T. cati* no se produce y los gatos suelen infectarse por la ingestión de larvas L2 que se hallan en los tejidos del ratón u otros hospedadores paraténicos<sup>66</sup>.

### **15.1. Ciclo biológico en el hombre**

El hombre adquiere la toxocariosis al ingerir de forma accidental huevos embrionados de *T. canis* a partir de tierra, alimentos u objetos contaminados. La geofagia y la pica, frecuente en niños de 1 a 4 años, contribuye a que la población infantil sea una de las más afectadas por tener hábitos de juego íntimamente vinculados con el suelo, donde suele haber una gran dispersión de los huevos de *T. canis*<sup>63</sup>.

Una vez ingeridos los huevos larvados, las larvas 2, por acción de los jugos gástricos, eclosionan en el intestino delgado, penetran la mucosa, traspasan la pared intestinal, llegan al hígado a través de la vena porta y de allí al corazón y pulmones. Luego penetran en la circulación mayor donde son empujadas hacia los distintos tejidos periféricos. Las larvas continúan diseminándose y se detienen cuando su tamaño excede al diámetro del vaso sanguíneo por el que viajan. Cuando esto ocurre, traspasan activamente la pared vascular y migran hacia los tejidos circundantes. La migración larvaria va acompañada de hemorragia, necrosis y reacciones inflamatorias, pudiendo continuar durante un período indeterminado, que acostumbra a ser de varios meses de duración. Las larvas 2 pueden permanecer durante años en estado quiescente, para luego reanudar su migración. Finalmente algunas de ellas permanecen encapsuladas y rodeadas de un tejido inflamatorio que, para-

dójicamente, las protege, mientras que otras son destruidas por distintos mecanismos de defensa del huésped<sup>75, 76</sup>.

Debido a que las larvas nunca llegan a completar su ciclo para alcanzar la madurez sexual en el intestino, no se hallan huevos de *T. canis* en las heces humanas.

## 16. PATOGÉNESIS DE LA TOXOCARIOSIS HUMANA

En los humanos, la larva de *T. canis* sigue la misma ruta somática de migración que en un huésped paraténico. La larva eclosionada, libre, puede migrar y ser encontrada en el hígado, pulmones, corazón, ojos, cerebro y otros parénquimas<sup>77, 78</sup>.

Las larvas están siempre asociadas con tractos migratorios caracterizados por hemorragia, necrosis e inflamación, con predominio de eosinófilos. La larva L2 puede ser encapsulada en granulomas, donde ellas pueden destruirse o persistir viables por muchos años.

En ojos, se suele observar la migración de *una sola larva*, pero la respuesta inflamatoria puede terminar en un deterioro parcial o total de la retina, con pérdida de la visión<sup>79</sup>.

La respuesta inmune del huésped hacia la larva migrante, está dirigida a los antígenos de excreción/secreción (TES).

El mecanismo por el cual la larva es muerta y eliminada de los tejidos no es bien conocido hasta el momento. En ratones, los eosinófilos no parecieran estar involucrados en la resistencia del huésped<sup>80</sup>, desde que la citólisis mediada tanto por eosinófilos como por IgE específica está ausente<sup>81</sup>.

La patogénesis de la toxocarosis ha sido ampliamente revisada por Glickman y Schantz<sup>72</sup>.

Las manifestaciones patológicas de esta parasitosis son consecuencia de las lesiones de tipo mecánico producidas por la larva durante su migración y de la reacción inflamatoria que se desarrolla por parte del hospedador.

La formación de granulomas eosinofílicos es uno de los principales sistemas de defensa del hospedador para evitar la migración larvaria. La histopatología de estos granulomas puede variar según la toxocarosis se halle en fase aguda o crónica<sup>82</sup>.

En fase aguda, estudios realizados con secciones de hígado de ratones infestados muestran áreas irregulares de necrosis hepatocelular y moderado infiltrado neutrófilo, hipertrofia generalizada de los núcleos de las células de Kupffer y vacuolización

de los hepatocitos. Focos de neutrófilos con eosinófilos ocasionales, se observan adyacentes y alrededor de las secciones larvianas pero también en otros lugares distantes<sup>82</sup>.

El hallazgo de granulomas vacíos, adyacentes a otros granulomas que aparentemente contienen larva 2, hace suponer que la larva se hallaba en la formación inicial del granuloma, escapando posteriormente para establecerse en otro lugar<sup>83</sup>.

En fase crónica, las secciones del hígado muestran muchos granulomas, formados por una densa cápsula de colágeno, en cuyo interior se halla la larva de *T. canis*, o sus restos, rodeada por eosinófilos, células epiteliales y macrófagos. En la parte externa de esta cápsula de colágeno, se observa un infiltrado formado por linfocitos y células plasmáticas<sup>82</sup>.

La predilección de las larvas de *Toxocara* por diferentes órganos puede variar según la especie del hospedador. En el hombre, las larvas tienen especial predilección por el hígado, donde la mayoría de ellas suelen quedar retenidas, pero pueden invadir otros órganos. La respuesta inmune del hospedador también juega un papel importante en esta distribución<sup>72</sup>.

## **17. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.**

La importancia del cuadro clínico en el hombre depende del número de larvas ingeridas, la frecuencia de las reinfecciones, la distribución de las larvas y otros factores relacionados con el hospedador y su estado inmune. Las infecciones ligeras, que son probablemente las más frecuentes, acostumbran a ser asintomáticas. En todos los casos, sin embargo, la infección por *T. canis* es potencialmente capaz de causar graves patologías<sup>67</sup>.

### **17.1. Larva Migrans Visceral**

En 1952 Beaver y cols., identifican larvas de *T. canis* en biopsias de hígado de pacientes con lesiones granulomatosas, e introducen el término de "larva migrans visceral"(LMV)<sup>75</sup>.

La LMV es un síndrome que afecta principalmente a niños de edades comprendidas entre 1 y 4 años con historia de pica, geofagia y contacto con perros.

Los signos generales de la LMV son: pérdida de peso, astenia, anorexia, fiebre moderada prolongada e irregular, sudoración, palidez, irritabilidad y cambios en el comportamiento. A veces suele presentarse anemia<sup>63, 84</sup>. En otras ocasiones se pueden presentar erupciones pruriginosas en tronco y extremidades inferiores.

La leucocitosis alcanza valores de 30.000 a 100.000 leucocitos por mm<sup>3</sup>, debido fundamentalmente a un incremento en el número de eosinófilos, que puede alcanzar entre un 50-90%<sup>84</sup>. Es normal que esta eosinofilia persista durante meses e incluso años, después de que las otras manifestaciones han remitido.

La hepatomegalia se considera un síntoma constante que va asociado en el 45% de los casos a una esplenomegalia<sup>63</sup>. El hígado se presenta agrandado, liso e indoloro. Su aumento de volumen es debido a la inflamación producida alrededor de la larva durante la formación de los granulomas eosinofílicos.

Las complicaciones pulmonares, debidas a la migración larvaria por el parénquima pulmonar, son frecuentes pero raras veces llegan a ser graves. Normalmente cursan como una bronquitis aguda, asma o neumonía, acompañada de otros síntomas. La placa radiográfica muestra un infiltrado pulmonar que en la mitad de los pacientes suele ser transitorio<sup>63</sup>. Los infiltrados pulmonares pueden persistir durante largo tiempo en ausencia de la larva, debido a que los antígenos circulantes que quedan atrapados en los pulmones continúan produciendo reacción inflamatoria. No ocurre así con la ascariasis, en que el infiltrado pulmonar remite una vez que la larva abandona los pulmones<sup>85</sup>.

La afección del SNC, principalmente cerebro, es una de las complicaciones graves de la toxocariasis. Siendo el cerebro un lugar privilegiado inmunológicamente<sup>63</sup>, las larvas acumuladas allí gozan de poca inmunoreactividad por parte del hospedador. Una vez en el cerebro, las larvas no sufren ninguna reacción celular por parte del hospedador, permaneciendo viables durante largos períodos de tiempo. En estudios histopatológicos no se observa respuesta inflamatoria en íntimo contacto con las larvas y en muchas ocasiones las lesiones halladas carecen de foco larvario<sup>63</sup>.

La predisposición a la infección por *T. canis* en niños con problemas neurológicos es dudosa. Woodruff y cols.<sup>84, 86</sup> y Glickman y cols, hallaron que los niños epilépticos están más frecuentemente infectados por *Toxocara* que los sanos. Sin embargo, no se ha hallado diferencia entre la frecuencia de la infección por *Toxocara* que presentaban niños epilépticos de causa desconocida y epilépticos de causa conocida<sup>72</sup>, como tumores cerebrales, traumatismos e infecciones víricas cerebrales. La hiperactividad, signo característico de los niños epilépticos, acompañada de pica, se aso-



cia, según algunos autores, a una mayor predisposición a la infección por *T. canis*<sup>87</sup>.

## **17.2. Larva Migrans Ocular**

La invasión ocular es una de las complicaciones más frecuentes e importantes de la toxocariasis. La reacción inflamatoria que se produce puede causar necrosis y desprendimiento de retina, provocando ceguera permanente en el paciente. La lesión producida por las larvas o sus restos larvarios puede confundirse con un retinoblastoma, habiéndose llevado a cabo en varias ocasiones, la enucleación innecesaria del ojo afectado<sup>67</sup>.

En 1950, Wilder descubrió larvas y restos larvarios de nematodos en 24 de 42 pseudogliomas de ojos enucleados, con diagnóstico todos ellos de endoftalmitis o posibles retinoblastomas<sup>77</sup>. Posteriormente, Nichols en 1956, reexaminando muestras de ojos enucleados identificó a estas larvas de nematodos como de *T. canis*<sup>68,69</sup>.

La afección ocular es típicamente unilateral y se presenta con mayor frecuencia en niños mayores de 7 años, jóvenes y adultos, cuyos antecedentes epidemiológicos (convivencia con perros, geofagia y pica), suelen ser escasos o nulos. Probablemente la infección tuvo lugar en la infancia y el daño ocular aparece como una complicación tardía<sup>63</sup>.

La hipereosinofilia que suele estar presente en la LMV, así como otras manifestaciones clínicas orientativas como leucocitosis, hepatomegalia, gammaglobulinemia, aumento del título de isohemaglutininas e hiper IgE, suelen estar también ausentes en la LMO<sup>72</sup>.

Una hipótesis sobre el desarrollo de LMO ha sido descrita por Glickman y Schantz (1981), en la que se supone que a dosis larvarias bajas, la cantidad de antígeno es insuficiente para estimular una buena reacción inmune y un incremento del número de eosinófilos. En consecuencia, las larvas migran sin impedimento logrando salvar el filtro de hígado y pulmón, no provocando ningún signo clínico en estos órganos. Las larvas penetran en la circulación sistémica hasta los pequeños capilares y se reparten por todo el organismo. Pueden permanecer en los tejidos durante períodos de hasta 10 años y periódicamente reanudar su migración; en una de estas reactivaciones pueden alcanzar la retina y vasos coroidales. Esto explica que la LMO tenga una larga incubación y que por ello sea una parasitosis que se halla con mayor frecuencia en jóvenes y adultos<sup>72</sup>.

Por el contrario, cuando la dosis larvaria es alta hay un rápido incremento del título de anticuerpos y de eosinófilos. Las larvas penetran en el hígado y pulmones, en

donde son atrapadas por la reacción inflamatoria mediada por la misma respuesta inmune. Este período de incubación suele ser corto y suele ir relacionado con el número de larvas ingeridas y si el huésped estaba inmunizado frente al parásito. Aunque el hígado ejerce una importante acción como filtro, un pequeño número de larvas pueden escapar del hígado y pulmones, quedando retenidas en otros órganos, como corazón, sistema nervioso central y ojos, produciendo en algunas ocasiones importantes trastornos<sup>63</sup>.

La infección ocular es más frecuente en varones que en mujeres (2:1) y usualmente se halla en adolescentes. La pérdida de la visión es generalmente unilateral, pero se han descrito casos bilaterales<sup>88</sup>. Los pacientes con enfermedad ocular tienen una baja concentración de anticuerpos en comparación con las formas viscerales de esta enfermedad. Ese hecho tiene importancia en el diagnóstico de laboratorio de esta parasitosis ya que los reactivos deben tener suficiente sensibilidad para detectar estos casos.

En las primeras revisiones sobre toxocariasis ocular, el granuloma fue la complicación más frecuentemente hallada, la mayoría en el polo posterior del ojo. La toxocariasis es aún hoy, un importante diagnóstico diferencial de retinoblastoma en paciente pediátricos<sup>89</sup>. La persistente eosinofilia, leucocitosis y los elevados valores de isohemaglutininas, generalmente asociados con LMV, usualmente no ocurren en la enfermedad ocular<sup>90</sup>.

La síntesis de inmunoglobulina local en el ojo, permite el empleo de pruebas inmunológicas usando el humor vítreo y/o acuoso. Estas pruebas se consideran indispensables para asegurar el diagnóstico de LMO<sup>88</sup>. Los criterios principales para el diagnóstico de LMO establecidos por Petithory y cols. en 1990 son los siguientes: a) lesiones oculares; b) eosinofilia en humor acuoso o en humor vítreo y c) test inmunológico positivo en el humor acuoso o en el humor vítreo<sup>91</sup>.

### **17.3 Síndromes más recientemente reconocidos.**

#### **17.3.1. Toxocariasis encubierta.**

La toxocariasis encubierta describe los signos y síntomas de pacientes con toxocariasis que no pueden ser ingresados en la categoría de LMV o LMO. Los síntomas son generalmente inespecíficos, pero cuando se agrupan forman un síndrome reconocible<sup>73</sup>.

Síntomas como hepatomegalia, tos, alteraciones del sueño, dolor abdominal, cefaleas y trastornos de la conducta, se han asociado con títulos elevados de anticuerpos anti-*Toxocara*<sup>73</sup>. La eosinofilia es variable. Otras manifestaciones incluyen

anorexia, adenitis cervical, dolores de extremidades, disnea y fiebre. El diagnóstico se confirma por serología anti- *Toxocara* positiva.

### **17.3.2 Toxocariasis neurológica.**

Las manifestaciones neurológicas incluyen descargas focales o generalizadas y alteraciones en la conducta, que han sido comunicadas hasta en un 28% de pacientes con LMV. El LCR puede contener un elevado número de eosinófilos<sup>84</sup>.

*T. canis* ha sido cuestionado como causa frecuente o importante de enfermedad neurológica, pero recientemente, Glickman y cols. (1981), estudiaron los casos de 84 niños epilépticos y 108 controles no epilépticos y encontraron que los epilépticos tenían títulos de anticuerpos anti-*Toxocara* significativamente más altos<sup>72</sup>.

No obstante, no observaron ninguna diferencia entre los títulos de niños con epilepsia idiopática y aquellos con epilepsia de causa conocida. Como ya fuera antes dicho, la pica, el retardo mental y la hiperactividad están comúnmente asociados con la epilepsia, y estas condiciones facilitan a los epilépticos la posibilidad de infección por *T. canis*<sup>72</sup>.

### **17.3.3. Toxocariasis asmátiforme.**

Se ha descrito que la infección por *T. canis* induce asma. En un estudio llevado a cabo en Hawaii, en 80 niños asmáticos, el 45% tenía IgE anti-*Toxocara* y el 17,5% IgG anti-*Toxocara*. Boureey cols., describen un síndrome de insuficiencia respiratoria aguda con test serológico positivo para toxocariasis en un paciente de 42 años<sup>73</sup>. Niedfeld y cols. (1997) llevaron a cabo un estudio en pacientes concurrentes a un servicio de alergia en quienes encontraron toxocariasis asmátiforme en el 14,6%<sup>92</sup> En una serie estudiada por López y cols. (2010) en niños asmáticos de la ciudad de Resistencia, se encontró una mayor prevalencia de anticuerpos anti-*Toxocara* en el grupo de asmáticos (58.3%) comparado con el grupo control (43.8%), aunque esta diferencia no alcanza significación estadística. No obstante esto, se pudo establecer relación entre severidad de los síntomas de asma y seropositividad para *Toxocara*, ya que entre los niños con sintomatología más severa de asma se halló un mayor porcentaje de seropositividad<sup>93</sup>.

### **17.3.4. Toxocariasis neurofisiológica.**

Las larvas de *T. canis* también han sido halladas en autopsias cerebrales humanas<sup>73</sup>.

En un estudio realizado en Nueva York en 1993, se comparó el rendimiento de 50 niños de 1-5 años con serología positiva anti-*Toxocara* con igual número de personas control. En los niños infectados se obtuvo un test de funciones cognitivas con

resultados inferiores que el grupo control. Es muy difícil discernir si fueron las alteraciones neurofisiológicas las que predispusieron a la infección por *T. canis* o, por el contrario, es la migración parasitaria la que produce detrimento de la salud mental<sup>73</sup>. En 1996, Nelson y cols.<sup>94</sup> llevaron a cabo un estudio en niños de edad preescolar y llegaron a la conclusión de que no pudieron confirmar ni rechazar una relación entre *T. canis* y el nivel de inteligencia<sup>73, 94</sup>.

### **17.3.5. Toxocariasis subclínica**

De particular interés son los casos de diagnóstico serológico de toxocariasis en pacientes sin signos ni síntomas. La toxocariasis clínicamente inaparente es frecuentemente informada en los países donde la serología se realiza de rutina en los pacientes pediátricos o en aquellos estudios llevados a cabo en donantes de sangre<sup>73</sup>.

## **18. EPIDEMIOLOGÍA**

Como ya se dijo, la toxocariasis humana es una zoonosis primariamente adquirida a partir de suelos contaminados, siendo la geofagia la causa más común, especialmente en niños que conviven con cachorros que no han sido desparasitados. La pobre higiene personal como así también el consumo de vegetales crudos de huertas caseras contaminadas, puede resultar en una infección a dosis bajas pero crónica<sup>71</sup>. Menos común es la infección asociada con el consumo de huéspedes paraténicos crudos o mal cocidos como patos, pollos<sup>95</sup>, cordero<sup>96</sup> o conejo<sup>97</sup>.

Un estudio hecho en la ciudad de Toulouse (Francia), demostró que la seroprevalencia de toxocariasis es mayor entre las personas que frecuentemente comen hígado de ternera crudo o poco cocido, que entre aquellas que lo ingieren bien cocinado<sup>98</sup>.

Estudios más recientes muestran presencia de *Toxocara* en el 1,5% de vegetales y frutas sin lavar, y sugieren que esto se deba a la contaminación de los vegetales con heces de animales como así también el uso de agua contaminada para riego. En un estudio realizado en "compost" utilizado para abono encontraron 43% de huevos de *Toxocara*<sup>99</sup>. En Irán, evaluaron la presencia de helmintos transmitidos por el suelo en vegetales, encontrando el 14,89% de contaminación en vegetales no lavados, apareciendo *Toxocara* spp en el 1,68% del total<sup>100</sup>.

Esto sugiere que la larva infectiva puede ser liberada de los tejidos animales durante la digestión y subsecuentemente causar infección en el hombre<sup>71</sup>.

La dispersión que realizan los artrópodos también debe ser tomada en cuenta. Las moscas ingieren hasta 1-3 mg de heces en 2 o 3 horas, y pueden ingerir huevos de helmintos como el de *T. canis*, tanto es así que han sido hallados en un 2,4 y en 2,1% de moscas silvestres atrapadas en Nigeria<sup>101</sup>.

La lombriz de tierra, aparece como un importante vector ya que puede facilitar la transmisión de la toxocariasis. Estudios realizados por Mizgajka, encontraron huevos viables de *Toxocara* spp, en lombrices de tierra<sup>102</sup>. Hay que mencionar también que éstas constituyen el alimento principal de pequeños mamíferos que son también importantes reservorios de infección por *Toxocara*<sup>103</sup>.

La toxocariasis es una de las infecciones helminto zoonóticas más comúnmente reportadas en el mundo y se detecta más frecuentemente en niños, ya que por sus hábitos higiénicos y su contacto con animales constituyen el grupo más expuesto. Entre países latinoamericanos se pueden mencionar los datos de Bolivia con un 34,6%<sup>104</sup>, 47,5% en Bogotá<sup>105</sup>, 66,6% en niños de la ciudad de Caracas<sup>106</sup>, 13,09% en niños menores de 15 años de Santos, Brasil<sup>107</sup>, 8,7% en una población infantil ambulatoria del Sudeste de Brasil<sup>108</sup>, 29% en niños pre-escolares de entre 1 y 6 años en tres municipios del estado Aragua en Venezuela<sup>109</sup>, 63,6% en niños en edad escolar en zonas rurales del Noreste de Brasil<sup>110</sup>.

La seroprevalencia encontrada en los países occidentales es menor aunque variable. En adultos aparentemente sanos de áreas urbanas de Francia se encontró un 2%<sup>102</sup>, 3,9% en Italia<sup>111</sup>, 7% en Suecia<sup>112</sup>, comparada con un 16% en Escocia<sup>113</sup> o un 37% en el sur de Francia donde se considera zona endémica para esta patología<sup>114</sup>. En Eslovaquia oriental la seroprevalencia en población general fue de 15,3%<sup>115</sup>. En Polonia, un país caracterizado por un clima templado en el cual, en teoría, debería tener pocos casos de toxocariasis, entre 1994 y 2005 hubieron 16,6-75,6 % de seropositividad en personas sospechosas de estar infectadas con *Toxocara*<sup>99</sup>. En otro estudio en el noreste de Polonia, testaron niños sin síntomas de toxocariasis y hallaron un 4,2% de seropositividad<sup>116</sup>. Resultados similares fueron obtenidos en Eslovaquia con el 27,4%, Francia con 15% y Holanda con 11% de seropositividad<sup>99</sup>.

En países tropicales el porcentaje se eleva al 63,2% en Bali<sup>117</sup> y 92,8% en la isla de La Reunión<sup>118</sup>.

En Argentina no abundan los datos sobre seroprevalencia en población adulta, sin embargo se pueden mencionar algunos. En un trabajo realizado en donantes de sangre de la ciudad de Gualeguaychú se encontró una positividad del 10%<sup>119</sup>, un trabajo de Radman y cols señala un 39% en población general de la ciudad de La Plata<sup>120</sup> y el estudio realizado en donantes de sangre de la ciudad de Resistencia, Chaco, por Alonso y cols se encontró una prevalencia global de 38,9%<sup>121</sup>. Hay que destacar también los trabajos de Taranto y cols con 22,1% de seroprevalencia en aborígenes del norte de la provincia de Salta <sup>122</sup>.

Entre los datos de prevalencia en niños de nuestro país se pueden mencionar el 37,9% encontrado en niños de la ciudad de Resistencia, Chaco<sup>123</sup>, un porcentaje similar reportado para niños de la ciudad de Buenos Aires <sup>124</sup>, el 67,7% de seropositividad para población infantil en la ciudad de Corrientes<sup>125</sup> y el trabajo realizados en niños abandonados en la ciudad de La Plata, con un porcentaje de positividad del 38,33%<sup>126</sup>.

En un trabajo en población general de una comunidad rural de la provincia de Buenos Aires, Chiodo y cols en el año 2006, encontraron una seroprevalencia de 23%, evaluando al mismo tiempo factores ambientales, demográficos, sanitarios, eosinofilia y parasitosis<sup>127</sup>.

Los relevamientos seroepidemiológicos sugieren que si bien la enfermedad se detecta más frecuentemente en niños, existe un pequeño incremento de la seropositividad con la edad, lo cual podría ser explicado por la prolongada respuesta inmune de los individuos después de la infección y por la posibilidad de reinfecciones<sup>73</sup>.

Recientemente, se realizó un estudio para determinar la seroprevalencia de *Toxocara* entre trabajadores de salud e investigadores, encontrando un 14,9 % de positividad entre personal e investigadores que trabajan y manipulan *T. canis* <sup>128</sup>.

## **19. Diseminación ambiental de los huevos de *Toxocara***

Los huevos de *Toxocara canis* tienen gran capacidad de resistencia a las condiciones ambientales. El ciclo del parásito nos indica la importancia que tiene el suelo, ya que allí se efectúa obligatoriamente la maduración de los huevos hasta el desarrollo de la larva 2 infectante. Para ello, los huevos deben permanecer en el suelo para su maduración entre 10 y 14 días, aunque pueden permanecer viables en el suelo por más de dos años, si las condiciones de temperatura y humedad son ade-

cuadas <sup>129</sup>, aunque los huevos se destruyen rápidamente cuando se hallan expuestos a las radiaciones solares directas o a la desecación. El desarrollo larvario se detiene a temperaturas inferiores a los 10° C y la larva 2 muere a temperaturas inferiores a los -15° C. Sin embargo, en regiones donde la nieve es frecuente en invierno, se ha podido observar que los huevos sobreviven a bajas temperaturas, debido al microclima que se forma debajo de la capa de nieve<sup>63</sup>.

En los suelos arcillosos los huevos se agrupan y concentran por acción de la lluvia, sedimentando en capa fina entre una delgada cubierta de arcilla coloidal y la capa más profunda de partículas gruesas. De esta forma los huevos quedan protegidos de la desecación y la acción solar directa <sup>63</sup>.

La elevada reproductividad de *Toxocara* spp. y la extrema resistencia de sus huevos a condiciones ambientales adversas, contribuyen a la acumulación de los estados infectantes en el suelo<sup>67</sup>.

Entre los factores ecológicos importantes para que se complete con éxito el ciclo de vida de *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, están las actividades de los vectores biológicos como la lombríz de tierra y la mosca doméstica<sup>102, 130</sup>, y el hecho de que los huevos permanezcan cerca de la superficie del suelo<sup>102</sup>.

La presencia de huevos de *Toxocara* en los suelos y la extensión de la contaminación de los espacios de uso público y privado son muy variables<sup>131, 132, 133, 134, 135, 136</sup> y ha sido estudiado en casi todos los países.

Los porcentajes de contaminación de suelos con huevos de *Toxocara* spp. en areneros y lugares de recreación varían entre 0,3 y 50 % de huevos. Así por ejemplo en Iraq, Nooraldeen ha reportado el 91,6% de contaminación con huevos de parásitos en lugares públicos, de los cuales el 50% era *Toxocara* spp. <sup>137</sup>. En el noreste de Polonia encontraron que la contaminación ambiental con huevos de *Toxocara* varía entre 18 y 46% dependiendo de si es urbano, suburbano o parques y de la época del año, siendo mayor en parques y en épocas templadas<sup>116</sup>. En la región centro-este de Polonia fueron estudiadas granjas de agroturismo para evaluar el riesgo de infección por geohelminetos, encontrándose un 7% de contaminación por huevos de geohelminetos, de los cuales el 6,4% representa a *Toxocara* spp. y *Ascaris* spp.<sup>138</sup>.

La gran variación de resultados depende de las condiciones ambientales, la población canina y de gatos, la elección de las muestras y el tipo de suelo, y el tipo de técnica empleada para la recuperación de los huevos <sup>139</sup>.

La humedad ambiente es necesaria para evitar la desecación o deshidratación de los huevos, como así de las larvas de geohelminthos las cuales son muy sensibles a la luz solar y a las condiciones secas. La humedad es necesaria también para el movimiento de las larvas y el desarrollo y maduración de los huevos <sup>140</sup>.

En nuestro país, se ha demostrado que la toxocariasis es un problema ambiental sobre todo en las grandes ciudades, pero los estudios de Alonso y colaboradores nos muestran que es también un problema de las ciudades medianas y pequeñas, aunque existen variaciones sustanciales del comportamiento social de sus habitantes en relación con el uso de los espacios urbanos. Estos datos referidos a la ciudad de Resistencia, Chaco <sup>123, 141</sup>, mientras que en Corrientes, los datos de contaminación de aceras de esa ciudad revelan un 16% para huevos de *Toxocara canis*, encontrando mayor proporción en las aceras del centro de la ciudad <sup>133</sup>.

## **20. Control biológico de nematodos**

El uso de hongos nematófagos y ovidas ayudaría a la decontaminación del ambiente de las formas infectivas de parásitos zoonóticos potenciales y además, reduciría la recurrencia de infecciones helmínticas<sup>5</sup>.

Los principales grupos de microorganismos utilizados para el control biológico son los virus, bacterias, hongos y protozoarios<sup>33</sup>.

En 1888 se descubrió por primera vez que un hongo, *A. oligospora*, era capaz de infectar nematodos. Ahora, por que estudiarlos? Muchos de los nematodos son parásitos de plantas y/o animales que afectan a los cultivos, al ganado e incluso al hombre. Los nematicidas químicos que se usan para su control son compuestos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. Muchos de ellos ya han sido prohibidos o se ha limitado su uso en muchos países. Por esto resulta adecuado estudiar a los hongos nematófagos como agentes de control biológico contra los nematodos <sup>13</sup>.

La ecología de los hongos nematófagos es aún pobremente entendida. Ellos se encuentran relativamente, en pequeño número en los suelos. Mientras algunos de ellos pueden crecer saprofiticamente, su ventaja probablemente reside en su habilidad de atacar nematodos vivos. Sin embargo, antes que estos predadores puedan ser usados de rutina y satisfactoriamente como control biológico de nematodos o



como control natural, es necesario tener mayor información sobre la ecología y eco-fisiología de estos hongos<sup>3</sup>.

### **20.1. Control biológico de huevos de nematodos**

Los huevos de nematodos son un importante estadio del ciclo de vida del parásito, tanto desde el punto de vista del desarrollo del parásito como un potencial blanco de acción de las estrategias de control, y la estructura de la pared de los huevos es igualmente importante para ambos casos, desarrollo y estrategias de control <sup>142</sup>.

Se han llevado a cabo diversos intentos con algunas especies de hongos para poner a prueba la capacidad de estos para atacar y destruir los huevos de nematodos parásitos. Huevos de *A. lumbricoides* colectados naturalmente de cerdos infectados, fueron usados para probar el efecto de *Verticillium* spp. Este hongo mostró la capacidad de degradar la cubierta del huevo enzimáticamente e infectarlo. Una corta exposición a altas temperaturas o radiación UV hace de los huevos más susceptibles al ataque por parte del hongo. Es deseable poder controlar biológicamente a parásitos como *Ascaris*, *Trichuris* y otros cuyos huevos son muy estables en el ambiente<sup>142</sup>.

Larsen menciona el trabajo de Chien y cols, donde han demostrado que *V. chlamydosporium* ataca y destruye huevos de *Ascaridia galli* y *Parascaris equorum* pero no invade *Trichuris suis*. En Dinamarca, varias especies fúngicas fueron estudiadas como agentes de control para *A. summ*, *T. suis*, *Fasciola hepática*, entre otros, indicando que hay buena actividad contra aquellos huevos que poseen una cubierta delgada, en tanto que aquellos con una "cáscara" más gruesa, son más resistentes al ataque<sup>143</sup>.

Araujo y cols. ensayaron tres especies, dos depredadoras *Arthrobotrys conoides*, *A. robusta* y una parásita de huevos, *Paecilomyces lilacinus*, para ver su actividad contra huevos de *T. canis*, y, como era de esperar, los hongos depredadores no atacaron los huevos, en tanto que *P. lilacinus* mostró alguna actividad<sup>50</sup>.

## **21. TENDENCIAS FUTURAS**

Muy probablemente, el conocimiento sobre los hongos nematófagos se incrementará en los próximos años. Ello se deberá sin dudas a los descubrimientos recientes de la biología moderna y en especial con los avances y aplicaciones de técnicas moleculares en el estudio de la patogénesis fúngica. De igual manera, el estudio de las

relaciones entre hongos no patógenos y las raíces vegetales es de gran relevancia en la futura investigación sobre hongos nematófagos. La probable inducción modulada de defensas en la planta por hongos no-patógenos (micorrizas y endófitos), en el caso de los hongos nematófagos sería un elemento a añadir al parasitismo en la lucha contra los nematodos fitopatógenos. Por ello, cuanto mayor sea el conocimiento sobre hongos nematófagos a escala tanto ecológica como molecular, mayores serán las posibilidades de su uso como agentes biológicos de control de nematodos fitopatógenos<sup>13</sup>.

Todo parece indicar que no existirían efectos ambientales negativos en el uso de hongos predadores como estrategia preventiva, pero más estudios deben ser realizados, y una de las cosas que se debe analizar de cerca, es que pasará en el ambiente luego de varios años de tratamiento con hongos<sup>143</sup>.

Las proteasas, quitinasas y glucanasas pueden ser inducidas por sustratos complejos como por ejemplo, la cutícula de los insectos, la pared celular de los hongos o apartir de sustratos simples. Esta capacidad que tienen los hongos para inducir la expresión de las enzimas con diferentes sustratos o moléculas, abre la posibilidad para utilizarse como control biológico de plagas <sup>33</sup>.

A través de todo lo expuesto, se deduce que un control biológico con hongos es una alternativa viable y segura para los animales, el hombre y el ambiente. En consecuencia, surgen preguntas como: ¿porqué solo existe bajo condiciones de laboratorio y porqué solo pocas personas tienen acceso a el? Una de las respuestas es la dificultad para la estandarización tanto del producto como de la dosis a usar para su comercialización. Los obstáculos parecen superar las ventajas del uso de organismos vivos para el control de nematodos parásitos. Así, el impacto esperado por el uso de hongos nematófagos puede ser reconocido a mediano y largo plazo, uno de los grandes obstáculos a los que se enfrentan los investigadores<sup>4</sup>.

.....Debe quedar claro que los hongos nematófagos, en general, son "viejos amigos" que están dispuestos "a pelear contra viejos enemigos", los helmintos parásitos perjudiciales tanto para el hombre como para los animales.....

## 22. JUSTIFICACIÓN

La toxocariosis tiene una distribución cosmopolita en el mundo, considerándose endémica en la mayor parte de los países de América, y Argentina no escapa de esa situación<sup>62</sup>.

Las cifras de prevalencia de huevos en suelo y de seroprevalencia tanto en niños como en adultos, muestran que está presente en todo el mundo, aunque con amplias variaciones de acuerdo a las características sanitarias de cada país e inclusive de cada región dentro de un mismo país. Las poblaciones de bajo nivel socio-económico, particularmente las del mundo en desarrollo, presentan generalmente altas tasas de infección y concomitantemente alta frecuencia de enteroparásitos. En los países desarrollados, aun cuando la prevalencia de enfermedades parasitarias es habitualmente baja, la toxocariosis es la helmintiasis más frecuente<sup>61</sup>.

Las tasas de seroprevalencia en América Latina van desde 1,8 a 66,6 %<sup>62</sup>. En Argentina, estudios epidemiológicos publicados muestran que la misma se mueve en un rango de entre 10,6 a 67,8 %, y la región nordeste argentina no escapa a esta situación.

Entre los trabajos publicados en relación a la situación en el NEA se pueden mencionar:

- 37,9% en niños sanos de la ciudad de Resistencia, Chaco<sup>123</sup>
- 38,9% en donantes de sangre de la ciudad de Resistencia, Chaco<sup>144</sup> 67% en niños con eosinofilia mayor del 10%<sup>145</sup>
- 50% en barrios carenciados y 67,8% en niños internados en Hogar Escuela de la ciudad de Corrientes<sup>125</sup>

En referencia a la contaminación medioambiental en la misma región la prevalencia encontrada es:

- 12% de huevos de *T. canis* en muestras de suelo, 28% en muestras de arena y 6% en materia fecal canina en parques y plazas de la ciudad de Corrientes<sup>146</sup>
- 3,4% de huevos de *Toxocara spp.* en lugares públicos en la ciudad de Resistencia, Chaco<sup>147</sup>
- 7,63% de huevos de *T. canis* y 19,32% de huevos de *T. cati*s en materia fecal de perros y gatos de la ciudad de Corrientes<sup>148</sup>.
- 16% de huevos de *T. canis* en aceras de la ciudad de Corrientes<sup>133</sup>

- 22,7% de huevos de *Toxocara spp.* en lugares públicos en la ciudad de Resistencia, Chaco <sup>141</sup>.

Por todo lo expuesto, hay suficiente evidencia que demuestra que la toxocariosis existe y que las variaciones, sobre todo en cuanto a la prevalencia de huevos en suelo, no tienen una explicación científica.

Concomitante con los adelantos informados respecto de estudios sobre la actividad ovicida de hongos saprófitos contra diferentes nematodos parásitos de hombres y animales, se observa también la diferente distribución geográfica, tanto de estos hongos como de los parásitos. En esta distribución influyen una serie de factores, entre ellos el tipo de suelo, la temperatura y humedad ambiente, la presencia de animales vagabundos, la educación sanitaria de la población y la presencia de otros microorganismos vivos que pueden modificar la acción de los hongos o la supervivencia de los huevos.

A partir del trabajo de tesis de Ciarmela 2008, donde determina el grado de actividad ovicida de diferentes especies fúngicas, es pertinente poder establecer, junto con el proceso mecánico ya determinado, que tipo de acción enzimática existe entre determinados hongos del suelo y los huevos de *T. canis*, completando así los resultados por ella expuestos<sup>58</sup>. La bibliografía explica también que tanto quitinasas como proteasas están involucradas en la ruptura de la cubierta de huevos de nematodos por hongos parásitos <sup>27</sup>.

Los estudios sobre los procesos naturales de destrucción de huevos de geohelminthos están en sus etapas iniciales, pero representan una alternativa interesante que, usada en combinación con otras medidas profilácticas, puede contribuir al control de especies de importancia epidemiológica.

Es por ello, que el conocimiento de la relación, bioquímica de acción hongo saprófito de suelo –huevo de *T. canis*, permitiría explicar las diferencias existentes en cuanto a prevalencia de la toxocariosis según las diferentes regiones geográficas y, por otro lado, aportaría una información muy importante para el desarrollo de biocontroladores de esta parasitosis, lo cual sería de suma importancia para la Salud Pública.

## 23. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

Determinar la interacción biológica *in vitro* de hongos saprófitos de suelo con huevos de *Toxocara canis* hallados en parques y plazas de la ciudad de Corrientes.

1. Observar actividad mecánica de los hongos saprófitos sobre los huevos de *T. canis*.
2. Determinar la actividad enzimática entre hongos saprófitos y huevo de *T. canis*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar la flora fúngica saprófita de suelos de espacios públicos de la ciudad de Corrientes.
  1. a. Aislar los hongos saprófitos de suelo de parques y plazas de la ciudad de Corrientes.
  1. b. Recuperar huevos de *T. canis* de suelos
  1. c. Tipificar y conservar las especies fúngicas aisladas.
2. Seleccionar una especie fúngica que muestre actividad ovicida.
  2. a. Enfrentar *in vitro* hongo saprófita y huevos de *T. canis*
  2. b. Observar la acción mecánica por microscopía óptica (MO)
  2. c. Observar la acción mecánica por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)
  2. d. Evaluar la acción mecánica de la interacción por MO y por MEB
3. Determinar la acción enzimática extracelular de los hongos con actividad ovicida
  3. a. Establecer un "screening enzimático" por cultivo en medio sólido
  3. b. Producir un extracto enzimático crudo a partir de cultivos líquidos de los hongos
  3. c. Analizar el extracto enzimático para identificar los componentes proteicos mayoritarios.
4. Experimentar *in vitro* la acción del extracto enzimático crudo sobre la viabilidad del huevo de *T. canis*.

## 24. MATERIALES Y MÉTODOS.

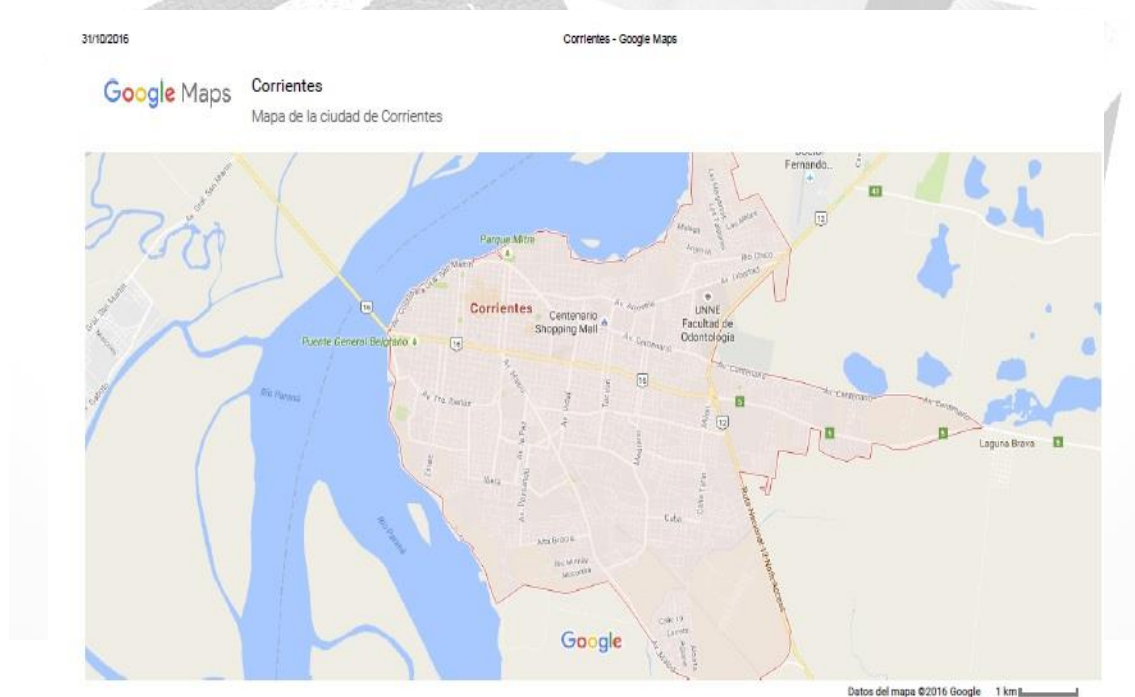
1. Determinar la flora fúngica saprófita de suelos de espacios públicos de la ciudad de Corrientes.

1. a. Aislar los hongos saprófitos de suelo de parques y plazas de la ciudad de Corrientes.

### 1. a. 1. Área de estudio.

La ciudad de Corrientes, Argentina ( $27^{\circ}28'S-58^{\circ}49'O$ ) (Figura 24 a y b), posee dos parques y plazas y plazoletas distribuidas por los diferentes barrios de la ciudad, y de los cuales se tomaron muestras de tierra, para determinar la flora fúngica saprófita de suelos y para la recuperación de huevos de *T. canis*.

Las muestras de suelo fueron tomadas en los parques Camba Cuá (PCC) (Figura 25) y Mitre (PM) (Figura 26) y en las plazas y plazoletas del casco céntrico de la ciudad de Corrientes: plazas Torrent, Libertad (Figura 27), La Cruz (Figura 31), Cabral (Figura 32), 25 de mayo; plazoletas Eva Perón, Llano, Cocomarola (Figura 28), rotonda Av. Pujol (Figura 29 a y 29 b), Aguas de Corrientes (Figura 33), Rotonda de la Virgen de Itatí (Figura 35), Los Inmigrantes y plazoletas de los barrios Yapeyú (Figura 34), Molina Punta (Figura 30), 300 viviendas y 236 viviendas.



**Fig. 24 a.** Plano panorámico de la Ciudad de Corrientes

Ésta ciudad es la capital de la provincia homónima y está situada a 52 metros sobre el nivel del mar a orillas del Río Paraná. Su clima es subtropical sin estación seca. La humedad relativa media anual es de 72%. La temperatura media anual es de 21,5°C, con temperaturas extremas de 45°C en verano y - 4°C en invierno. Su régimen de lluvias es regular, con precipitaciones que van de 950 a 1400 mm anuales



**Fig. 24 b.** Plano de la ciudad de Corrientes (casco céntrico).

Los parques Mitre y Cambá Cuá, están ubicados en la zona urbana, frente al Río Paraná y ambos presentan árboles altos que proporcionan amplias áreas sombreadas.

El parque Cambá Cuá (Figura 25) es amplio, de forma rectangular. Tiene juegos para niños, areneros, circuito de kartings y un lago natural. Uno de los más grandes de la ciudad. En él se encuentran un centro cultural municipal, paseos, juegos mecánicos para niños, instalaciones para bicicletas, patines y patinetas, puntos de ventas de artesanías y de comidas rápidas.

Google Maps Parque Camba Cua



**Fig. 25.** Parque Camba Cua

El parque Mitre (Figura 26) tiene forma irregular, ofrece espacios sombreados amplios, juegos infantiles, calesita, circuito de kartings, pista de patinetas, cancha de fútbol, biblioteca infantil, areneros, paseos, murales, un club deportivo y mirador hacia el río, todo rodeado de una importante como histórica arboleda<sup>150</sup>.



**Fig. 26.** Parque Mitre

El casco céntrico de la ciudad cuenta con cinco plazas clásicas; las cuatro restantes son de menor tamaño. Las primeras son de planta cuadrada, tienen una superficie de una hectárea, y poseen una frondosa y añosa arboleda con sendas peatonales y



lugares de juego y de recreo para niños. Las plazas de menor tamaño son de planta irregular, con arboleda, sendas peatonales y lugares de juego y de recreo acordes al tamaño de la misma. Algunas son sede de vendedores ambulantes, kioscos, locales de comida rápida y semanalmente se instala la feria municipal de forma alterna. En todos los casos, se convierten en pulmones de la ciudad junto con las avenidas y bulevares<sup>151</sup>.



**Fig. 27.** Plaza Libertad



**Fig. 28.** Plazoleta Cocomarola



**Fig.29 a.** Plazoleta Rotonda Av. Pujol.



**Fig. 29 b.** Plazoleta Rotonda Av. Pujol.



**Fig. 30.** Plazoleta Barrio Molina Punta



**Fig. 31.** Plaza La Cruz



**Fig. 32.** Plaza Cabral



**Fig. 33.** Plazoleta de Aguas de Corrientes.



**Fig. 34.** Plazoleta Barrio Yapeyú.



**Fig. 35.** Plazoleta Rotonda Virgen de Itatí.

### 1. a. 2. **Muestras de tierra para aislamiento fúngico.**

Las muestras de suelo de los parques Mitre y Cambá Cuá fueron tomadas en las áreas de juegos de niños y del área utilizada para deportes de cada parque, ya que son las áreas más concurridas por los visitantes. El material se recogió con pala de jardinería estéril tomando la muestra de suelo justo por debajo de la superficie de la tierra, eliminando el material vegetal, detritos y otros restos de la superficie del suelo. Cada muestra consistió en 200-250 g de suelo que se colocaron en sobres de papel estériles y se conservaron a 4°C hasta el momento de su procesamiento<sup>152</sup>.

Las muestras de tierra de las plazas y plazoletas fueron tomadas de acuerdo a la metodología utilizada por Ciarmela ML (2008), eligiendo al azar, una zona del suelo cercana a dos árboles, desechando la hojarasca y a no más de 2 cm de profundidad. Las muestras fueron recibidas en bolsas de papel estériles y conservadas en heladera hasta su procesamiento (Figura 36)<sup>58</sup>.

Fueron colectadas en total 60 muestras de suelo, realizándose 2 muestreos en el año 2012, Marzo y Septiembre.



**Fig. 36.** Toma de muestra de suelo para aislamiento fúngico.

**1. b. Recuperar huevos de *T. canis* de suelos.**

**1. b. 1. Obtención de las muestras de suelo para recuperación de huevos de *T. canis*.**

Se recolectaron 67 muestras de aprox. 200-250 gramos de suelo de la capa superficial, hasta 1 cm de profundidad, cada 10 m<sup>2</sup> del área y se tomaron pequeñas alícuotas formando un pool. Las muestras se recolectaron en sobres de papel y se conservaron en oscuridad a temperatura ambiente hasta su procesamiento no más de 20 días<sup>141</sup> (Figura 37).



**Fig. 37.** Toma de muestra de suelo para recuperación de huevos de *T. canis*.

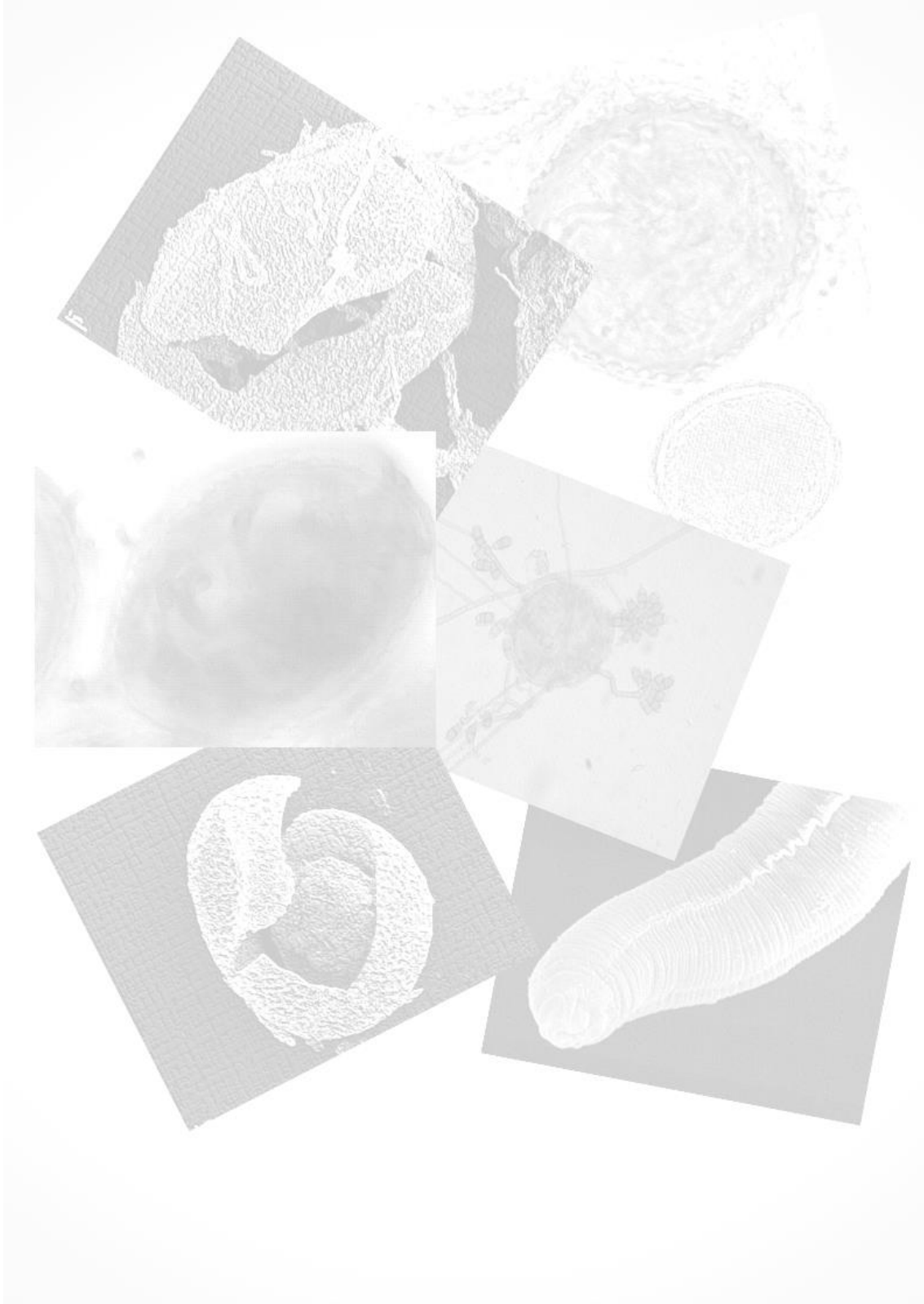
**1. b. 2. Recuperación de huevos de *Toxocara* spp. a partir de suelos.**

Se probaron 4 soluciones de flotación diferentes para recuperación de huevos:

1. Solución saturada de ZnSO<sub>4</sub><sup>153</sup>
2. Solución de ZnSO<sub>4</sub> al 33% (p/v)
3. Solución saturada de sacarosa<sup>154</sup>
4. Solución saturada de ClNa<sup>141</sup>

Cada muestra fue tamizada a fin de eliminar piedras y restos de material vegetal; del tamizado se procesaron alícuotas de 5 g de tierra por duplicado para cada solución de flotación. A cada alícuota se le realizaron dos lavados con 10 ml de agua destilada, eliminando en cada lavado el sobrenadante. Al sedimento se le agregó la solución de flotación, se agitó el tubo a fin de emulsionar el sedimento con la solu-

ción y posteriormente se llenó el tubo con la solución de flotación probada hasta formar un menisco. Se colocó un cubre objeto se dejó reposar 15 minutos y se observó al microscopio.



1. c. Tipificar y conservar las especies fúngicas aisladas.

1 c. 1. **Aislamiento fúngico.**

Para el aislamiento fúngico fueron utilizadas las siguientes técnicas:

- **Técnica del "anzuelo queratínico"** de Vanbreuseghem, modificada por Orr<sup>155</sup>. Las muestras de tierra se dispusieron, por duplicado, en placas de Petri de 10 cm de diámetro, y sobre ellas se colocaron fragmentos de cabello de niños estériles de 1-1,5 cm (Figura 38). Luego se humedecieron con una solución de cicloheximida-cloramfenicol (DERMASEL-OXOID) y se incubaron en estufa a 28°C durante 60 días. Las observaciones se realizaron cada 7 días las dos primeras veces, luego cada 15 días hasta llegar a los 60 días. Fue necesario re-humedecer las tierras con agua destilada estéril frecuentemente.



**Fig. 38.** Técnica del "anzuelo queratínico".

- **Técnica selectiva de espolvoreado o "tierra rociada"**<sup>60</sup>. En placas de Petri de 10 cm de diámetro con agar agua 2% y por duplicado, se agregó 1 ml de suspensión de huevos de *T. canis* y luego se roció con 0,5 g de tierra aproximadamente. Las placas fueron incubadas durante 3 semanas a 25-28°C. Luego de ese tiempo se procedió a la observación bajo lupa estereoscópica para la identificación y/o aislamiento de los hongos que desarrollaron sobre los huevos. Los huevos se comportaron como señuelo para el aislamiento fúngico.



## 1 c. 2. Clasificación e identificación de los hongos aislados.

Los hongos se clasificaron por observación macroscópica y microscópica. La observación macroscópica se efectuó con lupa estereoscópica y, bajo este instrumento, se procedió a la obtención de material para el aislamiento e identificación, por análisis microscópico de estructuras con preparaciones teñidas con azul de lactofenol. La mayoría de los hongos que desarrollaron con las diferentes técnicas fueron sembrados en medio de agar papa más cloramfenicol para su aislamiento e identificación (Figura 39). Aquellas cepas que pudieron ser aisladas fueron guardadas en agua destilada -glicerol a temperatura ambiente. Cada especie se contabilizó una sola vez en cada muestra, no importando si se repetía en la misma placa o en el duplicado.

Para la clasificación general de los hongos se utilizaron las siguiente referencias: Cano y Guarro, 1990<sup>156</sup> ; Currah, 1985<sup>157</sup>, De Hoog y *cols.*, 2000<sup>158</sup> ; Domsch y *cols.*, 1980<sup>159</sup>; Gams 1971 <sup>160</sup>; Ellis, 1971<sup>161</sup>; Solé *et al.*, 2002<sup>162</sup>; Van Oorschot, 1980<sup>163</sup>; Von Arx, 1986<sup>164</sup>; Piontelli, 2013 <sup>165</sup>.



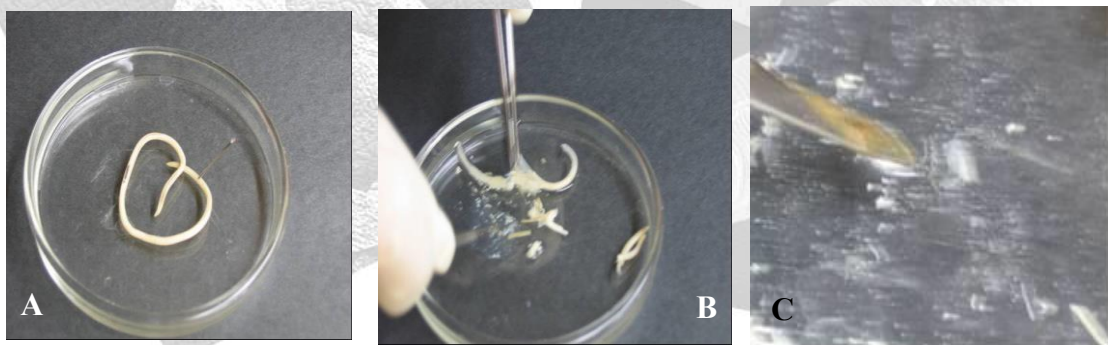
**Fig. 39.** Tubos de Agar papa + cloramfenicol para aislamiento e identificación de cepas fúngicas.

2. Seleccionar una especie fúngica que muestre actividad ovidica

### 2. a. Enfrentar *in vitro* hongo saprófito y huevos de *T. canis*.

2 a. 1. Obtención de huevos de *T. canis* y preparación de la suspensión de trabajo.

Las formas adultas de *T. canis* se obtuvieron de las heces de perros menores de 6 meses infectados, previa administración de tratamiento antiparasitario. De los parásitos eliminados, se seleccionaron las hembras adultas de *T. canis*, a las cuales se las lavó repetidas veces con solución salina y se las guardó en formol al 1%. Posteriormente se procedió a realizar el corte de una o dos hembras, dependiendo del tamaño, bajo lupa estereoscópica, seccionando el tercio anterior del cuerpo del parásito posterior al ventrículo y extrayendo el útero<sup>167</sup> (Figura 40). Los huevos fueron recibidos en hipoclorito de sodio diluido (0,1% v/v)<sup>60</sup> durante 5 minutos para disminuir la contaminación y luego centrifugados 5 minutos a bajas revoluciones. El "pellet" resultante fue lavado 2 veces con agua destilada estéril con el agregado de antibióticos, y resuspendido en agua estéril. De esa suspensión se preparó la dilución de trabajo de aproximadamente 1000 huevos /ml. Es importante tener en cuenta que la mayoría de los huevos estaban no embrionados<sup>25</sup>.



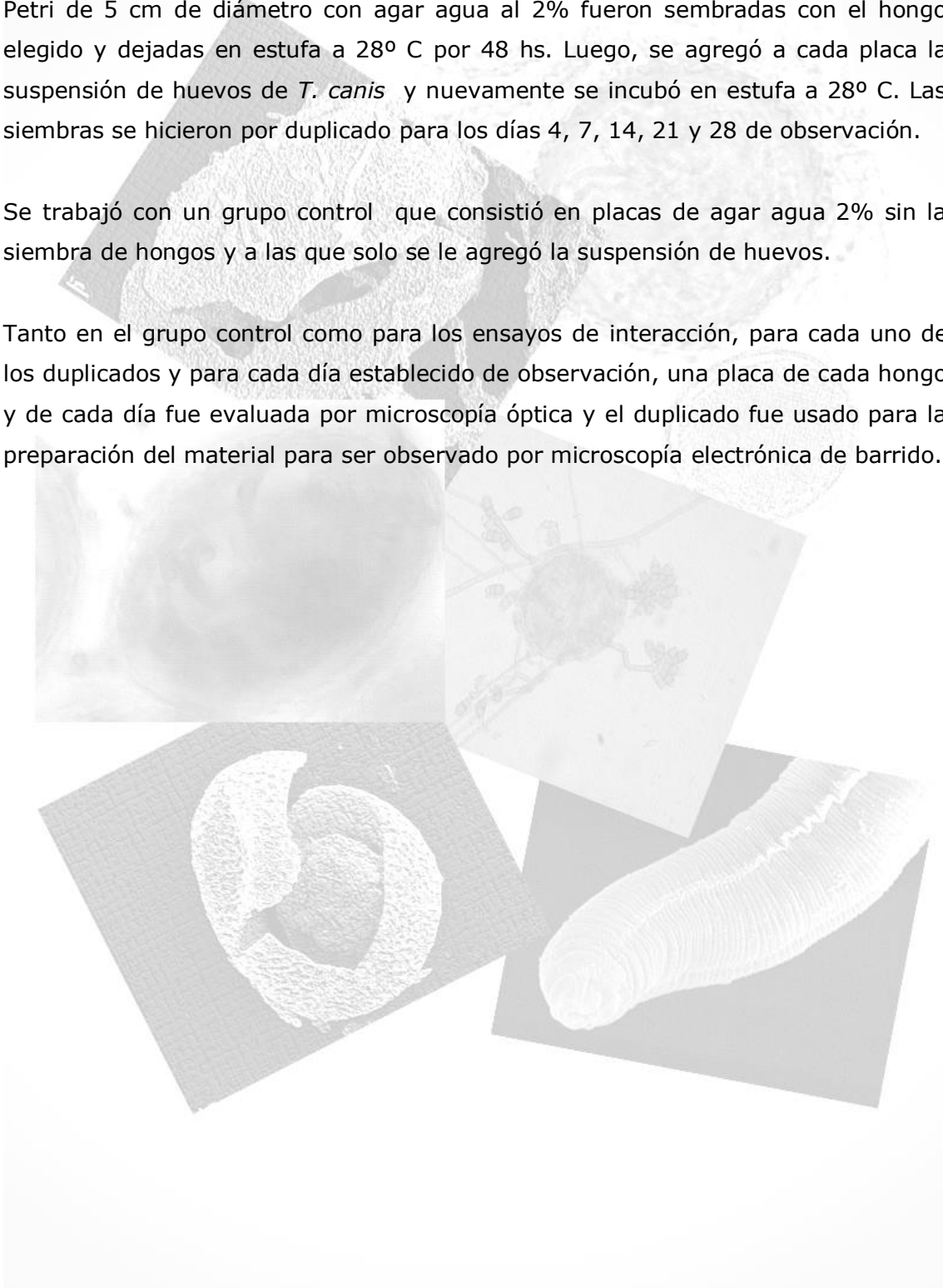
**Fig. 40.** Adulto hembra de *T. canis* (A); Disección de la hembra (B); Recuperación de huevos no larvados (C)<sup>67</sup>

## 2. a. 2. Incubación de huevos de *T. canis* en presencia del hongo.

Se trabajó de acuerdo a la técnica descrita por Basualdo<sup>25</sup>. Para ello, placas de Petri de 5 cm de diámetro con agar agua al 2% fueron sembradas con el hongo elegido y dejadas en estufa a 28° C por 48 hs. Luego, se agregó a cada placa la suspensión de huevos de *T. canis* y nuevamente se incubó en estufa a 28° C. Las siembras se hicieron por duplicado para los días 4, 7, 14, 21 y 28 de observación.

Se trabajó con un grupo control que consistió en placas de agar agua 2% sin la siembra de hongos y a las que solo se le agregó la suspensión de huevos.

Tanto en el grupo control como para los ensayos de interacción, para cada uno de los duplicados y para cada día establecido de observación, una placa de cada hongo y de cada día fue evaluada por microscopía óptica y el duplicado fue usado para la preparación del material para ser observado por microscopía electrónica de barrido.

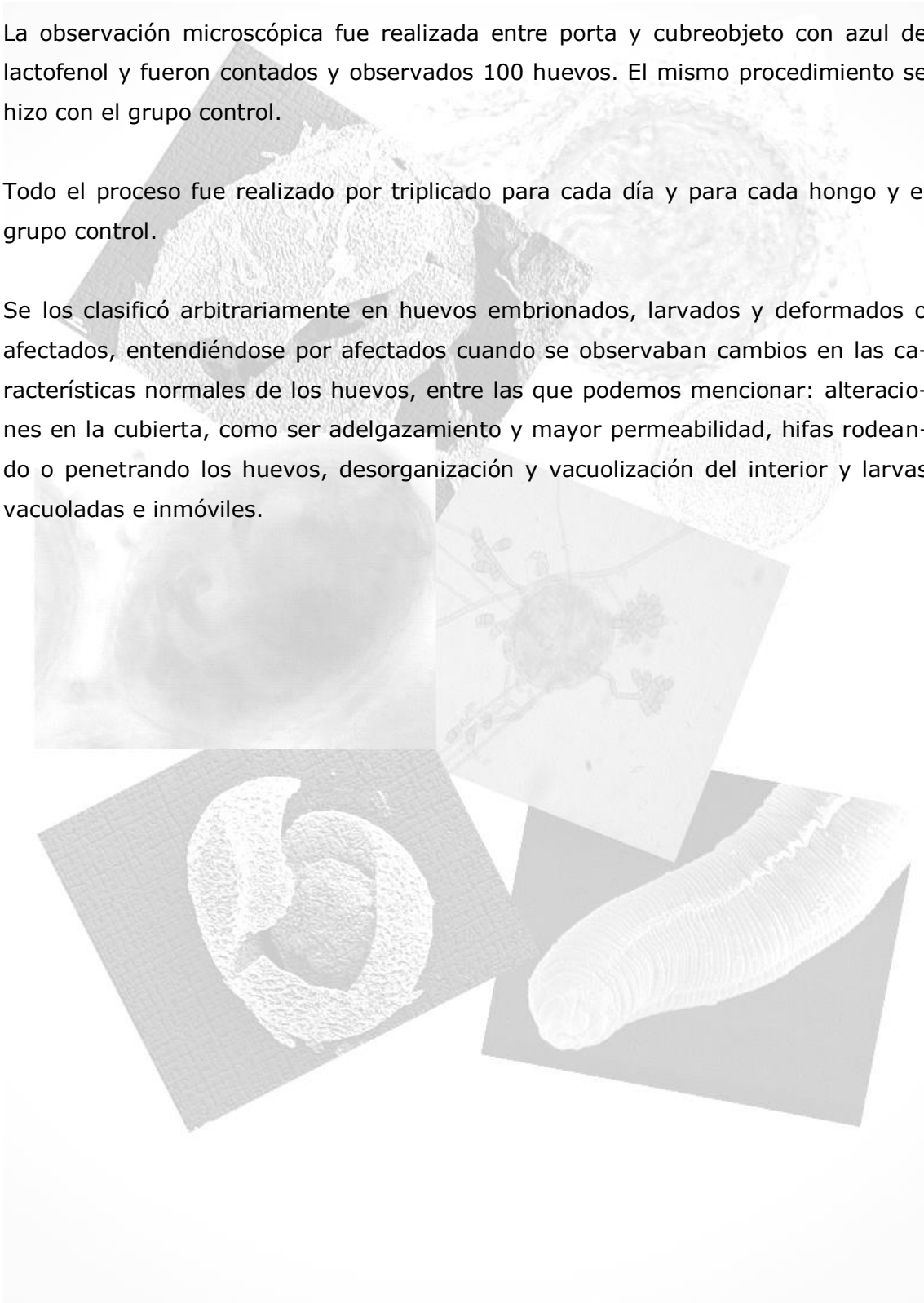


## 2. b. Observar la acción mecánica por microscopía óptica (MO)

La observación microscópica fue realizada entre porta y cubreobjeto con azul de lactofenol y fueron contados y observados 100 huevos. El mismo procedimiento se hizo con el grupo control.

Todo el proceso fue realizado por triplicado para cada día y para cada hongo y el grupo control.

Se los clasificó arbitrariamente en huevos embrionados, larvados y deformados o afectados, entendiéndose por afectados cuando se observaban cambios en las características normales de los huevos, entre las que podemos mencionar: alteraciones en la cubierta, como ser adelgazamiento y mayor permeabilidad, hifas rodeando o penetrando los huevos, desorganización y vacuolización del interior y larvas vacuoladas e inmóviles.



## 2. c. Observar la acción mecánica por Microscopía Electrónica de Barrido.

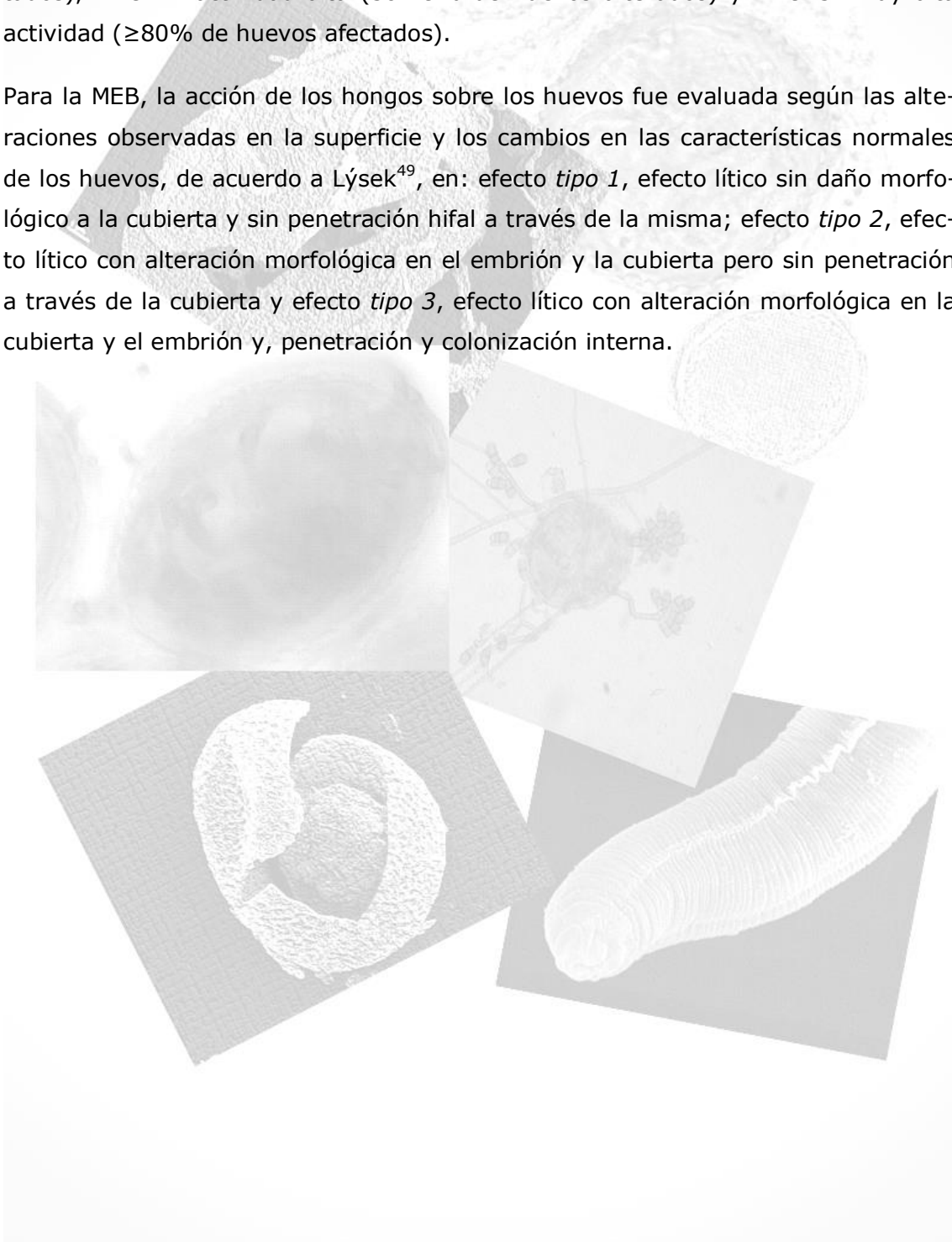
Todos los pasos de fijación, deshidratación, secado a punto crítico, montaje, metalizado y observación fueron realizados para cada hongo probado, para el control y para cada día de interacción establecido (4, 7, 14, 21 y 28), siguiendo la técnica descrita por Sarmiento y cols.<sup>167</sup> con algunas modificaciones.

- 1- Fijación: las placas sembradas con hongos más huevos de *T. canis* se colocaron en solución de formaldehído 2% v/v preparado en el momento, a razón de 2-3 ml por placa de Petri de 5 cm de diámetro, durante 48 hs. Pasado ese tiempo, se pasó el material ya fijado a tubos eppendorf y se centrifugó durante 5 minutos a bajas revoluciones. El pelet obtenido fue colocado sobre un pequeño círculo de papel de filtro y éstos a su vez dentro de tubos eppendorf perforados y rotulados. Los tubos perforados con el material fueron sumergidos nuevamente en formaldehído fresco por 24 hs.
- 2- Deshidratación: La deshidratación del material se realizó por pasajes en concentraciones crecientes de alcohol etílico (10%, 30%, 50% y 70% v/v), colocando los eppendorf perforados con el material durante 15 minutos en cada alcohol hasta llegar al alcohol 70 donde fueron guardados y llevados al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste.
- 3- Secado a punto crítico: En el servicio, el material fue deshidratado nuevamente pasando por acetona 70% y 85 % y luego dos pasajes por acetona 100%. Una vez hecho esto, los tubos fueron llevados a secado punto crítico con CO<sub>2</sub>, y entregados nuevamente junto con la placa metálica para el montaje bajo lupa estereoscópica.
- 4- Metalizado y Observación: el día pactado para la observación, el material colocado sobre la placa metálica fue metalizado con oro durante 3 minutos aproximadamente, previamente a la observación. El microscopio utilizado fue un MEB-SEM JEOL -JSM 5800 LV. Las observaciones se hicieron a diferentes aumentos (x220 - x2200) de acuerdo a las características a resaltar en el material.

## 2. d. Evaluación de la acción mecánica de los hongos sobre los huevos.

Para la MO, la actividad ovicida se determinó considerando 5 niveles de actividad<sup>25, 58</sup>: nivel 1: sin actividad ( $\leq 15\%$  huevos afectados), nivel 2: actividad baja ( $\geq 15-20\%$  de huevos afectados), nivel 3: actividad intermedia ( $21-49\%$  de huevos afectados), nivel 4: actividad alta ( $50-79\%$  de huevos alterados) y nivel 5: muy alta actividad ( $\geq 80\%$  de huevos afectados).

Para la MEB, la acción de los hongos sobre los huevos fue evaluada según las alteraciones observadas en la superficie y los cambios en las características normales de los huevos, de acuerdo a Lýsek<sup>49</sup>, en: efecto *tipo 1*, efecto lítico sin daño morfológico a la cubierta y sin penetración hifal a través de la misma; efecto *tipo 2*, efecto lítico con alteración morfológica en el embrión y la cubierta pero sin penetración a través de la cubierta y efecto *tipo 3*, efecto lítico con alteración morfológica en la cubierta y el embrión y, penetración y colonización interna.



3. Determinar la acción enzimática extracelular de los hongos con actividad ovicida.

3. a. Establecer un "screening enzimático" por cultivo en medio sólido.

### 3. a. 1. **Actividades enzimáticas extracelulares**

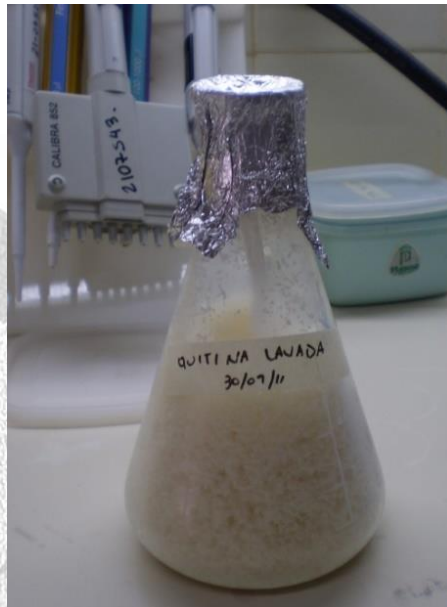
#### 3.a. 1. 1. **Preparación de quitina coloidal para ser usada en los ensayos enzimáticos<sup>168</sup>.**

A 50 g de quitina en escamas (Sigma) (Figura 41) se agrega 500 ml de NaOH 1N y ClH 1N (5-6 veces) de forma alternada con el objeto de lavar las escamas y se deja durante 24 horas. Luego se lava con etanol 95% (3-4 veces) hasta remover la materia extraña, quedando un producto blanco (Figura 42).

15 g de quitina blanqueada y limpia se humedecieron con acetona y se disolvieron en 100 ml de ClH concentrado en frío y con agitación durante 20 minutos en baño de hielo (Figura 43). La solución obtenida queda como un "jarabe grueso" que se filtra por succión a través de lana de fibra de vidrio en embudo Buchner (Figura 44), a 2 litros de agua helada agitando y el material precipita como una fina suspensión coloidal (Figura 45). Seguir agregando al residuo que queda ClH cc 3 o 4 veces y re-filtrarlo hasta que no precipite más quitina. La quitina coloidal así obtenida se lava con agua destilada hasta 4-5 veces para eliminar el ácido y se almacena en heladera hasta su utilización (Figura 46).



**Fig. 41.** Escamas de quitina (Sigma)



**Fig. 42.** Escamas de quitina lavadas



**Fig. 43.** Baño de hielo previo a la filtración.

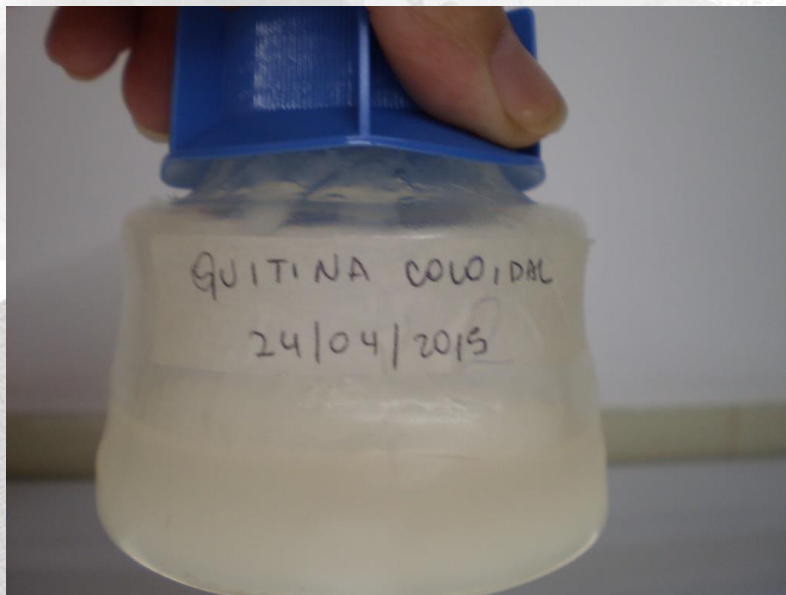


**Fig. 44.** Filtración por Buchner de la quitina





**Fig. 45.** Recepción de la quitina coloidal en agua helada.



**Fig. 46.** Quitina coloidal lista para usar

### 3.a. 1. 2. **Cultivos sólidos para determinar actividades enzimáticas extracelulares.**

Se realizó un "screening enzimático" con el objeto de poder decir el tipo de enzimas que secretan los hongos elegidos, utilizando la metodología descrita por Gortari mediante cultivo en placa para la detección de proteasas, quitinasas y lipasas. La producción de enzimas extracelulares se determinó mediante la técnica de difusión radial en placas con el sustrato específico<sup>60</sup>.

Se determinaron:

- **Actividad quitinolítica**, utilizando agar quitina coloidal 2% (Ciarmela ML dato no publicado) la cual fue obtenida a partir de escamas de quitina como material de partida y obteniendo la quitina coloidal según Lingappa and Lockwood, 1962<sup>168</sup> y descrita en el punto 3.a.1.1 de esta tesis.
- **Actividad proteolítica**, utilizando agar caseína y agar gelatina.
- **Actividad lipolítica**, utilizando agar Tween 80.

Procedimiento: Placas de Petri de 9 cm de diámetro fueron sembradas por triplicado con los hongos: *Chrysosporium indicum*, *Ch keratinophylum*, *Curvularia lunata*, *Trichophyton ajelloi* y fueron incubadas a 28°C durante 14 días.

La actividad enzimática fue determinada de acuerdo a la degradación o la precipitación de cada sustrato. Un halo transparente alrededor de la colonia es indicativo de la degradación de los sustratos proteicos por el microorganismo y un halo de precipitación es observado cuando el microorganismo es capaz de hidrolizar el Tween 80 y se evidencia por la liberación de ácidos grasos que en combinación con el  $Cl_2 Ca$ , precipitan.

Los resultados fueron interpretados teniendo en cuenta el radio entre el halo de degradación del sustrato y el de la colonia de acuerdo a la siguiente escala:

Grado 0	Sin degradación
Grado 1	Se degrada solo bajo el centro de la colonia
Grado 2	Degradación evidente bajo toda la colonia
Grado 3	2-10 mm más de la colonia
Grado 4	Radio > 10mm de la colonia

**3. b.** Producir un extracto enzimático crudo a partir de cultivos líquidos de los hongos.

**3 b. 1. Cultivos líquidos para determinar actividades enzimáticas extracelulares**

Se prepararon medios mínimos con el agregado del sustrato correspondiente de acuerdo a la enzima a producir por el hongo, quitina coloidal o caseína para obtener quitinasas o proteasas respectivamente (ver en el anexo de esta tesis la composición del medio mínimo).

Quitinasas:

Para la obtención de quitinasas se realizaron dos ensayos diferentes.

- Un cultivo en medio mínimo solo con el agregado de quitina coloidal, el cual, luego de la siembra de los diferentes hongos, se mantuvo en rotador a temperatura ambiente durante 40 días<sup>60</sup>.
- Un cultivo en medio mínimo con el agregado de quitina coloidal como sustrato más el agregado de extracto de levadura para mejorar el crecimiento fúngico (Figura 47). Este cultivo se mantuvo solo durante 30 días, en rotador y a temperatura ambiente<sup>169</sup>.

Para ambos casos se sembraron Erlenmeyer con 150 ml de medio de cultivo.



**Fig. 47.** Cultivo líquido. Medio mínimo + quitina coloidal

Proteasas:

Para la obtención de proteasas, se eligió como sustrato leche descremada. Se procedió de igual manera que en el caso anterior: erlemmeyers con 150ml del medio se sembraron con las diferentes cepas fúngicas y de mantuvieron en rotador a temperatura ambiente pero solo durante 9 días<sup>12</sup> (Figura 48).



**Fig. 48.** Medio de leche descremada más cepas de hongos en el día cero de incubación.

### 3 b. 2. **Obtención de los extractos crudos.**

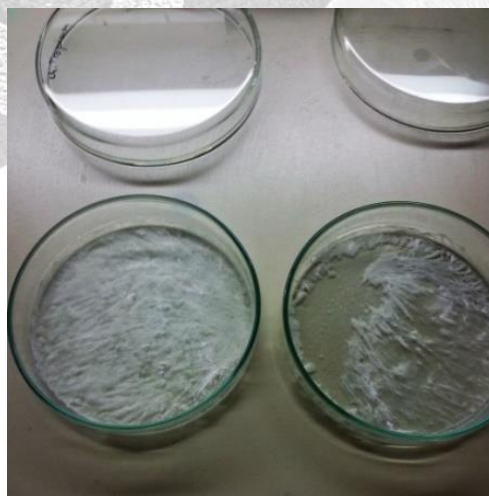
#### **Concentración:**

Para la obtención de quitinasa, con quitina coloidal más extracto de levadura como sustrato, se procedió a concentrar el medio líquido aproximadamente 10 veces, mediante ultracentrifugación a través de filtro de exclusión molecular de polieter-sulfona de 10000 Daltons (MILLIPORE Co, USA) bajo presión positiva, para permitir un flujo continuo<sup>129</sup> (Figura 49).



**Fig. 49.** Ultrafiltración de cultivo líquido

En los otros, obtención de proteasa y quitinasa con sólo quitina coloidal como sustrato, la concentración realizó por desecación, en estufa a 37°C durante casi 10 días. Para evitar la contaminación de los extractos se agregó a cada Erlenmeyer una solución de timerosal y borato de sodio al 1%. Una vez secos, se reconstituyó cada extracto con 10 ml de agua destilada (Figura 50).

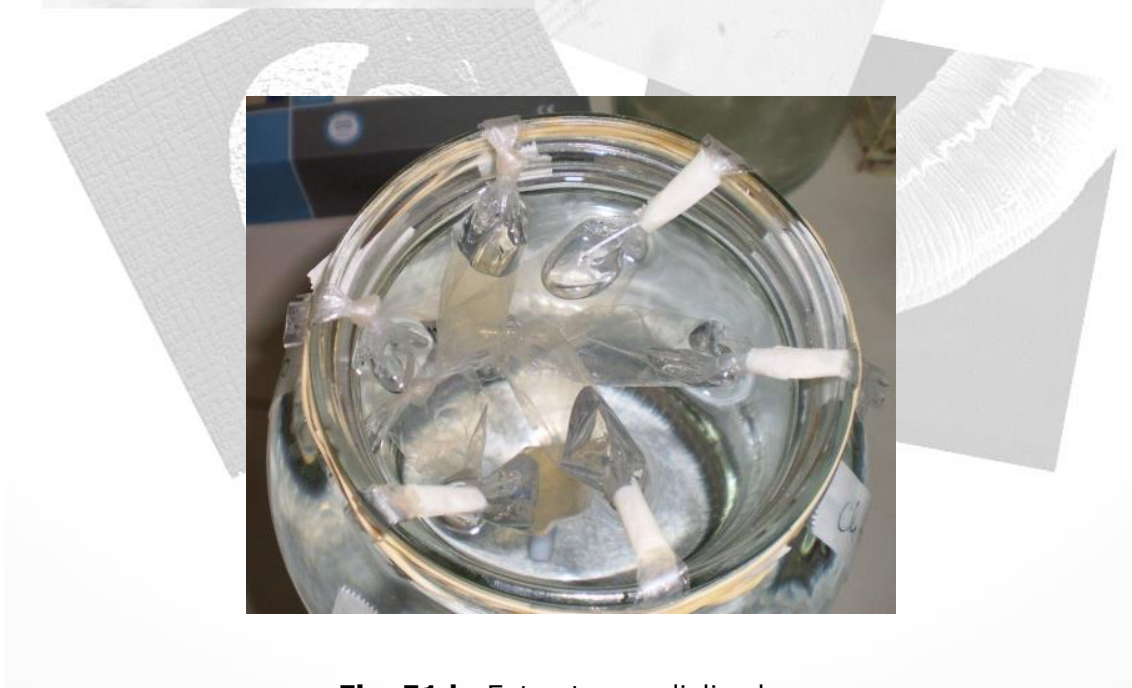


**Fig. 50.** Extracto seco obtenido por desecación en estufa de 37°C.

Luego, cualquiera sea la forma de concentración, se realizó la diálisis de los extractos contra agua destilada durante 48hs, la cual tiene por objeto eliminar las sales del medio (Figura 51 a y b).



**Fig. 51 a.** Diálisis de los extractos reconstituidos contra agua destilada, extracto obtenido del medio mínimo + quitina+ extracto de levadura.



**Fig. 51 b.** Extractos ya dializados.

### ***Determinación del contenido proteico.***

- El contenido proteico de los extractos se determinó por el método de Bradford 1976<sup>170</sup>, utilizando la solución colorante de azul de Coomasie (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Se utilizó seroalbúmina bovina como proteína estándar.
- Los extractos así obtenidos se fraccionaron en alícuotas y se conservaron a -20°C (Figura 52).



**Fig. 52.** Extractos enzimáticos crudos.



**3. c.** Analizar el extracto enzimático para identificar los componentes proteicos mayoritarios.

### 3 c. 1. **Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-Page)**

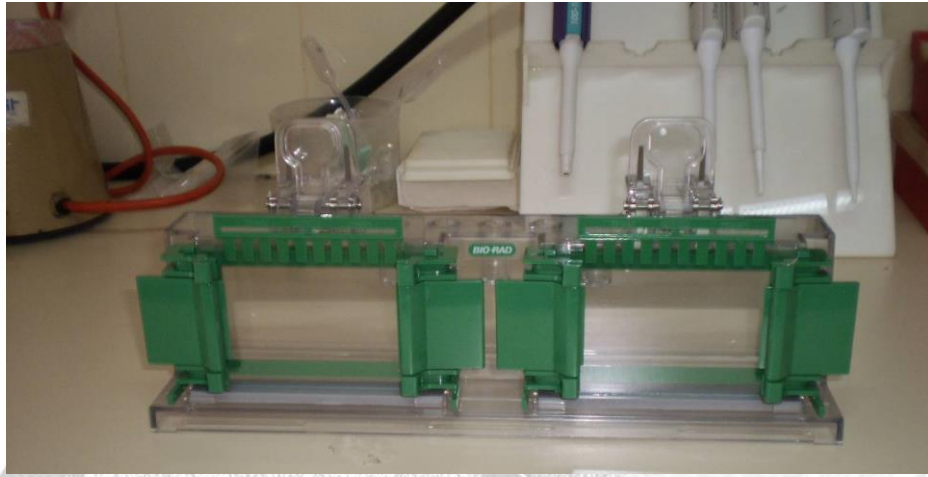
El extracto enzimático crudo fue fraccionado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) <sup>171</sup>. Para ello, se prepararon geles de 70 x 80 x 0.25 mm empleando una Mini-protean II Slab Cell (Bio-Rad Labs, USA). Los geles constan de una parte concentradora (5% Poliacrilamida) y otra separadora (12% Poliacrilamida). El detergente iónico SDS se añade para eliminar diferencias conformacionales de moléculas y diferencias de densidades de cargas, haciendo que los polipéptidos migren diferencialmente solo sobre la base de su tamaño.

Preparación de geles: Se prepararon dos soluciones de poliacrilamida de 5% y 12% respectivamente, mezclando volúmenes adecuados de buffer TRIS-HCl pH 6.8, buffer TRIS-HCl pH 8.8, glicerol, solución de SDS 10%, solución de acrilamida/bis-acrilamida, persulfato de amonio y TEMED. (Tabla 3). Se emplearon separadores de 0.25 mm. (Figura 53).

**Tabla 3.** Concentraciones de los reactivos utilizados en la preparación de geles de poliacrilamida.

	<b>Gel Separador (12%)</b>	<b>Gel Concentrador (5%)</b>
Agua dest. (ml)	2.80	2.80
Acrilamida-bisAcrilamida 30% (ml)	4.00	0.66
Buffer pH 8.8(ml)	1.70	-
Buffer pH 6.8 (ml)	-	0.50
Glicerol (ml)	0.86	-
SDS 10% (ml)	0.34	0.04
Persulfato amónico 10% (ml)	0.12	0.04
TEMED (μl)	10.0	5.0



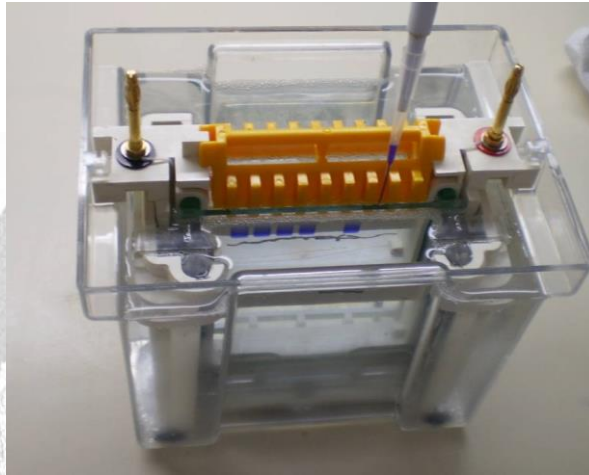


**Fig. 53.** Montaje de los geles separador y concentrador.

### 3 c. 2. Preparación de las muestras y del marcador de peso molecular.

Se mezclaron 9 partes de la solución proteica a separar con 1 parte del buffer de muestra 5x (4.2 ml de buffer TRIS-HCl pH 6.8; 1 g de SDS; 5 ml de Glicerol; 10 mg de azul de bromofenol).

- Por cada 500ul de muestra se agregaron 40 ul de 2-mercaptoetanol, y se llevó a ebullición 5 minutos, a fin de desnaturalizar las proteínas. Se sembraron 20ul de muestra por pocillo (Figura 54).
- Para la estimación de los pesos moleculares relativos de los componentes polipeptídicos se empleó un marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad), que incluye las siguientes proteínas: miosina, 200 kDa; beta-galactosidasa, 116.25 kDa; fosforilasa b, 97.4 kDa, seroalbúmina bovina, 66.2 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa, inhibidor de tripsina de soja, 21.5 kDa; li-sozima, 14.4 kDa; aprotinina, 6.5 kDa.
- El marcador de peso molecular se preparó de la siguiente manera: 5ul de Marcador + 10ul de buffer de muestra + 35 ul de agua destilada.
- Se sembraron 20 ul por pocillo.



**Fig. 54.** Siembra de los pocillos con marcador de peso molecular y las muestras

### 3 c. 3. **Electroforesis** <sup>172</sup>.

- Se empleó buffer de electroforesis TRIS-Glicina pH 8.3 (Tris 0.025M, Glicina 0.192M, SDS 0.1%).
- Las condiciones de corrida fueron: 30 minutos a 50 V, y luego 70 minutos a 150V (Figura 55).



**Fig. 55.** Equipo de electroforesis: cuba vertical y fuente de poder.

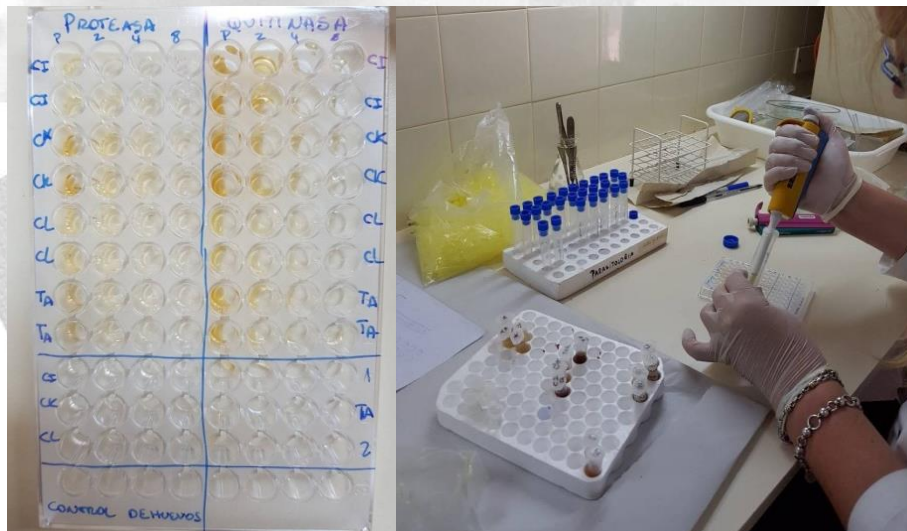
Los pesos moleculares de las bandas fueron estimados mediante el empleo de marcadores de peso molecular. Cuando las proteínas son desnaturizadas por calor en presencia de un exceso de SDS y 2-mercaptoetanol, la mayoría de los polipéptidos se unen al SDS en una relación de masa constante tal, que adquieren idéntica densidad de carga y migran en geles de poliacrilamida de acuerdo a su tamaño. Bajo estas condiciones, un gráfico del  $\log_{10}$  del peso molecular del polipéptido vs. la movilidad relativa (R f) revela una relación lineal.

#### 4. Experimentar *in vitro* la acción del extracto enzimático crudo sobre la viabilidad del huevo de *T. canis*.

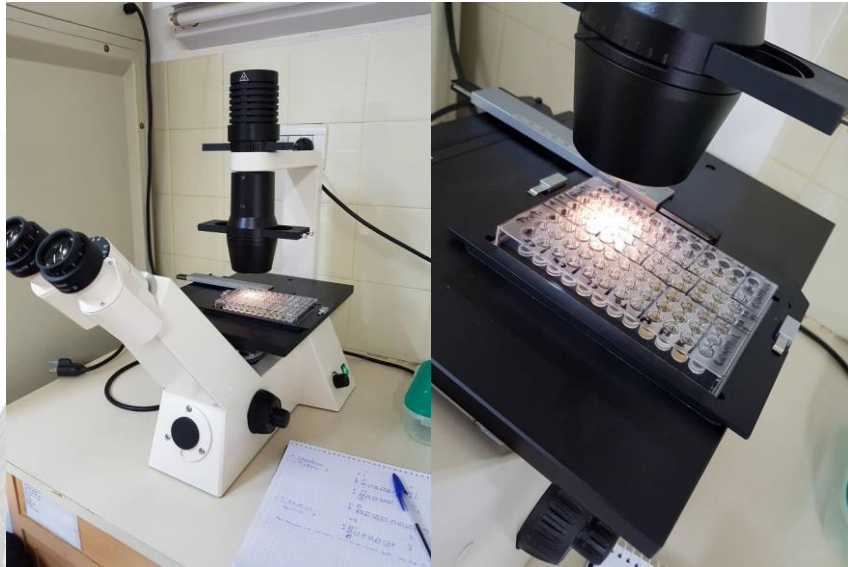
El ensayo consistió en 12 grupos experimentales (extracto enzimático crudo de proteasa y quitinasa de los 4 hongos ensayados) y un grupo control.

En una placa de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos, se enfrentaron, en dadero, los huevos de *T. canis* y los extractos enzimáticos crudos. La proporción fue de 25  $\mu$ l de extracto crudo de enzima y 25  $\mu$ l de la suspensión de huevos en PBS. Se realizaron a su vez diluciones al medio de cada uno de los enfrentamientos y por triplicado. Se ensayaron extractos de proteasa, quitinasa y de proteasa y quitinasa juntos para cada hongo trabajado (Figura 56). A los huevos del grupo control no se le agregó el extracto enzimático.

La placa así diseñada y sembrada, se dejó en estufa a 28°C durante 14 días, procediéndose a la observación, bajo microscopio invertido (Figura 57), de cada pocillo a los 7 y 14 días.



**Fig. 56.** Ensayo en Dadero. A la izquierda la placa luego de ser sembrada y lista para su incubación. A la derecha, procedimiento de siembra de huevos de *T. canis* y los diferentes extractos enzimáticos.



**Fig. 57.** Microscopio invertido. Observación de las placas fondo plano con el ensayo propuesto.

Para la **evaluación de los efectos** se tenía en cuenta si los huevos estaban embrionados, larvados y afectados, entendiéndose por huevos normales aquellos que mantenían las características del grupo control, y por alterados o afectados, todos aquellos que presentaron cambios en la membrana o cubierta (mayor permeabilidad y adelgazamiento y pérdida de la estructura foseada), en el interior (vacuolización, desorganización) y la no movilidad de la larva.



## 25. RESULTADOS

1. Determinar la flora fúngica saprófita de suelos de espacios públicos de la ciudad de Corrientes.

### 1. a. Aislar hongos saprófitos de suelo de parques y plazas de la ciudad de Corrientes.

Fueron colectadas **60 muestras** de suelo en total, de las cuales 26 correspondían al parque Mitre, 18 al parque Cambá Cuá y 16 a las plazas y plazoletas de la ciudad de Corrientes. En ese total de muestras fueron identificados **40 géneros y 69 especies** fúngicas. De ellas, 12 especies, entre mohos y levaduras, no pudieron ser identificadas, por no haber desarrollado fructificación que permitiera su identificación (Tabla 4).

**Tabla 4.** Géneros y especies fúngicas identificadas en muestras de suelo de la ciudad de Corrientes.

Gen.	Esp.	Géneros y especies identificados
1	1	<i>Absidia</i> spp.
2	2	<i>Acremonium</i> spp.
3	3	<i>Aphanoascus fulvescens</i> (Cooke) Apinis
	4	<i>Aphanoascus terréus</i> (Randhawa&Sandhu) Apinis
4	5	<i>Arthroderma gypsea</i>
5	6	<i>Aspergillus flavus</i>
	7	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem
	8	<i>Aspergillus ochraceus</i>
	9	<i>Aspergillus terreus</i> Thom
	10	<i>Aspergillus versicolor</i> Vuill. Tiraboschi
6	11	<i>Aureobasidium pullulans</i>
7	12	<i>Bipolaris australiensis</i> (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama
	13	<i>Bipolaris hawaiiensis</i>
8	14	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries
	15	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link:Fr.
	16	<i>Cladosporium oxysporum</i>
9	17	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> Stadel
10	18	<i>Curvularia clavata</i> Jain
	19	<i>Curvularia australiensis</i>
	20	<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedjin
	21	<i>Curvularia pallescens</i>
11	22	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze: Fries
12	23	<i>Chrisosporium pannicola</i>
	24	<i>Chrisosporium zonatum</i>
	25	<i>Chrysosporium indicum</i> (Randhawa & Sandhu) Garg
	26	<i>Chrysosporium keratinophilum</i> (Frey) Carmichael
13	27	<i>Dictyoarthrinium sacchari</i> (Stevenson) Damon

14	28	<i>Emericella nidulans</i>
15	29	<i>Eupenicillium javanicum</i> y su anamorfo
16	30	<i>Fusarium chlamydosporum</i> Wollenw.& Reinking
	31	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht:Fr.
	32	<i>Fusarium solani</i>
	33	<i>Fusarium spp.</i>
17	34	<i>Gymnascella spp.</i>
18	35	<i>Malbranchea spp.</i>
19	35	<i>Melanospora spp.</i>
	36	<i>Melanospora var. microsporus</i> Corda
20	37	<i>Miceliophthora vellerea</i>
21	38	<i>Microsporium canis</i> (Bodin) Bodin
	39	<i>Microsporium gypseum</i> (Bodin) Guiart & Grigorakis
22	40	<i>Mortierella polycephala</i>
23	41	<i>Mucor circinelloides</i>
	42	<i>Mucor racemosus</i>
	43	<i>Mucor ramosissimus</i> Samutsevitsch
24	44	<i>Myceliophthora vellerea</i> Sacc.& Speg van Oosrhot
25	45	<i>Myrothecium roridum</i> Tode:Fries
26	46	<i>Nigrospora sphaerica</i>
27	47	<i>Paecilomyces o Purpureocillium lilacinus</i> (Thom) Samson
	48	<i>Paecilomyces o Purpureocillium spp.</i>
28	49	<i>Penicillium pinophilum</i> Hedgcock
	50	<i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudemans) Thom
	51	<i>Penicillium spp.</i>
	52	<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll
29	53	<i>Phoma spp.</i>
30	54	<i>Pithomyces flavus</i>
31	55	<i>Rhizopus microsporus</i> v. Tiegh.
	56	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg: Fries) Vuillemin
	57	<i>Rhizopus onyzae.</i>
32	58	<i>Rhizomucor spp</i>
33	59	<i>Scytalidium infestans</i>
34	60	<i>Sporidesmium socium</i>
35	61	<i>Talaromyces clavus</i>
	62	<i>Talaromyces purpurogenus</i>
36	63	<i>Thielavia hyalocarpa</i> Arx
37	64	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
	65	<i>Trichoderma viride</i> Pers.;Fr.
38	66	<i>Trichophyton ajelloi</i>
39	67	<i>Verticillium spp.</i>
	68	<i>Verticillum chlamydosporum</i>
40	69	<i>Zygomycete</i>

### 1. b. Recuperar huevos de *T. canis* de suelos.

Fueron recolectadas y procesadas 67 muestras de suelo para la recuperación de huevos, de las cuales, solo **9 (13,43%)**, fueron positivas para huevos de *Toxocara* spp.

Los datos de Plazas y parques y la técnica utilizada se encuentran en la **tabla 5**.

**Tabla 5:** Plazas y plazoletas muestreadas para la recuperación de huevos de *T. canis* y la técnica utilizada para tal fin.

<b>Plaza/Parque</b>	<b>N° de Muestras</b>	<b>Solución de Flotación</b>	<b>Muestras positivas para de huevos de <i>Toxocara</i> spp.</b>
Plazoleta Eva Perón	1	NaCl saturado, ZnSO <sub>4</sub> 33%, Sacarosa saturada y ZnSO <sub>4</sub> saturado	-
Plazoleta Llano	1	NaCl saturado, ZnSO <sub>4</sub> 33%, Sacarosa saturada y ZnSO <sub>4</sub> saturado	-
Plaza Torrent	4	NaCl saturado, ZnSO <sub>4</sub> 33%, Sacarosa saturada y ZnSO <sub>4</sub> saturado	-
Parque Mitre	22	NaCl saturado, Sacarosa saturada	<b>2</b>
Parque Cambá Cuá	12	NaCl saturado, Sacarosa saturada y ZnSO <sub>4</sub> al 33%	<b>3</b>
Plazoletas rotonda Av. Pujol	7	NaCl saturado y ZnSO <sub>4</sub> 33%	<b>1</b>
Plazoleta Los Inmigrantes	2	NaCl saturado y ZnSO <sub>4</sub> 33%	-
Plaza La Cruz	4	NaCl saturado y ZnSO <sub>4</sub> 33%	-
Plaza Libertad	4	NaCl saturado y ZnSO <sub>4</sub> 33%	-
Plazoleta 236	4	NaCl saturado y ZnSO <sub>4</sub> 33%	<b>1</b>
Plazoleta aguas	2	NaCl saturado y ZnSO <sub>4</sub> 33%	-
Plazoleta B° 300 viviendas	4	NaCl saturado y ZnSO <sub>4</sub> 33%	<b>2</b>
Plazoleta Cocoma-rola	2	NaCl saturado y ZnSO <sub>4</sub> 33%	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>67</b>		<b>9</b>

### 1. c. Tipificar y conservar las especies fúngicas aisladas.

Con la Técnica de espolvoreado selectivo o de la tierra "rociada" fueron recuperadas **44 cepas** de las 69 especies identificadas, las que se pueden ver en la tabla 6 junto a la porcentage que representan.

**Tabla 6.** Porcentaje de Géneros y especies que desarrollaron sobre los huevos de *T. canis*.

Géneros y especies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Número de cepas	%
<i>Bipolaris australiensis</i>		Xx							x	3	6,8
<i>Curvularia clavata</i>	X		x	X	Xx		x			6	14,6
<i>Curvularia lunata</i>	X	x	x	x		Xx			Xx	8	18,2
<i>Curvularia pallescens</i>			x							1	2,3
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	X	X						X		3	6,8
<i>Purpureocillium lilacinus</i>	Xx		x	X	Xx	X		X		8	18,2
<i>Phoma sp.</i>	x	x	x	x						4	9,0
<i>Scytalidium sp.</i>	Xx	Xx	x	x	X	Xx			Xx	11	24,1
<b>Total</b>										<b>44</b>	<b>100</b>

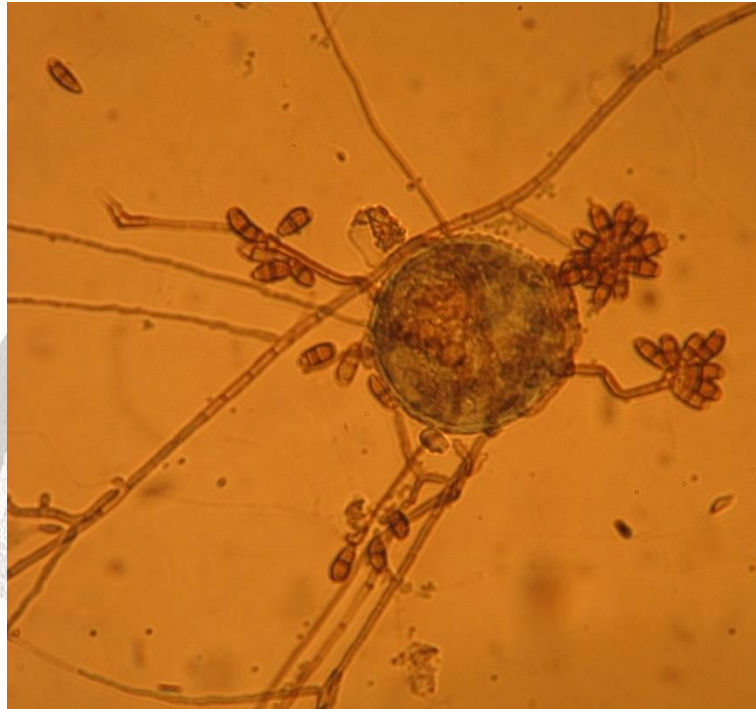
X Otoño – x primavera

Como se puede observar, *Scytalidium* spp. fue el identificado en mayor porcentaje, pero no se pudo llegar a la especie. Le siguen en orden *C. lunata* (Figuras 58 y 59) y *P. lilacinus*.



**Fig. 58.** *Curvularia* sobre huevos de *T. canis*, observación bajo lupa estereoscópica 4x





**Fig. 59.** Desarrollo de *C. lunata* sobre huevo de *T. canis* utilizado como señuelo. Observación al MO 40x.

Con la Técnica del anzuelo queratínico se aislaron **170 cepas** que se clasificaron en 18 géneros y 22 especies. En otoño se aislaron 20 especies y en primavera 10. Las especies que aparecieron únicamente en otoño fueron 12 y 2 especies sólo en primavera (Tabla 7).

**Tabla 7.** Frecuencia de Géneros y especies fúngicas aislados mediante la técnica del anzuelo queratínico.

<b>Taxa Fúngicos</b>	<b>Otoño</b>	<b>Primave- ra</b>	<b>Total</b>	<b>Frecuencia %</b>
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	1		1	0,59
<i>Aphanoascus terreus</i>	2		2	1,18
<i>Arthroderma gypseum</i> y su anamorfo	7	1	8	4,70
<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	1		1	0,59
<i>Chrysosporium indicum</i>	20	18	38	22,48
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	21	16	37	21,89
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1		1	0,59
<i>Cladosporium herbarum</i>	1		1	0,59

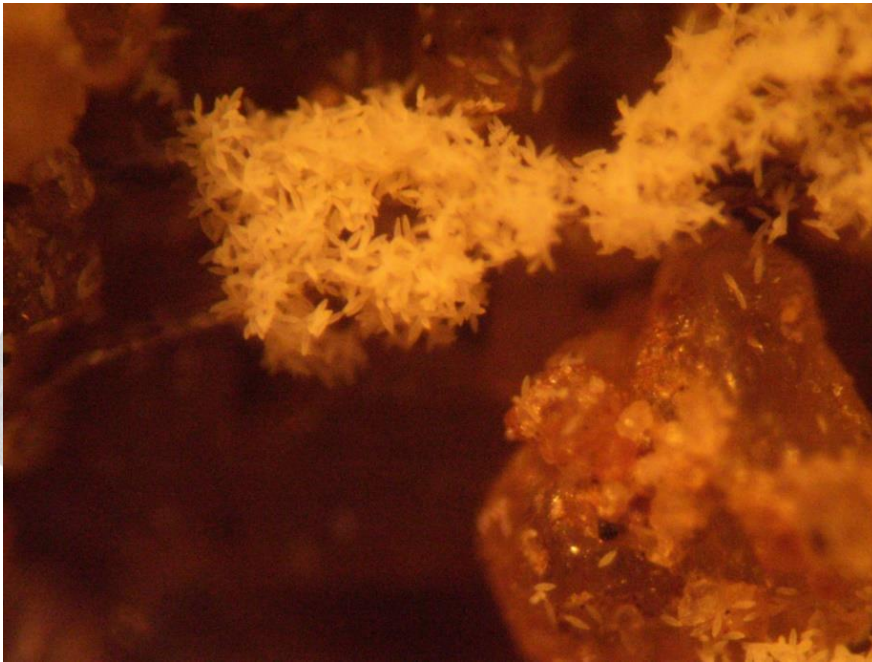
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	5	1	6	3,55
<i>Curvularia australiensis</i>	2		2	1,18
<i>Curvularia lunata</i>	2		2	1,18
<i>Fusarium oxysporum</i>	3	15	18	10,65
<i>Malbranchea spp.</i>	2		2	1,18
<i>Microsporium canis</i>	1		1	0,59
<i>Myceliophthora vellerea</i>	2		2	1,18
<i>Mucor ramosissimus</i>	1		1	0,59
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	20	12	32	18,93
<i>Trichophyton ajelloi</i>	2		2	1,18
<i>Sporidesmium socium</i>	1		1	0,59
<i>Trichoderma viride</i>	1		1	0,59
<i>Verticillium spp.</i>	3	8	11	6,50
<b>Total</b>	<b>99</b>	<b>71</b>	<b>170</b>	<b>100</b>

Dentro del orden Onygenales, los principales protagonistas fueron: *Chrysosporium indicum* (22,50%) y *C. keratinophilum* (21,90%) (Figura 60). Entre los no Onygenales, se destacaron: *Purpureocillium lilacinum* (18,90%), *Fusarium oxysporum* (10,70%) y *Verticillium spp.* (6,50%).



**Fig. 60.** Género *Chrysosporium* sobre cabello de niños, observación bajo lupa estereoscópica, 32 X.

En las figuras 61 y 62 se observa el crecimiento de *T. ajelloi* sobre cabello de niños.



**Fig. 61.** *T. ajelloi* sobre cabello de niños. Técnica del anzuelo queratínico. Observación bajo lupa estereoscópica, 20x.



**Fig. 62.** *T. ajelloi* sobre cabellos de niños, técnica del anzuelo queratínico. Observación bajo lupa estereoscópica, 10x.

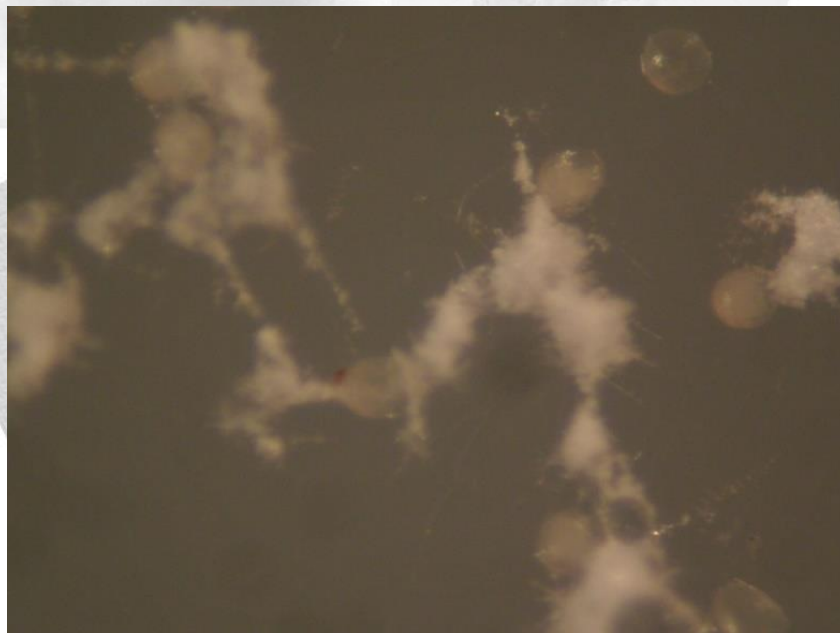
2. Seleccionar una especie fúngica que muestre actividad ovidica.

**2. a. Enfrentar *in vitro* hongo saprófito y huevos de *T. canis*.**

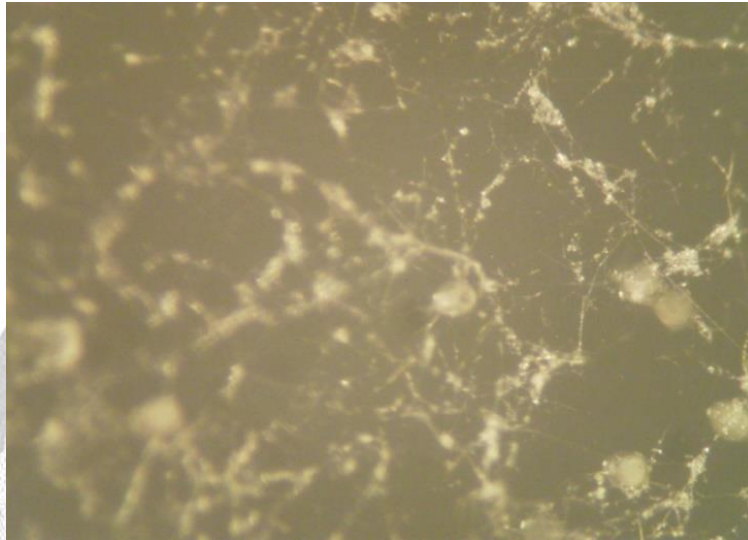
Fueron seleccionadas para realizar los ensayos de interacción, las siguientes especies fúngicas:

- *Chrysosporium indicum*
- *Chrysosporium keratinophilum*
- *Curvularia lunata*
- *Trichophyton ajelloi*

El género *Chrysosporium* y sus especies *indicum* y *keratinophilum* fueron aislados mediante la técnica del anzuelo queratínico (Figura 63 y 64) y fueron los que se recuperaron en mayor porcentaje (22,48% y 21,89% respectivamente). A su vez, era importante evaluar su acción sobre huevos de *T. canis*, ya que Ciarmela, 2008 y 2010, identificó a *Chrysosporium merdarium* como con "muy alta" actividad ovidica<sup>58, 59</sup>.

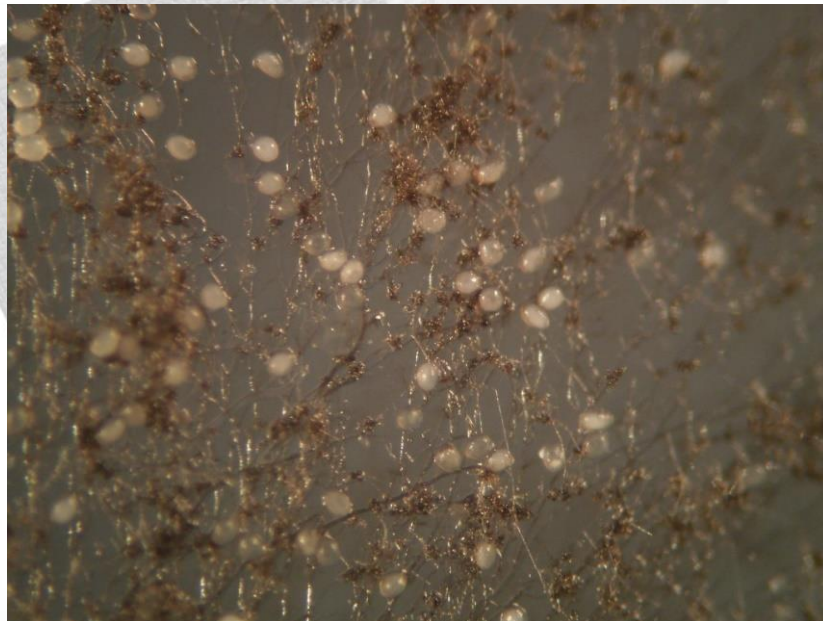


**Fig. 63.** Cultivo en agar agua 2%: *Ch indicum* + huevo de *T. canis*. Observación bajo lupa estereoscópica



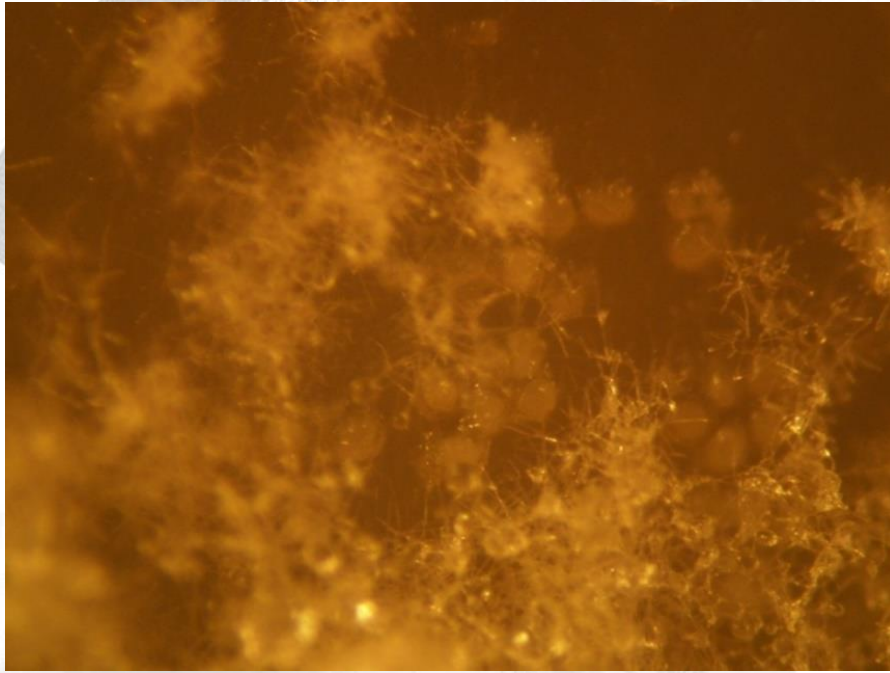
**Fig. 64.** Cultivo en agar agua 2%: *Ch keratinophylum* + huevo de *T. canis*. Observación bajo lupa estereoscópica.

El género *Curvularia* con su especie *lunata* fue elegido porque fue uno de los hongos demateaceos que con mayor frecuencia desarrolló sobre los huevos de *T. canis* mediante la técnica de espolvoreado selectivo o tierra "rociada" y, hasta el momento, en la bibliografía no se han encontrado datos de que *Curvularia* interaccione con huevos de ningún nematodo (Figura 65).



**Fig. 65.** Cultivo en agar agua 2%: *C. lunata* + huevo de *T. canis*. Observación bajo lupa estereoscópica 32X

El género *Trichophyton* con su especie *ajelloi*, fue aislado por la técnica del anzuelo queratínico y se lo eligió porque la bibliografía lo describe como entomopatógeno<sup>173</sup> y resultó interesante estudiarlo frente a huevos de nematodos para ver cómo se manifestaba (Figura 66).



**Fig. 66.** Cultivo en agar agua 2%: *T. ajelloi* + huevo de *T. canis*. Observación bajo lupa estereoscópica 32x.



2 **b.** Resultados de la interacción hongo-huevo de *T. canis* por microscopía óptica.

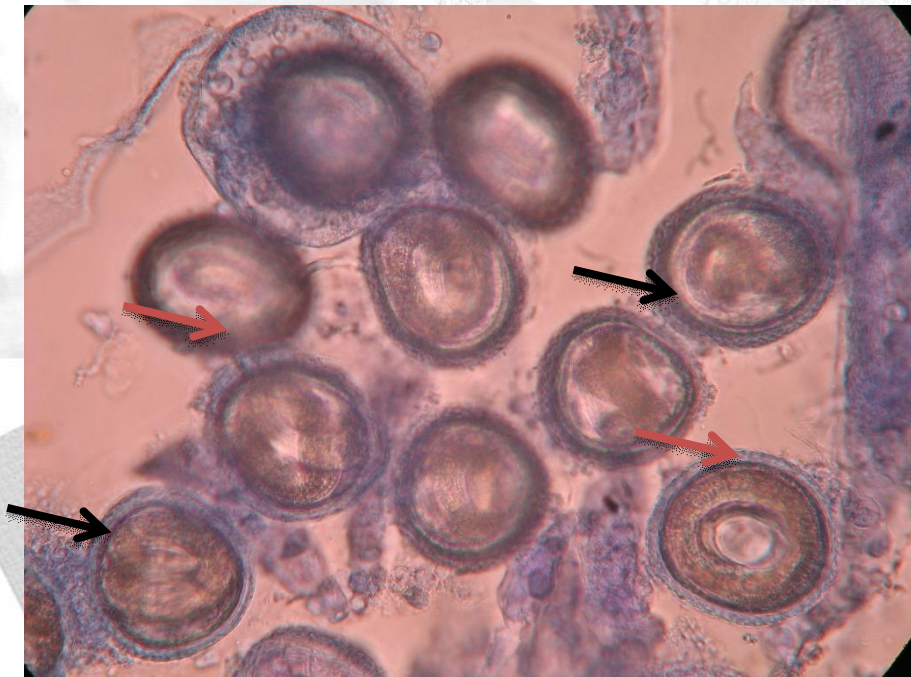
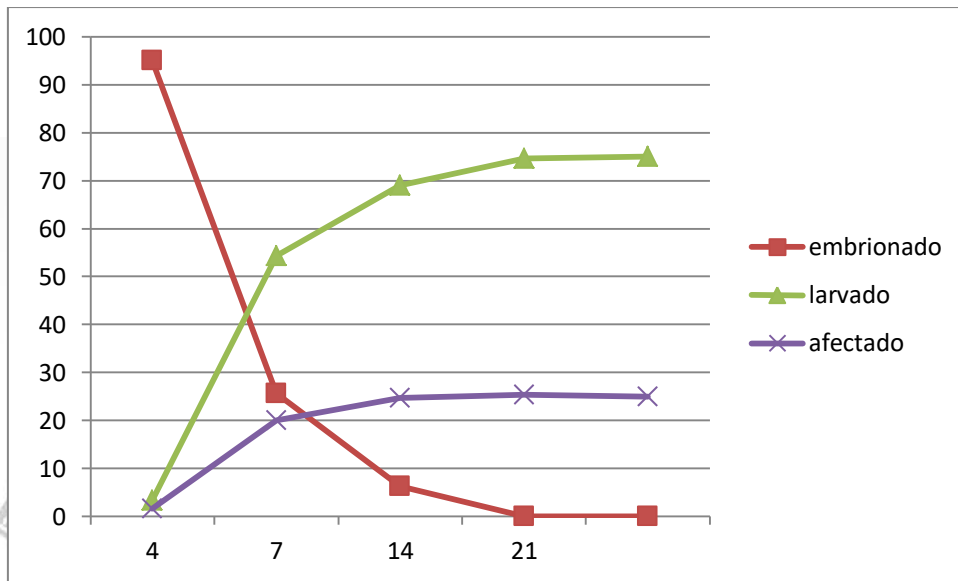
**GRUPO CONTROL.**

En el grupo control los huevos de *T. canis* fueron evolucionando conforme al tiempo que iba transcurriendo y el porcentaje de huevos con alteraciones no fue muy elevado (25 %). Si bien es el grupo control y no debería haber huevos alterados, ese porcentaje significa que no todos los huevos que son depositados en el ambiente son fértiles y están en condiciones de larvar, y siempre existe un porcentaje de huevos que no llegan a ser infectantes.

En el gráfico 1 se puede apreciar cómo evolucionan los huevos en función del tiempo y en la figura 67, se observan sus características normales: la cubierta se mantuvo intacta sin alteraciones morfológicas y las larvas se desarrollaron conforme al paso de los días.

**Gráfico 1.** Desarrollo de los huevos de *Toxocara* en función del tiempo. Grupo control.

<b>Grupo Control</b>			
Día	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
4	95	3	1,7
7	26	54	20
14	6,3	69,0	24,7
21	0,0	74,7	25,3
28	0	75	25



**Fig. 67.** Huevos del grupo control. Se observa la cubierta intacta (flecha roja) y las larvas L2 en su interior (flecha negra). Observación al MO, 40X.



## GRUPOS EXPERIMENTALES.

### **CHRYSOSPORIUM INDICUM**

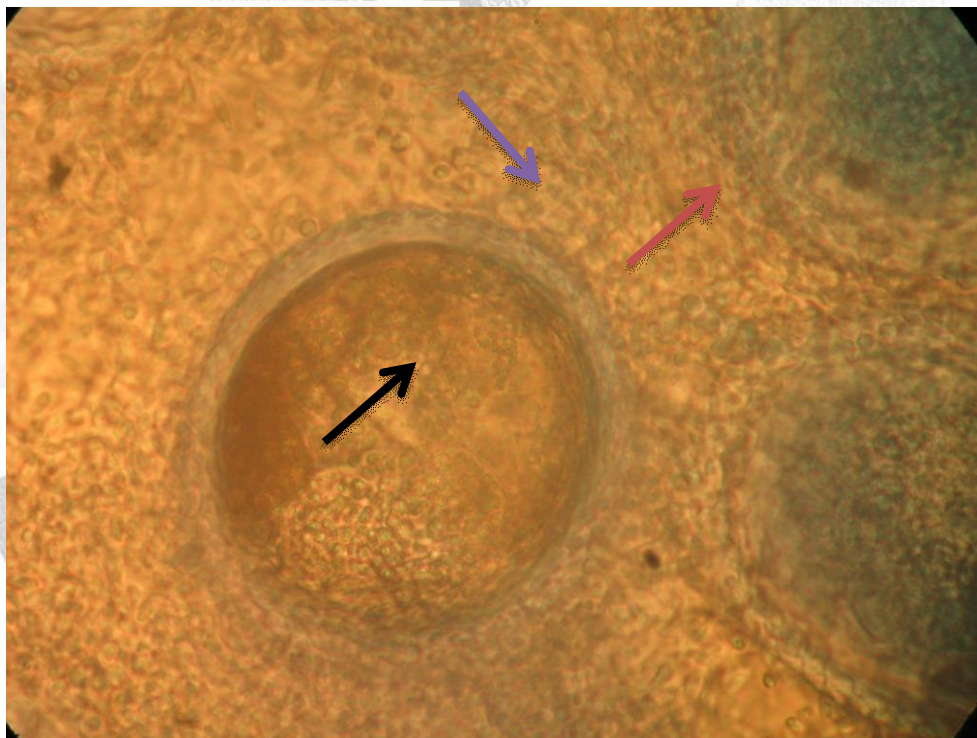
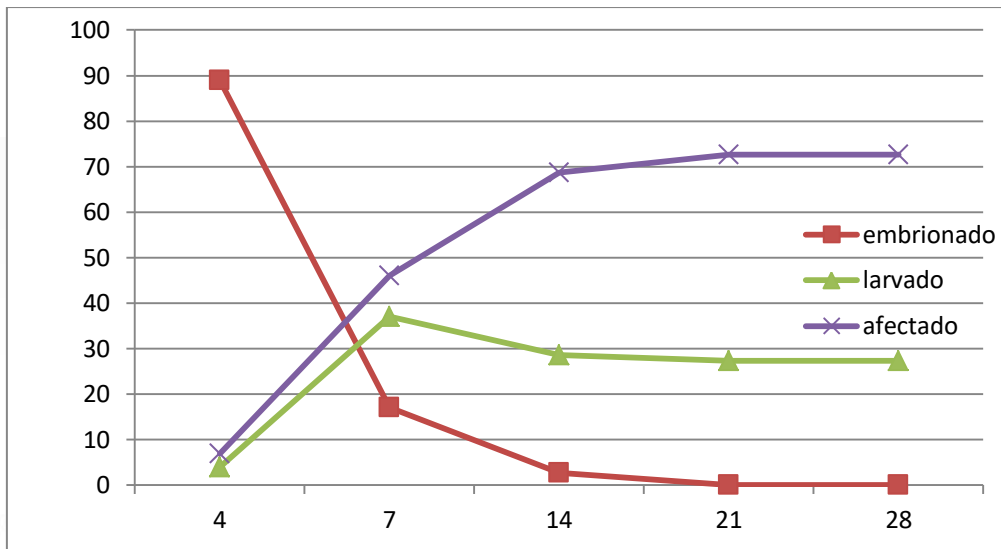
El ensayo de interacción entre huevos de *T. canis* y el hongo saprófito *C. indicum*, reveló que *C. indicum* ejerce una acción mecánica, que es mejor observada a los 21 días de incubación (72,7%) (Gráfico 2).

Este porcentaje de 72,7% de huevos afectados, significa que *C. indicum* tiene un efecto ovicida alto (nivel 4: 50-79% de huevos afectados, según la clasificación propuesta por Ciarmela y expuesta en materiales y métodos).

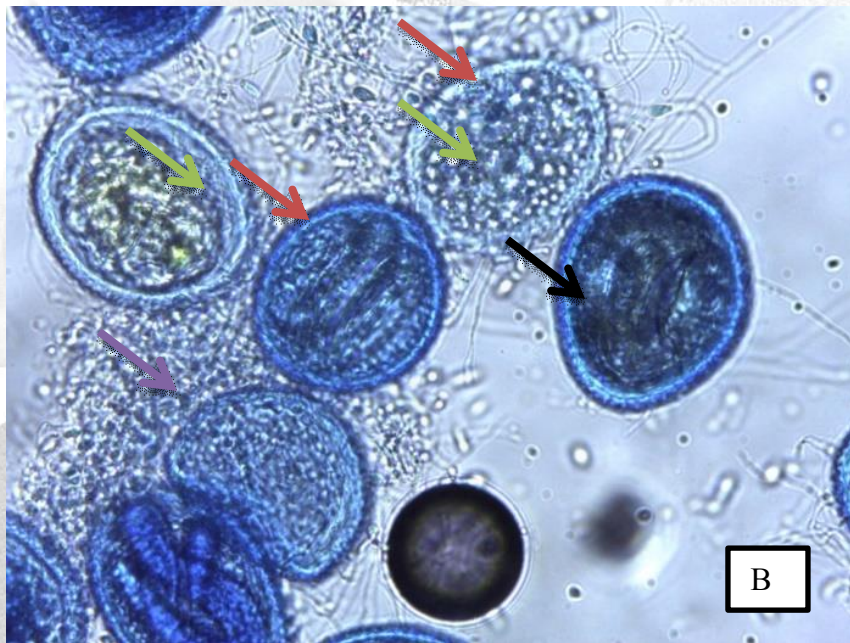
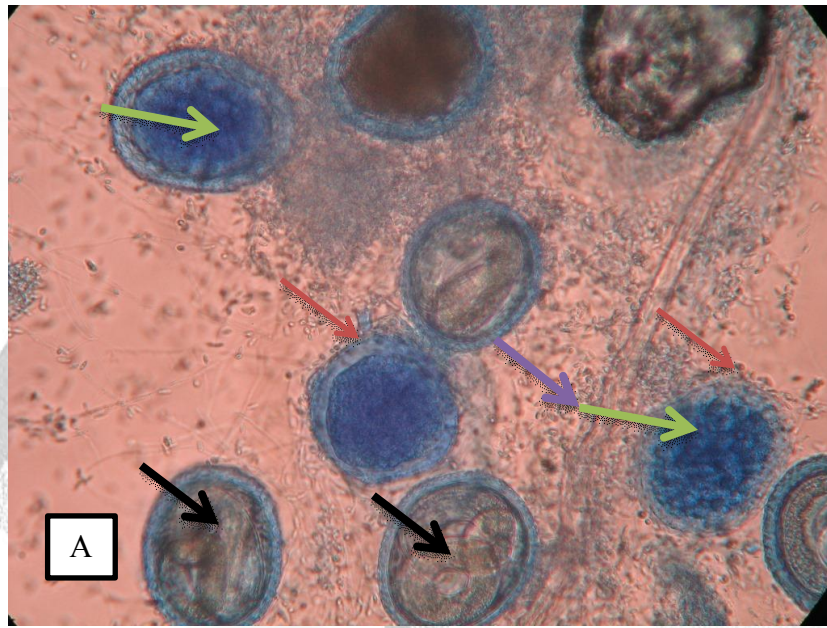
Las interacciones observadas al MO sobre los huevos de *T. canis* fueron: hifas rodeando o penetrando los huevos, cambios en la membrana del huevo, como ser cubierta adelgazada y sin la trama tipo "panal" característica, y larvas vacuoladas (Figuras 68, 69, 70 y 71).

**Gráfico 2.** Desarrollo de los huevos de *Toxocara* en presencia de *Ch. indicum* en función del tiempo.

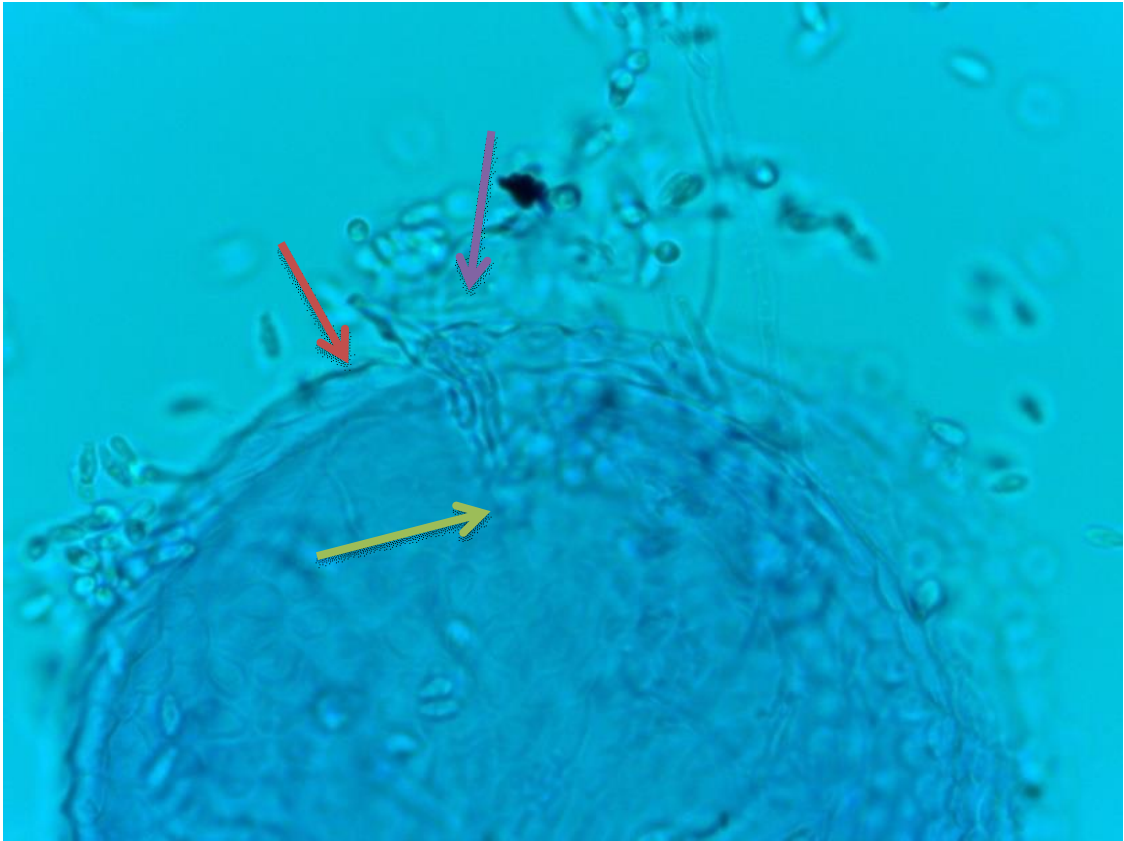
Día	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
4	89	4	7
7	17,0	37	46,0
14	2,7	28,7	68,7
21	0	27,3	72,7
28	0	27,3	72,7



**Fig. 68.** Huevos de *T. canis* en presencia de *C. indicum*. El huevo que se encuentra en el centro se observa la involución del embrión (flecha negra), no alcanzó a pasar al estadio larval. Se observa también la cubierta adelgazada (flecha roja), hifas rodeando los huevos (flecha lila). Día 7. Observación por MO, 1000x.

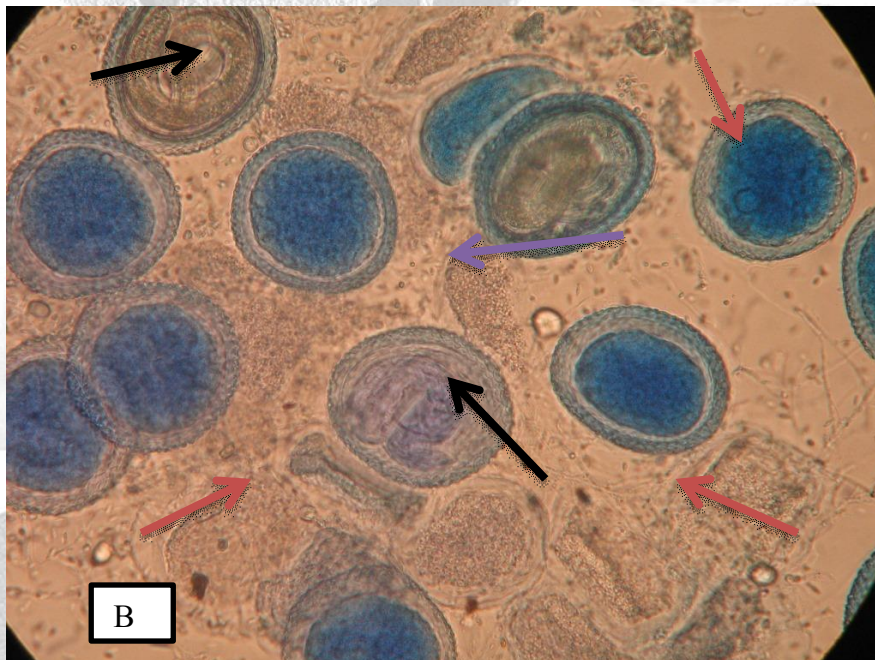
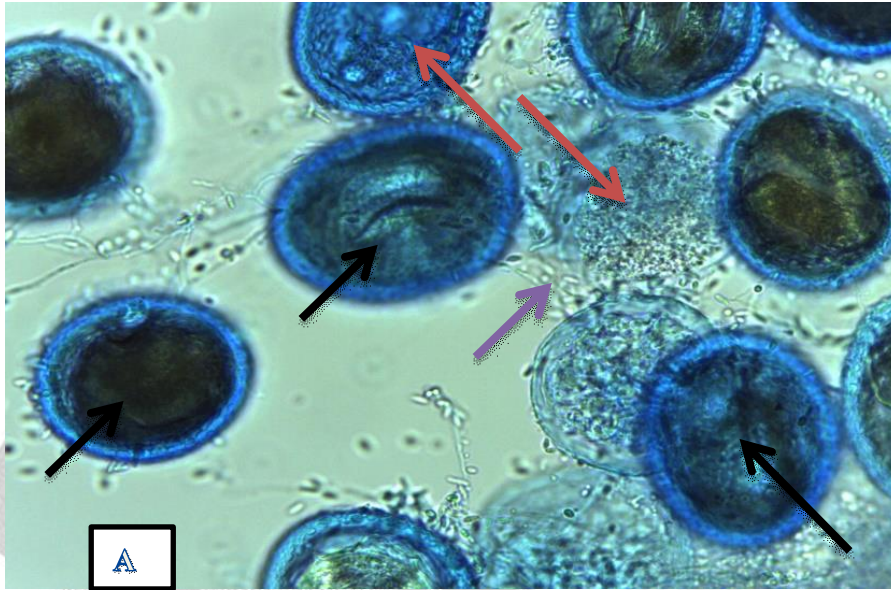


**Fig. 69 a y b.** Huevos de *T. canis* en presencia de *C. indicum*. En los huevos afectados se observa la cubierta adelgazada (flecha roja), hifas rodeando los huevos (flecha lila) y el interior vacuolado (flecha verde). Se observan también huevos larvados intactos (flecha negra). Día 14. Observación por MO, 400x.



**Fig. 70.** Huevos de *T. canis* en presencia de *C. indicum*. Se observa la cubierta adelgazada (flecha roja), hifas rodeando los huevos (flecha lila) y el interior vacuolado y con hifas en su interior (flecha verde). Día 14. Observación por MO, 1000x.





**Fig. 71 a y b.** Observación bajo microscopía óptica: huevo de *T. canis* + *Ch indicum*. En ambas fotografías se observa la red hifal formada (flecha lila), huevos en diferentes estadios de evolución (flecha negra) y huevos alterados (flecha roja). Día 21, 400x.

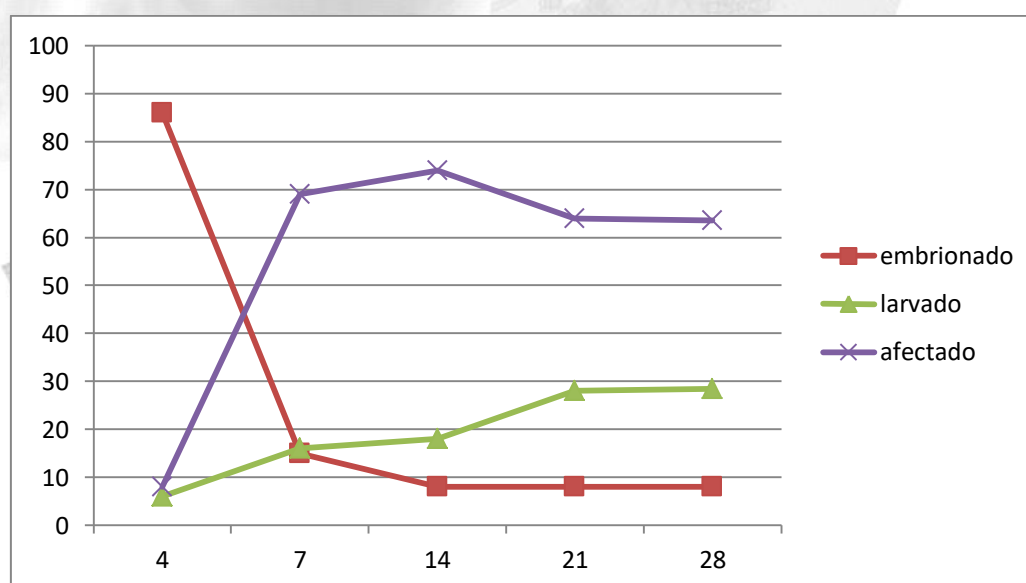
### **CHRYSOSPORIUM KERATINOPHYLUM**

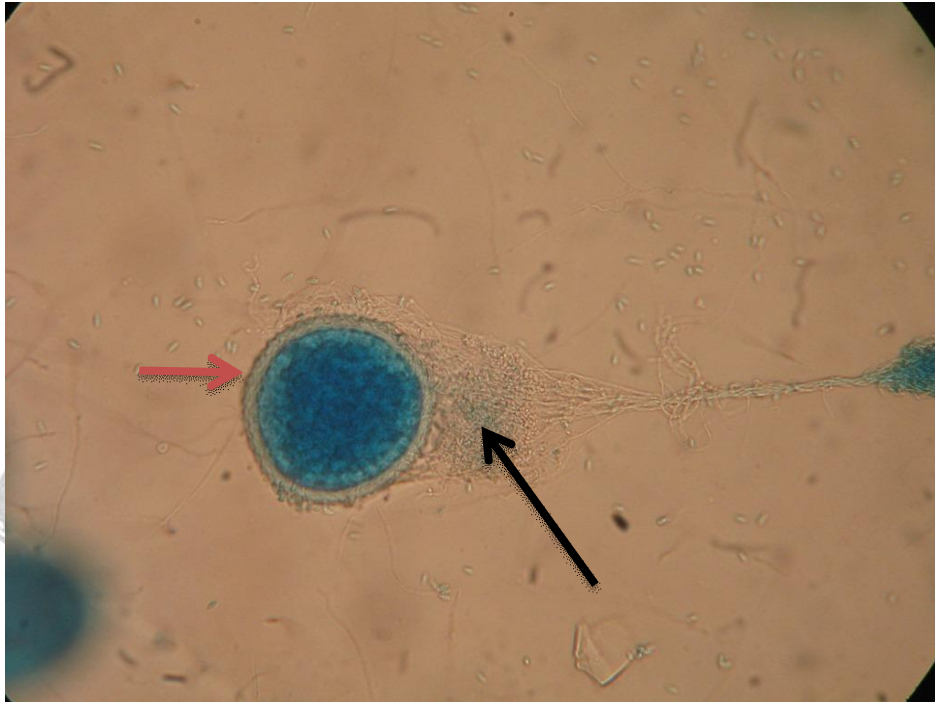
Los ensayos de interacción con *C. keratinophilum*, también revelan una actividad ovicida alta, con un 74 % de huevos afectados (gráfico 3).

La acción de este hongo al MO puede expresarse como: cubierta adelgazada, embrión vacuolado e hifas penetrando y rodeando el huevo (Figura 72, 73 y 74).

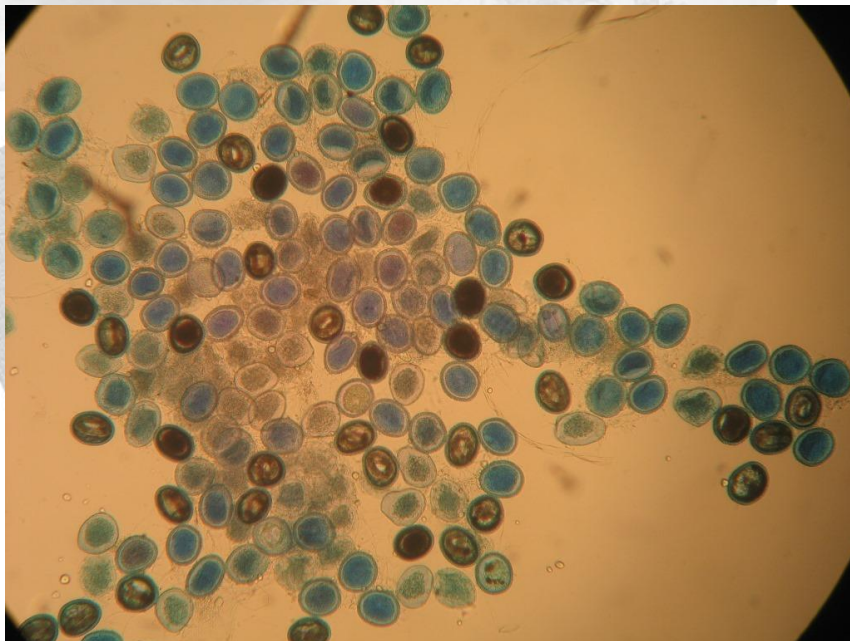
**Gráfico 3.** Desarrollo de los huevos de *Toxocara* en presencia de *Ch. keratyniphilum* en función del tiempo.

Día	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
4	86	6	8
7	15	16	69
14	8	18	74
21	8	28	64
28	8	28,5	63,5

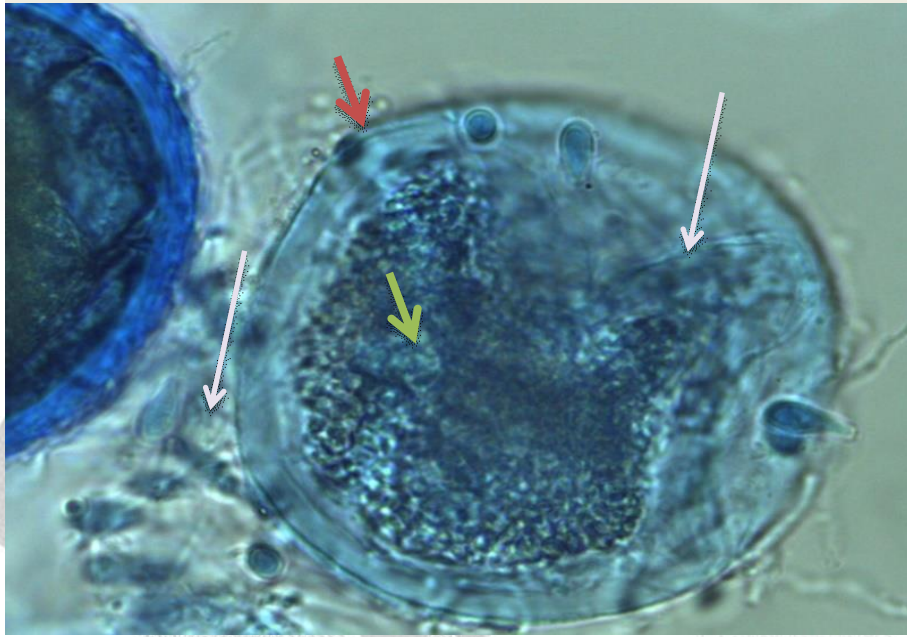




**Fig. 72.** Observese la red hifal de *C. keratinophylum* rodeando el huevo de *T. canis* sin evolucionar (flecha negra) y con la cubierta adelgazada (flecha roja). Día 14. MO. 400x.

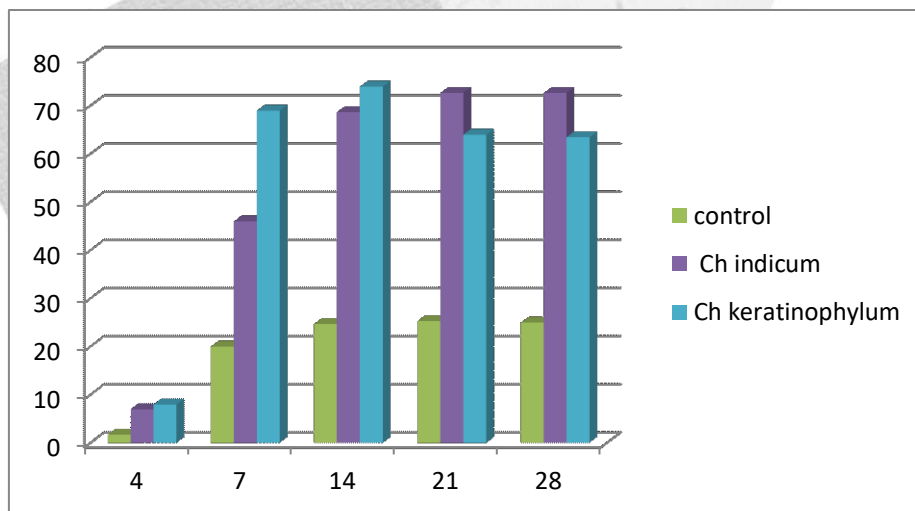


**Fig. 73.** Imagen al MO donde se onservan huevos de *T. canis* inmersos en la red hifal de *C. keratinophylum*. Se observan también los diferentes estadios evolutivos de los huevos junto a los huevos afectados por la acción del hongo. Día 21. 100x.



**Fig. 74.** Observación bajo microscopía óptica: *Ch keratinophylum* + huevo de *T. canis*, día 21, 1000x. Se observa cubierta adelgazada (flecha roja), embrión vacuolado (flecha verde) e hifas penetrando y rodeando el huevo (flecha blanca).

**Gráfico 4.** Comparación de la acción de ambos *Chrysosporium* y el control sobre los huevos de *Toxocara* en función del tiempo de incubación.





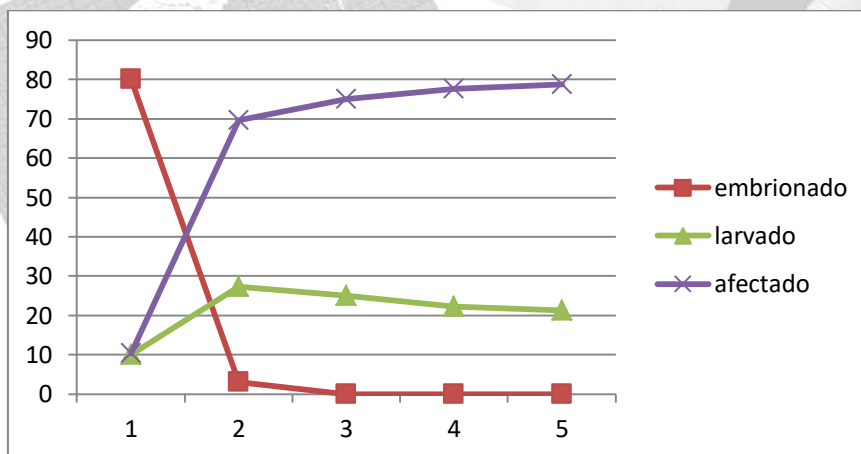
## **CURVULARIA LUNATA.**

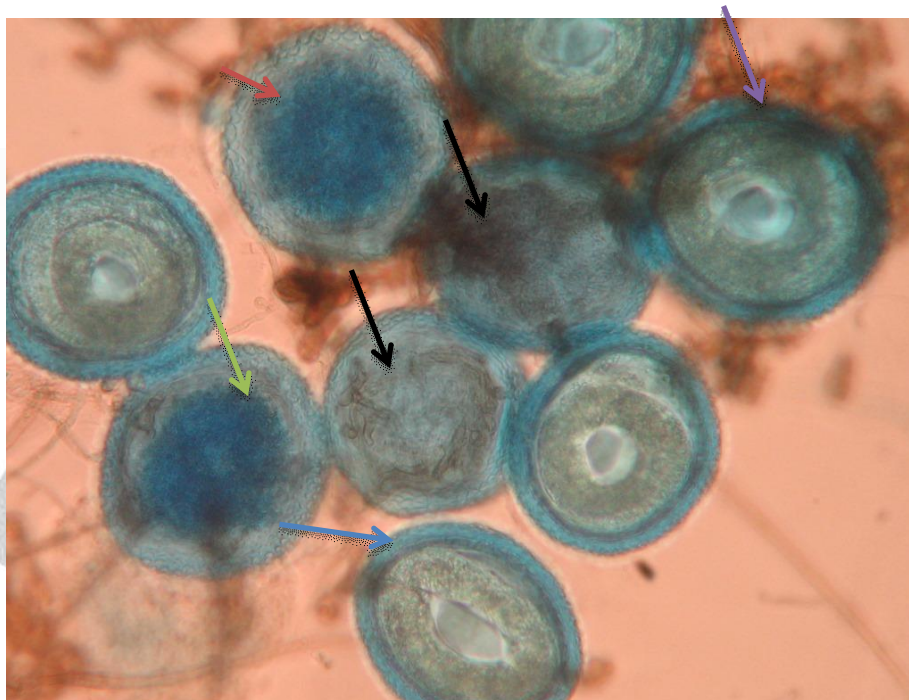
El ensayo de enfrentamiento de huevos de *T. canis* y *C. lunata*, reveló que ésta última afecta a los huevos conforme el paso de los días y su acción va aumentando (gráfico 5).

Se puede decir que su acción ovicida es alta (78,7%, nivel 4), afectando sobre todo el embrión y evitando el desarrollo a larva de estadio 2 (Figura 75, 76 y 77). Se observa también el adelgazamiento de la cubierta con el consiguiente aumento de la permeabilidad. Las hifas pueden penetrar y desarrollarse en el interior del huevo (Figura 78).

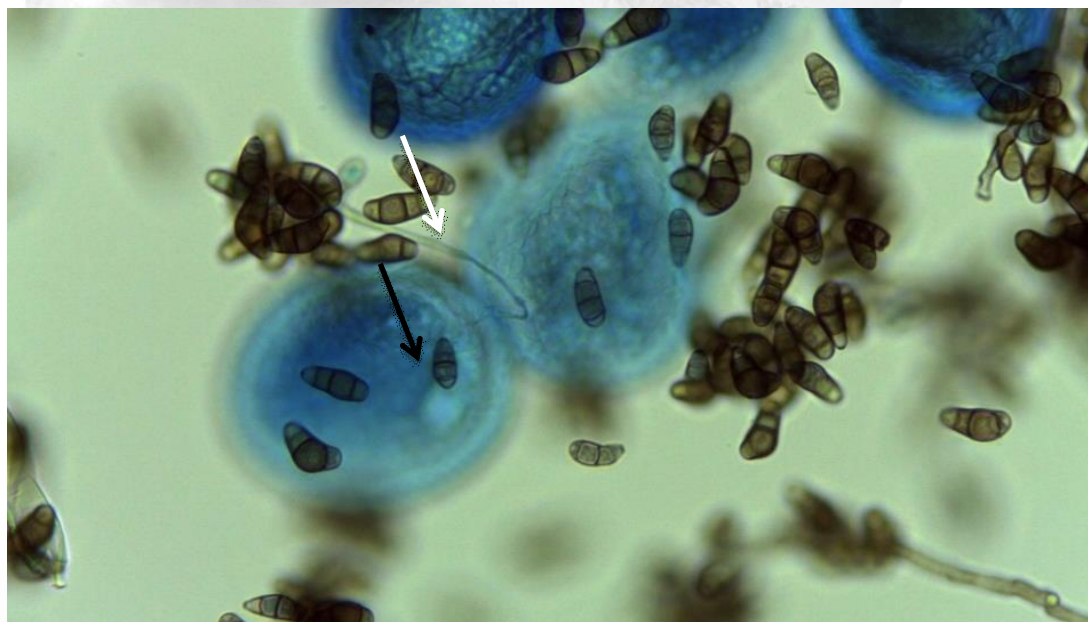
**Gráfico 5.** Desarrollo de los huevos de *Toxocara* en presencia de *C. lunata* en función del tiempo.

Día	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
4	80	10	10,3
7	3	27,3	69,7
14	0	25,0	75,0
21	0	22,3	77,7
28	0	21,3	78,7

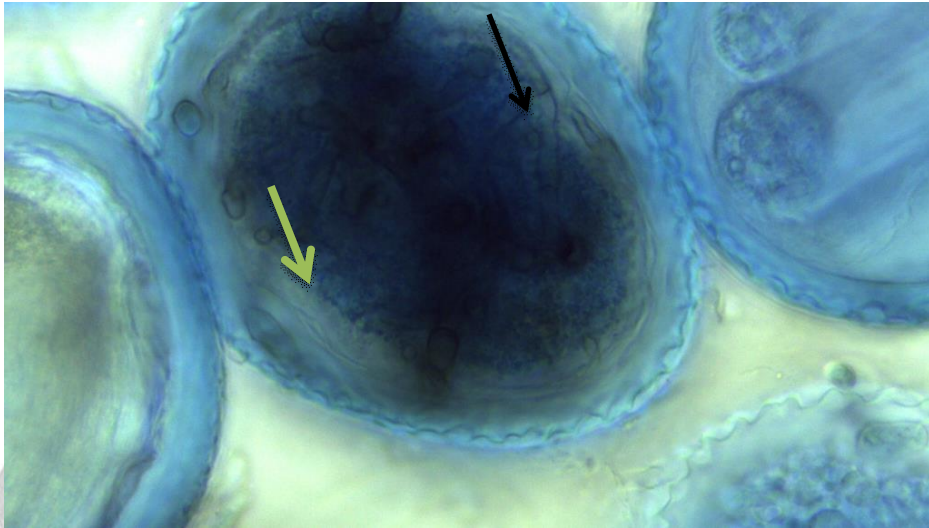




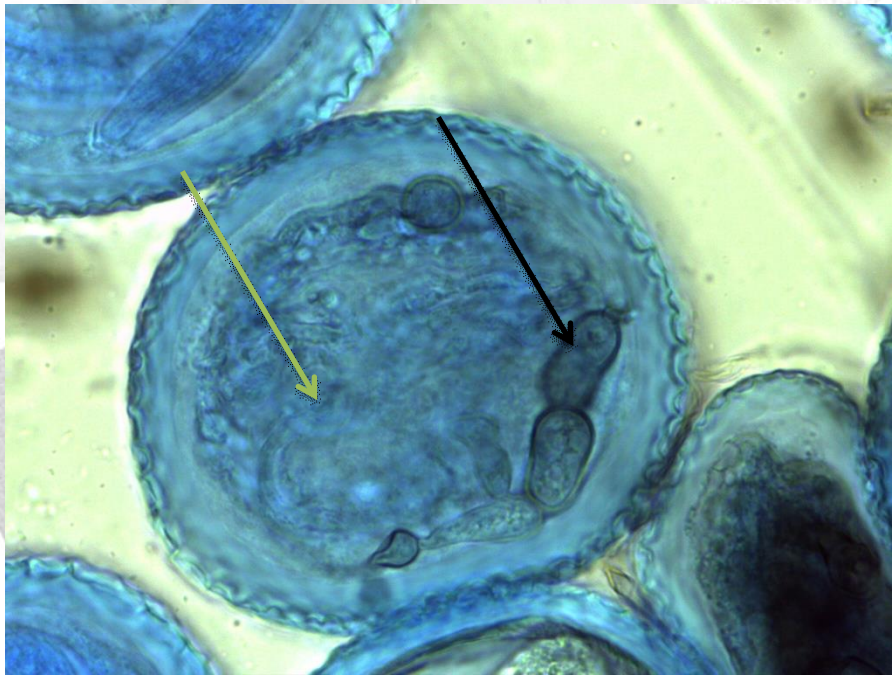
**Fig. 75.** Huevos de *T. canis* en presencia de *C. lunata*. Obsérvese: la cubierta adelgazada (flecha roja), crecimiento hifal en el interior del huevo (flecha negra), hifas rodeando los huevos (flecha lila), larvas vacuoladas (flecha verde), huevos larvados normales (flecha azul). Observación al MO, Día 14. 400x.



**Fig. 76.** Huevos de *T. canis* en presencia de *C. lunata*. Obsérvese el crecimiento hifal hacia el exterior (flecha blanca) pero el micelio vegetativo en el interior del huevo (flecha negra). Observación al MO, día 14. 400x.



**Fig. 77.** Huevos de *T. canis* en presencia de *C. lunata*. Obsérvese: el crecimiento hifal en el interior del huevo (flecha negra), y la vacuolización del contenido (flecha verde). Observación al MO, Día 21. 1000x.



**Fig. 78.** Huevos de *T. canis* en presencia de *C. lunata*. Obsérvese: el crecimiento hifal en el interior del huevo (flecha negra), y la vacuolización del contenido (flecha verde). Observación al MO, D+ía 21. 1000x.

## TRICHOPHYTON AJELLOI

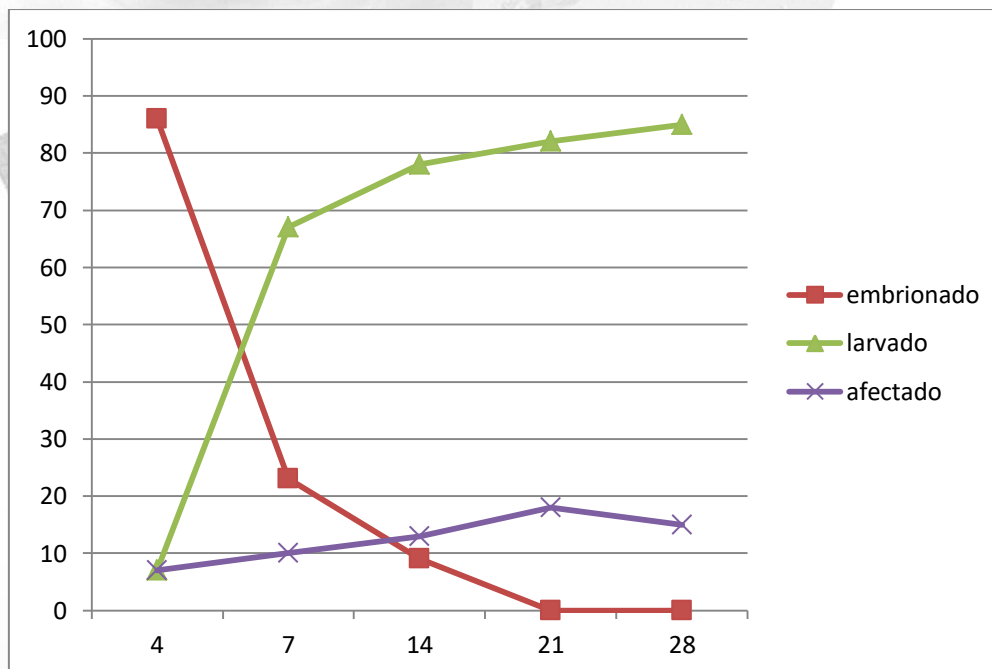
La elección de *T. ajelloi* para los ensayos de interacción se debió a que es un hongo descrito como excelente entomopatógeno, o sea que, si puede degradar la membrana de quitina de los insectos, es probable que degrade la cubierta de quitina de los huevos de nematodos.

Los ensayos de interacción revelaron que, si bien afecta y utiliza al huevo de *T. canis* como alimento, lo hace en muy bajo porcentaje, 18%, por lo que tiene actividad ovicida baja (nivel 2: entre 15 y 20% de afectación) (Gráfico 6).

En las figuras 79 y 80 se observan las alteraciones que produce en el huevo.

**Gráfico 6.** Desarrollo de los huevos de *Toxocara* en presencia de *T. ajelloi* en función del tiempo.

Día	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
4	86	7	7
7	23	67	10
14	9	78	13
21	0	82	18
28	0	85	15





**Fig. 79.** Huevos de *T. canis* en presencia de *T. ajelloi*. Obsérvese: la cubierta adelgazada (flecha roja), el crecimiento hifal en el interior del huevo (flecha negra), y la vacuolización del contenido (flecha verde). Observación al MO, día 14. 400x.



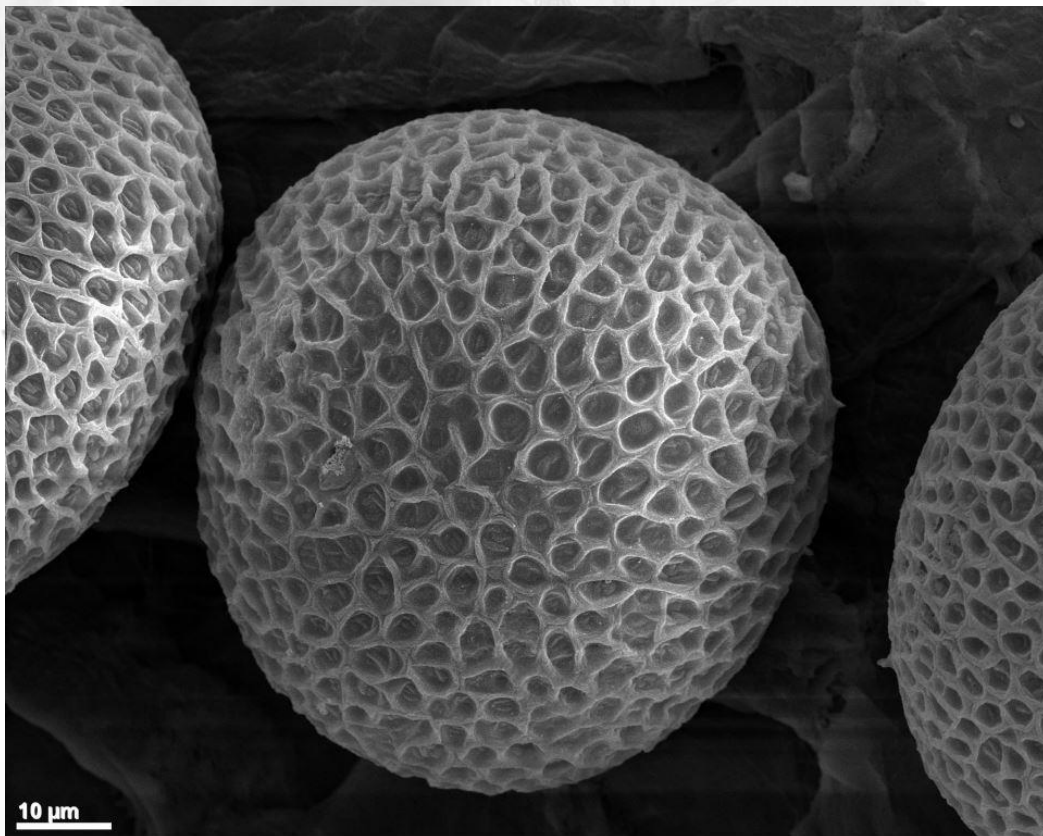
**Fig. 80.** Huevos de *T. canis* en presencia de *T. ajelloi*. Obsérvese: la cubierta adelgazada (flecha roja), el crecimiento hifal en el interior del huevo (flecha negra), y la vacuolización del contenido (flecha verde). Observación al MO, día 21. 1000x.

## 2. c. Resultados de la interacción hongo-huevo de *T. canis* por MEB.

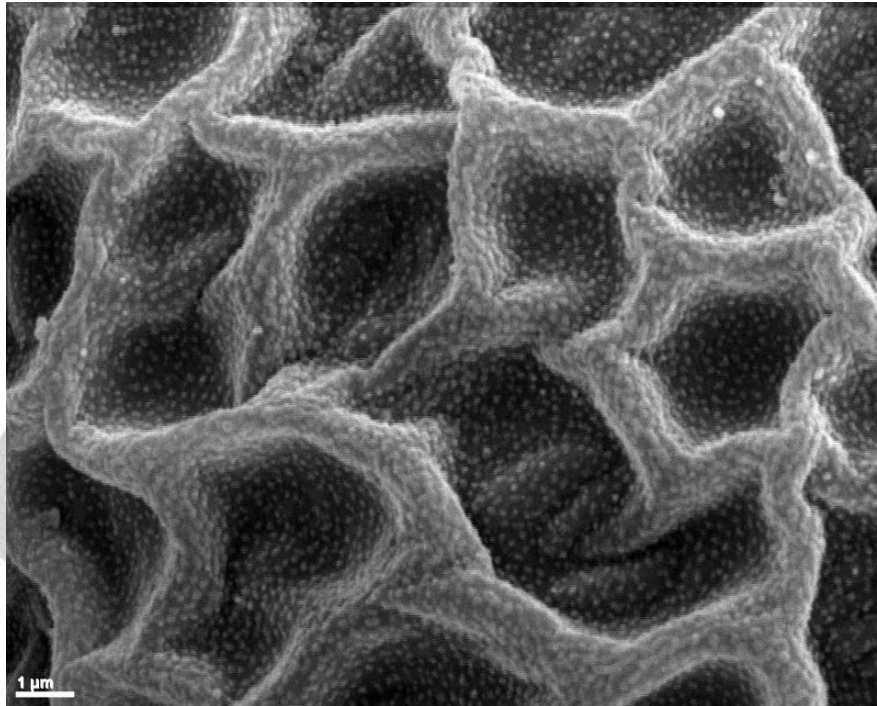
La Microscopía Electrónica de Barrido corroboró las observaciones realizadas a través del microscopio óptico de los diferentes enfrentamientos. Al ser un instrumento que permite observar en detalle las características superficiales de los huevos, sus resultados son más contundentes y mejor observables. Las interacciones fueron clasificadas según Lýsek<sup>49</sup>, en efecto tipo 1, 2 y 3.

El efecto de los hongos sobre los huevos fue evaluado de acuerdo a las alteraciones observadas sobre los huevos de *T. canis*, ellas son: hifas rodeando los huevos y en el interior de los mismos, *appresorios* penetrando la cubierta, y cambios en la membrana característica del huevo.

Los huevos del **grupo control** mostraron un desarrollo normal, sin alteraciones morfológicas y la cubierta se mantuvo intacta exhibiendo su superficie foseada característica (Figuras 81 y 82).



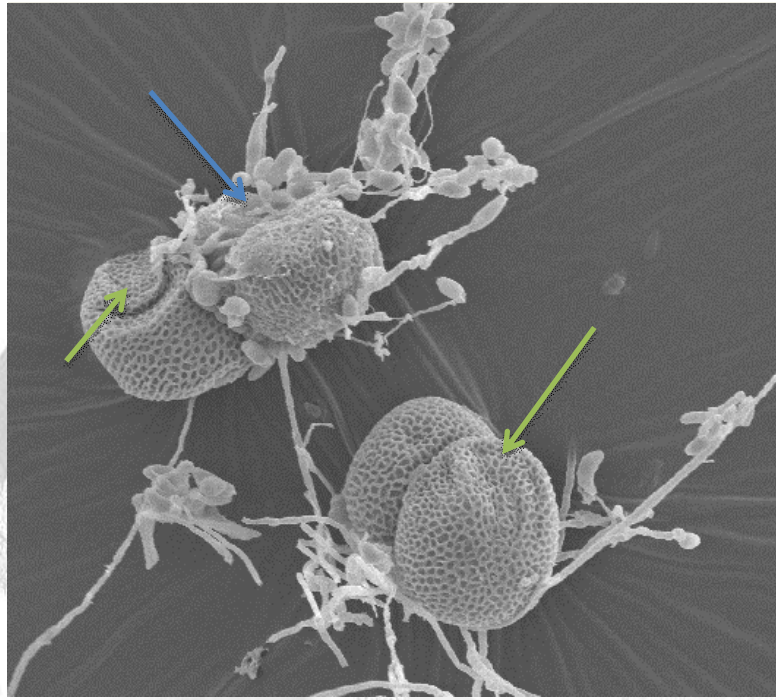
**Fig. 81.** Huevo control día 14, x1100. Obsérvese la característica cubierta en panel de abeja o "foseada" de los huevos de *Toxocara*.



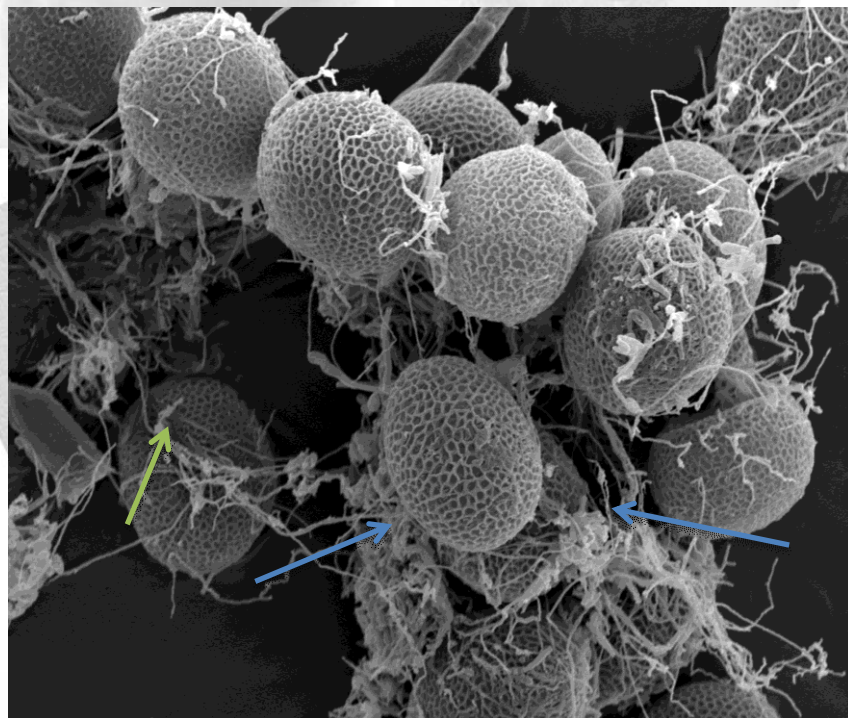
**Fig. 82.** Huevos de *T. canis*, Control, día 14, x8000, superficie aumentada de tamaño. Obsérvese la característica estructura foseada.

### **Grupos experimentales.**

En contraste con el grupo control, los huevos de *T. canis* sometidos a los ensayos de interacción con ambas especies de *Chrysosporium*, *indicum* y *keratynophilum*, fueron observados encerrados en una red hifal (Figuras 83 y 84) desde el día 7 de incubación y al mismo tiempo aparecen los órganos de penetración, apresorios, que finalmente dirigen la entrada del hongo al interior del huevo (Figuras 85 y 86).



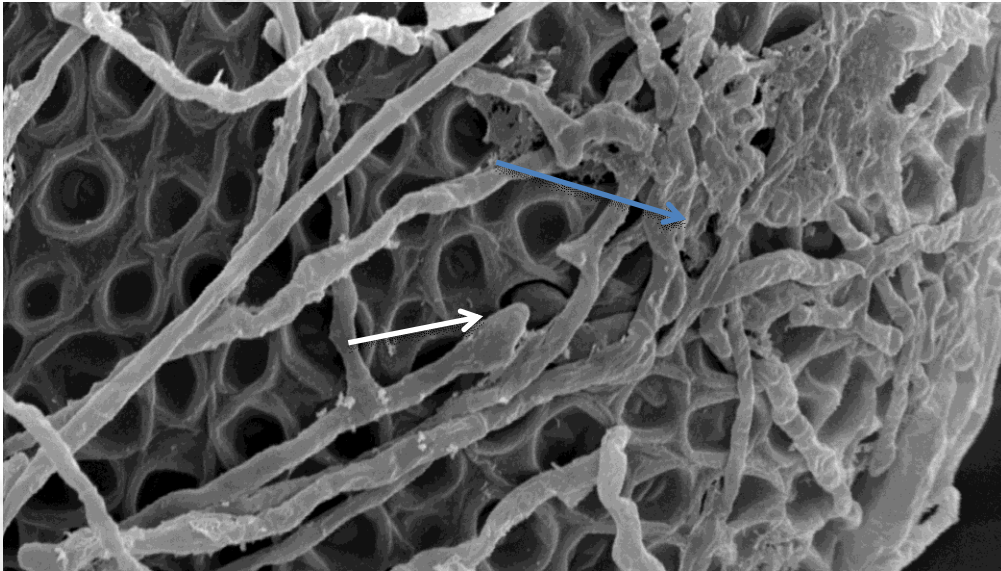
**Fig. 83.** Huevos de *T. canis* en presencia de *Ch. indicum*, x350. Se puede observar la red hifal rodeando los huevos (flecha azul) y la consumición de los mismos por efecto del hongo en su interior (flecha verde).



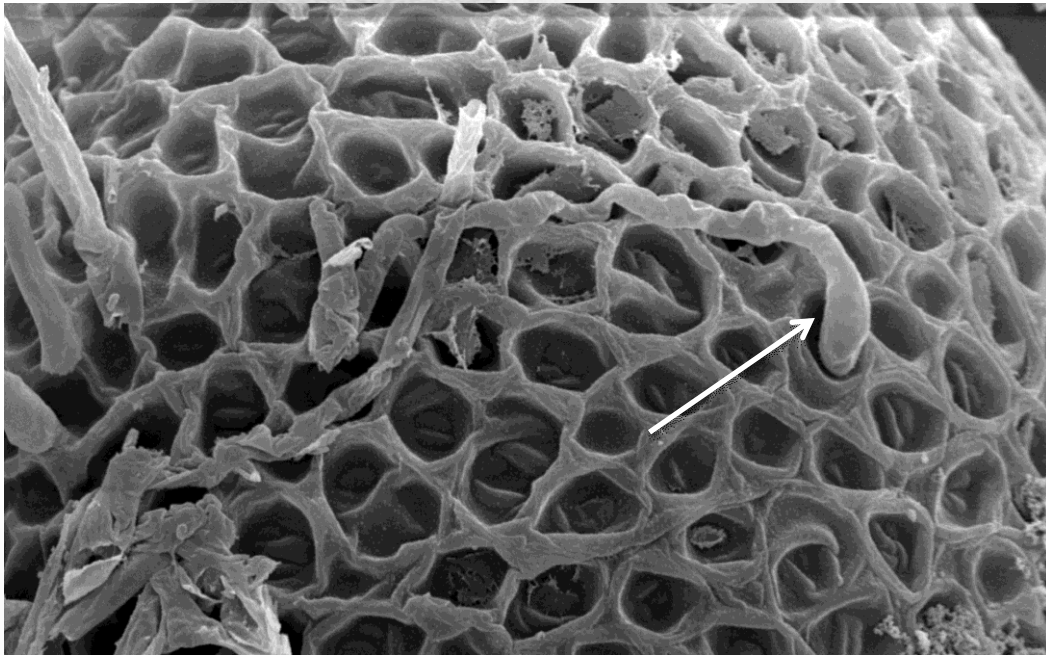
**Fig. 84.** Huevos de *T. canis* en presencia de *Ch. keratinophylum* x320. Se puede observar la red hifal rodeando los huevos (flecha azul) y la consumición de los mismos por efecto del hongo en su interior (flecha verde).



La formación de la red alrededor del huevo provoca que esa "cáscara" se vaya transformando en una membrana más delgada, suave y fina, y permite que el órgano de penetración (*apresorio*) que se va formando logre su objetivo que es atravesar la cubierta (Figura 85 y 86).

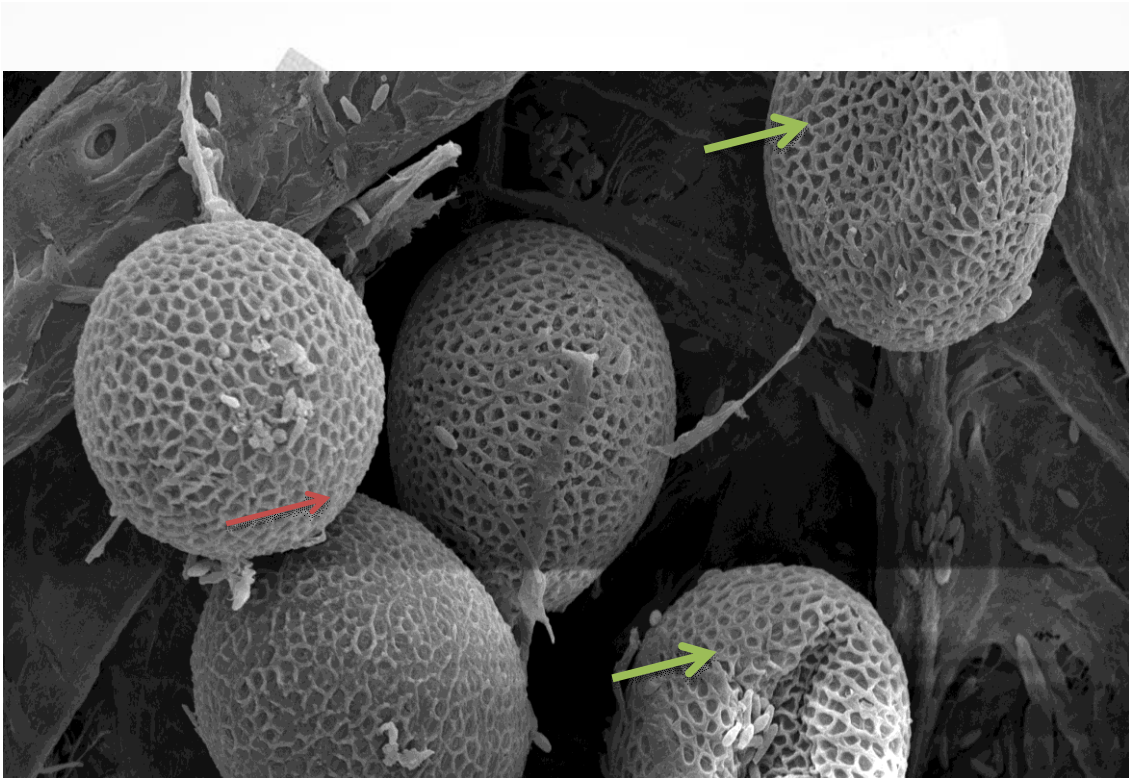


**Fig. 85.** *Ch keratinophilum* x2500, formando un *apresorio* sobre la cubierta del huevo de *T. canis* (flecha blanca), y la red hifal sobre el mismo (flecha azul).



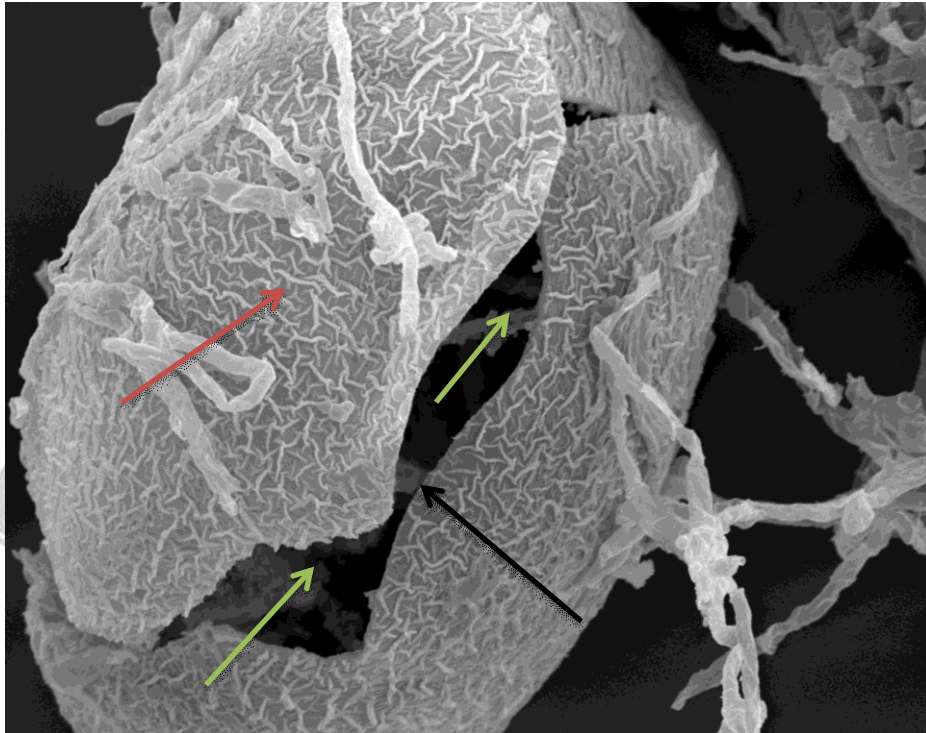
**Fig. 86.** *Ch keratinophilum* x2500. Se observa "*apresorio*" penetrando la cubierta (flecha blanca).

Se producen cambios marcados en la cubierta de los huevos una vez que las hifas se ponen en contacto y consecuentemente afectan al embrión (Figura 87).

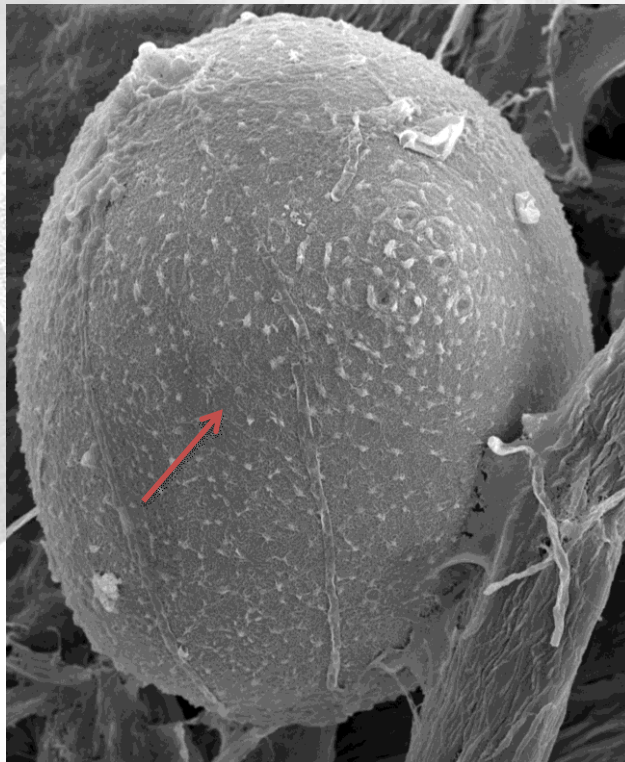


**Fig. 87.** Huevos de *T. canis* en presencia de *Ch. indicum*, x500. Se puede observar la consumisión de los huevos por efecto del hongo en su interior (flecha verde) y la cubierta adelgazada (flecha roja).

La observación de la hifa en el interior del huevo solo es posible cuando, por efecto de la preparación del material para ser observado por MEB, la cubierta se rompe y se observa el interior (Figura 88), ya que de otra manera no sería posible.



**Fig. 88.** *Ch keratinophylum* x1400. 14 días de incubación. Obsérvese las alteraciones de la cubierta (flecha roja), la presencia del micelio en el interior (flecha verde) con la consiguiente consumición del embrión, y la ruptura del huevo (flecha negra).

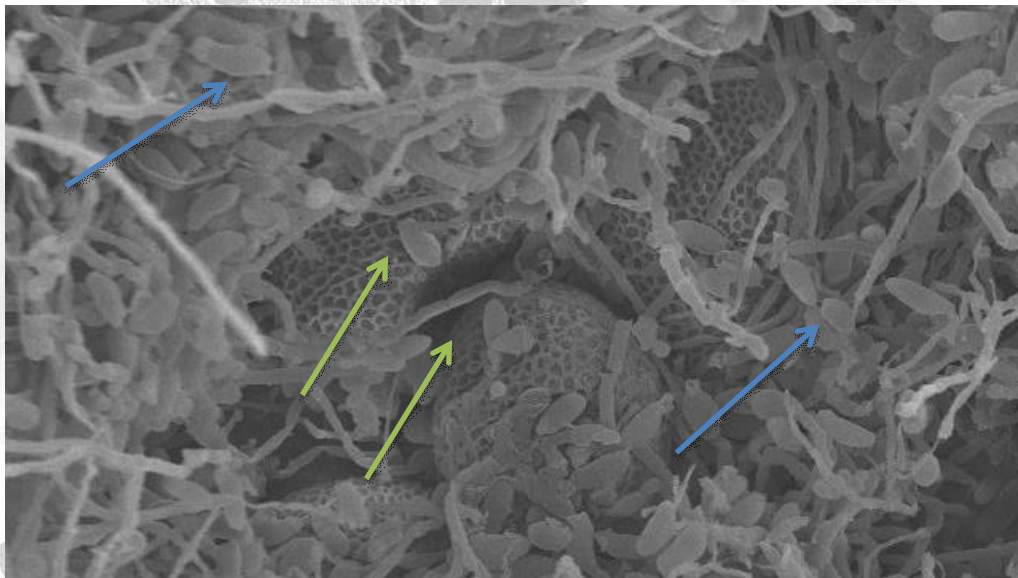


**Fig. 89.** *Ch keratinophylum* x1100. Obsérvese como a los 28 días de incubación del huevo en presencia del hongo, la cubierta pierde totalmente su característica estructura foseada (flecha roja).

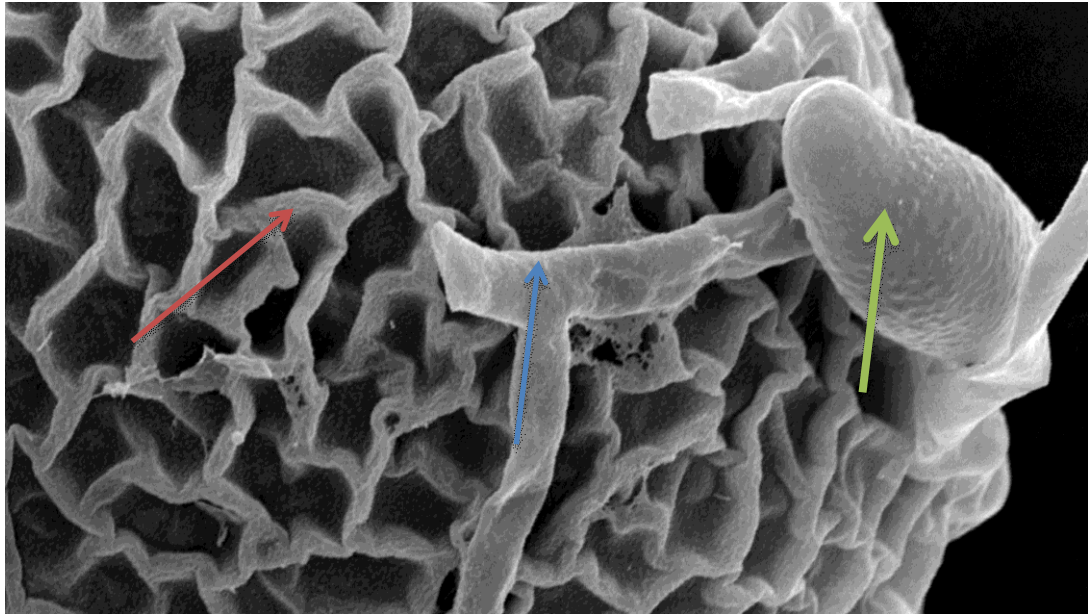
De acuerdo a la clasificación de Lýsek tomada de referencia, para los hongos *Ch. indicum* y *C. keratinophilum* prevalece el efecto Tipo 3, que incluye las hifas penetrando los huevos y las alteraciones tanto en la cubierta como en el interior del huevo afectando también al embrión.

*Curvularia lunata* ejerce también efecto tipo 3, ya que afecta la cubierta de los huevos, penetra y coloniza el interior, provocando el no desarrollo a larva infectante de los huevos de *T. canis*.

En la figura 90, se puede observar la red hifal abundante que forma *C. lunata*.

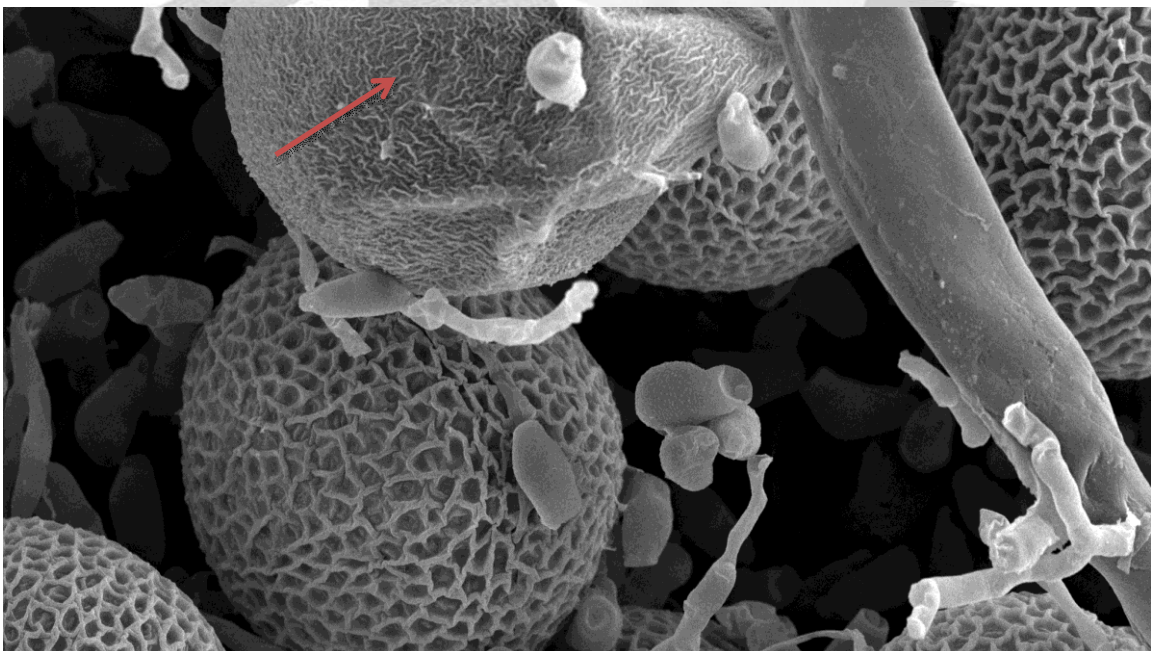


**Fig. 90.** Desarrollo de la red hifal de *C. lunata* (flecha azul) sobre los huevos de *T. canis* con la consiguiente consumición de su interior (flecha verde). Día 14. x 1500.



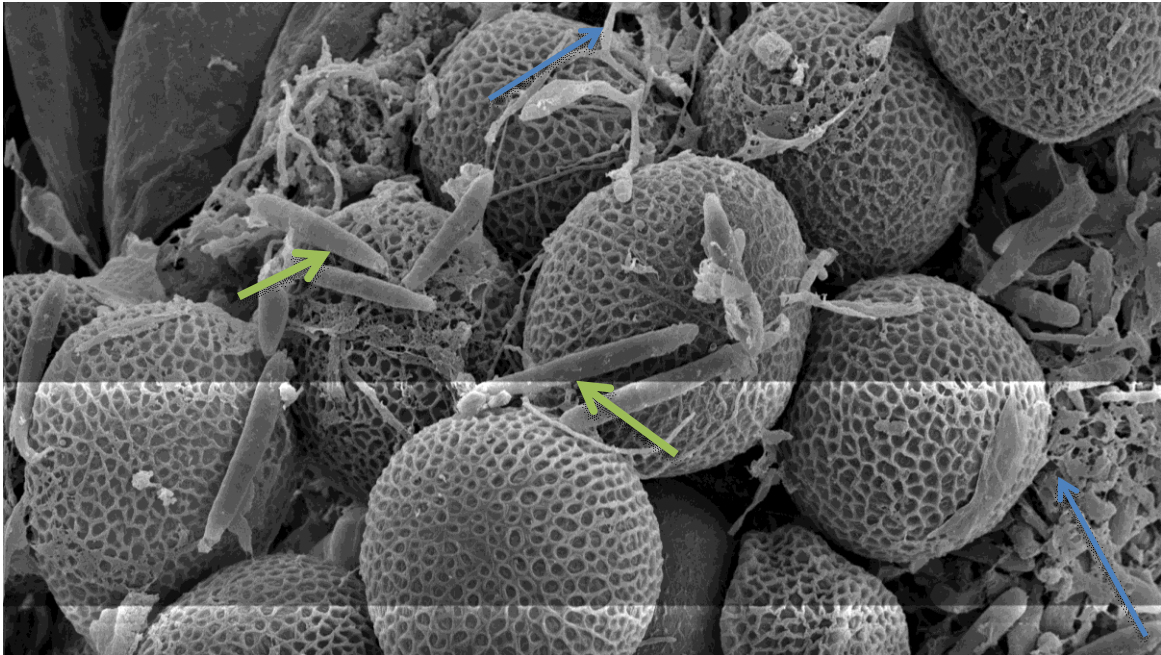
**Fig. 91.** *C. lunata* x2500. Día 21. Se observa su conidia (flecha verde) y las hifas rodeando el huevo (flecha azul) cuya cubierta ya cambió sus características (flecha roja).

Para los 28 días de incubación, *C. lunata* provoca un cambio drástico en las características de la cubierta, acción que comparte con las cepas de *Chrysosporium* ensayadas (figura 92).

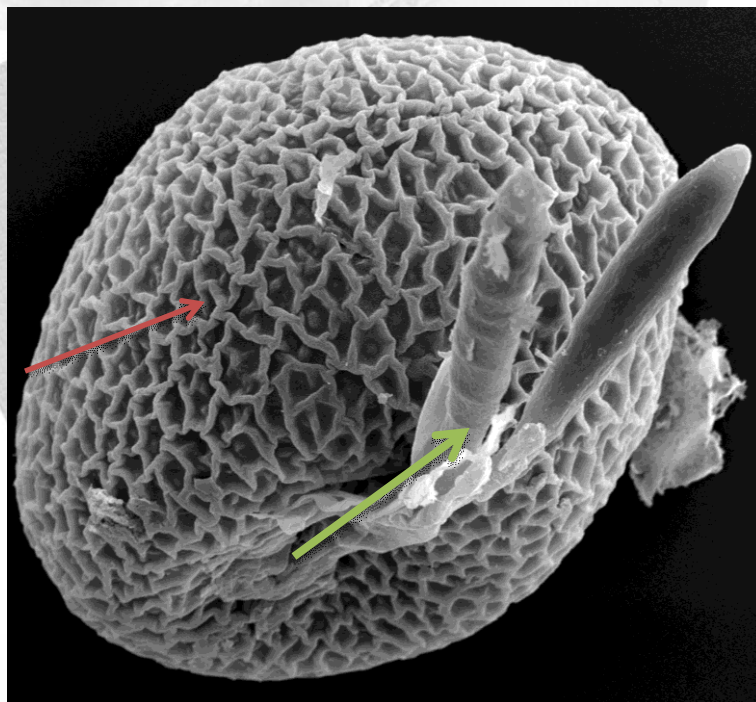


**Fig. 92.** *C. lunata* x700. Cambio total de la morfología de la cubierta del huevo de *T. canis* (flecha roja). Día 28.

Para *Trychophyton ajelloi* el efecto es también tipo 3, pero no tan marcado como en los otros dos géneros fúngicos ensayados, y su efecto es, sobre todo, la penetración de la cubierta y alteración del embrión (Figuras 93 y 94).



**Fig. 93.** Huevos de *T. canis* en presencia de *T. ajelloi*, x440. Se puede observar la red hifal (flecha azul) y las conidias sobre los huevos (flecha verde).



**Fig. 94.** Huevo de *T. canis* en presencia de *T. ajelloi*, x1100. Obsérvese como las conidias emergen del interior del huevo (flecha verde), cuya integridad y cubierta se ven afectadas por el hongo que penetró y colonizó el embrión (flecha roja).

### 3. Determinar la acción enzimática extracelular de los hongos con actividad ovicida.

#### 3. a. Resultados del "screening enzimático" por cultivo en medio sólido.

Debido a las características de crecimiento de los hongos filamentosos, determinar la presencia o no de enzimas utilizando cultivo en medio sólido no es algo acertado y su utilidad a los efectos de los objetivos del ensayo es prácticamente nula. No obstante esto, estos resultados permitieron ver el perfil enzimático de las cepas ensayadas.

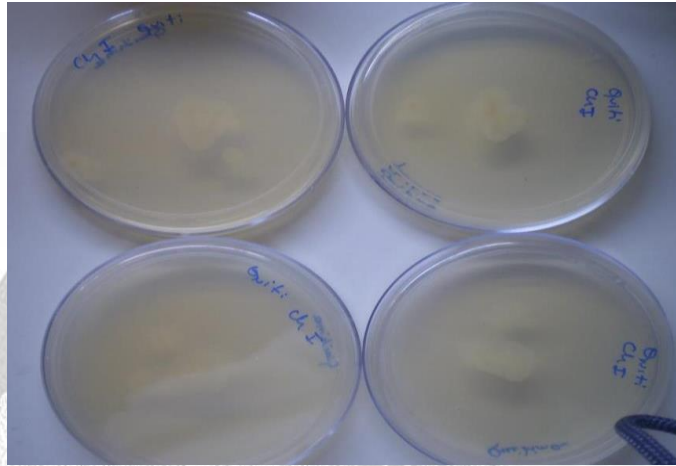
De todos los ensayos y repeticiones realizados para medir la actividad enzimática, solo en muy pocos casos fueron resultados que pudieron ser leídos y promediados satisfactoriamente. En la tabla 8 se presentan los valores promedio de los halos de actividad.

**Tabla 8:** Grado de actividad enzimática para cada hongo y para cada sustrato, al día 14 de incubación.

Actividad testada	Medio de cultivo	<i>Ch. indicum</i>	<i>Ch. keratinophylum</i>	<i>C. lunata</i> **	<i>T. ajelloi</i>
Quitinolítica	Quitina coloidal 2%	0	0	0	0
Proteolítica	Caseína	4	3	1	2
	Gelatina	3	4	2	2
Lipolítica	Tween 80	4	3	3	0

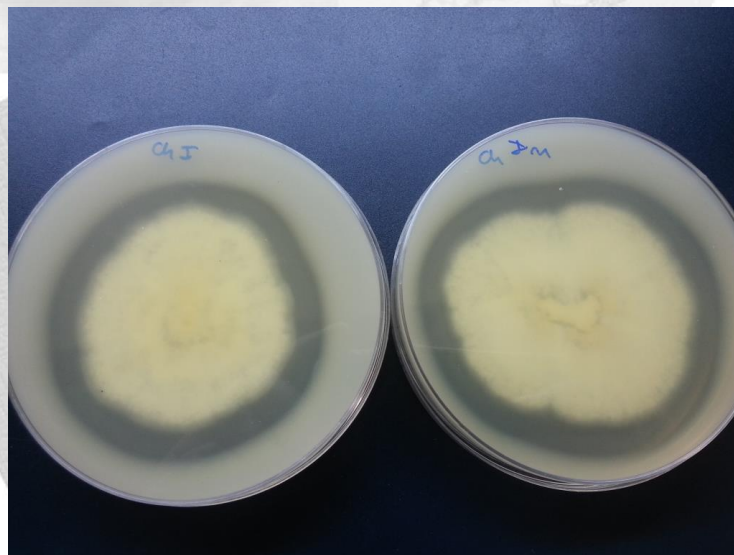
\*\*colonia muy grande

Como se puede observar en la tabla, la actividad quitinolítica no pudo ser determinada por este *screening* enzimático, ya que no se pudieron observar halos de hidrólisis. Ejemplo de esto se observa en la Figura 95.



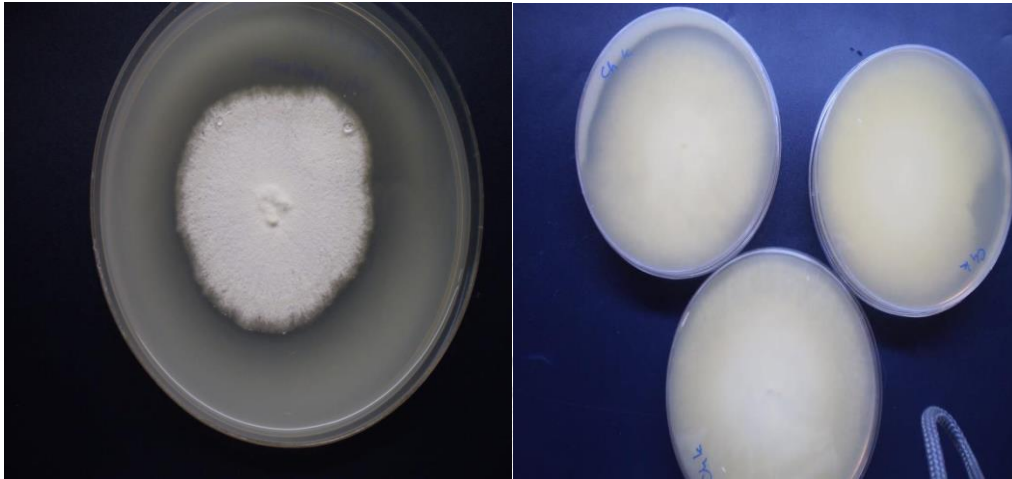
**Fig. 95.** *Ch. indicum* en medio de quitina coloidal al 2%. No se observa halo de hidrólisis de quitina.

La actividad proteolítica fue considerada positiva en aquellos casos en los que se observaba un halo transparente alrededor de la colonia (Figuras 96, 97, 98 y 99), lo que es indicativo de la degradación del sustrato por el hongo. Para esta actividad fueron ensayados dos medios, uno con caseína o leche descremada y otro con gelatina.

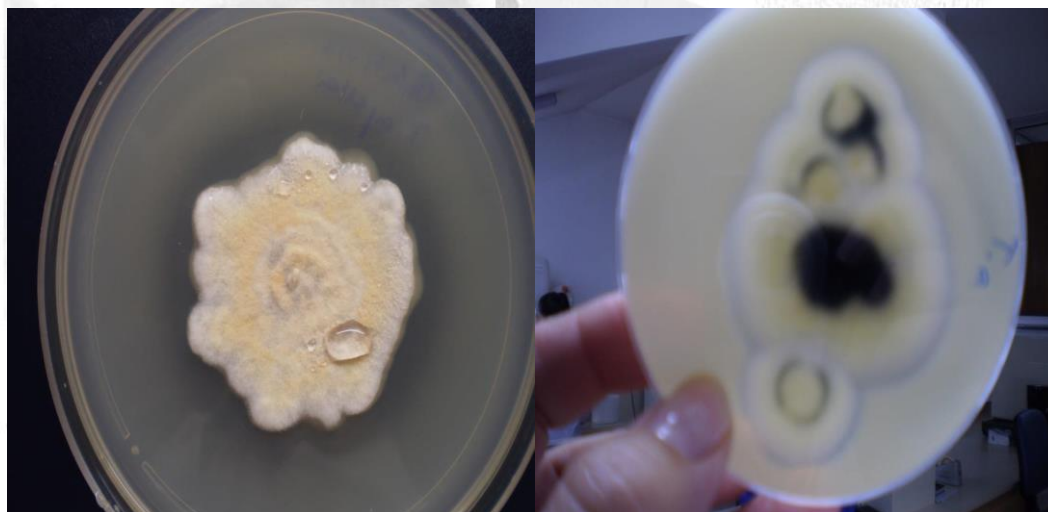


**Fig. 96.** Medio de caseína y 14 días de crecimiento del hongo. Se puede observar el halo transparente alrededor de la colonia de *Ch. indicum*, indicativo de actividad de proteasa

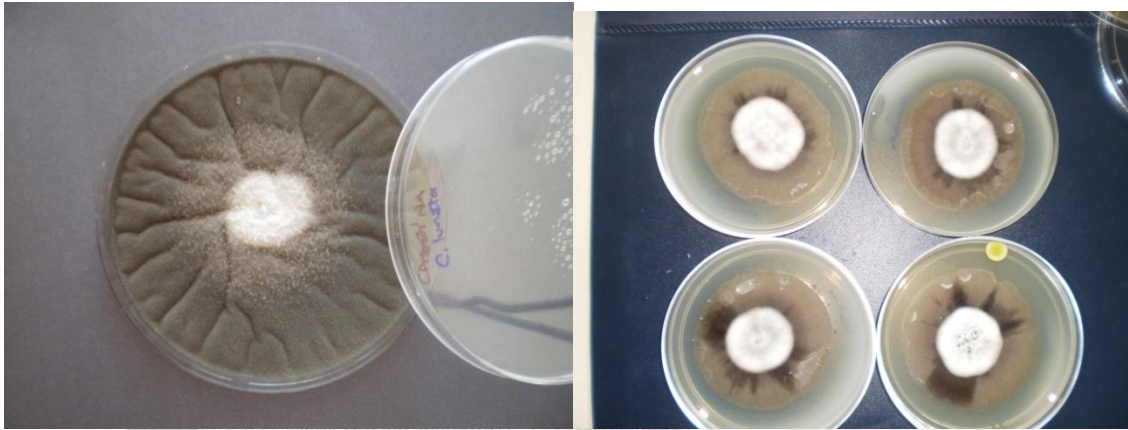




**Fig. 97.** *Ch. keratinophilum* en cultivo sólido. A la izquierda se observa el halo de hidrólisis de gelatina, en tanto que a la derecha se aprecia el halo de hidrólisis de caseína.

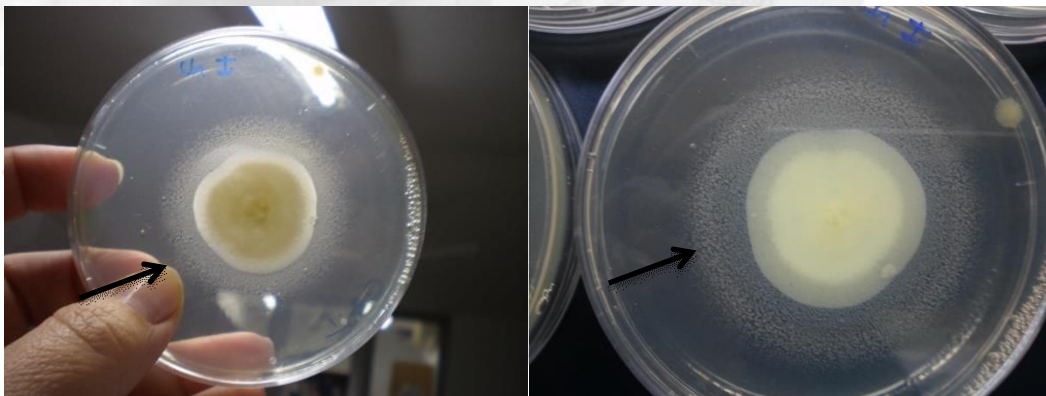


**Fig. 98.** *T. ajelloi*, hidrólisis de gelatina (izquierda) y de caseína (derecha). Obsérvese aunque pequeños, los halos de hidrólisis para ambos sustratos.

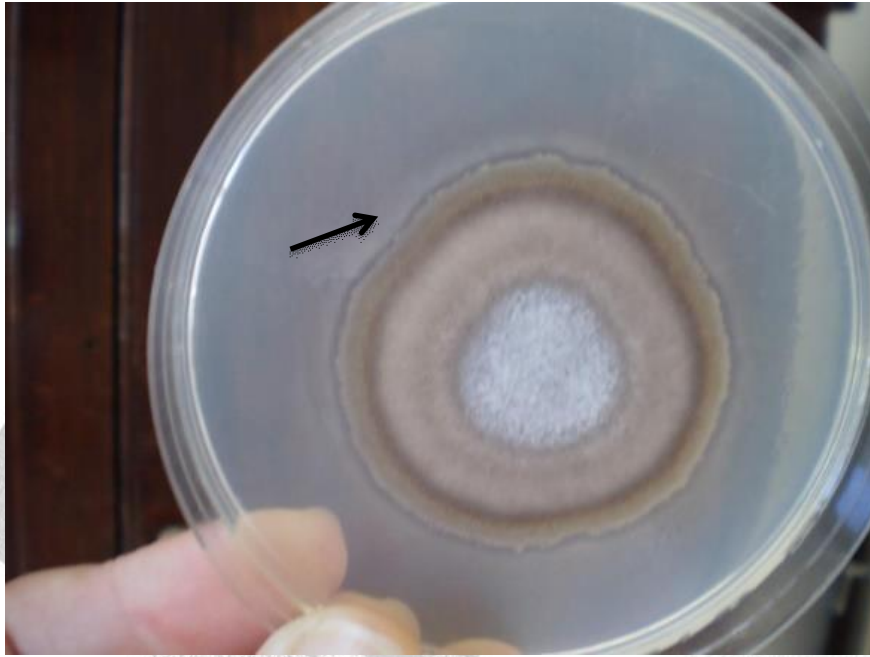


**Fig. 99.** *C. lunata*, hidrólisis de caseína (izquierda), gelatina (derecha). La lectura del halo de hidrólisis de caseína se vio dificultada por el tamaño de las colonias a los 14 días de incubación. El halo de hidrólisis de gelatina pudo ser leído normalmente.

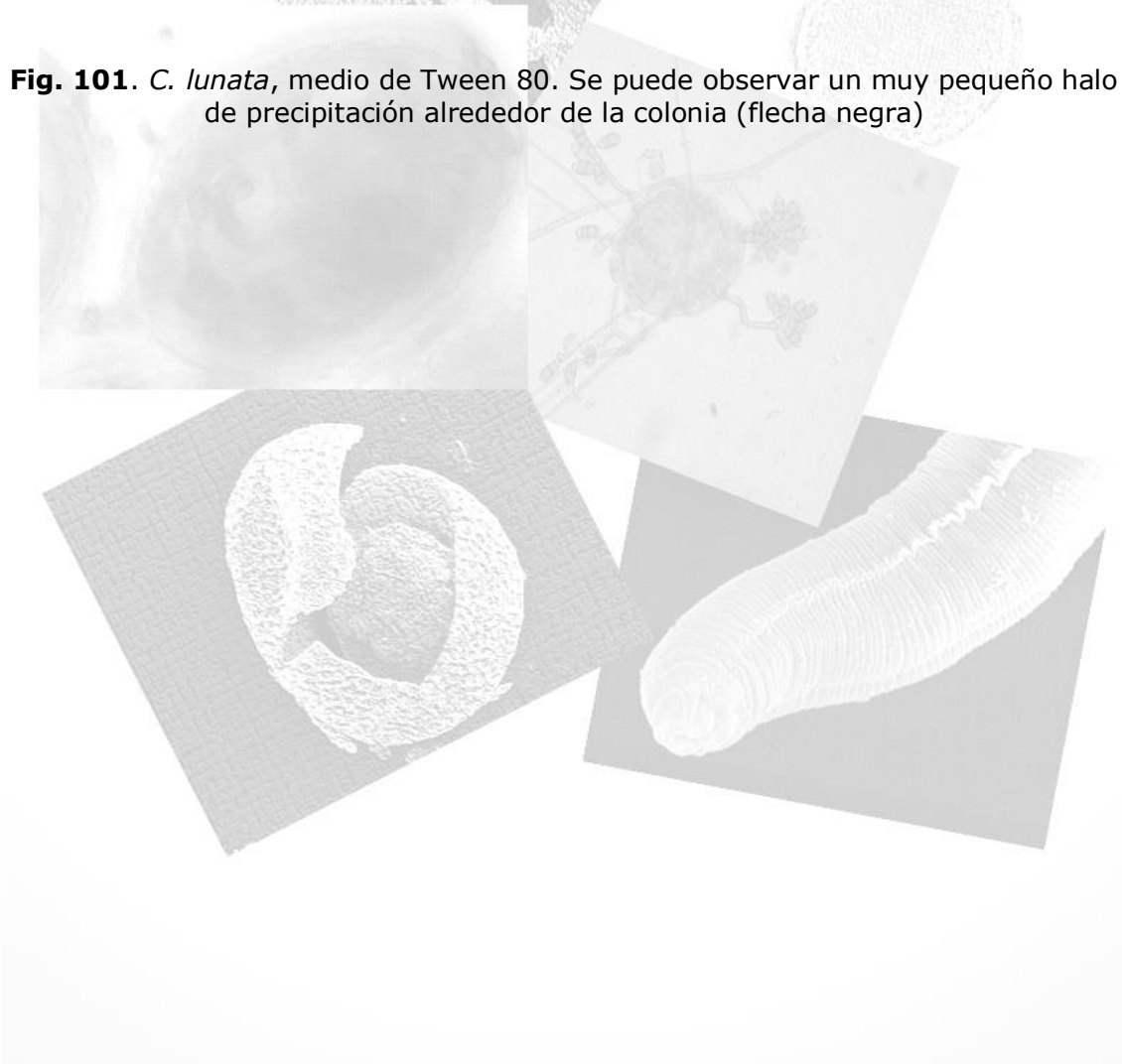
La actividad lipolítica fue observada mediante el halo de precipitación (Figuras 100 y 101) cuando el Tween 80 es hidrolizado por el hongo y se liberan los ácidos grasos que en combinación con el cloruro de Calcio precipitan.



**Fig. 100.** *Ch indicum*, medio de Tween 80. Obsérvese el halo de precipitación alrededor de la colonia (flecha negra)



**Fig. 101.** *C. lunata*, medio de Tween 80. Se puede observar un muy pequeño halo de precipitación alrededor de la colonia (flecha negra)



### 3 b. Producción de extracto enzimático crudo a partir de cultivos líquidos de los hongos.

El desarrollo en medios de cultivo líquido es una técnica mucho más efectiva para la determinación y obtención de enzimas a partir del crecimiento de cualquier tipo de microorganismos. En el ensayo que nos convoca, el crecimiento de los hongos en medio líquido es también engorroso, ya que los mismos necesitan oxígeno constante y su desarrollo en cierta forma es lento y por consiguiente dable de contaminación.

Fueron obtenidos tres extractos crudos para cada hongo ensayado y cuyas concentraciones de proteínas se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9:** Concentraciones proteicas de los diferentes extractos, determinadas por Bradford.

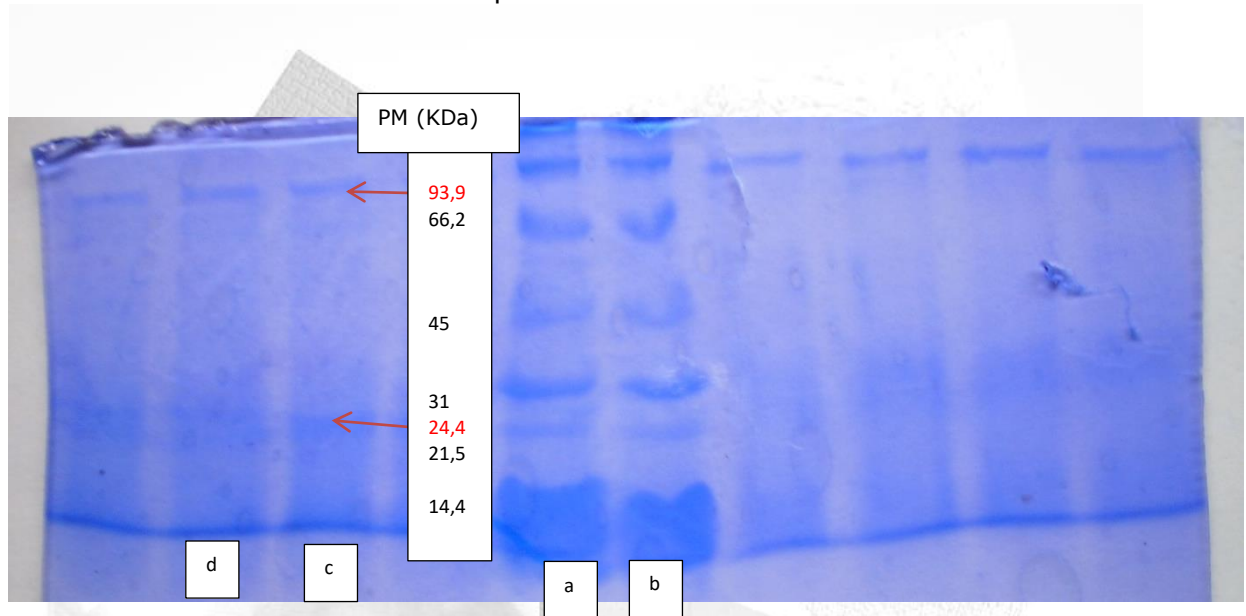
Hongo	Quitinasas ( $\mu\text{g/ml}$ )		Proteasas ( $\mu\text{g/ml}$ )
	Con extracto de levadura	Sin extracto de levadura	
<i>Ch indicum</i>	47	<1	240
<i>Ch keratinophylum</i>	25,8	<1	804
<i>C lunata</i>	39,6	<1	414
<i>T ajelloi</i>	38,2	<1	218

Los valores de proteínas  $<1 \mu\text{g/ml}$  para los extractos de quitinasas cuando el cultivo se realizó sin extracto de levadura, indica que no hubo producción suficiente de enzimas. Esto puede deberse a que los hongos no pudieron crecer en condiciones nutricionales tan mínimas y sería coincidente con el "screening" enzimático en placa, donde no se observa halo de hidrólisis y existe un crecimiento deficiente del hongo en el medio de quitina coloidal (Figura 86).

Los valores de proteínas de quitinasa con extracto de levadura y de proteasas son aceptables de análisis por SDS-Page.

Se realizó la corrida electroforética del extracto crudo de *Ch indicum*, ya que fue el que tenía mayor concentración de proteínas ( $47 \mu\text{g/ml}$ ). Dicho extracto mostró un

patrón de bandas en el que se podían identificar claramente dos componentes con pesos moleculares de 24 KDa y 94 KDa, compatible con quitinasas (Figura 102). En las calles del centro el marcador de peso molecular.



**Fig. 102.** Corrida electroforética en gel de poliacrilamida. Calles a y b (centro) el marcador de peso molecular, calles c y d extracto crudo de quitinasa de *C. indicum*. A en el centro del gráfico obsérvense los pesos moleculares. En rojo los pesos de la bandas de quitinasa.

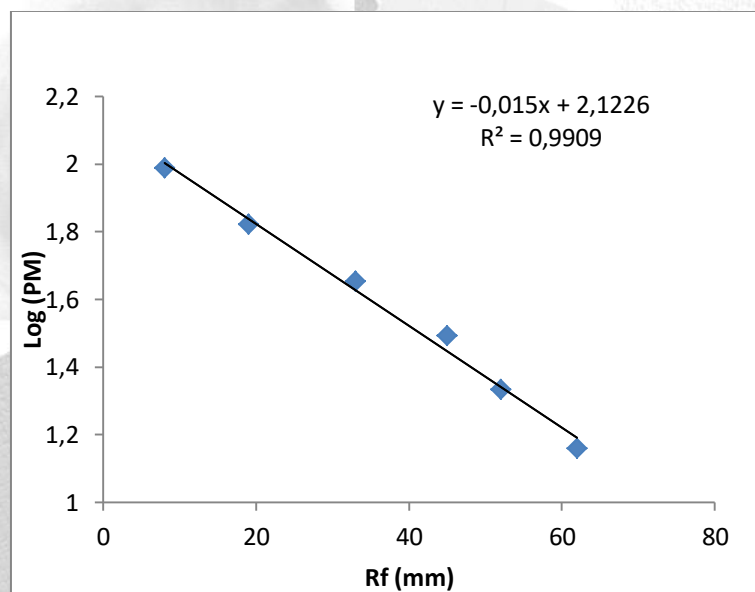
Los pesos moleculares de las bandas fueron estimados mediante el empleo de marcadores de peso molecular. Cuando las proteínas son desnaturalizadas por calor en presencia de un exceso de SDS y 2-mercaptoetanol, la mayoría de los polipéptidos se unen al SDS en una relación de masa constante tal, que adquieren idéntica densidad de carga y migran en geles de poliacrilamida de acuerdo a su tamaño. Bajo estas condiciones, un gráfico del  $\log_{10}$  del peso molecular del polipéptido vs. la movilidad relativa (Rf) revela una relación lineal (Gráfico 7).

Si se incluye en la corrida electroforética un set de polipéptidos marcadores de peso molecular conocido, a partir de la distancia de migración de cada polipéptido se puede construir una curva estándar. De esta curva se pueden obtener los pesos moleculares de los polipéptidos que migraron bajo las mismas condiciones <sup>174</sup> (Tablas 10 y 11).

**Tabla 10:** Marcador de peso molecular. Distancias de migración en geles SDS-PAGE

<b>Polipéptido</b>	<b>Rf(mm)</b>	<b>PM (kDa)</b>	<b>Log(PM)</b>
Fosforilasa b	8	97.4	1.989
Seroalbúmina	19	66.2	1.821
Ovoalbumina	33	45.0	1.653
Anhidrasa carbónica	45	31.0	1.491
Inhibidor de tripsina	52	21.5	1.332
Lisozima	62	14.4	1.158

**Gráfico 7:** Logaritmo del peso molecular versus movilidad relativa del marcador de peso molecular.



**Tabla 11:** Estimación del tamaño de banda incógnita.

Rf (mm)	PM (KDa)	LOG(PM)
x	y	
49	24,42	1,3876
10	93,89	1,9726

#### 4. Experimentar *in vitro* la acción del extracto enzimático crudo sobre la viabilidad del huevo de *T. canis*.

El procedimiento ideado para la observación *in vitro* de la viabilidad de los huevos de *T. canis* al ser incubados con el extracto enzimático de los hongos ensayados, reveló lo siguiente:

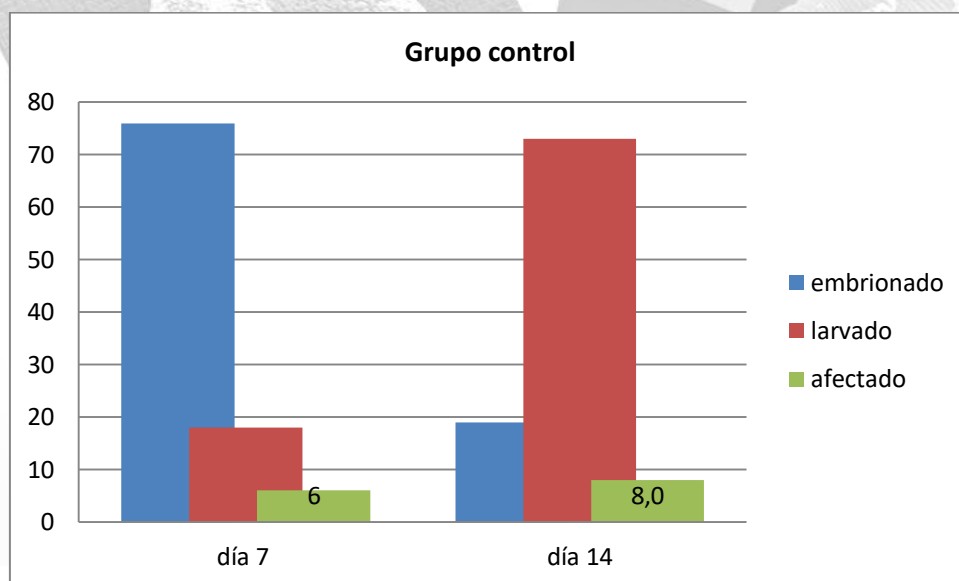
##### Grupo Control.

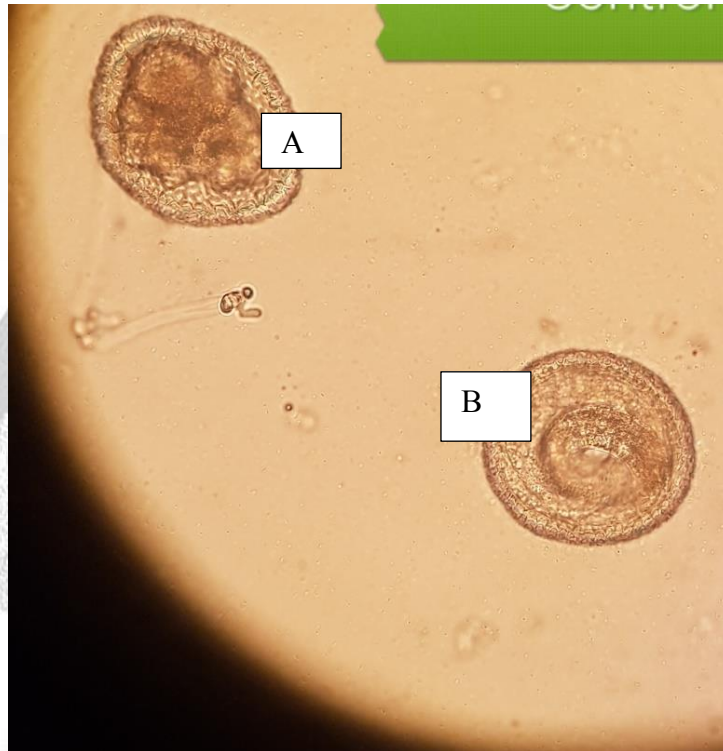
El grupo control se comportó como era de esperar, con un 73% de huevos larvados para los 14 días de incubación (Gráfico 8) y con un mínimo de afectación y no desarrollo (8% y 19% respectivamente), porcentajes que son totalmente aceptables.

En las figuras 103, 104 y 105 se pueden ver las características conservadas de los huevos cuando son observados al microscopio invertido.

**Gráfico 8:** Porcentaje de desarrollo de los huevos de *T. canis* a los 7 y 14 días de incubación.

Control			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
Día 7	76	18	6
Día 14	19	73	8



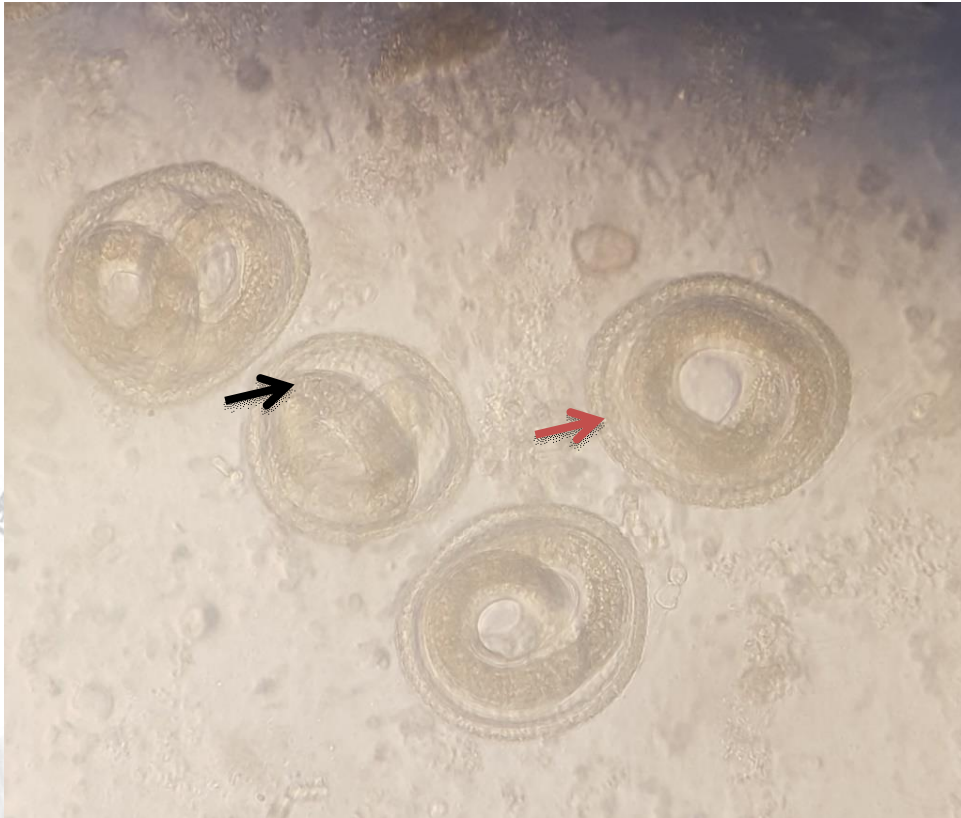


**Fig. 103.** Huevos del grupo control, día 7 de incubación. Se observa huevo embriionado (A) y huevo larvado (B), ambos con sus características normales. 400x



**Fig. 104.** Huevos del grupo control embriionados (flecha azul), día 7 de incubación. Observación al microscopio invertido, 400X.





**Fig. 105.** Huevos del grupo control, al día 14 de incubación. Obsérvese la presencia de larvas L2 en el interior (flecha negra) y las características intactas de la cubierta (flecha roja). (400x)



## Grupos experimentales.

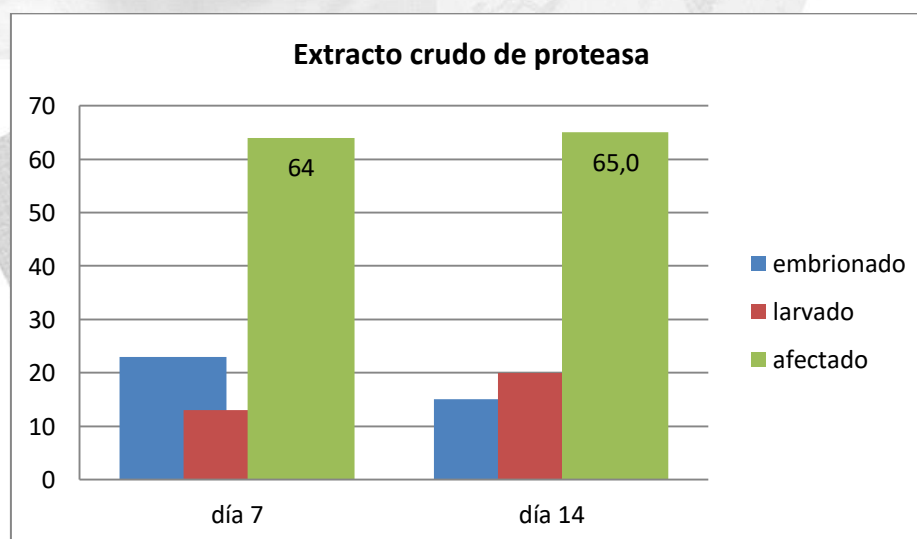
### *Chrysosporium indicum*

En el enfrentamiento de los huevos de *T. canis* y el hongo *C. indicum* se observa que existe una afectación tanto a los 7 como a los 14 días, tanto para los extractos enzimáticos de proteasa (Gráfico 9) y quitinasa (Gráfico 10), y que se mantiene sin haber sinergismo al combinar ambas enzimas (Gráfico 11).

El valor promedio de 65% de huevos afectados indica que, aunque no se afecten el 100% de los huevos, la actividad ovicida del hongo, teniendo en cuenta la clasificación de Ciarmela<sup>58</sup> es alta (nivel 4) y concuerda con el nivel de actividad ovicida cuando lo que se enfrentaba era el hongo propiamente dicho.

**Gráfico 9:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto enzimático crudo de proteasa.

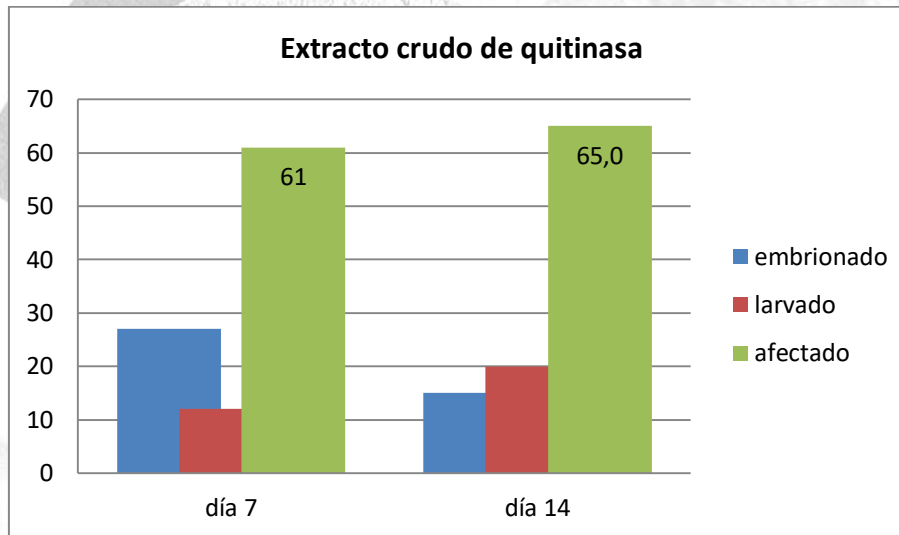
<i>C. indicum</i> + proteasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	23	13	64
día 14	15,0	20,0	65,0



Respecto a la enzima quitinasa, existe también un 65% de afectación y que se corresponde a un nivel 4 de actividad ovicida, según Ciarmela (Gráfico 10).

**Gráfico 10:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa.

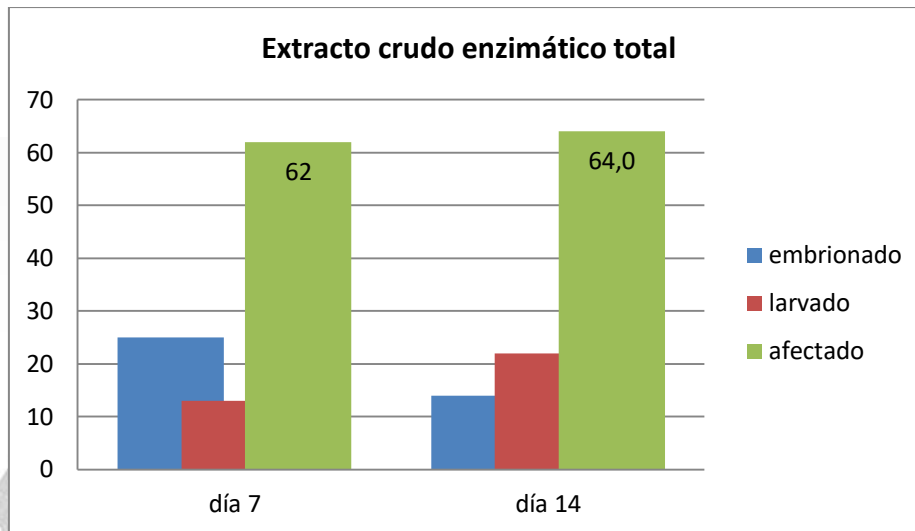
<i>C. indicum</i> + quitinasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	27	12	61
día 14	15	20	65



Al incubar los huevos de *T. canis* con ambos extractos enzimáticos, no se observa un sinergismo, sino que se mantiene el porcentaje de afectación (gráfico 11), como así también el porcentaje de huevos larvados a los 14 días de incubación.

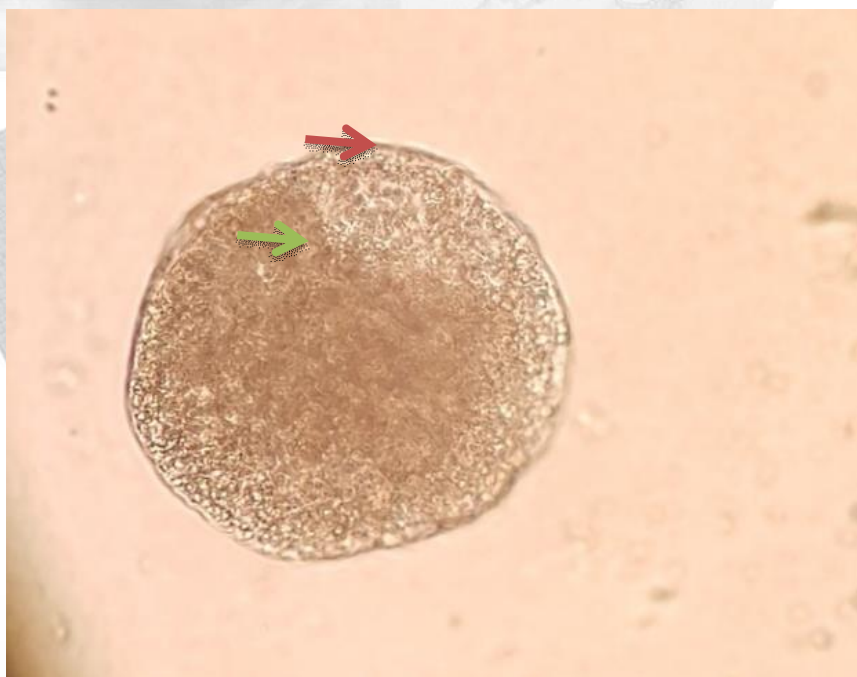
**Gráfico 11:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa y proteasa.

<i>C. indicum</i> + quitinasa+ proteasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	25	13	62
día 14	14	22	64

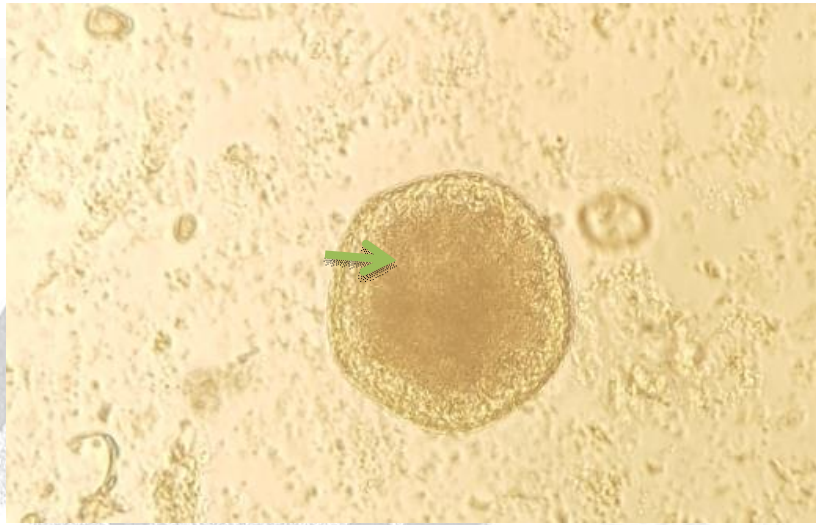


Las alteraciones o afectaciones observadas en todos los enfrentamientos huevo-extracto enzimático crudo son: cambios en las características de la cubierta, entre ellos, adelgazamiento, permeabilidad en exceso, vacuolización del embrión, interior del huevo desorganizado y larvas L1 sin movimiento.

Cada uno de estos cambios se pueden observar en las figuras que a continuación se presentan.



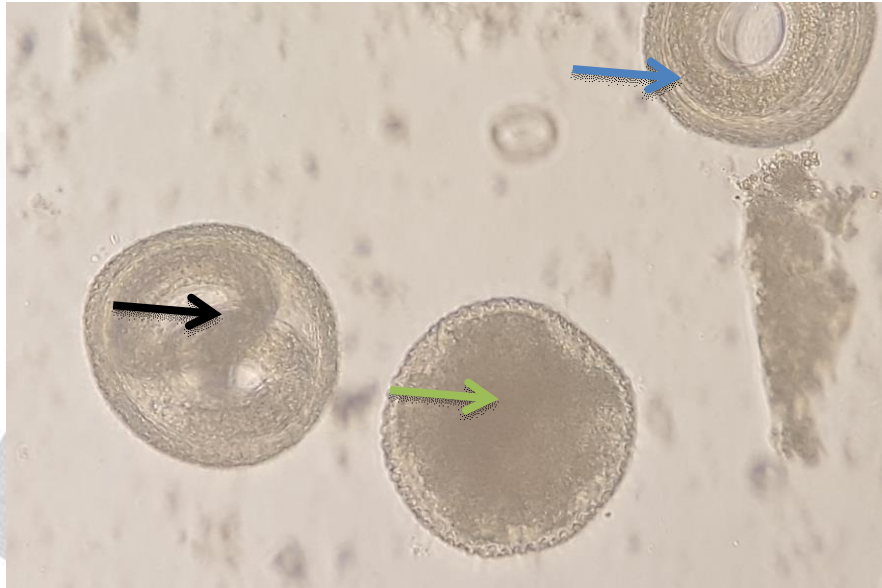
**Fig. 106.** Huevo de *T. canis* incubado con extracto enzimático crudo de proteasa de *C. indicum*. Huevo totalmente alterado, obsérvese el adelgazamiento de la cubierta (flecha roja) y la vacuolización del interior (flecha verde). 400x



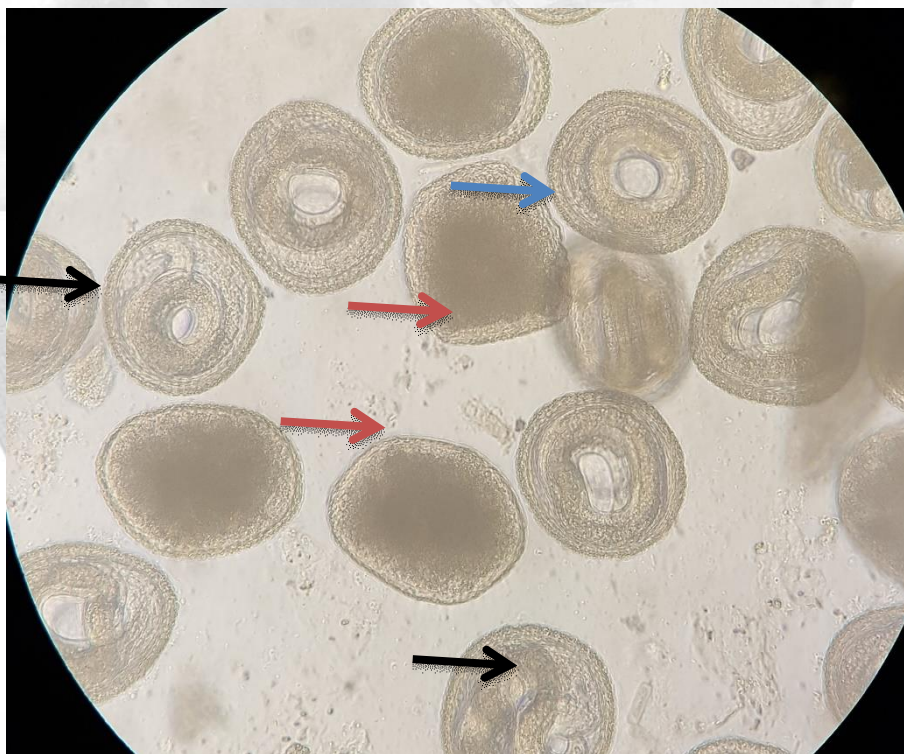
**Fig. 107.** Huevo de *T. canis* incubado con extracto enzimático crudo de quitinasa de *C. indicum*. Obsérvese la vacuolización del interior (flecha verde) pero la cubierta aún mantiene sus características. Foto a los 7 días de incubación. 400x



**Fig. 108.** Huevo totalmente alterado por actividad de proteasa de *C. indicum*. Cubierta adelgazada (flecha roja) y permeable, interior sin embrión ni larva formados (flecha verde). 400x



**Fig. 109.** Huevo afectado por actividad de quitinasa de *C. indicum*. Se vuelve a observar que la cubierta no está del todo destruida, en tanto que su interior está desorganizado (flecha verde). Se observa un huevo normal (flecha negra), y un huevo con larva inmadura (flecha azul). 400x.



**Fig. 110.** Desarrollo de los huevos frente a los extractos enzimáticos de proteasa y quitinasa al día 14 de incubación. Obsérvese en los huevos ubicados en el medio de la foto que poseen la cubierta adelgazada (flecha roja) y mamelonada (flecha azul), en tanto que el resto se mantienen normales con la larva L2 en su interior (flecha negra). 400x

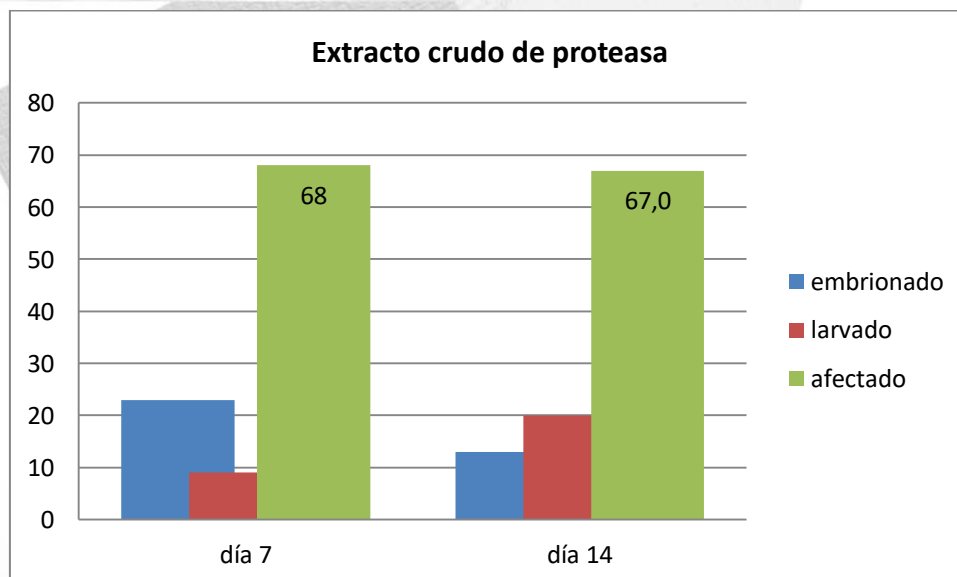
## ***Chrysosporium keratinophilum***

Los extractos enzimáticos de *C. keratinophilum* también afectan considerablemente a los huevos de *T. canis*, con un porcentaje promedio para las dos enzimas de 66% de afectación, lo que se condice con el nivel alto de actividad ovicida que muestra este hongo y cuya justificación fue presentada anteriormente.

En los gráficos 12, 13 y 14, se muestran los porcentajes de afectación de los huevos de *T. canis* en función del tiempo de exposición a los extractos de proteasa, quitinasa y una combinación de ambos. Los extractos corresponden al cultivo en medio líquido de *C. keratinophilum*.

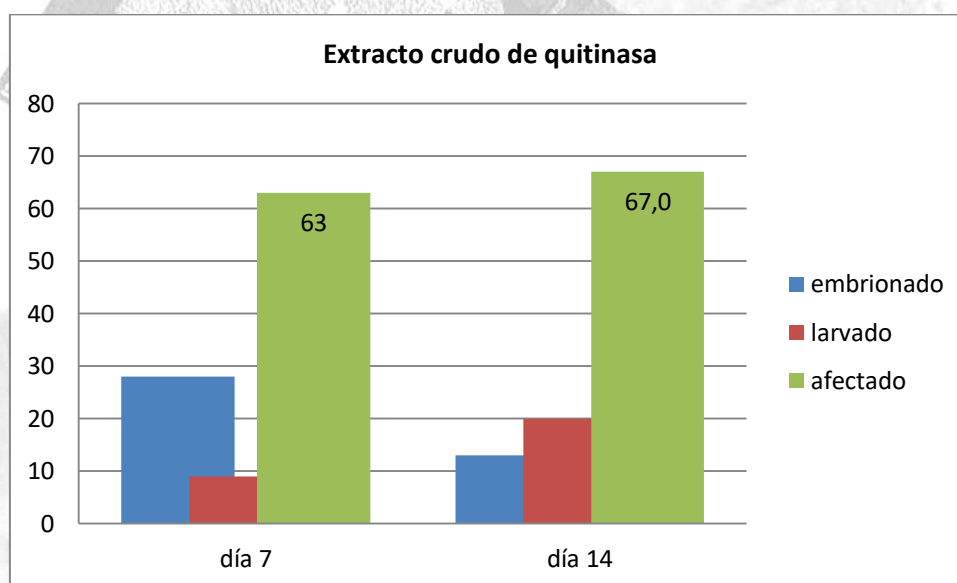
**Gráfico 12:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de proteasa.

<i>C. keratinophilum</i> + proteasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	23	9	68
día 14	13	20	67



**Gráfico 13:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa.

<i>C. keratinophylum</i> + quitinasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	28	9	63
día 14	13,0	20,0	67,0

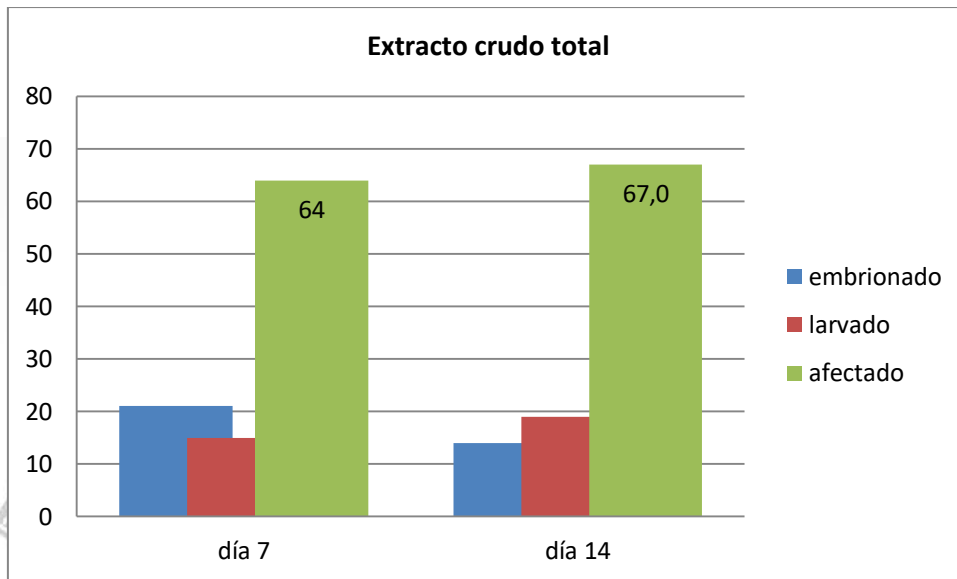


En la acción conjunta de ambos extractos el porcentaje de afectación fue similar (65%) y no se observa un sinergismo marcado (Gráfico 14).

**Gráfico 14:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa y proteasa.

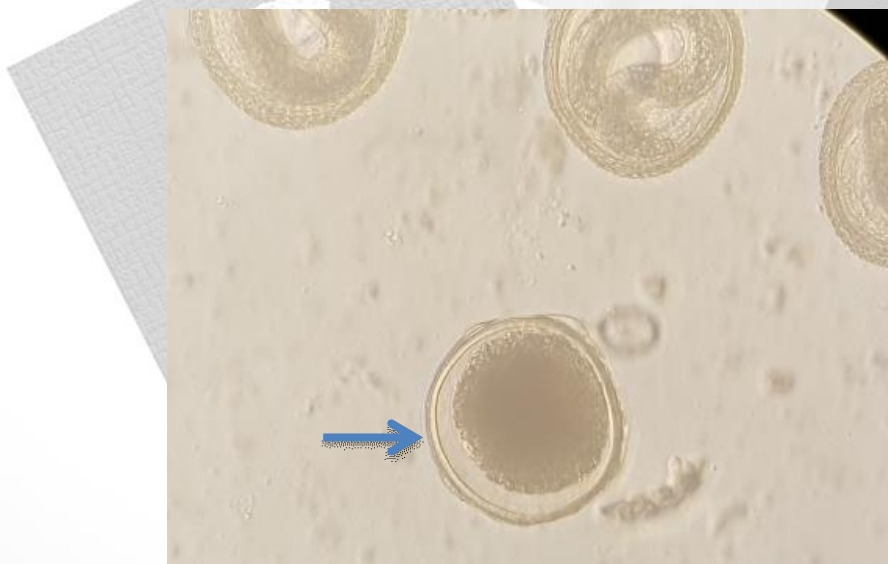
<i>C. keratinophylum</i> + quitinasa + proteasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	21	15	64
día 14	14,0	19,0	67,0





Las alteraciones o afectaciones observadas en todos los enfrentamientos huevo-extracto enzimático crudo son similares a las ya mencionadas para *C. indicum*, y ellas son: cambios en las características de la cubierta, entre ellos, adelgazamiento, permeabilidad en exceso, vacuolización del embrión, interior del huevo desorganizado y larvas L1 sin movimiento.

Cada uno de estos cambios se pueden observar en las figuras que a continuación se presentan.



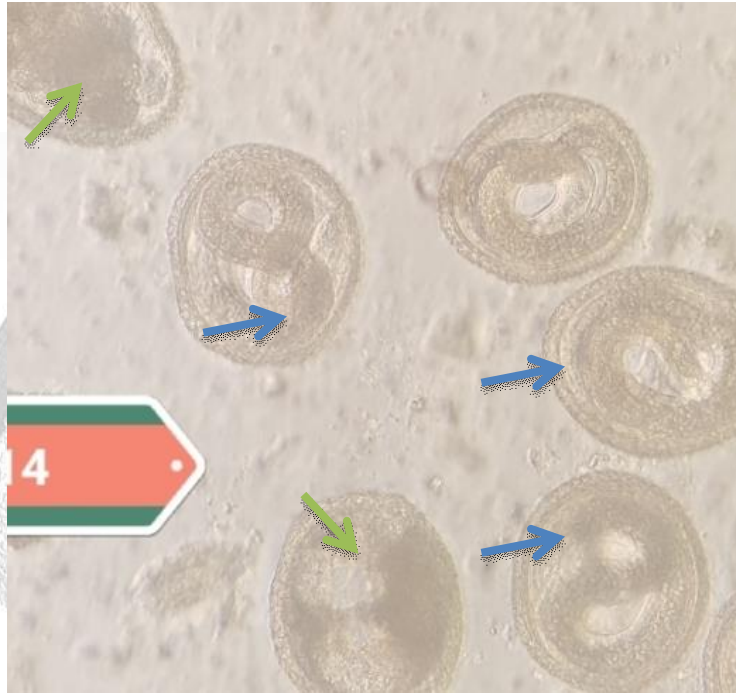
**Fig. 111.** Se observa un huevo que ha perdido las características de la cubierta y en su interior no tiene definido un embrión (flecha azul). Incubación con extractos de proteasa y quitinasa. Los huevos restantes, están en perfectas condiciones. Día 14 post incubación. 400x



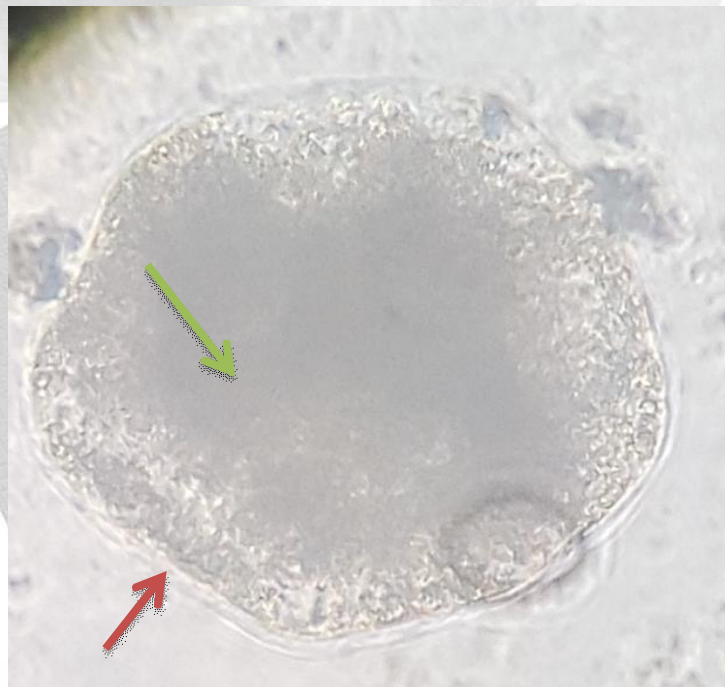
**Fig. 112.** Se observa las características de las cubiertas afectadas (flecha roja) y la desorganización en el interior de los huevos (flecha verde). Incubación en presencia de quitinasa. 40x



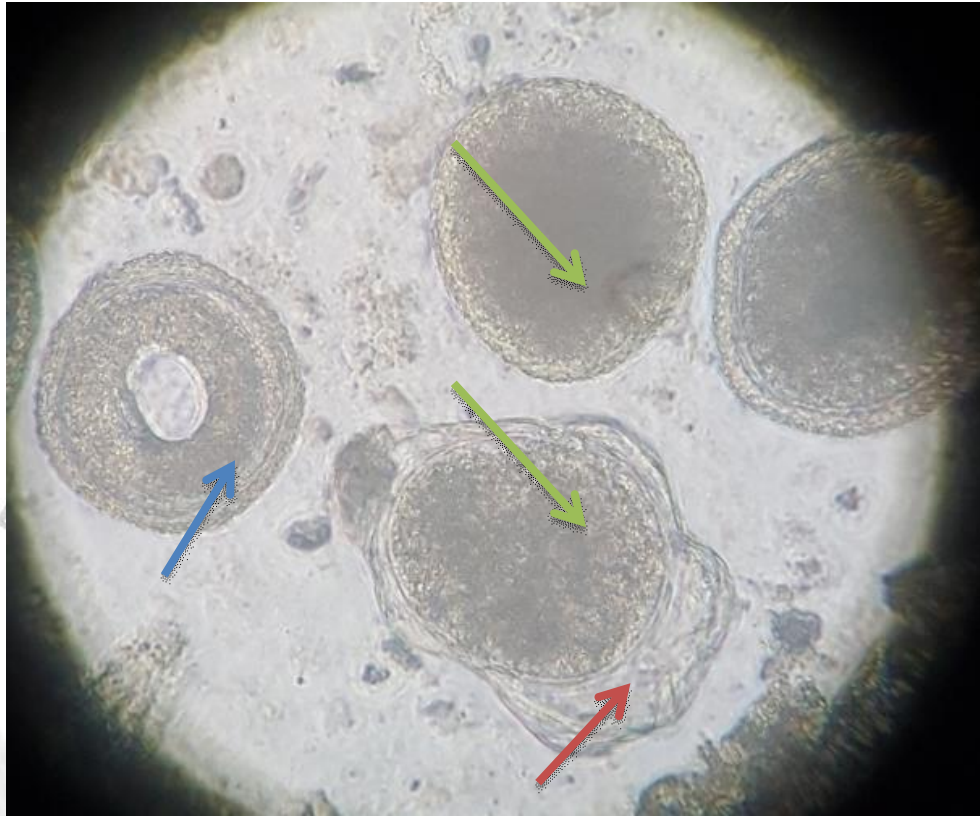
**Fig. 113.** En esta fotografía se observa la desorganización interior del huevo (flecha verde). En la parte inferior izquierda se puede observar un huevo que mantiene sus características (flecha azul). Proteasa, día 14 de incubación. 400x



**Fig. 114.** En esta fotografía también se observa la desorganización interior del huevo (flecha verde), y también se pueden observar huevos que mantiene sus características y se puede ver las diferentes posiciones de las larvas, indicativo de que están vivas y no se vieron afectadas (flecha azul). Proteasa, día 14 de incubación. 400x



**Fig. 115.** Huevo de *T. canis* incubado en presencia de quitinasa y proteasa de *C. keratinophylum*. Obsérvese el adelgazamiento de la cubierta (flecha roja), con la desorganización del interior del huevo (flecha verde). Día 7. Foto tomada al microscopio invertido, 1000x.



**Fig. 116.** Huevo de *T. canis* incubado en presencia de quitinasa de *C. keratinophilum*. Obsérvese el adelgazamiento de la cubierta y la laxitud que presenta (flecha roja), con la desorganización del interior del huevo (flecha verde). La flecha azul señala la larva sin movimiento, diferente a las imágenes de los huevos larvados observadas en la figura 105. Día 14. 40x.

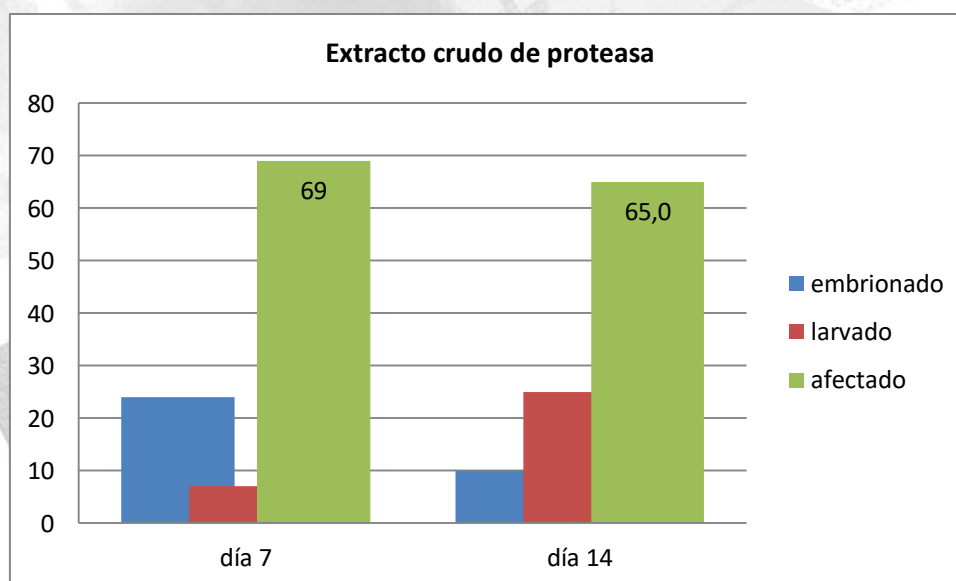


### ***Curvularia lunata*.**

La incubación de los huevos de *T. canis* en presencia de extractos enzimáticos crudos de *C. lunata*, arrojó que el nivel de afectación es alto (65%) (Gráficos 15 y 16), coincidente con el nivel 4 observado en el ensayo de incubación directa hongo-huevo. Con este grupo experimental tampoco se observa un aumento de la interacción al combinar ambas enzimas, manteniendo el 65% de afectación (Gráfico 17).

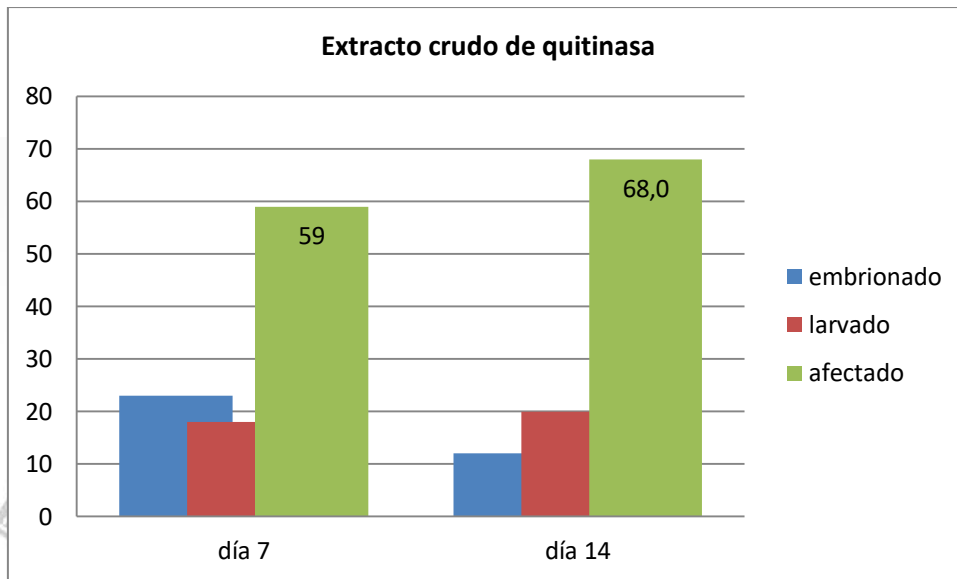
**Gráfico 15:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de proteasa.

<i>C. lunata</i> + proteasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	24	7	69
día 14	10	25	65



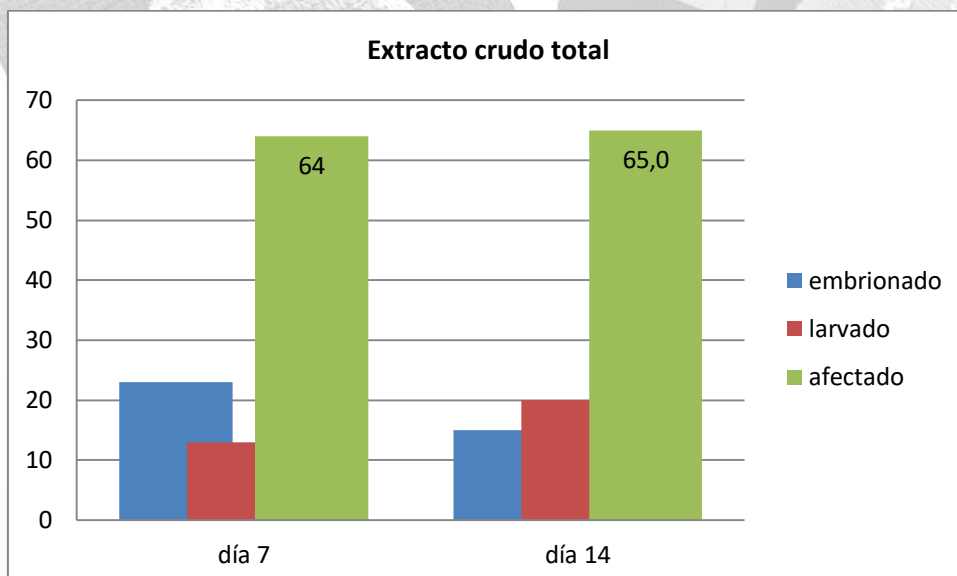
**Gráfico 16:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa.

<i>C. lunata</i> + quitinasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	23	18	59
día 14	12	20	68



**Gráfico 17:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de proteasa y quitinasa.

<i>C. lunata</i> + proteasa+ quitinasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	23	13	64
día 14	15	20	65



Teniendo en cuenta las alteraciones antes mencionadas, para los extractos enzimáticos crudos de *C. lunata*, ellas fueron: desorganización y vacuolización interna del embrión (Figuras 117 y 118), adelgazamiento de la cubierta pero en mucha menor medida respecto al género *Chrysosporium*. Ese adelgazamiento se observa mejor cuando los huevos son enfrentados a ambas enzimas (Figura 119 y 120).



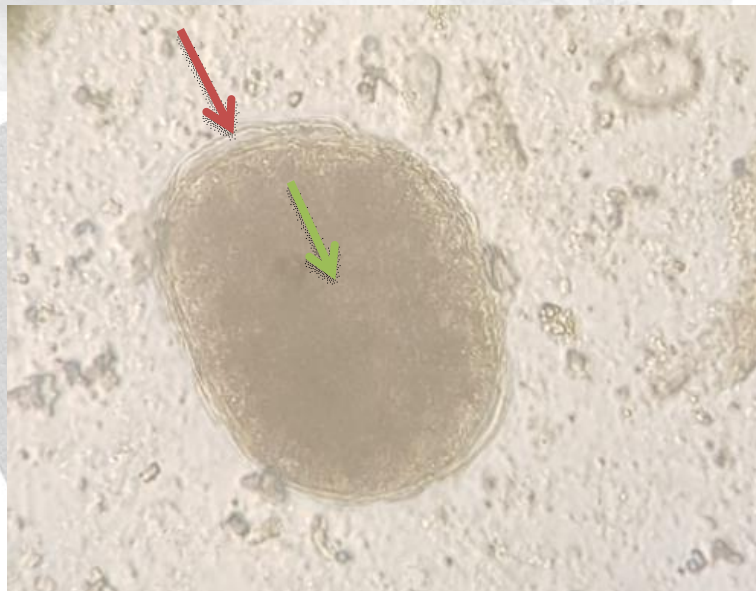
**Fig. 117.** Huevo de *T. canis* incubado en presencia de quitinasa de *C. lunata*. Obsérvese la desorganización y vacuolización del interior del huevo (flecha verde). Día 14, 400x.



**Fig. 118.** Huevo de *T. canis* incubado en presencia de proteasa de *C. lunata*. Obsérvese la desorganización y vacuolización del interior del huevo (flecha verde). Día 14, 400x.



**Fig. 119.** Huevo de *T. canis* incubado en presencia de quitinasa y proteasa de *C. lunata*. Obsérvese el adelgazamiento de la cubierta (flecha roja), con la desorganización y la vacuolización del interior del huevo (flecha verde). Día 14, 400x.



**Fig. 120.** Huevo de *T. canis* incubado en presencia de quitinasa y proteasa de *C. lunata*. Obsérvese el adelgazamiento de la cubierta (flecha roja), con la desorganización del interior del huevo (flecha verde). Día 7, 400x.

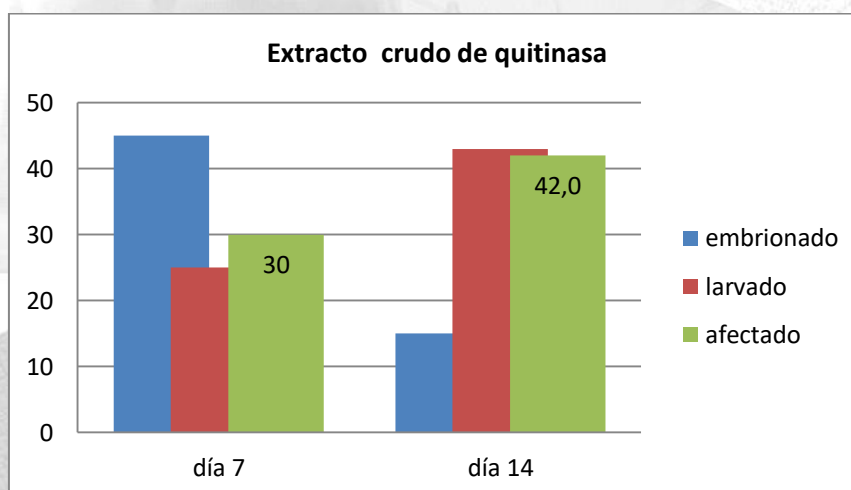


### ***Trichophyton ajelloi***

Los ensayos realizados con los extractos enzimáticos de *T. ajelloi* son compatibles con los ensayos de incubación huevo de *T. canis*-hongo, cuya actividad ovicida era baja (18%) (Gráfico 6). El porcentaje de afectación al experimentar con los extractos enzimáticos también resultó bajo (34% en promedio), y por lo tanto su actividad ovicida es baja (Gráficos 18, 19 y 20).

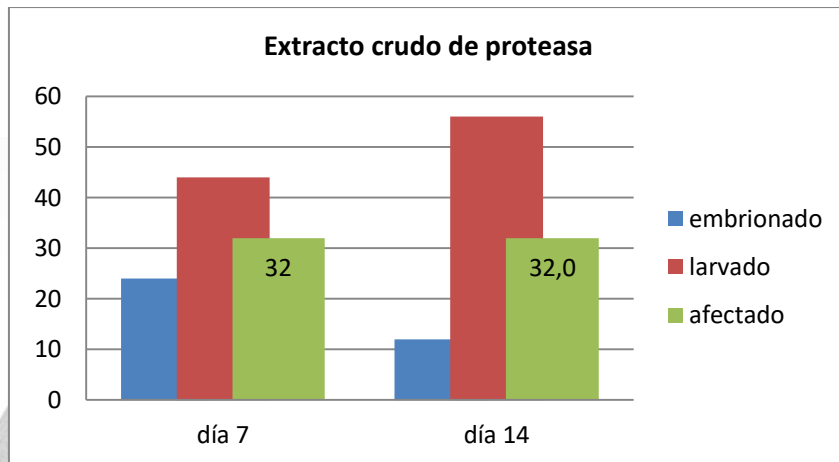
**Gráfico 18:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa.

<i>T. ajelloi</i> + quitinasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	45	25	30
día 14	15	43	42



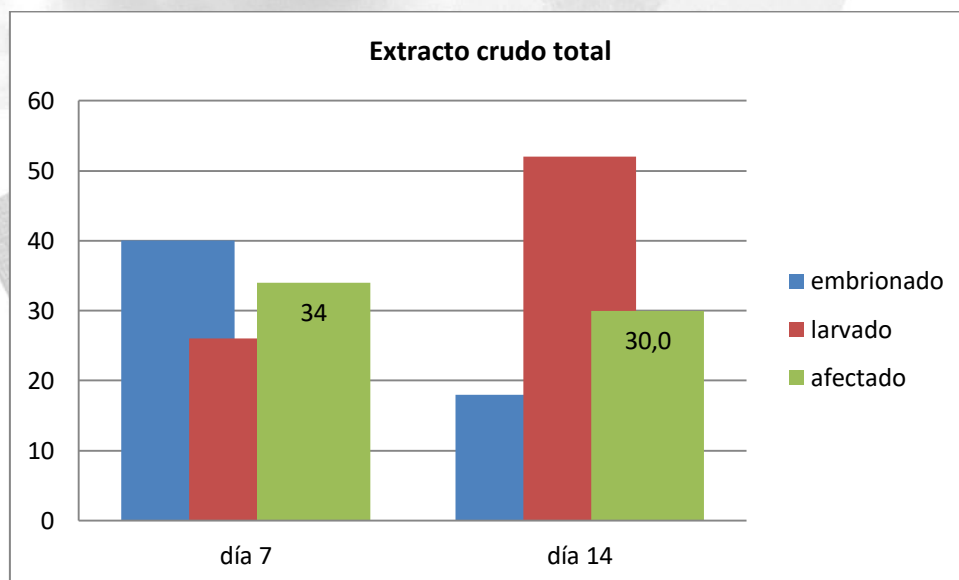
**Gráfico 19:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático.

<i>T. ajelloi</i> + proteasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	24	44	32
día 14	12	56	32



**Gráfico 20:** Porcentaje de afectación de los huevos de *T. canis* al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa y proteasa.

<i>T. ajelloi</i> + quitinasa+ proteasa			
	Embrionado (%)	Larvado (%)	Afectado (%)
día 7	40	26	34
día 14	18	52	30



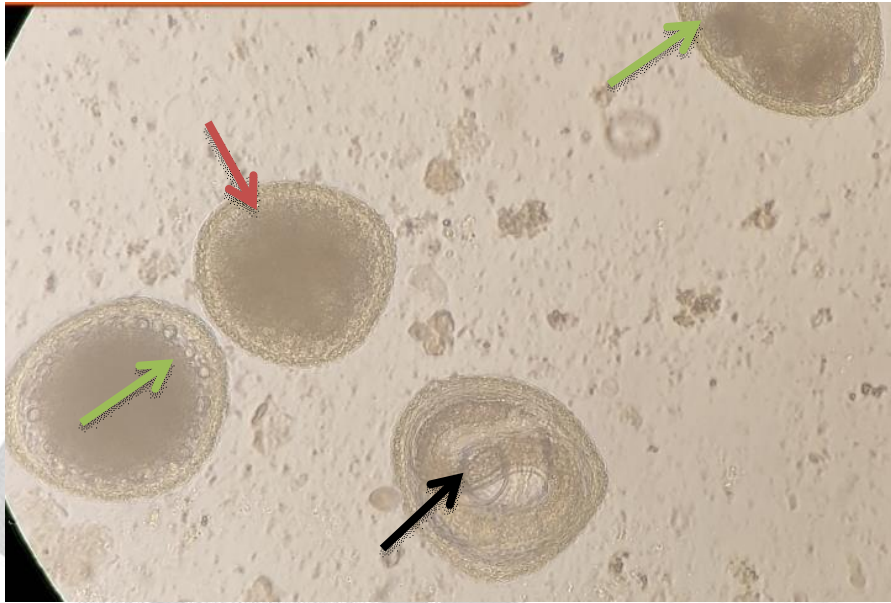
Las pocas alteraciones observadas se pueden resumir en: cambios en el interior de los huevos y aumento de la permeabilidad de la cubierta para alcanzar y destruir al embrión (Figuras 121, 122, 123 y 124).



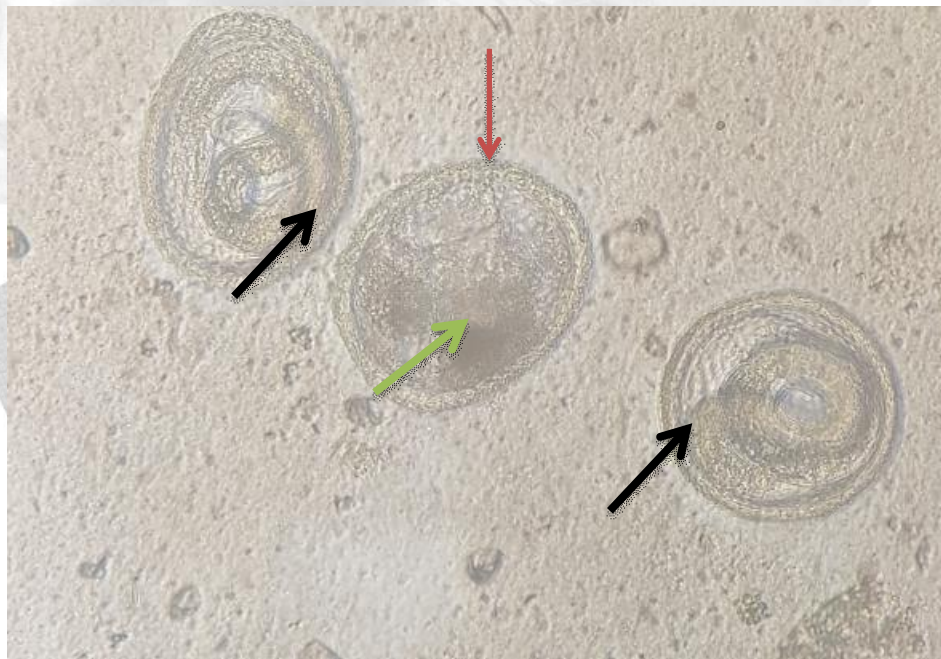
**Fig. 121.** 7 días de incubación en presencia de quitinasa de *T. ajelloi*. Obsérvese el cambio interior (flecha verde). La flecha azul marca la presencia de una larva aún no madura y la negra las larvas 2. 400x



**Fig. 122.** 14 días de incubación en presencia de quitinasa de *T. ajelloi*. Obsérvese el cambio interior (flecha verde). La flecha negra marca la larva 2. 400x



**Fig. 123.** Huevos en presencia de quitinasa de *T. ajelloi* a los 14 días de incubación. Obsérvese el desorden y vacuolización en el interior (flecha verde), pero no se observa cambios drásticos en la cubierta (flecha roja). La flecha negra marca un huevo larvado intacto. 400x



**Fig. 124.** Huevos en presencia de quitinasa y proteasa de *T. ajelloi*, a los 14 días de incubación. Obsérvese el desorden y vacuolización en el interior (flecha verde), y la cubierta sin cambios (flecha roja). Las flechas negras marcan los huevos larvados intactos. 400x.

Se observó que cuando la larva L2 logra salir del huevo por el adelgazamiento de la cubierta, se desintegra en el medio con el extracto enzimático, situación que se puede ver en las figuras 125 y 126.



**Fig. 125.** Huevos de *T. canis* perdiendo su contenido interior al medio con extracto de enzimas, el cual desintegra a las larvas y/o embrión desarrollado.



**Fig. 126.** Obsérvese la cubierta de ambos huevos muy fina. El huevo de la derecha está perdiendo su embrión el cual se destruye al contacto con el extracto enzimático.

## 26. DISCUSIÓN

La ciudad de Corrientes, capital de la Provincia de Corrientes, se encuentra en la zona occidental de la provincia y el suelo de esta zona se caracteriza por poseer zonas arenosas, que forman, en sentido longitudinal, verdaderos cordones de unos 110 a 170 kilómetros de largo, denominados médanos o medanales<sup>175</sup>. Estas características hacen que la ciudad tenga un tipo de suelo en particular y por lo tanto un perfil fúngico determinado. Además, como ya fuera mencionado, la ciudad de Corrientes está situada a 52 metros sobre el nivel del mar a orillas del Río Paraná. Su clima es subtropical sin estación seca. La humedad relativa media anual es de 72%. La temperatura media anual es de 21,5°C, con temperaturas extremas de 45°C en verano y -4°C en invierno. Su régimen de lluvias es regular, con precipitaciones que van de 950 a 1400 mm anuales<sup>149</sup>. Estas características, junto con las del suelo, se deben tener en cuenta a la hora de hacer las comparaciones con los aislamientos y especies fúngicas de otras localidades, ya que se sabe que todos ellos son factores que afectan la flora fúngica del suelo.

El suelo, como ecosistema que es, constituye un hábitat complejo y heterogéneo que alberga gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas, siendo un ambiente apropiado para el desarrollo de microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos y protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). La interrelación de estos organismos es muy variada y compleja y su distribución no es al azar, sino que siguen patrones espaciales de agregación<sup>6</sup>.

Los procedimientos clásicos para estudiar los hongos del suelo se basan en cultivos *in vitro* que implican el aislamiento de conidias o hifas activas y su crecimiento en un medio de cultivo axénico para su posterior identificación y cuantificación<sup>9</sup>.

Lýsek y Nigenda, consideran necesario señalar el tipo de uso que se le da al suelo colectado, así por ejemplo si es un campo de cultivo, camino forestal, jardín, área recreativa, si es suelo de labranza, si fue o no abonado y qué se usó para ello, etc. También registran la altura sobre el nivel del mar, el tipo de vegetación natural, las condiciones de temperatura, lluvias, etc.<sup>1</sup>. El suelo aquí estudiado pertenece, como ya se ha mencionado, a parques y plazas de la ciudad de Corrientes, todas áreas recreativas utilizadas activamente en la ciudad y en todas las épocas del año.

Los resultados obtenidos de un estudio de hongos del suelo dependen, principalmente, de los métodos utilizados para el aislamiento. En general, cada método presenta ciertas preferencias a ciertos grupos específicos de hongos; además, se deberá tomar en cuenta que el suelo no es un sustrato, sino un ecosistema compuesto

por una mezcla de sustratos más diversos que incluyen partes de plantas vivas y muertas, animales y otros microorganismos, junto con minerales y agua<sup>9</sup>. La actividad proteolítica del suelo se ve afectada por factores ambientales como el tipo de suelo, concentración de dióxido de carbono, la profundidad en que se encuentren los microorganismos. Dicha actividad disminuye al aumentar la profundidad, ya que disminuye la carga microbiana y los nutrientes<sup>36</sup>.

El uso de diferentes técnicas de aislamiento permite recuperar los hongos en función de su capacidad para utilizar o no un determinado sustrato. Así por ejemplo, la técnica selectiva de espolvoreado o "*tierra rociada*" ("soil sprinkling method") es un método simple y efectivo para la recuperación de hongos nematófagos del suelo. Esta técnica fue diseñada por Duddington, 1955, utilizando *Panagrellus redivivus* L, nematodo de vida libre, como señuelo para estimular el crecimiento de los hongos<sup>176</sup>, y es una modificación de un método ampliamente utilizado en microbiología de suelos para hongos queratinofílicos, la técnica del "*anzuelo*", técnica también utilizada en esta investigación. Gortari (2007) adaptó la técnica selectiva de espolvoreado, utilizando como anzuelo huevos de *T. canis* y así poder recuperar los hongos con capacidad para desarrollar sobre los huevos de nematodos, cuya cubierta es muy diferente a la de los estadios larvarios o a la de los gusanos adultos<sup>57</sup>. Los huevos actuarían como "*carnada*" para los hongos que se pretenden aislar.

Investigadores como Lysek y Nigenda utilizaron huevos de *Ascaris lumbricoides* como señuelo para su estudio de suelos en México. Además esos huevos utilizados eran obtenidos en el momento, a diferencia de la experiencia aquí presentada que las hembras eran mantenidas en refrigerador y llegado el momento del ensayo, se procedía a abrirlas, preparar la suspensión de trabajo y con ella enfrentar los huevos a los hongos<sup>1</sup>.

El método del espolvoreado, simple y eficiente, tiene la ventaja de que al utilizar una pequeña cantidad de suelo sin tratamiento, la información que brinda es representativa de la mayoría de los hongos nematófagos presentes<sup>176</sup>. Asimismo permite *a priori* aislar hongos que pueden crecer sobre huevos de geohelminthos; esto permitió cumplir con uno de los objetivos propuestos, al demostrarse la presencia de hongos con actividad antagónica sobre huevos de *T. canis* en el suelo de parques y plazas de la ciudad de Corrientes.

Entre los autores que han usado el método del espolvoreado podemos mencionar: Lýsek y cols. (1982), empleando como señuelo huevos de *Ascaris lumbricoides*, aislaron los géneros *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Verticillium*, de varias regiones de Cuba<sup>177</sup>. Soto-

Barrientos y cols. (2011), en Costa Rica, valiéndose de tres métodos para la extracción de geohongos nematófagos, obtuvieron el 83% de las cepas con la técnica de espolvoreado e identificaron *Arthrobotrys* con tres especies, *Candelabrella*, *Trichoderma*, *Beauveria*, *Clonostachys* y *Lecanicillium*<sup>178</sup>. Gortari y cols. (2007), en Argentina, utilizando huevos de *T. canis* como señuelo, lograron aislar *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces* y *Penicillium*<sup>57</sup>. Finalmente, de Souza Maia Filho y cols. (2013) en Rio Grande do Sul Brasil, con el mismo señuelo que Gortari (2007), recuperaron cepas de *Aspergillus*, *Acremonium*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Mucor* y *Trichoderma*<sup>55</sup>.

Mediante la técnica de espolvoreado, en este trabajo se recuperaron 6 (seis) géneros, de los cuales 3 (tres), *Bipolaris*, *Fusarium* y *Purpureocillium*, fueron hallados también por los autores nombrados más arriba y 3 (tres) géneros que hasta ahora no se los había encontrado parasitando o interaccionando con huevos de nematodos, *Curvularia*, *Phoma* y *Scytalidium*.

Respecto a los cambios introducidos en este estudio a la técnica de Gortari, cabe aclarar que por ser Corrientes una ciudad más húmeda y calurosa que la ciudad de La Plata (Argentina), las incubaciones no se realizaron en bolsas plásticas, pues debido a las condiciones climáticas se generaba una alta concentración de humedad dentro de las placas. El otro cambio fue acortar el tiempo de observación de los cultivos pues en 3 semanas el crecimiento era tal que no permitía distinguir los huevos de *T. canis*, ni tampoco si había desarrollo fúngico sobre ellos. Cuando la temperatura era templada la primera observación se realizó a los 14 días y, cuando superaba los 28 °C, a partir del día 7.

*Purpureocillium lilacinus* también aislado en otros estudios, es una de las especies que se halló con mayor frecuencia en este trabajo. Este hongo tiene reconocida acción sobre los huevos de *T. canis*<sup>51, 52, 54, 60, 179</sup>.

Dentro del género *Fusarium*, varias especies han sido citadas como antagonistas de huevos de *T. canis*: *Fusarium oxysporum*, *F. sulphureum*, *F. moniliforme*, *F. pallidoserum* y *F. solani*<sup>55, 57, 59</sup>. La presencia de *F. chlamydosporum* ampliaría el espectro de especies de este género con capacidad ovicida.

El género *Curvularia* con tres especies representó el 34% de los aislamientos. Este género es conocido por su capacidad celulo y queratinolítica como patógeno de vegetales y de animales respectivamente<sup>180, 181</sup>. No se han encontrado referencias en la bibliografía de su actividad sobre huevos de *T. canis* ni de otros geohelminthos. Sin embargo, en los ensayos aquí presentados su desarrollo sobre los huevos fue frecuente y abundante, como así también su actividad ovicida fue determinada.



Esta actividad tal como fuera expresada en la sección Resultados, corresponde a un nivel 4 según la clasificación establecida por Basualdo, 2000 y Ciarmela, 2008<sup>25, 58</sup>.

Los hongos considerados tradicionalmente como "coelomycetes", son un vasto y heterogéneo grupo de *taxa* dispersos en numerosos y variados nichos ecológicos, tales como suelo, desechos orgánicos o agua. Asimismo, pueden ser parásitos de hongos, líquenes, plantas, insectos y vertebrados, actuando a veces como simbiosistas y otras como patógenos<sup>165, 182</sup>. Los géneros *Scytalidium* y *Phoma*, que aparecieron también en este estudio, están incluidos en este grupo. De ellos tampoco se han encontrado informes relacionados a su actividad sobre huevos de *T. canis* o de otros geohelminthos, pero no fueron considerados por no llegar a identificar las especies de ambos y no superar a *Curvularia* en la frecuencia de aparición<sup>183</sup>.

Gray (1985) encontró que la presencia de hongos endoparásitos es influenciada por el porcentaje de humedad y de materia orgánica, en tanto que la de los hongos predadores está asociada al pH y al porcentaje de humedad, existiendo variaciones individuales entre las diferentes especies<sup>15</sup>. Por esto podría decirse que existe asociación entre los factores abióticos y la presencia de hongos en determinados ecosistemas, pero estas asociaciones no se pueden generalizar, tomando importancia los factores del suelo como determinantes de la presencia de hongos nematófagos. Gortari y cols. (2007), en su estudio de la ciudad de La Plata, no encontraron asociación entre los hongos con efecto antagónico sobre huevos de *Toxocara* spp. y los factores edáficos que analizaron<sup>57</sup>.

Al estudiar la influencia de factores bióticos y abióticos en la colonización y desarrollo de los hongos nematófagos en el sustrato, Saumell y cols. (2008) explican, que sería conveniente que los hongos nematófagos a ser utilizados para control biológico puedan desarrollarse en condiciones ambientales poco favorables. La temperatura ambiente en los países tropicales ofrecería un hábitat ideal para que los hongos nematófagos pudiesen desarrollar su acción predatora. El desarrollo de los mismos en las épocas secas es limitado, pero las condiciones del período lluvioso coinciden también con el desarrollo de las formas pre-parasíticas de los nematodos. Otro factor es el suelo, cuyas características podrían influir en la permanencia de los hongos en el ambiente<sup>184</sup>.

La interacción hábitat-hongos es importante en el control biológico, donde la selección del hongo deberá ser hecha con base a su adecuación para el hábitat donde será eventualmente colocado y no sólo por su facilidad de asilamiento y producción en el laboratorio. Su adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas será esencial para la eficacia del hongo contra las formas parasíticas en cuestión. Los hongos

nematófaos son pobres competidores con referencia a otros hongos en el microhábitat del suelo<sup>184</sup>.

Otra cuestión a tener en cuenta en este estudio fue la recuperación de huevos de *Toxocara* del suelo. El hallazgo de huevos de *Toxocara* spp. en los suelos de los espacios públicos depende de varios factores, como ser: la presencia de heces caninas o felinas, la conducta higiénica de los dueños de las mascotas, la presencia de animales vagabundos y sin control veterinario, las características de los suelos, las condiciones climatológicas, las técnicas de laboratorio que se utilicen para su búsqueda, etc., y todas estas circunstancias deben ser consideradas al momento de comparar los resultados encontrados en diferentes regiones geográficas. Sin embargo, para definir con exactitud la importancia sanitaria que cumplirían los espacios públicos en la transmisión de la infección al humano hay que considerar también el rol de los patios o espacios verdes de las viviendas en aquellas localidades medianas y pequeñas donde sus pobladores, por disponer de tales espacios en sus viviendas, no acostumbran al paseo de las mascotas en los espacios públicos, con lo cual una fracción significativa de la población puede adquirir la infección en el intradomicilio<sup>185</sup>.

Esto tiene importancia porque los valores de serología positiva para *Toxocara* en la región noreste de Argentina y especialmente en la ciudad de Corrientes, es elevada, como lo demuestran los trabajos publicados con un 50% en barrios carenciados y 67,8% en niños internados en Hogar Escuela de la ciudad de Corrientes<sup>125</sup>. A su vez, la contaminación medioambiental en la misma ciudad es relativamente baja. Se pueden mencionar los siguientes trabajos que muestran por ejemplo, un 12% de huevos de *T. canis* en muestras de suelo, 28% en muestras de arena y 6% en materia fecal canina en parques y plazas de la ciudad de Corrientes<sup>146</sup>, un 7,63% de huevos de *T. canis* y 19,32% de huevos de *T. cati*s en materia fecal de perros y gatos<sup>148</sup> y un 16% de huevos de *T. canis* en aceras<sup>133</sup>, todos de la ciudad de Corrientes.

En la vecina ciudad de Resistencia, donde las características edáficas son otras, el porcentaje de recuperación de huevos es menor, por ejemplo 3,4% y un 22,7% de huevos de *Toxocara* spp. en lugares públicos en la ciudad de Resistencia, Chaco, trabajos de Alonso, 2001 y Alonso, 2006, respectivamente<sup>141, 147</sup>.

A su vez, los valores de seroprevalencia también son menores, 37,9% en niños sanos de la ciudad de Resistencia, Chaco<sup>123</sup>, un 38,9% en donantes de sangre de la misma ciudad<sup>121</sup> y un 67% en niños con eosinofilia mayor del 10%<sup>144</sup>. Este últi-

mo porcentaje es relativamente más elevado porque es un estudio dirigido a niños con eosinofilia.

Estos datos revelan la importancia del tipo de suelo en la recuperación de los huevos de geohelminthos, ya que los suelos chaqueños son casi impermeables y retienen el agua, están cubiertos por un manto de tierra cuyo color predominante es el gris, compuesto principalmente por arenas y arcillas, característica que hace más difícil la recuperación<sup>186</sup>, en tanto que los suelos de Corrientes son arenosos.

Ya se sabe que la recuperación de huevos de *T. canis* a partir de muestras de suelo depende de varios factores, entre los que se encuentran las condiciones ambientales, el sitio de muestreo, el tipo de suelo, el método utilizado para la recuperación de los huevos en laboratorio, etc.<sup>187</sup>. La textura del suelo es una variable muy importante, ya que hay diferencias significativas en la recuperación de huevos según el suelo sea arenoso, arcilloso, lodoso o tierra fértil <sup>188</sup>.

Por todo lo expuesto, hay suficiente evidencia que demuestra que la toxocariasis existe y que las variaciones, sobre todo en cuanto a la prevalencia de huevos en suelo, no tienen una explicación científica, aunque ya podemos aproximar que los hongos del suelo juegan un papel muy importante en la eliminación de huevos de los suelos.

Gortari y cols (2007) refieren haber encontrado valores de contaminación (prevalencia y densidad) por huevos de geohelminthos muy similares al de otros investigadores en otras regiones. El número de nematodos en el suelo puede variar según el ecosistema, dependiendo de factores físicos como tipo de suelo, humedad, temperatura, y de factores biológicos como la presencia de organismos antagónicos densidad independiente, como ser hongos trampa y hongos parásitos de huevos, y de organismos densidad dependiente, hongos endoparásitos y otros parásitos obligados <sup>57</sup>.

En condiciones naturales, tanto los huevos de geohelminthos como las partículas de suelos, pueden ser movidas vertical y horizontalmente por la acción del viento, la lluvia y los animales vivos en el suelo. Es también conocido el comportamiento de gatos y perros para la defecación: la mayoría de los gatos cubre sus excrementos en tanto que los perros dejan al descubierto sobre el suelo<sup>139</sup>. Es también conocido que animales como lombrices de tierra, culebras y roedores, cumplen un papel en el esparcimiento de huevos de parásitos, transportando los mismos de capas más profundas hacia la superficie y viceversa<sup>139</sup>.

Las condiciones estacionales son importantes factores que afectan el grado de desarrollo y contaminación con huevos de *Toxocara* spp. Blaszkowska y cols., hacen

referencia a que la presencia de huevos de *Toxocara* es mayor en las épocas de otoño, primavera y a comienzos del verano, y que también se relaciona con período reproductivo de los hospedadores definitivos, lo que lleva a un aumento de cachorros y gatitos en esas épocas. Hay que considerar también las condiciones humedad ambiente, ya que en épocas de sequía, los huevos son expuestos a la destrucción por luz solar y baja humedad<sup>139</sup>.

Mizgajska (2001) afirma también que en condiciones de aridez, con exposición a la luz solar directa y temperaturas inferiores a 10°C, los huevos de *Toxocara* mueren<sup>64</sup> (Mizgajska, 2001). Cabe destacar que el muestreo del presente trabajo fue efectuado en otoño y finales de primavera, cuando las condiciones son relativamente aptas para la viabilidad de los huevos<sup>64</sup>.

En este trabajo, utilizando las diferentes soluciones de flotación (mencionadas en la sección Materiales y Métodos), se logró recuperar solo un 13,47% de huevos de *Toxocara* spp. de las muestras de suelo colectadas, porcentaje que no es muy diferente a los encontrados en otros estudios realizados en Argentina, donde la infección y la contaminación medioambiental han sido mayoritariamente estudiadas y descritas en las áreas centrales de las grandes ciudades, debido a los malos hábitos de sus pobladores en relación con la defecación de sus mascotas.

Así, se pueden citar los trabajos de Minvielle y cols. (1993) quienes estudiaron el nivel de contaminación con huevos de helmintos de paseos públicos y de aceras de la ciudad de La Plata, y encontraron que el 13 y el 10,7% de las muestras fecales caninas analizadas contenían huevos de *T. canis* respectivamente<sup>189</sup>. Sommerfeld y cols. en 1995 informaron contaminación con huevos de *T. canis* en el 78,6% de las muestras de suelo estudiadas y en el 45,5% de las muestras de areneros de plazas y parques de la ciudad de Buenos Aires<sup>190</sup>. En otro trabajo llevado a cabo en la ciudad de La Plata por Fonrouge y cols. (2000) se encontró que el 13,2% de las muestras de suelos analizadas estaban contaminadas con huevos de *Toxocara*<sup>191</sup>. Más tarde, Córdoba y cols. (2002) en un estudio en paseos públicos de La Plata, encontraron que un 12,1% de las muestras de tierra analizadas estaban contaminadas con huevos de *Toxocara* spp.<sup>192</sup>. En el Gran Buenos Aires, Rubel y Wisnivesky (2005) hicieron similar evaluación pero en dos áreas suburbanas diferentes, una con población de ingresos medios, y otra con población de bajos ingresos, siendo el grado de contaminación fecal con huevos de *Toxocara* del 9 y 17%, respectivamente<sup>193</sup>.

Chiodo y cols. (2006), encontraron huevos de *Toxocara* spp. en el 41,17% de las muestras de tierra analizadas en General Mansilla, una población rural en el norte de la provincia de Buenos Aires<sup>127</sup>. Por otro lado, Martin y cols. (2008) estudiaron la

contaminación de áreas urbanas de recreación en la región centro de la Argentina (Pampa Húmeda y Mesopotamia), hallando huevos de *T. canis* en el 25,7% de muestras fecales y en el 60% de los parques públicos de las ciudades<sup>194</sup>. El trabajo se llevó a cabo en primavera y otoño cuando las condiciones de humedad son apropiadas para la sobrevivencia de los huevos de *Toxocara*.

En la provincia de Salta, en las localidades de Fortín Dragones y Misión Chaqueña, Taranto y cols. (2000) analizaron 106 muestras de heces caninas, de las cuales 19 (17,2%) fueron positivas para *T. canis*<sup>195</sup>.

En la región patagónica argentina, se efectuaron trabajos en la ciudad de Neuquén por Soriano y cols. (2001), quienes estudiaron la frecuencia de parásitos intestinales en niños en un barrio suburbano y la relacionaron con factores socioculturales y ambientales, pero no encontraron helmintos en las muestras de suelos analizadas<sup>196</sup>. Sánchez Thevenet y cols. (2003), investigaron la presencia de parásitos intestinales en heces caninas recolectadas de plazas públicas de la ciudad de Comodoro Rivadavia (provincia de Chubut), y encontraron contaminadas el 46,6% de las muestras, siendo *Toxocara* spp una de las especies más frecuentes<sup>197</sup>. Brusoni y cols. (2005) refieren la presencia de huevos de *Toxocara* spp. en el 67% de las muestras de suelo y en el 59% de las muestras de materia fecal canina recolectadas de los espacios públicos de la ciudad de San Martín de los Andes en la provincia del Neuquén<sup>198</sup>. En un trabajo posterior realizado en las provincias de Chubut, Neuquén y Río Negro, Fillaux y cols. (2007) hallaron un 35,1% de contaminación de los suelos por huevos de *Toxocara* spp.<sup>199</sup>. En el año 2010, Soriano y cols. examinaron heces de perros urbanos y rurales en la provincia de Neuquén, Argentina encontrando *T. canis* en el 16,35% de las muestras<sup>200</sup>.

En cuanto a la contaminación medioambiental en el noreste argentino, se pueden citar, un trabajo realizado por Fernández y cols., en el que se analizaron 575 muestras de parques y plazas de la ciudad de Corrientes resultando positivas para *T. canis* un 12% de las muestras de tierra, un 28% de las muestras de arena y un 6% de las muestras de heces caninas<sup>146</sup>. En el año 2001, Alonso y cols., en la ciudad de Resistencia (provincia del Chaco) encontraron que el 3,4% de los lugares públicos de dicha ciudad eran positivos para *Toxocara* spp.<sup>147</sup>. En el año 2002, Milano y Oscherov evaluaron la presencia de nematodos parásitos caninos a partir de muestras de heces caninas y de arena de playas de la ciudad de Corrientes, las que resultaron positivas en un 4,1% y 0,3% para *T. canis*, respectivamente<sup>201</sup>. Ese mismo año, Marder y cols. presentan un informe en el cual analizaron la infestación parasitaria de suelos y materia fecal de perros y gatos de la ciudad de Corrientes, en el que se encontró un 7,63% de *T. canis* y un 19,32% de *T. cati*<sup>148</sup>. Milano y Oscherov en el año 2005, en un estudio llevado a cabo sobre materia fecal canina de ace-

ras de la ciudad de Corrientes encontraron un 16% de huevos de *T. canis*<sup>133</sup>. En otro estudio posterior realizado en la ciudad de Resistencia por Alonso y cols. en el año 2006, en 612 muestras de suelos de áreas destinadas al juego infantil encontraron huevos de *Toxocara* spp. en el 33,3% de las plazas, en el 25% de los parques y en el 20,6% de las plazoletas<sup>141</sup>.

Más recientemente un trabajo realizado en la región centro-oeste de Argentina, reveló un resultado negativo, el cual está en relación directa con las características climáticas y del suelo de la región estudiada, ya que las regiones geográficas caracterizadas por tener gran amplitud térmica, bajo porcentaje de humedad, fuerte radiación solar y suelos con escasa cobertura vegetal ofrecen condiciones desfavorables para la viabilidad de huevos de *Toxocara* spp<sup>185</sup>.

Como ya se mencionó en Resultados, la elección de las especies fúngicas se realizó por: frecuencia de recuperación en los suelos, antecedentes de antagonismo con huevos de nematodos tanto positivo como negativo y actividad quitinolítica, al margen de no considerar los hongos ya estudiados en profundidad por otros investigadores, como ser *P. lilacinus*, *Verticillium* spp., *Fusarium* spp. Es así que fueron elegidos los géneros *Chrysosporium*, *Curvularia* y *Trichophyton*.

El género *Chrysosporium* y sus especies *indicum* y *keratinophylum* fueron aisladas mediante la técnica del anzuelo queratínico y fueron las que se recuperaron en mayor porcentaje (22,48 % y 21,89% respectivamente). A su vez, era importante evaluar su comportamiento sobre huevos de *T. canis*, ya que Ciarmela, 2008 y 2010, identificó a *Chrysosporium merdarium* como con "muy alta" actividad ovicida<sup>58, 59</sup>.

El género *Curvularia*, con su especie *lunata*, fue elegido porque fue uno de hongos demateaceos que con mayor frecuencia creció sobre los huevos de *T. canis* mediante la técnica de espolvoreado selectivo y, hasta el momento, en la bibliografía no se han encontrado datos de que *Curvularia* interaccione con huevos de ningún nematodo.

El género *Trichophyton* con su especie *ajelloi*, fue aislado por la técnica del anzuelo queratínico y se lo eligió porque la bibliografía lo describe como entomopatógeno<sup>173</sup> y resultó interesante estudiarlo frente a huevos de nematodos para ver cómo se manifestaba.

Gortari y cols. (2007), demostraron la presencia de hongos con actividad antagónica sobre huevos de *Toxocara* spp, en el suelo del paseo del Bosque en la ciudad de La Plata. Los géneros identificados fueron: *Acremonium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mor-*

*tierella*, *Paecilomyces* y *Penicillium*, alguno de los cuales han sido mencionados por otros autores como antagonistas de huevos de fitonematodos y sobre huevos de *Ascaris lumbricoides*. De los géneros aislados, el más estudiado por su actividad antagónica sobre huevos de nematodos es *P. lilacinus*, el cual muestra actividad ovicida independientemente del ecosistema y el nematodo considerado<sup>57</sup>. Como ya se ha mencionado, *P. lilacinus* fue encontrado en este trabajo, pero su elección fue descalificada ya que está ampliamente estudiado como antagonista de huevos de nematodos.

Los hongos predadores son el grupo más estudiado y hasta el momento, el más usado como control biológico de nematodos parásitos del ganado, reduciendo la población de los mismos bajo condiciones de campo y de laboratorio, y tienen la ventaja de industrialización<sup>4</sup>.

Los hongos nematófagos son predadores naturales de los nematodos, aunque algunos tienen predilección por los huevos y larvas de geohelminos a los que parasitan y destruyen<sup>55</sup>. Estos hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza pudiéndose aislar una diversidad de especies de diferentes ecosistemas. Algunos investigadores han estudiado la influencia de factores ambientales en su distribución para poder establecer si los hongos nematófagos son ubicuos o si están limitados a un hábitat en particular<sup>57</sup>.

Saumuell y cols., (2008), en su investigación sobre hongos nematófagos y su aplicación como control biológico, explica que *Duddingtonia flagrans*, además de su excelente cualidad nematófaga, tanto en trabajos de campo como en el laboratorio, demostró posibilidades de manipulación, siendo considerado la principal herramienta para la producción comercial. Además, es preciso tener en cuenta que diferentes aislamientos de la misma especie pueden diferir en sus propiedades y agresividad contra nematodos<sup>184</sup>.

Cuando hablamos de la interacción del hongo y los huevos de *Toxocara in vitro*, es necesario hablar y considerar el porqué de las condiciones elegidas para los ensayos.

El medio de cultivo Agar-Agua al 2% es utilizado y testeado de rutina bajo condiciones de laboratorio con hongos ovicidas de huevos de geohelminos que desarrollan parte de su ciclo de vida en el suelo. Como este medio es pobre en nutrientes, puede obligar al hongo a cambiar de saprofítico a ovicida, lo cual también justificaría su capacidad de infección en medios pobres en carbono y nitrógeno.

Se puede justificar el uso de agar-agua 2% por las siguientes situaciones: 1) crecimiento homogéneo de los hongos aislados, 2) mejor visualización de la interacción hongo-huevo de helminto, y 3) disponibilidad del medio en los laboratorios.

La capacidad de infección de estos hongos está en concordancia con los resultados de De y cols., quienes ponen en discusión el rol de los hongos nematófagos en los medios de cultivo utilizados de rutina en el laboratorio<sup>202</sup>. En consecuencia, Braga (2010) dice que más rico es el medio menor será la capacidad ovicida, y que, la producción de clamidosporas es mayor en los medios que son sólo a base de agar<sup>51</sup>.

Ahora bien, Lelis y cols (2014) han suplementado el medio de cultivo con almidón y vieron una mayor producción de estructuras fúngicas como conidias y clamidosporas en *P. chlamidosporia*<sup>203</sup>. Trabajando con este mismo hongo, Braga y cols. (2010) reportaron mayor actividad ovicida también al agregar al medio almidón, y sugieren que es una buena opción cuando no se tienen medios más costosos<sup>51</sup>.

La dependencia del huésped ha sido observada en hongos nematófagos, principalmente para hongos trampa y endoparásitos. En el caso de hongos asociados a quistes, huevos y hembras de nematodos, se han encontrado un cierto grado de dependencia, por lo que son considerados oportunistas e indicando su adaptación a estas estructuras en el medioambiente<sup>57</sup>.

Gortari y cols (2007) no encuentran dependencia de la población fúngica con ninguna de las formas parasitarias que buscaron (larvas, huevos totales y huevos de *Toxocara* spp.), y explican que eso podría deberse a que el estudio que realizaron fue en un ambiente diferente a un agro ecosistema y que el grupo de hongos que analizaron presenta una actividad sobre huevos de geohelminths, cuya distribución en suelo es muy variable<sup>57</sup>.

La existencia de hongos ovicidas autóctonos es importante en el campo del control biológico, ya que para la elección de un posible agente de control, debería tomarse como base la adaptabilidad al ambiente en el que va a ser incorporado más que la facilidad de su aislamiento y mantenimiento en condiciones de laboratorio<sup>57</sup>.

El mecanismo de penetración de los hongos ovicidas a través de las resistentes cáscaras de los huevos de geohelminths al interior del mismo, aún hoy no ha sido dilucidado por completo<sup>19</sup>. Lýsek y Sterba, expresan que hay autores que creen que el mecanismo de penetración es un proceso mecánico donde la actividad enzimática que involucre es un factor adicional. Esta idea se basa en el hecho de que algunos hongos están capacitados para producir el órgano de penetración o *apresorio* en el sitio de contacto hongo-superficie del huevo<sup>23</sup>. Se presume que el *apresorio* presio-



na fuertemente contra la superficie y la perfora y por eso penetra el huevo. Por el otro lado, otros investigadores dicen que la presencia del *apresorio* no es un prerequisite para que un determinado hongo logre penetrar un huevo, y es aquí donde la actividad enzimática es importante para el ataque y penetración del huevo<sup>23</sup>.

En el proceso de ataque de *Verticillium chlamydosporium* al huevo de *Ascaris lumbricoides*, el área de contacto entre el hongo y la superficie del huevo es suave, lisa y fluida en las fases de contacto y en la de adhesión. En la tercera fase, este hongo produce una estructura cónica, que hace suponer que es de carácter enzimático<sup>23</sup>.

Otra cuestión que se sigue investigando es si los hongos ovicidas colonizan a los huevos de nematodos en todos sus estadios de desarrollo o si prefieren uno en especial. Jatala (1986) explica que *Paecilomyces lilacinus* coloniza los huevos de *Globodera pallida* más fácilmente antes de que comience a diferenciarse. En la mayoría de los hongos, la habilidad de colonización disminuye cuando la larva empieza a desarrollarse dentro del huevo. Es importante destacar que la actividad ovicida difiere entre cepas dentro de una misma especie fúngica<sup>204</sup>.

Irving and Kerry (1986) probaron que *Verticillium chlamydosporium* coloniza a los huevos de fitonematodos en todos los estadios de desarrollo<sup>205</sup>.

El "moco" alrededor de los huevos es probablemente un muy buen sustrato como nutriente, lo cual aumenta el crecimiento micelial y conduce a la colonización de los huevos<sup>23</sup>.

Lýsek y Nigenda (1989), explican la acción ovicida con un esquema de 5 fases (contacto, adhesión, penetración, consumación y liberación) pero que esto no siempre es igual en todos los hongos. Así por ejemplo, en algunos hongos, es suficiente que solo una hifa entre en contacto con la superficie del huevo para que esa hifa sea capaz de penetrar las cubiertas. Los hongos de crecimiento rápido, forman una red densa de hifas alrededor del huevo y varias hifas lo atraviesan simultáneamente. En otros, no se diferencian las fases 4 y 5, ya que el hongo al penetrar el huevo, consume de inmediato la cubierta y al mismo tiempo destruye el embrión. Los hongos ovicidas son capaces de mantener al sistema ecológico en los límites del nivel homeostático, es decir, las acciones de los hongos, componentes importantes de los ecosistemas, contribuyen a la regulación de esos niveles en la tierra<sup>1</sup>.

Las perspectivas de investigación desde hace ya dos décadas y a futuro, están enfocadas en comparar la capacidad ovicida de distintas especies de hongos bajo distintas condiciones micro y macro-ecológicas, a fin de caracterizar las condiciones óptimas de ataque<sup>1</sup>. Incluso las cepas con la mínima habilidad para disolver la qui-

tina coloidal en un medio artificial, puede destruir la capa de quitina en huevos vivos de manera eficiente. Se supone que estos hongos no son capaces de utilizar quitina como única fuente de nutrientes, pero si son capaces de desarrollar una fuerte actividad quitinolítica en presencia de nutrientes más apropiados. Este fenómeno previamente descrito podría deberse a una insuficiente capacidad de inducción de la quitina purificada usada en los ensayos *in vitro*, en comparación con la estructura y capacidad que tiene quitina natural <sup>19</sup>.

Algunos resultados nos indican que algunas cepas de hongos ovidas penetran la cubierta del huevo mecánicamente, sin actividad quitinolítica. En relación con el hecho de que la actividad ovida puede ser débil, no se puede excluir que los hongos atacan sólo los huevos previamente dañados, y esto es respaldado por el hecho de que entre el 10 y el 15 % de los huevos son infértiles, y éstos son permeables al lugol y al azul de lactofenol, lo que nos dice que están aparentemente dañados<sup>19</sup>.

Entre las observaciones de esta investigación referidas a las características de la cubierta y su observación bajo MO, podemos mencionar que el azul de lactofenol ingresa al huevo cuando por alguna razón el huevo se ve afectado, ya sea por haber sido atacado por el hongo o por estar dañado *per se*. Cuando las larvas en el interior mantienen su color, está indicando que la cubierta del huevo está intacta y por ende la larva en su interior. Otras imágenes muestran que a pesar de que las larvas mantienen el color como en el grupo control, sus características de movilidad e integridad se ven afectadas y por lo tanto estaría indicando que la larva no está viva y eso es indicativo de afectación (ver imágenes en resultados).

Como ya se ha mencionado, la "cáscara" o cubierta de los huevos está compuesta básicamente por tres membranas o capas secretadas por el embrión. Estas incluyen una capa interna lipídica, una media quitinosa y una externa vitelina. Estas membranas se empiezan a formar inmediatamente luego de la fertilización del huevo. La capa lipídica compuesta por proteínas y lípidos, es una membrana semipermeable y permite el flujo de agua, pequeños iones y gases. La capa de quitina, usualmente "pegajosa", proporciona resistencia estructural. El complejo quitina/proteína se encuentra frecuentemente como microfibrillas de 2,8 nm, embebidas en una matriz proteica. Estas microfibrillas se encuentran organizadas con diferentes patrones, orden y espesor. La capa vitelina, de naturaleza lipo-proteica, tiene una estructura tipo membrana celular <sup>60</sup>. La cubierta de los huevos es la única estructura de los nematodos en la que se ha demostrado la presencia de quitina y es una estructura biológicamente muy resistente.

A través de la MEB se puede observar, al igual que otros autores, que los hongos ovicidas forman una red micelial densa alrededor de los huevos y que los mismos no son atacados por la primera hifa que entra en contacto con la superficie del huevo, sino que luego de formar la red hifal y rodear los huevos, forman los órganos de penetración o *apresorios*, para ingresar y consumir el embrión<sup>23</sup>.

La MEB no permite ver lo que sucede en el interior, pero cuando por efecto del tratamiento de la muestra el huevo se rompe, deja ver el crecimiento del hongo en el interior y el consumo del embrión por el mismo (Figura 79).

Otra característica destacable de esta técnica, es que permite distinguir perfectamente las características de la cubierta de los huevos y comparar entre huevos control y huevos del grupo experimental.

Otro aspecto a considerar, es el estado de los huevos en la suspensión de trabajo. En los ensayos de esta tesis la suspensión se realizaba al momento de realizar los enfrentamientos y consistía en un pool de huevos de distintas hembras de *T. canis*, las que se encontraban guardadas en solución fisiológica en heladera. Por lo tanto, el porcentaje de huevos alterados en el grupo control, era el blanco para el grupo experimental, ya que la misma suspensión de huevos era utilizada para ambos ensayos. En algunos huevos del grupo control, por motivos diferentes al ataque fúngico, el colorante también penetra, lo que significa algún defecto en la integridad de la cubierta.

Los ensayos fueron observados a los 7, 14, 21 y 28 días post incubación. En aquellos huevos en que a los 14 o 21 días las larvas que pudieron haberse formado aparecían como un círculo al MO, indicaba que el desarrollo se había detenido, aunque no se manifestaran acciones de consumo del embrión, y esos huevos eran considerados afectados por el hongo en cuestión.

Otra observación importante a tener en cuenta es que a los 28 días la afectación ya no debe ser considerada, ya que es tanto el tiempo de exposición que la red hifal desarrollada ejerce una presión mecánica tal que destruye los huevos y, además, la desecación de la cubierta del huevo juega un papel en contra.

Es sabido que las hifas son transportadoras de las enzimas que finalmente van a ayudar a la acción mecánica ejercida por el hongo. Estas enzimas son las que consumen el embrión.

Hay que tener en cuenta también que cuando hay muchos huevos en el ensayo de enfrentamiento la acción fúngica, tanto mecánica como enzimática, se ven dismi-

nuidas, ya que ellos se van protegiendo mutuamente y por lo tanto son menos afectados.

Con respecto a los porcentajes de afectación encontrados en este trabajo, 72,7% de huevos afectados para *C. indicum*, significa que *C. indicum* tiene un efecto ovicida alto (nivel 4: 50-79% de huevos afectados, según la clasificación propuesta por Ciarmela y expuesta en materiales y métodos), lo que significa que su presencia en los suelos afecta la viabilidad de los huevos de *T. canis* y por lo tanto la presencia de huevos en el medio ambiente se ve disminuida.

*C. keratinophylum* también ejerce un alto poder ovicida, con el 74 % de actividad, y al igual que *C. indicum*, es acertado pensar que ambos hongos ejercen su acción sobre los huevos en el medio ambiente, ya que como se ha mencionado, su presencia en suelos es escasa (13, 43% en plazas y parques de la ciudad de Corrientes). Si comparamos ambas especies de *Chrysosporium* aquí ensayadas (Gráfico 5 en resultados), podemos decir que *C. keratinophylum* empieza a afectar más rápidamente a los huevos, en tanto que *C. indicum*, lo hace más lentamente pero perdura más en el tiempo.

El hecho que el mayor porcentaje de huevos afectados (74%) sea el día 14 post incubación para *C. keratinophylum*, nos estaría diciendo además que su acción es un poco más agresiva y más rápida que *C. indicum*.

*C. lunata* mostró un alto poder ovicida y dado que existe en un porcentaje importante en los suelos de la ciudad de Corrientes, su presencia interfiere en la viabilidad de los huevos en el medio ambiente, dato que se relaciona con el bajo porcentaje de recuperación de huevos de los suelos independientemente de la técnica empleada para ello.

*T. ajelloi* existe en bajo porcentaje en los suelos, por lo que su presencia no afecta a la viabilidad de los huevos en el ambiente dato que se correlaciona con su baja actividad sobre los huevos.

Otro punto de este trabajo fue la producción de enzimas extracelulares y su evaluación frente a huevos de *T. canis*.

Los hongos pueden producir más de un tipo o clase de enzimas, las cuales utiliza para su crecimiento y alimentación, y esto es lo que se aprovecha para estudiar su acción sobre los huevos de *T. canis*<sup>35</sup>.

Es importante recordar que la producción óptima de proteasas es controlada por algunas condiciones de crecimiento como ser la composición del medio de cultivo,

agitación, temperatura de, pH, entre otros. La producción de lipasas microbianas es también influenciada por los componentes del medio como las fuentes de nitrógeno y carbono como ser los ácidos grasos, triglicéridos y carbohidratos, los que pueden estimular o reprimir la producción de lipasas. Las quitinasas microbianas son producidas por procesos de fermentación líquida, los cuales son controlados por factores físicos como aireación, pH y temperatura de incubación<sup>206</sup>.

Los huevos de helmintos están compuestos por una cáscara de quitina y proteínas y la actividad ovicida de los hongos nematófagos se basa específicamente en la destrucción de esas capas. En este contexto, es importante que los hongos puedan crecer en un medio que favorezca la producción de enzimas.

En el caso de la producción de quitinasa en medio sólido, en el *screening* enzimático presentado en este trabajo, no fue posible observar halo de hidrólisis en el medio de quitina coloidal al 2%, pero independientemente de ese resultado negativo se procedió al cultivo líquido para obtención del extracto crudo, que, como es sabido, siempre el medio líquido favorece el desarrollo de los microorganismos y por lo tanto en el sobrenadante es posible encontrar los metabolitos de excreción y secreción debido simplemente, como en este caso, al crecimiento del hongo. Además, la enzima quitinasa existe en los hongos, ya que la utilizan para el crecimiento y elongación de las hifas.

Con respecto al uso de extracto crudo de *P. chlamidosporia*, Lelis y cols (2014) han probado su efectividad pero sugieren que se debe buscar mayor esclarecimiento sobre la interacción del extracto y los huevos de helmintos. La literatura, en este punto, aún carece de información suficiente. Algunos autores sugieren la posibilidad de un "pool" de enzimas extracelulares de diferentes clases como quitinasas y proteasas, derivadas de diferentes hongos<sup>203</sup>.

Delgado Blandón y cols. (2001), en su trabajo sobre actividad enzimática de hongos entomopatógenos, explican que en la mayoría de los aislamientos que ellos realizaron, las enzimas aparecieron secuencialmente y mostraron distintas fases de producción. Esto se relaciona muy posiblemente, porque la cutícula del insecto presenta una capa de proteínas y lípidos que se encuentra cubriendo la capa de quitina. Por lo tanto, el hongo hidroliza los lípidos y proteínas durante los primeros días y queda expuesta la quitina para que actúen enzimas como la nagasa y la quitinasa en etapas tardías, lo cual ratifica que el mecanismo enzimático es parte de la acción integral del proceso de infección<sup>207</sup>.

Las quitinasas fúngicas son activas a un pH entre 4,0-7,0 y temperaturas que fluctúan de 20 a 40°C. Tienen un alto grado de estabilidad y sus pesos moleculares varían entre 27 y 190 kDa<sup>60</sup>.

Tikhonov y cols. reportaron la purificación y caracterización de una quitinasa, llamada CHI43, obtenida de los hongos nematófagos *V. chlamydosporium* y *V. suchlasporium*, y la proteína de 43 kDa fue determinada por electroforesis en SDS-PAGE<sup>27</sup>.

En este trabajo de tesis, se trabajó con un extracto crudo de quitinasa, el que reveló dos bandas de 24 kDa y 94 kDa en SDS-PAGE. Estas bandas son compatibles con quitinasas, ya que el rango de pesos moleculares de las quitinasas es variable respecto a que si fueron o no purificadas y cuál es el hongo que la produce.

Los valores de proteínas <1 µg/ml para los extractos de quitinasas cuando el cultivo se realizó sin extracto de levadura, indica que no hubo producción suficiente de enzimas. Esto puede deberse a que los hongos no pudieron crecer en condiciones nutricionales tan mínimas y sería coincidente con el "screening" enzimático en placa, donde no se observa halo de hidrólisis y existe un crecimiento deficiente del hongo en el medio de quitina coloidal (Figura 95).

Gortari y Hours, resumen las observaciones de varios autores sobre los efectos de las enzimas sobre los huevos de nematodos, en: falta de desarrollo de los estadios juveniles en los huevos, falta de eclosión y disminución de la movilidad larvaria dentro del huevo, lo cual se asume como larvas muertas. Los cuerpos de las larvas jóvenes se ven deformados, desintegrados y se vuelven transparentes y vacuolados<sup>60</sup>.

En los ensayos aquí presentados, se pudieron observar todas las características de destrucción antes mencionadas por Gortari, y que fueron presentadas en Resultados, las que se resumen en: desorganización y vacuolización interna del embrión (Figuras 117 y 118), cambios en las características de la cubierta, entre ellos, adelgazamiento, permeabilidad en exceso y larvas L1 sin movimiento (Figuras 111, 112, 113, 114, 115 y 116). El adelgazamiento de la cáscara se observa mejor cuando los huevos son enfrentados a quitinasas y proteasas de *C. lunata* (Figuras 119 y 120). Todas estas observaciones fueron hechas al MO.

Huang y cols., explican que tanto la microscopía óptica como la electrónica de barrido muestran a las capas más externas de los huevos exfoliadas, lo que prueba que las enzimas extracelulares pueden destruir la integridad de la cubierta de los huevos como de las cutículas de las larvas ayudando así a la penetración y patogenicidad del hongo. Estos mismos autores, refieren los efectos la CHI43 y la P32 sobre los huevos de *G. pallida* como cicatrices y una ligera descamación o "peeling" de la cáscara con una alteración importante y primordial producida por las enzimas<sup>32</sup>.

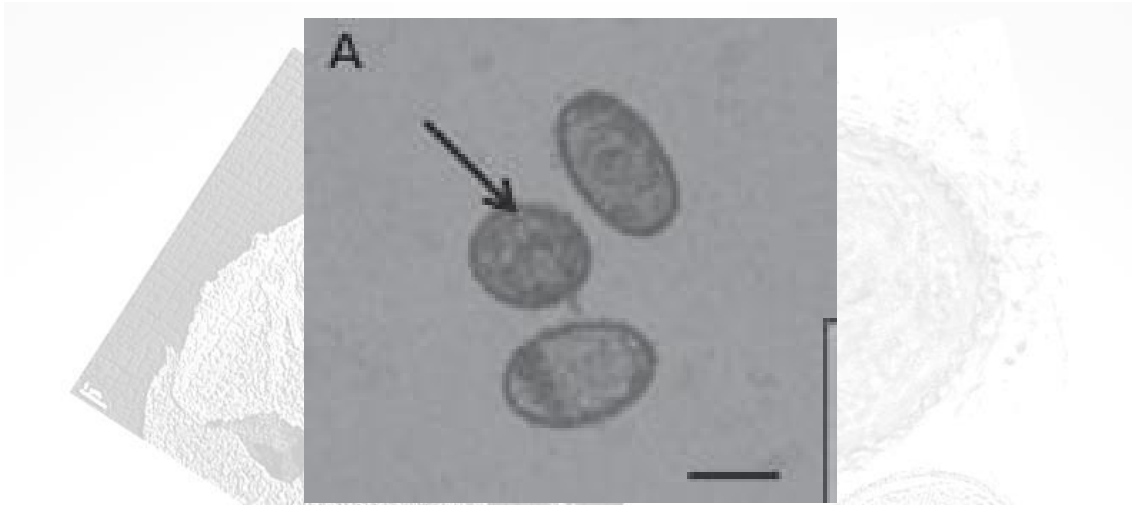
Otra observación en este ensayo fue que poner los extractos enzimáticos crudos puros o diluidos al medio no mostró diferencia con respecto a si afectan más o menos a los huevos. Tampoco se encontró diferencia al colocar juntos los extractos de quitinasa y proteasa, como se observan en los valores de frecuencia de afectación, los cuales fueron presentados en las Tablas 11, 14, 17 y 20.

Otra observación a tener en cuenta es que las fotografías presentadas en resultados, grafican el daño y los efectos de las enzimas sobre los huevos, pero esto no significa que sean afectados el 100% de los huevos, siempre hay que recordar que el porcentaje de afectación se mantuvo alrededor del 60%, y esas fotos son las que muestran cómo se observó la alteración pero existió un poco más del 40% de huevos sin ser afectados. Estos porcentajes de huevos alterados coinciden con los presentados por Braga y cols., donde muestran que los extractos crudos de *P. chlamydosporia* (VC1 y VC4) contra huevos de *Ascaridia galli* afectan en un 64,1%<sup>208</sup>.

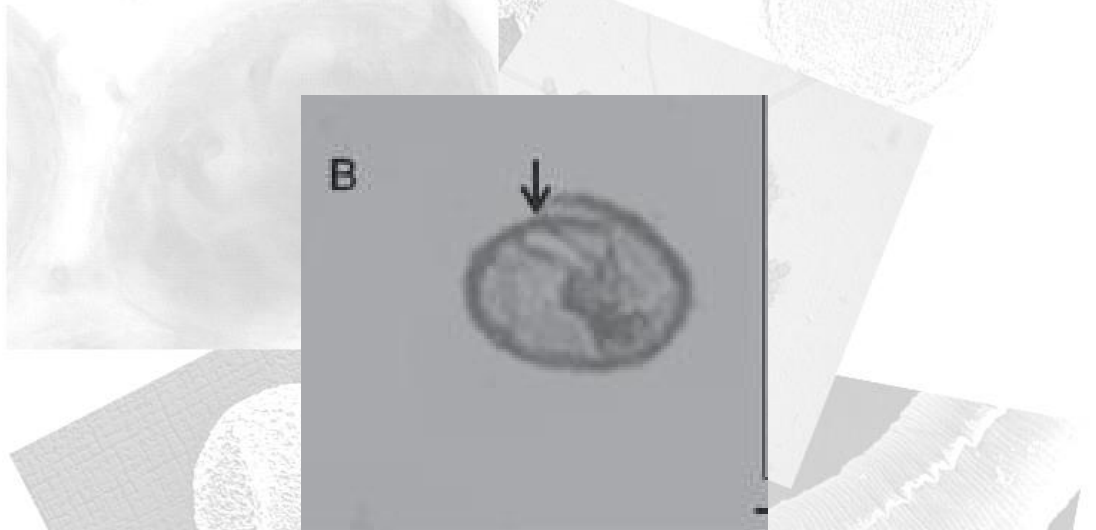
Una observación que llama la atención en todos los ensayos aquí presentados, es que, en presencia de algún componente diferente como ser en este caso los extractos enzimáticos, los huevos tienden a larvar más rápidamente, o sea que las condiciones externas de cultivo *in vitro* provocarían una maduración más apresurada de los huevos y por lo tanto el desarrollo de larva L2.

Braga y cols. enfrentaron huevos de *Platynosomum fastosum* a quitinasa y proteasa de *P. chlamydosporia* (VC4). Observaron los efectos de la acción enzimática y los compararon con los huevos control (Figura 127)<sup>209</sup>. Las observaciones de las figuras 128b y 129c y 129d son coincidentes con las presentadas en este trabajo (sec-

ción Resultados): la larva L2 logra salir del huevo por el adelgazamiento de la cubierta y se desintegra en el medio con el extracto enzimático (Figuras 125 y 126).

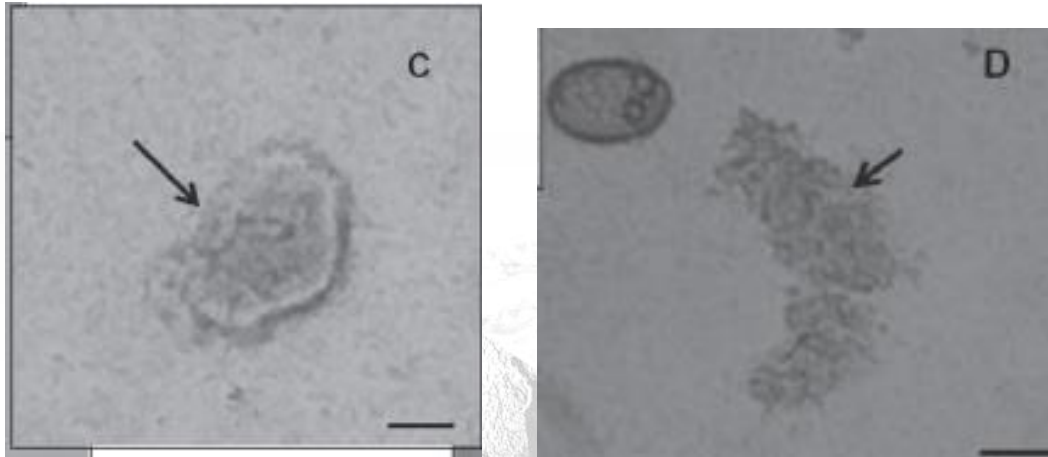


**Fig. 127.** Huevos intactos de *P. fastosum*. Grupo control <sup>209</sup>.



**Fig. 128.** Huevo de *P. fastosum*. Obsérvese la ruptura de la cubierta por la acción de las enzimas de *P. chlamydosporia* <sup>209</sup>.





**Fig. 129 c y d.** Huevos de *P. fastosum* destruidos por la acción de las enzimas de *P. chlamydosporia*<sup>209</sup>.

La purificación de las enzimas reduce la actividad enzimática, lo que puede deberse a que en el extracto crudo existe un sinergismo entre las isoformas, el cual se pierde en el proceso de purificación<sup>35</sup>. Este ensayo no contempló entre sus objetivos la purificación enzimática, por lo que siempre fueron ensayados los extractos crudos obtenidos y observar su acción sobre los huevos de *T. canis*.

Lelis y cols (2014) observaron las diferencias en el poder de destrucción de nematodos por el hongo *P. chlamydosporia* cuando éste crece en medio suplementado (46,6%) o sin suplemento (39,6%), y con el extracto crudo (53%). También destacan la velocidad de destrucción (25 días contra 7 con el extracto crudo), y enfatizan que este comportamiento pueda deberse a la alta concentración de enzimas en el extracto crudo<sup>203</sup>.

Hofstätter y cols. (2017), evaluaron el efecto de cuatro extractos fúngicos de cepas de *P. lilacinus*, *T. harzianum* y *T. virens*, en la maduración de huevos de *Ancylostoma*. Trabajaron con extractos crudos no filtrados y filtrados y con extracto proveniente de la maceración del micelio sin filtrar y filtrado. Los diferentes extractos mostraron una significativa actividad ovicida respecto al grupo control. La madurez y eclosión de los huevos se redujo en un 68,43% y 47,05% con *P. lilacinus* y un 56,43% con *T. harzianum* usando extracto crudo macerado. Con el mismo extracto pero de *T. virens* la reducción fue ligeramente más baja, 52,25%. Como conclusión, los autores dicen que con todos los extractos hubo una reducción de la madurez y eclosión de los huevos de *Ancylostoma*, y que el efecto ovicida observado fue causado por la acción de las enzimas hidrolíticas liberadas por los hongos. A pesar de que estos investigadores no purificaron ni identificaron las enzimas presentes en los

extractos que evaluaron, se cree que el efecto ovicida observado resulta de la degradación enzimática de proteasas y quitinasas <sup>210</sup>.

Habeed y cols., evaluaron el efecto del extracto enzimático crudo de quitinasas y proteasas producidas por hongos ambientales seguros, *Aspergillus* spp. NRC 4/5H, *Mucor* spp. NRC 5, *Trichoderma* spp. NRC 4/56, *Aspergillus sojae*, *Mucor ranosisinus* y *Aspergillus oryzae*, en huevos embrionados en desarrollo de *Hyalomma dromedarii*. Entre los resultados que obtuvieron se pueden mencionar: efecto ovicida de las quitinasas de *Aspergillus* spp. NRC 4/5H, *Mucor* spp. NRC 5 y *Trichoderma* spp. NRC 4/56, efecto ovicida con altas concentraciones de quitinasa en *Mucor* spp. NRC5, las proteasas de *A. sojae*, *M. ranosisinus* y *A. oryzae* son efectivas en todas las concentraciones. Por tanto estos autores indican que estas enzimas pueden ser usadas para el control de la infestación con huevos de *Hyalomma dromedarii* <sup>211</sup>.

Las proteasas producidas por hongos nematófagos han sido estudiadas porque ellas son importantes para la degradación de la cutícula de los nematodos <sup>212</sup>. De Freitas Soares y cols. mencionan el trabajo de Esteves y cols. (2009), quienes dicen que puede haber diferencias en los resultados de la producción de enzimas entre diferentes cepas de hongos nematófagos. Además, dicen que las condiciones de cultivo parecerían jugar un rol importante, las que deben ser estandarizadas para que se puedan hacer comparaciones <sup>212</sup>.

Aunque la mayoría de los estudios <sup>31, 47, 51, 179, 208, 209, 213</sup> han evaluado los filtrados de cultivos de hongos con huevos de fitonematodos y nematodos gastrointestinales de animales domésticos, Hofstätter y cols. decidieron probar diferentes extractos que involucran cultivos filtrados y macerados, observando que, independientemente del extracto de hongo utilizado, siempre hubo algún nivel de la actividad ovicida <sup>210</sup>. Sin embargo, el más alto porcentaje en la reducción en la maduración y eclosión de los huevos se observó con extracto crudo macerado, particularmente de *P. lilacinus*. Los autores sugieren que dicha actividad podría resultar de la presencia de enzimas liberadas durante el proceso de maceración que, junto con la acción de las enzimas extracelulares, aumentaría eficiencia del hongo <sup>210</sup>.

Por otro lado, algunos estudios han evaluado la actividad enzimática de cultivos filtrados o purificados de enzimas de hongos nematófagos en larvas y huevos de helmintos gastrointestinales de animales. Cuando los resultados de estos estudios fueron evaluados, se observó que, al probar la actividad enzimática de una serin proteasa aislada de *Monacrosporium thaumasium*, la reducción en el número de larvas de *Angiostrongylos vasorum* era solo 23.9%. Sin embargo, cuando el extrac-

to enzimático crudo de *D. flagrans* fue utilizado en larvas del mismo nematodo, el porcentaje de reducción alcanzó 71.3%, sugiriendo que la combinación de las enzimas hidrolíticas aumentan la actividad ovicida<sup>47</sup>. Del mismo modo, en otros estudios que usaron extractos enzimáticos crudos de *Pochonia chlamydosporia* en huevos de *Cyathostominae* y *Ancylostoma* encontraron una reducción en la maduración y eclosión del 72.8% y 76.8% respectivamente, un poco superior a lo informado en el presente estudio, aunque los huevos utilizados en cada investigación son diferentes<sup>47, 213</sup>.

En una investigación previa, Huang y cols. encontraron que el sinergismo de proteasas y quitinasas de *P. lilacinus* fue capaz de reducir significativamente el desarrollo y eclosión de huevos de *M. javanica*<sup>32</sup>. Del mismo modo, Tikhonov y cols. informaron que la acción combinada de proteasas y quitinasas destruye las capas de lípidos del huevo, causa la hidrólisis de la quitina y altera la capa vitelina<sup>27</sup>.

La contaminación de suelos con los estadios infectantes, huevos y larvas, han demostrado ser la mayor fuente de contaminación con geohelmintos<sup>57</sup>. Además, el uso de extractos crudos enzimáticos es también un artificio, aunque reciente, que puede ser usado para combatir los huevos o larvas de geohelmintos<sup>212</sup>.



## 27. CONCLUSIONES

1. Se aislaron los hongos saprófitos de suelos de plazas y parques de la ciudad de Corrientes, datos que actualizan la flora fúngica de la ciudad.
2. Se recuperaron huevos de *Toxocara* spp. de plazas y parques de la ciudad de Corrientes y cuyo resultado de frecuencia de huevos (13,43%) en suelos se mantuvo en el rango de los valores ya publicados para la zona.
3. Se lograron identificar el 83% (40 géneros y 69 especies) de las cepas fúngicas aisladas por los métodos de aislamiento elegidos para tal fin.
4. Se eligieron cuatro especies de hongos, *C. indicum*, *C. keratinophylum*, *C. lunata* y *T. ajelloi*, para realizar los ensayos de interacción con huevos de *T. canis*, obedeciendo esa elección a: frecuencia de recuperación en los suelos, antecedentes de antagonismo con huevos de nematodos tanto positivo como negativo y actividad quitinolítica.
5. Este trabajo es el **primero** que muestra la interacción entre huevos de *T. canis* y los hongos saprófitos *C. indicum*, *C. keratinophylum*, *C. lunata* y *T. ajelloi*.
6. La interacción entre los huevos de *T. canis* con los hongos saprófitos reveló que: *C. indicum* ejerce una acción mecánica, afectando el 72,7% de huevos, presentando un efecto ovicida alto (nivel 4: 50-79% de huevos afectados); *C. keratinophylum* posee una actividad ovicida alta, con un 74 % de huevos afectados; *C. lunata* muestra también una acción ovicida alta (78,7%, nivel 4); en tanto que *T. ajelloi*, lo hace en muy bajo porcentaje, 18%, por lo que tiene actividad ovicida baja (nivel 2: entre 15 y 20% de afectación).
7. Las interacciones observadas al Microscopio óptico sobre los huevos de *T. canis* fueron:
  - Para *C. indicum*: hifas rodeando o penetrando los huevos, cambios en la membrana del huevo, como ser cubierta adelgazada y sin la trama tipo "panal" característica, y larvas vacuoladas.
  - Para *C. keratinophylum*: cubierta adelgazada, embrión vacuolado e hifas penetrando y rodeando el huevo.

- Para *C. lunata*: afecta sobre todo el embrión y evita el desarrollo a larva de estadio 2. Se observa también el adelgazamiento de la cubierta con el consiguiente aumento de la permeabilidad. Las hifas pueden penetrar y desarrollarse en el interior del huevo.

- Para *T. ajelloi*: la cubierta adelgazada, el crecimiento hifal en el interior del huevo y la vacuolización del contenido.

8. Las observaciones al Microscopio Electrónico de Barrido revelaron que los 3 géneros fúngicos ensayados, ejercen un efecto Tipo 3, según la clasificación de Lýsek, sobre los huevos de *T. canis*.

- En los ensayos con *C. indicum* y *C. keratinophylum* se observan las hifas penetrando los huevos y las alteraciones tanto en la cubierta como en el interior del huevo afectando también al embrión.

- *Curvularia lunata* afecta la cubierta de los huevos, penetra y coloniza el interior, provocando el no desarrollo a larva infectante de los huevos de *T. canis*.

- *Trychophyton ajelloi* muestra un efecto no tan marcado como en los otros dos géneros fúngicos ensayados: penetración de la cubierta y alteración del embrión.

9. En este trabajo se enfrenta por **primera** vez los extractos enzimáticos crudos (proteasa y quitinasa) de los hongos con los huevos de *T. canis*.

10. Los enfrentamientos extractos enzimáticos – huevos de *T. canis* revelan que:

- Los extractos enzimáticos de proteasa y quitinasa de *C. indicum* afectan a los huevos tanto a los 7 como a los 14 días, y que se mantiene sin haber sinergismo al combinar ambas enzimas. El valor promedio de 65% de huevos afectados indica que, aunque no se afecten el 100% de los huevos, la actividad ovicida del hongo es alta (nivel 4) y concuerda con el nivel de actividad ovicida cuando lo que se enfrentaba era el hongo propiamente dicho.

- Los extractos enzimáticos de *C. keratinophylum* también afectan considerablemente a los huevos de *T. canis*, con un porcentaje promedio para las dos enzimas de 66% de afectación, lo que se condice con el nivel alto de actividad ovicida que muestra este hongo.

- La incubación de los huevos de *T. canis* en presencia de extractos enzimáticos crudos de *C. lunata*, arrojó que el nivel de afectación es alto (65%), coincidente con el nivel 4 observado en el ensayo de incubación directa hongo-huevo. Con este

grupo experimental tampoco se observa un aumento de la interacción al combinar ambas enzimas, manteniendo el 65% de afectación.

- Los ensayos realizados con los extractos enzimáticos de *T. ajelloi* son compatibles con los ensayos de incubación huevo de *T. canis*-hongo, cuya actividad ovicida era baja (18%). El porcentaje de afectación al experimentar con los extractos enzimáticos también resultó bajo (34% en promedio), y por lo tanto su actividad ovicida es baja.

11. Las alteraciones o afectaciones observadas en todos los enfrentamientos huevo-extracto enzimático crudo fueron:

- Para ambos *Chrysosporium* se observaron cambios en las características de la cubierta, entre ellos, adelgazamiento, permeabilidad en exceso, vacuolización del embrión, interior del huevo desorganizado y larvas L1 sin movimiento.

- Para *C. lunata* fueron: desorganización y vacuolización interna del embrión, adelgazamiento de la cubierta pero en mucha menor medida respecto al género *Chrysosporium*, y ese adelgazamiento se observa mejor cuando los huevos son enfrentados a ambas enzimas.

- Para *T. ajelloi* se pueden resumir en: cambios en el interior de los huevos y aumento de la permeabilidad de la cubierta para alcanzar y destruir al embrión.

Esta Tesis Doctoral describe por primera vez la interacción de los hongos saprófitos *C. indicum*, *C. keratinophilum*, *C. lunata* y *T. ajelloi* con huevos de *T. canis*, mostrando que esa interacción incluye acciones mecánicas, demostradas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, y acciones enzimáticas, demostradas con los ensayos realizados con extracto crudo de las enzimas proteasa y quitinasa de cada uno de los hongos.

Es importante mencionar que la existencia de *C. indicum*, *C. keratinophilum* y *C. lunata* en los suelos afecta la viabilidad de los huevos de *T. canis* y por lo tanto la presencia de los mismos en el medio ambiente se ve disminuida. Es acertado decir que estos hongos ejercen su acción sobre los huevos en el ambiente, dato que se relaciona con el bajo porcentaje de recuperación de huevos de los suelos independientemente de la técnica empleada para ello. *T. ajelloi*, existe en bajo porcentaje en los suelos, por lo que su presencia no afecta a la viabilidad de los huevos en el ambiente.

## 28. BIBLIOGRAFIA

1. Lysek H, Nigenda G. The autodehelminthizing capacity of the soil. *Salud pública de México*. 1989; 31(6):763–71.
2. Qureshi SA, Ruqqia, Sultana V, Ara J, Ehteshamul-Haque S. Nematicidal potential of culture filtrates of soil fungi associated with rhizosphere and rhizoplane of cultivated and wild plants. *Pak J Bot*. 2012; 44(3):1041–6.
3. Dijksterhuis J, Veenhuis M, Harder W, Nordbring Hertz B. Nematophagous fungi: physiological aspects and structure function relationships. *Adv Microb Physiol*. 1994; 36:111–46.
4. Braga FR, de Araújo JV. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014; 98(1):71–82.
5. Braga FR, Araujo JM, Araujo JV, Freitas Soares FE, Oliveira Tavela A, Frassy LN, et al. In vitro preadatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* firts-satge larvae. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(1):108–10.
6. Nogales B. La Microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. 2005; 14(2):41–51.
7. Ramos E, Zuñiga D. Efecto de la humedad, temperatura y ph del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecol Apl*. 2008; 7(1–2):123–30.
8. Foght J, Aislabie J. Enumeration of soil Microorganisms. In: R. Margesin FS, editor. *Manual for Soil Analysis*. 2005. p. 361.
9. Pfenning LH, Magalhães De Abreu L. Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas.
10. Yang J, Tian B, Liang L. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 75:21–31.
11. Dong LQ, Zhang KQ. Microbial control of plant-parasitic nematodes: A five-party interaction. *Plant Soil*. 2006; 288(1–2):31–45.
12. Bedelu T, Gessesse A, Abate D. Relation of protease production to nematode-degrading ability of two *Arthrobotrys* spp . *World J Microbiol Biotechnol*. 1998; 14:731–4.
13. López LV, Jansson H-B. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Cuad Biodivers*. 2001; 6(1):12–5.
14. Minglian Z, Minghe M, Keqin Z. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia*. 2004; 96(1):16–22.

15. Gray N. Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, pH and nematodes density on distribution. *Soil Biol Biochem.* 1985; 17(4):499–507.
16. Hayes W, Blackburn F. Estudios sobre la nutrición de *Arthrobotrys oligospora* Fres y *A. robusta* Dudd: La fase predaceous. *Ann Appl Biol.* 1966;
17. Nordbring-Hertz B. Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. *Microbiol Sci.* 1988; 5(4):108–16.
18. Tunlid A, Rosen S, Ek B, Rask L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology.* 1994; (140):1687–95.
19. Kunert J. On the mechanism of penetration of ovicidal fungi through eggshells of parasitic nematodes. Descomposition of chitinous and ascaroside layers. *Folia Parasitol (Praha).* 1992; 39:61–6.
20. Nordbring-Hertz B, Jansson HB, Tunlid A. Nematophagous fungi. In: Sons JW&, editor. *Encyclopedia of life sciences.* 2006. p. 1–11.
21. Lopez-Llorca L. Purification and properties of extracellular proteasas produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Can J Microbiol.* 1990; 36:530–7.
22. Ciarmela ML, Minvielle MC, Lori G, Basualdo JA. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol.* 2002; 103(3):251–7.
23. Lýsek H, Stěrba J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitol (Praha).* 1991; 38(3):255–259.
24. Lýsek H, Krajčí D. Penetration of ovicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* eggshells. *Folia Parasitol (Praha).* 1987; 34(1):57–60.
25. Basualdo JA, Ciarmela ML, Sarmiento PL, Minvielle MC. Biological activity of *Paecilomyces* genus against *Toxocara canis* eggs. *Parasitol Res.* 2000 Oct;86(10):854–9.
26. Jansson H-B, Tunlid A, Nordbring-Hertz B. Nematodes. In: T. Anke, editor. *Fungal Biotechnology.* 1997. p. 38–50.
27. Tikhonov VE, Lopez-Llorca L V. Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genet Biol.* 2002; 35:67–78.
28. Jansson H, Tunlid A, Nordbring-Hertz B. Nematodes. In: Chapman & Hall W, editor. *Fungal Biotechnology.* 1997. p. 33–50.
29. Wharton D. Nematode eggshells. *Parasitology.* 1980; 81:447–63.



30. Tunlid A, Johansson T, Nordbring-Hertz B. Surface polymers of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J Gen Microbiol*. 1991; 137(6):1231–1240.
31. Bonants PJM, Fitters PFL, Thijs H, Belder E Den, Waalwijk C, Henflings JWDM. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology*. 1995; 141:775–84.
32. Huang X, Zhao N, Zhang K. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Res Microbiol*. 2004; 155(10):811–6.
33. Franco Chávez, KG Rodriguez Navarro, S Cervantes Mayagoitia, JF Barranco Florido J. Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Soc Rural Prod y medio Ambient*. 2011; 11(22):143–60.
34. Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;71: 773–82.
35. Duo-chuan L. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*. 2006; 161:345–60.
36. Vranova V, Rejsek K FP. Proteolytic activity in soil: A review. *Appl Soil Ecol*. 2013; 70: 23–32.
37. Tunlid A, Jansson S. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl Environ Microbiol*. 1991; 57(10):2868–72.
38. La Cruz JD, Pintor-toro JA, Benitez T, Llobell A, Romero LC. A Novel Endo- $\beta$ -1, 3-Glucanase , BGN13 . 1. Involved in the Mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol*. 1995; 177(23):6937–45.
39. Olivares-Bernabeu CM, López-Illorca LV. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 19: 104–10.
40. Khan A, Williams K, Molloy MP, Nevalainen H. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expr Purif*. 2003; 32: 210–20.
41. Yang J, Huang X, Tian B, Wang M, Niu Q, Zhang K. Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity. *Biotechnol Lett*. 2005; 27: 1123–8.
42. Yang J, Liang L, Zhang Y, Li J. Purification and cloning of a novel serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylellina varietas* and its potential roles in infection against nematodes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 75:557–65.

43. Yang J-K, Ye F-P, Mi Q-L, Tang S-Q, Li J, Zhang K-Q. Purification and Cloning of an Extracellular Serine Protease from the Nematode-Trapping Fungus *Monacrosporium cystosporium*. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18(5):852-8.
44. Wang RB, Yang JK, Lin C, Zhang Y, Zhang KQ. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishanna*. *Lett Appl Microbiol*. 2006; 42: 589-94.
45. Ciarmela M, Sanchez Thevenet P, Alvarez H, Minvielle M, Basualdo J. Effect of *Paecilomyces lilacinus* on the viability of oncospheres of *Taenia hydatigena*. *Vet Parasitol*. 2005; 131:61-4.
46. Braga FR, Araújo J, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, et al. Observacao in vitro da acao dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillum chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40(3): 356-8.
47. Braga FR, Araujo JM, Ricardo e Silva A, Araujo JV, Carvalho RO, Freitas Soares FE, et al. Acao ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44(1):116-8.
48. Blaszkowska J, Wojcik A, Kurnatowski P, Szwabe K. Biological interactions between soil saprotrophic fungi and *ascaris suum* eggs. *Vet Parasitol*. 2013; 196: 401-8.
49. Blaszkowska J, Kurnatowski P, Wojcik A, Goralska K, Szwabe K. In vitro evaluation of the ovistatic and ovicidal effect of the cosmopolitan filamentous fungi isolated from soil on *Ascaris suum* eggs. *Vet Parasitol*. 2014;199:165-71.
50. Araújo J, Santos M, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 1995; 47(1):37-42.
51. Braga FR, Araujo JM, Alves CDF, Carvalho RO, Arau J V. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol*. 2010;
52. Carvalho RO, Araujo J V., Braga FR, Araujo JM, Alves CDF. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol*. 2010; 169(1-2):123-7.
53. Frassy LN, Braga FR, Ricardo e Silva A, Araújo J, Ferreira SR, Grassi de Freitas L. Destruicao de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(1):102-4.
54. Araujo JM, Araújo JV De, Braga FR, Ferreira SR, Tavela ADO. Predatory activity of chlamydospores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis*

- eggs under laboratory conditions. *Rev Bras Parasitol veterinária*. 2013; 22(1):171–4.
55. De Souza Maia Filho F, Nunes Vieira J, Aires Berne ME, Stoll FE, Da Silva Nascente P, Pötter L, et al. Fungal ovicidal activity on *Toxocara canis* eggs. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(4):226–30.
56. Mazurkiewicz-Zapalowicz K, Jaborowska-Jarmoluk M, Kolodziejczyk L, Kuzna-Grygiel W. Comparison of the effect of the chosen species of saprotrophic fungi on the development of *Toxocara canis* and *Ascaris suum* eggs. *Ann Parasitol*. 2014; 60(3):215–20.
57. Gortari C, Cazau C, Hours R. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Rev Iberoam Micol*. 2007; 24:24–8.
58. Ciarmela ML. Efecto Ovicida de Hongos del Suelo sobre Huevos de *Toxocara canis* (Werner) Johnston. Vol. 1. Universidad Nacional de La Plata; 2008.
59. Ciarmela M, Arambarri A, Basualdo J, Minvielle M. Effect of saprotrophic soil fungi on *Toxocara canis* eggs. *Malays J Microbiol*. 2010; 6(1):75–80.
60. Gortari MC, Galarza BC, Cazau MC, Hours RA. Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. *Malays J Microbiol*. 2008; 4(2):35–41.
61. Anaruma Filho F, Chieffi PP, Correa CRS, Camargo ED, Silveira EPR da, Aranha JJB, et al. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the municipality of Campinas (SP), Brazil. *Rev do Inst Med Trop São Paulo*. 2002; 44(6):303–7.
62. Delgado O, Rodríguez-Morales AJ. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. *Boletín Malariol y Salud Ambient*. 2009; XLIX (1):1–33.
63. Riera Lizandra MC. Estudios sobre la Toxocariosis humana en Barcelona. Puesta a punto y ensayo de una técnica diagnóstica. Barcelona; 1990.
64. Mizgajska H. Eggs of *Toxocara* spp. in the environment and their public health implications. *J Helminthol*. 2001; 75(2):147–51.
65. Burgwyn B, Nagel B, Ryerse J, Bolla RI. Heterodera glycines: eggshell ultrastructure and histochemical localization of chitinous components. *Exp Parasitol*. 2003; 104(1–2):47–53.
66. Bojanich MVI, López MA. *Toxocara canis* bajo la lupa. *Rev Argent Microbiol*. 2009; 74–6.
67. Bojanich, MVI. Inmunodiagnóstico de la Toxocariosis Humana. Efecto de los Epítopes Glucídicos en la Especificidad de los Enzimoimmunoensayos para Toxoca-

riosis (TESIS DE MESTRÍA). Editorial Académica Española. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH y Co. ISBN: 978-3-8484-5055-8. 2012

68. Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans I. Diagnostic morphology of infective second stage *Toxocara* larvae. *J Parast.* 1956a; 42:349–62.

69. Nichols RL. The etiology of vsiceral larva migrans II. Comparative larvae morphology of *Ascaris lumbricoides*, *necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Ancylostoma caninum*. *J Parast.* 1956b; 42:363–99.

70. Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology and Molecular Aspects. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16:265–72.

71. Magnaval J, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *Korean Lournal Parasitol.* 2001; 39: 1–11.

72. Glickman L, Schantz P. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidem Rev.* 1981; 3:230–50.

73. Minvielle M, Niedfeld G, Ciarmela L, Basualdo JA. Toxocariosis causada por *Toxocara canis*: aspectos clinicoepidemiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1999; 17:300–6.

74. Schantz PM, Glickmam LT. Ascáridos de perros y gatos: un problema de salud pública y de medicina veterinaria. *Bol Sanit Panam.* 1983; 94(6).

75. Beaver PC. Observations on the epidemiology of ascariasis in a region of high hookworm endemicity. *J Parasitol.* 1952; 38:445–53.

76. Beaver PC. Biology of soil transmitted helminths: the massive infection. *Heal Lab Sci.* 1975;12:116–25.

77. Wilder MC. Nematode endophthalmitis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1950;55:99–109.

78. Dent DH, Nichols RL, Beaver PC, Carrera GM, Staggers RJ. Visceral larva migrans with case report. *Am J Pathol.* 1956;32:284–8.

79. Neafie RC, Connor DH. Visceral larva migrans. In: Binford CH CD, editor. *Pathology of tropical and extraordinary diseases.* Washington DC; 1976, 433–6.

80. Dent LA, Daly CM, Mayrhofer G, Al E. Interleukin-5 transgenic mice show enhanced resistance to primary infections with *Nippostrongylus brasiliensis* but not primary infections with *Toxocara canis*. *Infect Immun.* 1999;67:989–93.

81. Jones RE, Finkelman FD, Hester RB, Kayes SG. *Toxocara canis*: failure to find IgE receptors (Fc epsilon R) on eosinophils from infected mice suggests that murine eosinophils do not kill helminth larvae by an Ig E-dependent mechanism. *Exp Parasitol.* 1994;78:64–75.

82. Parson JC, Bowman DD, Grieve RB. Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acuted chronic murine toxocariasis. *Am J trop Med Hyg.* 1986;35(5):974–81.

83. Kayes SG, Oaks JA. Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. *Am J Pathol.* 1978;93:277-94.
84. Glikman L, Cypess R, Cumrine P, Gitlin D. Toxocara infection and epilepsy in children. *J Pediatr.* 1979;94:75-8.
85. Kayes GS, Jones RE, Omholt PE. Pulmonary granuloma formation in murine Toxocariasis: transfer of granulomatous hypersensitivity using bronchoalveolar lavage cells. *J Parasitol.* 1988;74(6):950-6.
86. Woodruff AW, Bissereu B, Bowe JC. Infection with animal helminths as a factor in causing poliomyelitis and epilepsy. *Br Med J.* 1966;1:1576-9.
87. Arpino C, Gattinara G, Piergili D, Curatolo P. Toxocara infection and epilepsy in children: a case-control study. *Epilepsia.* 1990;38:33-6.
88. Benitez J, Herreros G, Guillén J, Fenoy S, Banares A, García J. Bilateral ocular toxocariasis demonstrated by aqueous humor enzyme linked immunosorbent assay. *Am J Ophthalmol.* 1995;514-6.
89. Lopez Velez R, Suarez de Figueroa M, Gimeno L, García Camacho A, Fenoy S, Guillén JL, et al. Toxocariasis ocular o retinoblastoma? *Enf Inf Microbiol Clin.* 1995;13:242-5.
90. Shields J. Ocular toxocariasis. *Rev Surv Ophthalmol.* 1984;28:361-81.
91. Petithory J, Liotet S, Chumeil C, Moissam F, Beddok A, Batellier L, et al. Le syndrome de larva migrans oculaire. *Rev Fr Lab.* 1990;207:69-80.
92. Niedfeld G, Minvielle M, de Falco A, Ghiani H, Paulin P, Ciarmela L, et al. Toxocarosis encubierta y enfermedades alérgicas. *Medicina (B Aires).* 1997;57-61.
93. López MA, Bojanich M V., Jacobacci JM, Sercic C, Michelini A, Alonso JM. Toxocara canis y Asma bronquial. *Med (Buenos Aires).* 2010;70(1):75-8.
94. Nelson S, Greene T, Ernhart C. Toxocara canis infection in preschool age children: risk factors and cognitive development of preschool children. *Neurotoxicol Teratol.* 1996;105:273-83.
95. Nagakura K, Tachibana H, Kaneda Y KY. Toxocariasis possibly caused by ingesting raw chicken. *J Infect Dis.* 1989;160:735-6.
96. Salem G SP. Toxocaral visceral larva migrans alter ingestion of raw lamb liver. *Clin Infect Dis.* 1992;15:743-4.
97. Stürchler D, Weiss N GM. Transmission of toxocariasis. *J Infect Dis.* 1990;162:571-2.
98. Baixench MT, Magnaval JF DP. Epidémiologie de la toxocarose chez les étudiants de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. *Rev Med Vet.* 1992;143:749-52.
99. Borecka A, Klapiec T. Epidemiology of human toxocariasis in Poland. A review of cases 1978-2009. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(1):28-31.

100. Rostami A, Ebrahimi M, Mehravar S, Fallah Omrani V, Fallahi S, Behniafar H. Contamination of commonly consumed raw vegetables with soil transmitted helminth eggs in Mazandaran province, northern Iran. *Int J Food Microbiol.* 2016;225:54–8.
101. Minvielle MC, Pezzani BC, Basualdo Farjat J. Frecuencia de hallazgos de huevos de helmintos en materia fecal canina recolectada en lugares públicos de la ciudad de La Plata (Argentina). *Boletín Chil Parasitol.* 1993;48:63–5.
102. Mizgajska H. The role of some environmental factors in the contamination of soil with *Toxocara* spp and other geohelminth eggs. *Parasit Int.* 1997;46:67–72.
103. Dubinsky P, Havasióvá-Reitervá K, Petko B, Hovorka I TO. Role of small mammals in the epidemiology of toxocariasis. *Parasitology.* 1995;110:187–93.
104. Di Sacco B, Bartoloni A GP et al. Seroprevalence of *Toxocara canis* antibodies in a South American population (Bolivia). *Parassitologia.* 1994;36:49.
105. Agudelo C, Villarreal E, Cáceres E, Al. E. Human and dogs *Toxocara canis* infection in a poor neighborhood in Bogotá. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1990;85:75–8.
106. Filix Pifano C, Orihuela AR, Delgado O, Cortez R, Salha Abdul-Hadi S, Dale de Ortiz M G de GJ. La Toxocariasis humana en Venezuela, especialmente en el valle de Caracas. *Gac Med Caracas.* 1988;64(2):283–90.
107. Chieffi PP, Ueda M CE et al. Visceral larva migrans: a seroepidemiological survey in five municipalities of Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 1990;32:204–10.
108. Teixeira CR, Chieffi PP, Lescano SAZ, de Melo Silva EO, Fux B, Cury MC. Frequency and risk factors for Toxocariasis in children from a pediatric outpatient center in southeastern Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2006;48(5):251–5.
109. Martínez M, García H, Figuera L, Gonzalez V, Lamas F, López K, et al. Seroprevalence and risk factors of toxocariasis in preschool children in Aragua state, Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109(9):579–88.
110. Silva M, Amor A, Santos L, Galvao A, Oviedo Vera A, Silva E, et al. Risk factors for *Toxocara* spp. seroprevalence and its association with atopy and asthma in school-age children in a small town and semi-rural areas of Northeast Brazil. *Acta Trop.* 2016;
111. Genchi C, Di Sacco B, Gatti S, Sangalli G, Scaglia M. Epidemiology of human toxocariasis in northern Italy. *Parassitologia* 1990; 32: 313-319.
112. Ljungstrom I, Knapen F. An epidemiological and serological study of *Toxocara* infection in Sweden. *Scan J Infect Dis.* 1989;21:87–93.
113. Girdwood RWA, Quinn RG, Bruce RG SH. The incidence of *Toxocara canis* in dogs, faeces and soils and the diagnosis of infections in human. *Parasitology.* 1978;77(3):XIX.

114. Glickman LT, Magnaval JF DL et al. Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? *Am J Epidemiol.* 1987;125:1019–34.
115. Boldis V, Ondriska F, Spitalska E, Reiterova K. Immunodiagnostic approaches for the detection of human toxocarosis. *Exp Parasitol.* 2015;159:252–8.
116. Kroten A, Toczyłowski K, Kiziewicz B, Oldak E, Sulik A. Environmental contamination with *Toxocara* eggs and seroprevalence of toxocariasis in children of northeastern Poland. *Parasitol Res.* 2016;115(1):205–9.
117. Chomel BB, Kasten R, Adams C et al. Serosurvey of some major zoonotic infections in children and teenagers in Bali, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1993;24:321–6.
118. Magnaval JF, Michault A, Calon N CJ. Epidemiology of human toxocariasis in La Reunion. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1994;88:531–3.
119. Minvielle M, Taus M, Raffo M, Ciarmela L, Basualdo J. Seroprevalence of toxocariasis in blood donors of Gualeguaychú, Argentina. *Trans Roy Trop Med Hyg.* 2000;94:373–5.
120. Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, Al E. Human Toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(3):281–285.
121. Alonso JM, López MA, Bojanich M V. Infección por *Toxocara canis* en población adulta sana de un área subtropical de Argentina. *Parasitol Latinoam.* 2004;61–4.
122. Taranto N, Cajal S, De Marzi M, Fernandez M, Frank F, Bru A, et al. Clinical status and parasitic infection in a Wichi Aboriginal community in Salta, Argentina. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97:554–8.
123. Alonso JM, Bojanich MVI, Chamorro M, Gorodner JO. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42(4):235–7.
124. Fonrouge R, Radman N, Archelli S, Guardis M GAL. Investigación de anticuerpos IgG anti *Toxocara canis* en pacientes pediátricos muestreados al azar, que asisten a la consulta hospitalaria por diversas patologías. In: Terceras Jornadas Rioplatenses de Microbiología (Buenos Aires). 1997.
125. Bojanich M, Lopez M, Fernández G, Azula L, Alonso JM. Infección por *Toxocara canis* en población infantil vulnerable del Noreste de Argentina. *Enfermedades Emergentes.* 2008; 10(2):84–7.
126. Archelli S, Santillán G, Fonrouge R, Céspedes G, Burgos L, Radman N. Toxocariasis: seroprevalence in abandoned-institutionalized children and infants. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46(1):3–6.

127. Chiodo P, Basualdo J, Ciarmela L, Pezzani B, Apezteguía M MM. Related factors to human toxocariasis in a rural community of Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):397-400.
128. Mattos G, Dos Santos P, Telmo P, Berne M, Scaini C. Human Toxocariasis: Prevalence and factors associated with biosafety in research laboratories. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;
129. Gilliespie SH. Migrating worms. In: *Medical parasitology A practical approach*. Oxford University Press; 1995. p. 177-83.
130. Monzon RB, Sanchez AR, Tadiaman BM, Najos OA, Valencia EG, Rueda RR, et al. A comparison of the role of *Musca domestica* (Linnaeus) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) as mechanical vectors of helminthic parasites in a typical slum area of Metropolitan Manila. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1991;22:222-8.
131. Barbosa J, Fernández Presas AM, Vazquez TO RH. Frecuencia de *Toxocara canis* en perros y áreas verdes del sur de la ciudad de México, Distrito Federal. *Vet Mex*. 1998; 29:239-44.
132. Duménigo B GD. Contaminación de suelos en la ciudad de La Habana con huevos de *Toxocara canis*. *Rev Cubana Med Trop*. 2005;47:178-80.
133. Milano AMF, Oscherov EB. Contaminación de aceras con enteroparásitos caninos en Corrientes, Argentina. *Parasitol Latinoam*. 2005;60:82-5.
134. Rinaldi L, Biggeri A, Carbone S, Musilla V, Catelan D, Veneziano V CG. Canine faecal contamination and parasitic risk in the city of Naples (southern Italy). *Vet Res*. 2006; 2:29.
135. Uga S. Prevalence of *Toxocara* eggs and number of faecal deposits from dogs and cats in sandpits of public parks in Japan. *J Helminthol*. 1993;67:78-82.
136. Zevallos Lezcano SA, Chieffi P, Peres B, O de Mello E, Velarde C, Salinas A RC. Soil contamination and human infection by *Toxocara* spp. in the urban area of Lima, Perú. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93:733-4.
137. Nooraldeen K. Contamination of public squares and parks with parasites in Erbil city, Iraq. *Ann Agric Environ Med*. 2015;22(3):418-20.
138. Gawor J, Borecka A. Risk of soil-transmitted helminth infections on agritourism farms in central and eastern Poland. *Acta Parasitol*. 2015;60(4):716-20.
139. Blaszkowska J, Górska K, Wójcik A, Kurnatowski P, Szwabe K. Presence of *Toxocara* spp. eggs in children's areas with varying degrees of access for animals. *Ann Agric Environ Med*. 2015;22(1):23-7.
140. Paller VG V, de Chavez E. *Toxocara* (Nematoda: Ascaridia) and other soil-transmitted helminth eggs contaminating soils in selected urban and rural areas in the Philippines. *Sci World J*. 2014;



141. Alonso J, Luna A, Bojanich M., Alonso M. Huevos de Toxocara en suelos destinados a la recreación en una ciudad argentina. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* 2006;40(2):219-22.
142. Gortari MC, Hours RA. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycol Prog.* 2008;7:221-38.
143. Larsen M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology.* 2000;120 Suppl:S121-31.
144. Lopez MA, Martin G, Del M, Chamorro C, Alonso JM. Toxocariosis En Niños De Una Region Subtropical. *Medicina (B Aires).* 2005;65:226-30.
145. Bojanich M, Lopez M, Fernández G, Azula L, Alonso JM. Infección por Toxocara canis en población infantil vulnerable del Noreste de Argentina. *Enfermedades Emergentes.* 2008;10(2):84-7.
146. Fernández GJ, Sottile ML. Huevos de Toxocara spp.: Prevalencia en parques y plazas de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Cartagena de Indias, Colombia;* 1998.
147. Alonso JM, Stein M, Chamorro MC, Bojanich M V. Contamination of soils with eggs of Toxocara in a subtropical city in Argentina. *J Helminthol.* 2001;75:165-8.
148. Marder G, Ulon S, Bottinelli O, Meza Fleitas Z, Lotero D, R. R, et al. Infestación parasitaria de suelos y materia fecal de perros y gatos de la ciudad de Corrientes. *Jornadas de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE.* 2002. Available from: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/cyt.htm>
149. Servicio Meteorológico Nacional. 2014. p. <http://www.smn.gov.ar/>.
150. Ciudad de Corrientes [en línea]. Wikipedia, la enciclopedia libre, 2015 [consultado 23 Feb 2015]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Ciudad deCorrientes](http://es.wikipedia.org/wiki/Ciudad_deCorrientes)
151. Salas A. Plazas de Corrientes. En: *Corrientes: calles, plazas y túneles de la ciudad Otra mirada (desde 1588 a la actualidad).* Buenos Aires: Artpress; 2009. p. 41-55.
152. Mangiaterra M, Giusiano G, González I. Hongos geófilicos en la zona occidental de la región chaqueña (Argentina). *Bol Micol.* 2007;22:21-9.
153. Quinn R, Smith H V, Bruce R, Girwood R. Studies on the incidence of Toxocara and Toxascaris spp ova in the environment. 1. A Comparison of flotation procederes for recovering Toxocara spp ova from soil. *J Hyg.* 1980;84:83-9.
154. Ybáñez M, Garijo M, Goyena M, Alonso F. Improved methods for recovering eggs of Toxocara canis from soil. *J Helminthol.* 2000;74:349-53.
155. Orr G. Keratinophilic fungi isolates from soil by hair bait technique. *Sabouraudia.* 1969;7:129-34.
156. Cano C, Guarro J. The genus *Aphanoascus*. *Mycol Res.* 1990;94:355-437.

157. Currah R. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae. *Mycotaxon*. 1985;24:1-216.
158. De Hoog G, Guarro J, Gené J, Figueras M. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. segunda ed. Utrecht, The Netherlands; 2000.
159. Domsch K, Gams W, Anderson T. Compendium of soil fungi. London: Academic Press; 1980.
160. Gams W. Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Stuttgart, Germany; 1971.
161. Ellis M. Dematiaceus hyphomycetes. Ellis M, editor. UK: Commonwealth Mycological Institute; 1971.
162. Solé M, Cano J, Pitarch L, Stchigel A, Guarro J. Molecular phylogeny of *Gymnoascus* and related genera. *Stud Mycol*. 2002;20:46-9.
163. Van Oorschot C. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. *Stud Mycol*. 1980;20:1-89.
164. Von Arx J. The ascomycete genus *Gymnoascus*. *Persoonia*. 1986;13:173-83.
165. Piontelli Laforet E. Manual de microrganismos filamentosos comunes. Claves, descripciones, imágenes y literatura. Segunda ed. Valparaíso, Chile: Alba Producciones; 2013.
166. Gupta A. A simple method of artificial hatching of *Toxocara canis* in vitro and preparation of excretory/secretory antigen. *Curr Sci*. 1984;53(10):529-30.
167. Sarmiento P, Ciarmela M, Sanchez Thevenet, P Minvielle M, Basualdo J. Comparison of preparation techniques of mixed samples (fungi-helminth eggs) for scanning electron microscopy by critical point drying. *Parasitol Res*. 2006;99:455-8.
168. Lingappa Y, Lockwood J. Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes. *Phytopathology*. 1962; 52:317-23.
169. Rodas Junco B, Quero Bautista M, Magaña Sevilla H, Reyes Ramírez A. Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp aisladas de suelos tropicales. *Rev Colomb Biotecnol*. 2009; XI(1):107-13.
170. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
171. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.
172. Hames B, Rickwood D. Electroforesis en gel de proteínas: un enfoque práctico. segunda ed. Rickwood D, Hames B, editors. Oxford: Oxford University Press; 1990. 383 p.

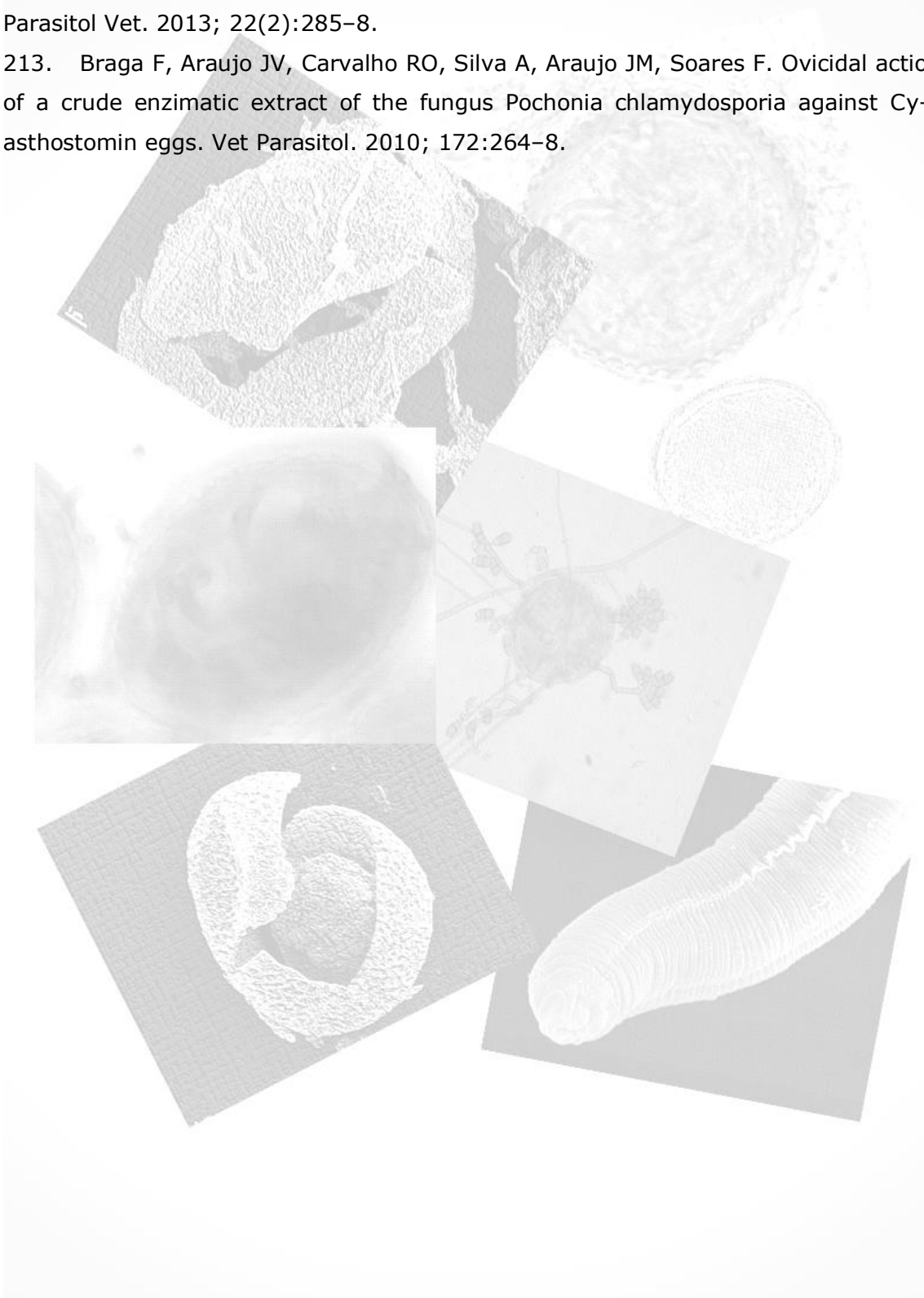
173. Mohanty S, Prakash S. Extracellular metabolites of *Trichophyton ajelloi* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *Curr Sci.* 2004;86(2):323–5.
174. Bourdon SH, Van Knippenberg PH. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular Biology.* Elsevier, editor.
175. Provincia de Corrientes. *Todo argentina.net.* 2012. Available from: <http://todoargentina.net/geografia/provincias/corrientes/relieve.html>
176. Bailey F, Gray N. The comparison of isolation techniques for nematophagous fungi from soil. *Ann Appl Biol.* 1989; 114:125–32.
177. Lýsek H, Fassatiová O, Cuervo Pineda N, Lorenzo Hernández N. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol (Praha).* 1982;29(3):265–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6890012>
178. Soto-Barrientos N, de Oliveira J, Vega Obando R, Montero-Caballero, D Vargas B, Hernández-Gamboa J, Orozco-Solano C. In-vitro predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Rev Biol Trop.* 2011; 59(1):37–52.
179. Braga FR, Ferreira SR, Araújo J V, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO, et al. Predatory activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara* (syn. *Neoascaris*) vitulorum eggs. *Trop Anim Health Prod.* 2010; 42(2):309–14.
180. Pereira Freire S, Mesquita Paiva L, de Luna-Alves Lima E, Maia L. Morphological, cytological and cultural aspects of *Curvularia pallescens*. *Rev Microbiol.* 1998; 29(3).
181. Carter E, Boudreaux C. Fatal cerebral Phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5419–23.
182. Ikram A, Hussain W, Luqman Satti M, Amin Wigar M. Invasive infection in a young immunocompetent soldier caused by *Scytalidium dimidiatum*. *J Coll Physicians Surg Pakistan.* 2009; 19(1):64–6.
183. Bojanich MV, Sarmiento MM, Giusiano G, Mangiaterra M, Basualdo JÁ. Huevos de *Toxocara canis* como anzuelo para hongos geófilos en una ciudad subtropical. *Rev Iberoam Micol.* 2015; 32(4):273–6.
184. Saumell C, Fusé L, Iglesias L, Fernández S, Fiel C. Enfoque bioecológico del potencial de los hongos nematófagos en el control biológico de tricostrongilídeos de rumiantes. *Rev Med Vet (Buenos Aires).* 2008; 89(2):45–54.
185. Bojanich MV, Alonso JM, Caraballo NA, Scholler MI, Lopez M, Garcia LM, et al. Assessment of the presence of toxocara eggs in soils of an arid area in Central-Western Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57(1):73–6.
186. Provincia del Chaco. *Todo argentina.net.* 2012 [cited 2018 Mar 19]. Available from: <http://todo-argentina.net/geografia/provincias/chaco/relieve.html>

187. Santarém V, Magoti L, Sichiari T. Influence of variables on centrifuge-flotation technique for recovery of *Toxocara* spp. eggs from soil. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2009;51:163–7.
188. Sievers G, Concha C, Gädicke P. Prueba de una técnica para recuperar huevos de *Toxocara canis* de muestras de tierra. *Parasitol Latinoam*. 2007; 62:61–6.
189. Minvielle MC, Pezzani BC BFJ. Frecuencia de hallazgos de huevos de helmintos en materia fecal canina recolectada en lugares públicos de la ciudad de La Plata (Argentina). *Boletín Chil Parasitol*. 1993; 48:63–5.
190. Sommerfelt IE, Degregorio O, Barrera M, Gallo G. Presencia de huevos de *Toxocara* spp en paseos públicos de la ciudad de Buenos Aires. *Rev Med Vet*. 1992; 73:71–3.
191. Fonrouge R, Guardis M, Radman N, Archelli S. Soil contamination with *Toxocara* spp. eggs in squares and public places from the city of La Plata, Buenos Aires , Argentina. *Boletín Chil Parasitol*. 2000; 55(3–4):83–5.
192. Córdoba A, Ciarmela M, Pezzani B, Gamboa M, De Luca M, Minvielle M, et al. Presencia de parásitos intestinales en paseos publicos urbanos en La Plata, Argentina. *Parasitol Latinoam*. 2002; 57:25–9.
193. Rubel D, Wisnivesky C. Magnitude and distribution of canine fecal contamination and helminth eggs in two areas of diferent urban structure, Greater Buenos Aires, Argentina. *Vet Parasitol*. 2005; 133:339–47.
194. Martin UO, Demonte MA. Urban contamination with zoonotic parasites in the central region of Argentina. *Med (Buenos Aires)*. 2008; 68:363–6.
195. Taranto N, Passamonte L, Marinconz R, De Marzi M, Cajal S, Malchiodi E. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. *Med (Buenos Aires)*. 2000; 60:217–20.
196. Soriano S, Barbieri L, Pierangeli N, Giayetto A, Manacorda A, Castronovo E, et al. Intestinal parasites and the environment: frequency of intestinal parasites in children of Neuquén, Patagonia, Argentina. *Rev Latinoam Microbiol*. 2001; 43(2):96–101.
197. Sánchez Thevenet P, Jensen O, Mellado I, Torrecillas C, Raso S, Flores ME, et al. Presence and persistence of intestinal parasites in canine fecal material collected from the environment in the Province of Chubut, Argentine Patagonia. *Vet Parasitol*. 2003; 117:263–9.
198. Brusoni C, Chistik J, Fernández C. Estudio de la contaminación con huevos de *Toxocara* sp. en suelos de espacios públicos de San Martin de los Andes, provincia de neuquén, Argentina. *Rev Electrónica Vet*. 2005; VI(10).

199. Fillaux J, Santillan G, Magnaval J-F, Jensen O, Larrieu E, Sobrino CD. Epidemiology of Toxocariasis in a Steppe environment : The patagonia study. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(6):1144-7.
200. Soriano S, Pierangeli N, Roccia I, Bergagna H, Lazzarini L, Celescinco A, et al. A wide diversity of zoonotic intestinal parasites infects urban and rural dogs in neuquén, Patagonia, Argentina. *Vet Parasitol.* 2010; 167:81-5.
201. Milano A, Oscherov E. Contaminación por parásitos caninos de importancia zoonótica en playas de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Parasitol Latinoam.* 2002; 75:165-8.
202. De S, Sanyal PK, Sarkar AK, Patel NK, Pal S, Mandal SC. Screening for Indian isolates of egg-parasitic fungi for use in biological control of fascioliasis and amphistomiasis in ruminant livestock. *J Helminthol.* 2008; 82(3):271-7.
203. Lelis RT, Braga FR, de Carvalho LM, de Paula AT, Araujo JM, Fausto MC, et al. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Acta Trop.* 2014; 139:88-92.
204. Jatala P. Biological control of plants-parasitic nematodes. *Ann Rev Phytopathol.* 1986; 24:453-89.
205. Irving F, Kerry B. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica.* 1986; 32:474-85.
206. Rebah F, Miled N. Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review. *Biotech.* 2012;
207. Delgado Blandón F, López Forero Y, Giraldo Cardozo EM. Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo Integr Plagas.* 2001; 60:43-9.
208. Braga FR, Araújo J, Araujo JM, Frassy LN, Tavela AO, Soares F, et al. *Pochonia chlamydosporia* fungal activity in a solid medium and its crude extract against eggs of *Ascaridia galli*. *J Helminthol.* 2012; 86(3):348-52.
209. Braga FR, de Freitas Soares FE, Araujo JM, da Fonseca LA, Hiura E, Garschagen Gava M, et al. Statistical experimental design to assess the influence of enzymes of nematophagous fungi versus helminths. *Res Vet Sci.* 2014; 97:527-32.
210. Delgado Menezes Hofstätter B, Oliveira da Silva Fonseca A, de Souza Maia Filho F, de Souza Silveira J, Maroneze Persici B, Pötter L, et al. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* eggs. *Rev Iberoam Micol.* 2017; 34(1):28-31.
211. Habeed S, Ashry H, Saad M. Ovicidal effect of chitinase and protease enzymes produced by soil fungi on the camel tick *Hyalomma dromedarii* eggs (Acari: Ixodidae). *J Parasitol Dis.* 2017; 41(1):268-73.

212. de Freitas Soares FE, Braga FR, de Araújo JV, dos Santos Lima W, Mozzer LR, de Queiroz J. Optimization of protease production by the fungus *Monacrosporium thaumasium* and its action against *Angiostrongylus vasorum* larvae. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013; 22(2):285–8.

213. Braga F, Araujo JV, Carvalho RO, Silva A, Araujo JM, Soares F. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against *Cyathostomum* eggs. *Vet Parasitol.* 2010; 172:264–8.



## 29. ANEXO

### TABLAS

TABLA 1. Ubicación taxonómica de hongos nematofagos; Phylum y Géneros Representativos (Dijksterhuis, 1994)	11
TABLA 2. Actividad enzimática de hongos nematofagos (Kunert, 1992)	25
TABLA 3. Concentraciones de los reactivos utilizados en la preparación de geles de poliacrilamida.	86
TABLA 4. Géneros y especies fúngicas identificadas en muestras de suelo de la ciudad de Corrientes.	91
TABLA 5. Plazas y plazoletas muestreadas para la recuperación de huevos de <i>T. canis</i> y la técnica utilizada para tal fin.	93
TABLA 6. Porcentaje de géneros y especies que desarrollaron sobre los huevos de <i>T. canis</i> .	94
TABLA 7. Frecuencia de géneros y especies de hongos aislados mediante la técnica del anzuelo queratínico.	95
TABLA 8. Grado de actividad enzimática para cada hongo y para cada sustrato, al día 14 de incubación.	125
TABLA 9. Concentraciones proteicas de los diferentes extractos, determinadas por Bradford.	130
TABLA 10. Marcador de peso molecular. Distancias de migración en geles SDS-PAGE	132
TABLA 11. Estimación del tamaño de banda incógnita	132

## GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Desarrollo de los huevos de <i>Toxocara</i> en función del tiempo. Grupo control	101
GRÁFICO 2. Desarrollo de los huevos de <i>Toxocara</i> en presencia de <i>Ch. indicum</i> en función del tiempo.	103
GRÁFICO 3. Desarrollo de los huevos de <i>Toxocara</i> en presencia de <i>Ch. keratyniphilum</i> en función del tiempo.	108
GRÁFICO 4. Comparación de la acción de ambos <i>Chrysosporium</i> y el control sobre los huevos de <i>Toxocara</i> en función del tiempo de incubación.	110
GRÁFICO 5. Desarrollo de los huevos de <i>Toxocara</i> en presencia de <i>C. lunata</i> en función del tiempo.	111
GRÁFICO 6. Desarrollo de los huevos de <i>Toxocara</i> en presencia de <i>T. ajelloi</i> en función del tiempo.	114
GRÁFICO 7. Logaritmo del peso molecular versus movilidad relativa del marcador de peso molecular.	132
GRÁFICO 8. Porcentaje de desarrollo de los huevos de <i>T. canis</i> a los 7 y 14 días de incubación.	133
GRÁFICO 9. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de proteasa.	136
GRÁFICO 10. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa.	137
GRÁFICO 11. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa y proteasa.	137
GRÁFICO 12. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de proteasa.	141
GRÁFICO 13. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa.	142
GRÁFICO 14. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa y proteasa.	142
GRÁFICO 15. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de proteasa.	147
GRÁFICO 16. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa.	147
GRÁFICO 17. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa y proteasa.	148
GRÁFICO 18. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa.	151
GRÁFICO 19. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de proteasa.	151
GRÁFICO 20. Porcentaje de afectación de los huevos de <i>T. canis</i> al ser incubados con extracto crudo enzimático de quitinasa y proteasa	152



## FIGURAS

FIGURA 1. Red adhesiva de <i>Dactylella dianchiensis</i>	16
FIGURA 2. Nódulos adhesivos de <i>Monacrosporium elliposporum</i>	16
FIGURA 3. Ramas adhesivas de <i>M. cyanopagum</i> .	16
FIGURA 4. Anillos constrictores de <i>Arthrobotrys brochopaga</i> .	17
FIGURA 5. Anillos no constrictores de <i>M. candidum</i> .	17
FIGURA 6. Esporas de <i>D. coniospora</i> con brotes adhesivos	18
FIGURA 7. Nematodo infectado por conidiosporas de <i>D. coniospora</i> .	18
FIGURA 8. Obsérvese el <i>apresorio</i> , órgano formado para penetrar la cubierta. Microscopía electrónica de barrido.	19
FIGURA 9. Se observa la acción de <i>Verticillium chlamyosporium</i> sobre <i>Ascaris lumbricoides</i> .	21
FIGURA 10. Se observan las hifas de <i>Fusarium pallidoserum</i> alrededor del huevo de <i>T. canis</i> . Microscopía electrónica de barrido.	22
FIGURA 11. Se observan los huevos de <i>T. canis</i> destruidos por <i>F. pallidoserum</i> , al día 14 post incubación. Microscopía electrónica de barrido.	23
FIGURA 12. Estructura de la cubierta del huevo de <i>T. canis</i> . Imagen tomada de Wharton 1980.	26
FIGURA 13. Microscopía electrónica de barrido mostrando huevos de <i>T. canis</i> destruidos por la actividad de <i>P. lilacinus</i> .	34
FIGURA 14. Microscopía electrónica de barrido. Larva emergiendo de huevo de <i>T. canis</i> rodeado por <i>P. marquandii</i> , día 14 de incubación.	34
FIGURA 15. A) MEB de huevo de <i>T. canis</i> rodeado de <i>F. pallidoseum</i> día 4 de incubación. B) MEB de una hifa penetrando la cubierta del huevo, día 7 de incubación. C) MEB de huevos destruidos por <i>F. pallidoseum</i> , día 14 de incubación.	35
FIGURA 16. A) MEB de las conidias de <i>M. hiemalis</i> . B) MEB de huevos de <i>T. canis</i> y cuerpos de fructificación del hongo, día 7 de incubación. C) MEB de huevos rodeados por una red hifal de <i>M. hiemalis</i> , día 14 de incubación.	35
FIGURA 17. MEB. Día 28 de incubación. Huevo de <i>T. canis</i> colonizado y destruido por <i>C. merdarium</i>	36
FIGURA 18. MEB. Día 28 de incubación. Huevo de <i>T. canis</i> deformado y destruido por <i>F. oxysporum</i> , con su cubierta lisa y la red hifal a su alrededor.	36
FIGURA 19. Fotografía del extremo anterior de <i>T. canis</i> mostrando las alas cervicales.	39
FIGURA 20. Fotografía del extremo cefálico de <i>T. canis</i> en la cual se aprecian los labios y las protuberancias dentiformes.	39
FIGURA 21. Izquierda, fotografía del extremo anterior de <i>T. canis</i> mostrando las alas cervicales (A) y del extremo posterior romo (B). Derecha, adultos macho y hembra.	39
FIGURA 22. Huevo de <i>T. canis</i> recién eliminado (A), en estado de mórula (B) y larvado (C).	40
FIGURA 23. Imagen al microscopio electrónico de larva L2 de <i>T. canis</i> .	40
FIGURA 24 A Y B: Plano panorámico de la Ciudad de Corrientes	60-61
FIGURA 25. Parque Camba Cua	62
FIGURA 26. Fig. 20: Parque Mitre	62
FIGURA 27. PLAZA LIBERTAD	63
FIGURA 28. PLAZOLETA COCOMAROLA	63
FIGURA 29 A Y B. PLAZOLETA ROTONDA AVENIDA PUJOL	64
FIGURA 30. PLAZOLETA BARRIO MOLINA PUNTA	64
FIGURA 31. PLAZA LA CRUZ	65
FIGURA 32. PLAZA CABRAL	65
FIGURA 33. PLAZOLETA AGUAS DE CORRIENTES	65
FIGURA 34. PLAZOLETA BARRIO YAPAYÚ	66
FIGURA 35. PLAZOLETA ROTONDA VIRGEN DE ITATÍ	66
FIGURA 36. Toma de muestra de suelo para aislamiento fúngico.	67
FIGURA 37. Toma de muestra de suelo para recuperación de huevos de <i>T. canis</i> .	68
FIGURA 38. Técnica del "anzuelo queratínico".	70
FIGURA 39. Tubos de Agar papa + cloranfenicol para aislamiento e identificación de cepas fúngicas.	71

FIGURA 40. Adulto hembra de <i>T. canis</i> (A); Disección de la hembra (B); Recuperación de huevos no larvados (C)	72
FIGURA 41. Escamas de quitina (Sigma)	77
FIGURA 42. Escamas de quitina lavadas	78
FIGURA 43. Baño de hielo previo a la filtración.	78
FIGURA 44. Filtración por Buchner de la quitina	78
FIGURA 45. Recepción de la quitina coloidal en agua helada.	79
FIGURA 46. Quitina coloidal lista para usar.	79
FIGURA 47. Cultivo líquido. Medio mínimo + quitina coloidal	81
FIGURA 48. Medio de leche descremada + cepas de hongos en el día cero de incubación	82
FIGURA 49. Ultrafiltración de cultivo líquido	83
FIGURA 50. Extracto seco por desecación	83
FIGURA 51. A. Diálisis de los extractos reconstituidos contra agua destilada, extracto obtenido del medio mínimo + quitina+ extracto de levadura.	84
FIGURA 51. B. Extractos dializados.	84
FIGURA 52. Extractos enzimáticos crudos.	85
FIGURA 53. Montaje de los geles separador y concentrador	87
FIGURA 54. Siembra de los pocillos con marcador de peso molecular y las muestras.	88
FIGURA 55. Equipo de electroforesis: cuba vertical y fuente de poder	88
FIGURA 56. Ensayo en Damero. A la izquierda la placa luego de ser sembrada y lista para su incubación. A la derecha, procedimiento de siembra de huevos de <i>T. canis</i> y los diferentes extractos enzimáticos.	89
FIGURA 57. Microscopio invertido. Observación de las placas fondo plano con el ensayo propuesto.	90
FIGURA 58. <i>Curvularia</i> sobre huevos de <i>T. canis</i> , observación bajo lupa estereoscópica 4x.	94
FIGURA 59. Desarrollo de <i>C. lunata</i> sobre huevo de <i>T. canis</i> utilizado como señuelo. Observación al MO 40x.	95
FIGURA 60. Género <i>Chrysosporium</i> sobre cabello de niños, observación bajo lupa estereoscópica, 32 X.	96
FIGURA 61. <i>T. ajelloi</i> sobre cabello de niños. Técnica del anzuelo queratínico. Observación bajo lupa estereoscópica, 20x.	97
FIGURA 62. <i>T. ajelloi</i> sobre cabellos de niños, técnica del anzuelo queratínico. Observación bajo lupa estereoscópica, 10x.	97
FIGURA 63. Cultivo en agar agua 2%: <i>Ch indicum</i> + huevo de <i>T. canis</i> . Observación bajo lupa estereoscópica.	98
FIGURA 64. Cultivo en agar agua 2%: <i>Ch keratinophylum</i> + huevo de <i>T. canis</i> . Observación bajo lupa estereoscópica.	99
FIGURA 65. Cultivo en agar agua 2%: <i>C. lunata</i> + huevo de <i>T. canis</i> . Observación bajo lupa estereoscópica 32X.	99
FIGURA 66. Cultivo en agar agua 2%: <i>T. ajelloi</i> + huevo de <i>T. canis</i> . Observación bajo lupa estereoscópica 32x.	100
FIGURA 67. Huevos del grupo control. Se observa la cubierta intacta (flecha roja) y las larvas L2 en su interior (flecha negra). Observación al MO, 40X.	102
FIGURA 68. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>C. indicum</i> .	104
FIGURA 69 A Y B. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>C. indicum</i> .	105
FIGURA 70. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>C. indicum</i> .	106
FIGURA 71 A Y B. Observación bajo microscopía óptica: huevo de <i>T. canis</i> + <i>Ch indicum</i> .	107
FIGURA 72. Observese la red hifal de <i>C. keratinophylum</i> rodeando el huevo de <i>T. canis</i> sin evolucionar (flecha negra) y con la cubierta adelgazada (flecha roja). Día 14. MO. 400x.	109
FIGURA 73. Imagen al MO donde se observan huevos de <i>T. canis</i> inmersos en la red hifal de <i>C. keratinophylum</i> .	109
FIGURA 74. Observación bajo microscopía óptica: <i>Ch keratinophylum</i> + huevo de <i>T. canis</i> , día 21, 1000x.	110
FIGURA 75. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>C. lunata</i> .	112

FIGURA 76. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>C. lunata</i> .	112
FIGURA 77. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>C. lunata</i> .	113
FIGURA 78. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>C. lunata</i> .	113
FIGURA 79. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>T. ajelloi</i> .	115
FIGURA 80. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>T. ajelloi</i> .	115
FIGURA 81. Huevo control día 14, x1100. Obsérvese la característica cubierta en panal de abeja o "fositada" de los huevos de <i>Toxocara</i> .	116
FIGURA 82. Huevos de <i>T. canis</i> , Control, día 14, x8000, superficie aumentada de tamaño. Obsérvese la característica estructura fositada.	117
FIGURA 83. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>Ch. indicum</i> , x350.	118
FIGURA 84. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>Ch. keratinophilum</i> x320.	118
FIGURA 85. <i>Ch keratinophilum</i> x2500, formando un <i>appresorio</i> sobre la cubierta del huevo de <i>T. canis</i> (flecha negra), y la red hifal sobre el mismo (flecha azul).	119
FIGURA 86. <i>Ch keratinophilum</i> x2500. Se observa " <i>appresorio</i> " penetrando la cubierta (flecha negra).	119
FIGURA 87. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>Ch. indicum</i> , x500.	120
FIGURA 88. <i>Ch keratinophilum</i> x1400. 14 días de incubación.	121
FIGURA 89. <i>Ch keratinophilum</i> x1100.	121
FIGURA 90. Desarrollo de la red hifal de <i>C. lunata</i> (flecha azul) sobre los huevos de <i>T. canis</i> con la consiguiente consumición de su interior (flecha verde). x1500	122
FIGURA 91. <i>C. lunata</i> x2500.	123
FIGURA 92. <i>C. lunata</i> x700. Cambio total de la morfología de la cubierta del huevo de <i>T. canis</i> (flecha roja).	123
FIGURA 93. Huevos de <i>T. canis</i> en presencia de <i>T. ajelloi</i> , x440.	124
FIGURA 94. Huevo de <i>T. canis</i> en presencia de <i>T. ajelloi</i> , x1100	124
FIGURA 95. <i>Ch. indicum</i> en medio de quitina coloidal al 2%. No se observa halo de hidrólisis de quitina.	126
FIGURA 96. Medio de caseína y 14 días de crecimiento del hongo. Se puede observar el halo transparente alrededor de la colonia de <i>Ch indicum</i> , indicativo de actividad de proteasa.	126
FIGURA 97. <i>Ch keratinophilum</i> en cultivo sólido. A la izquierda se observa el halo de hidrólisis de gelatina, en tanto que a la derecha se aprecia el halo de hidrólisis de caseína.	127
FIGURA 98. <i>T. ajelloi</i> , hidrólisis de gelatina (izquierda) y de caseína (derecha). Obsérvese aunque pequeños, los halos de hidrólisis para ambos sustratos.	127
FIGURA 99. <i>C. lunata</i> , hidrólisis de caseína (izquierda), gelatina (derecha).	128
FIGURA 100. <i>Ch indicum</i> , medio de Tween 80. Obsérvese el halo de precipitación alrededor de la colonia (flecha negra)	128
FIGURA 101. <i>C. lunata</i> , medio de Tween 80. Se puede observar un muy pequeño halo de precipitación alrededor de la colonia (flecha negra)	129
FIGURA 102. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida. Calles a y b (centro) el marcador de peso molecular, calles c y d extracto crudo de quitinasa de <i>C. indicum</i> . A la izquierda del gráfico obsérvese los pesos moleculares. En rojo los pesos de la bandas de quitinasa.	131
FIGURA 103. Huevos del grupo control, día 7 de incubación. Se observa huevo embrionado (A) y huevo larvado (B), ambos con sus características normales. (400x)	134
FIGURA 104. Huevos del grupo control embrionados (flecha azul), día 7 de incubación. Observación al microscopio invertido, 400X.	134
FIGURA 105. Huevos des grupo control, al día 14 de incubación.	135
FIGURA 106. Huevo de <i>T. canis</i> incubado con extracto enzimático crudo de proteasa de <i>C. indicum</i> . Huevo totalmente alterado, obsérvese el adelgazamiento de la cubierta (flecha roja) y la vacuolización del interior (flecha verde). 400x	138
FIGURA 107. Huevo de <i>T. canis</i> incubado con extracto enzimático crudo de quitinasa de <i>C. indicum</i> .	139
FIGURA 108. Huevo totalmente alterado por actividad de proteasa de <i>C. indicum</i> . Cubierta adelgazada (flecha roja) y permeable, interior sin embrión ni larva formados (flecha verde). 400x	139
FIGURA 109. Huevo afectado por actividad de quitinasa de <i>C. indicum</i> .	140
FIGURA 110. Desarrollo de los huevos frente a los extractos enzimáticos de proteasa y quitinasa al día 14 de incubación.	140
FIGURA 111. En el medio de la foto se observa un huevo que ha perdido las ca-	143

racterísticas de la cubierta y su interior no tiene definido un embrión. Incubación con extractos de proteasa y quitinasa. Los huevos restantes, están en perfectas condiciones. Día 14 post incubación. 400x	
FIGURA 112. Se observa las características de las cubiertas afectadas (flecha roja) y la desorganización en el interior de los huevos (flecha verde). Incubación en presencia de quitinasa. 400x	144
FIGURA 113. En esta fotografía se observa la desorganización interior del huevo (flecha verde). En la parte inferior izquierda se puede observar un huevo que mantiene sus características. Proteasa, día 14 de incubación. 400x	144
FIGURA 114. En esta fotografía también se observa la desorganización interior del huevo (flecha verde), y también se pueden observar huevos que mantiene sus características y se puede ver las diferentes posiciones de las larvas, indicativo de que están vivas y no se vieron afectadas (flecha azul). Proteasa, día 14 de incubación. 400x	145
FIGURA 115. Huevo de <i>T. canis</i> incubado en presencia de quitinasa y proteasa de <i>C. keratinophylum</i> . Obsérvese el adelgazamiento de la cubierta (flecha roja), con la desorganización del interior del huevo (flecha verde). Foto tomada al microscopio invertido, 1000x.	145
FIGURA 116. Huevo de <i>T. canis</i> incubado en presencia de quitinasa de <i>C. keratinophylum</i> .	146
FIGURA 117. Huevo de <i>T. canis</i> incubado en presencia de quitinasa de <i>C. lunata</i> . Obsérvese la desorganización y vacuolización del interior del huevo (flecha verde). Día 14, 400x.	149
FIGURA 118. Huevo de <i>T. canis</i> incubado en presencia de proteasa de <i>C. lunata</i> . Obsérvese la desorganización y vacuolización del interior del huevo (flecha verde). Día 14, 400x.	149
FIGURA 119. Huevo de <i>T. canis</i> incubado en presencia de quitinasa y proteasa de <i>C. lunata</i> .	150
FIGURA 120. Huevo de <i>T. canis</i> incubado en presencia de quitinasa y proteasa de <i>C. lunata</i> . Obsérvese el adelgazamiento de la cubierta (flecha roja), con la desorganización del interior del huevo (flecha verde). Día 7, 400x.	150
FIGURA 121. 7 días de incubación en presencia de quitinasa de <i>T. ajelloi</i> . Obsérvese el cambio interior (flecha verde). La flecha azul marca la presencia de una larva aún no madura y la negra las larvas 2. 400x	153
FIGURA 122. 14 días de incubación en presencia de quitinasa de <i>T. ajelloi</i> . Obsérvese el cambio interior (flecha verde). La flecha negra marca la larva 2. 400x	153
FIGURA 123. Huevos en presencia de quitinasa de <i>T. ajelloi</i> a los 14 días de incubación.	154
FIGURA 124. Huevos en presencia de quitinasa y proteasa de <i>T. ajelloi</i> , a los 14 días de incubación.	154
FIGURA 125. Huevos de <i>T. canis</i> perdiendo su contenido interior al medio con extracto de enzimas, el cual desintegra a las larvas y/o embrión desarrollado.	155
FIGURA 126. Obsérvese la cubierta de ambos huevos muy fina. El huevo de la derecha está perdiendo su embrión el cual se destruye al contacto con el extracto enzimático.	155
FIGURA 127. Huevos intactos de <i>P. fastosum</i> . Grupo control	174
FIGURA 128. Huevo de <i>P. fastosum</i> . Obsérvese la ruptura de la cubierta por la acción de las enzimas de <i>P. chlamydosporia</i>	174
FIGURA 129 C y D. Huevos de <i>P. fastosum</i> destruidos por la acción de las enzimas de <i>P. chlamydosporia</i> (F.R. Braga et al., 2014)	175

## REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

### Solución de Cicloheximida-Cloranfenicol.

Suplemento DERMASEL (OXOID): 200 mg Actidone/Cicloheximida -25 mg de Cloranfenicol.

#### Preparación:

Solución madre: Un frasco de Dermasel (polvo) se disuelve en 3 ml de etanol (agitar), de esta solución alcohólica se toman 3 ml y se diluye en 47 ml de agua destilada. Esterilizar (10 minutos a 121°C)

Solución de trabajo: 10 ml de la solución madre en 190 ml de agua destilada. Esterilizar (10 minutos a 121°C)

### Solución de formaldehído 2% v/v.

2 ml de Solución de formaldehído en 100 ml de agua destilada, preparado al momento de uso.

### Alcohol Etílico.

Para preparar diluciones de alcohol etílico a 10, 30, 50 y 70% v/v, se diluye 10, 30, 50 y 70 ml de alcohol etílico 96 % en 100 ml de agua destilada respectivamente.

### Agar agua 2%.

Agua destilada	1000 ml	500 ml
Agar agar	20 g/l	10 g/l
Cloranfenicol	500 mg	250 mg

### Agar papa dextrosa- cloranfenicol.

Para preparar 1000 ml:

Puré de papas (Knorr o Maggi)	5 g
Agar-agar	16 g
Extracto de levadura	1 g
Sulfato de magnesio	0,5 g
Dextrosa	10 g
Cloranfenicol	0,125 g

### **Agar Tween-80** pH 6,8

Agua destilada	1000 ml	500 ml	250 ml
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g/l	0.05 g/l	0.025 g/l
Peptona	10 g/l	5 g/l	2.5 g/l
NaCl	5 g/l	2.5 g/l	1.25 g/l
Agar	15 g/l	7.5 g/l	3.75 g/l
Tween 80	10 ml	5 ml	2,5 ml

#### Preparación:

Preparar el medio SIN TWEEN 80. Luego autoclavar.

Cuando la temperatura llegue a los 50°C, agregar 2,5 ml de Tween 80 estéril.

### **Agar Caseína**, pH = 7,0

Agua destilada	1000 ml	500 ml	200 ml
Leche descremada			10 g
Agar agar			2 g

#### Preparación

Preparar por separado:

- El agar agar en 100 ml de agua. Esterilizar.
- Disolver la leche descremada en 100 ml de agua destilada estéril.

Enfriar ambas soluciones a 48-50°C mezclar y homogeneizar.

### **Agar gelatina**, pH 7,2

Agua destilada	1000 ml	500 ml
Gelatina	4,8 g	2,4 g
Peptona	10 g	5 g
Cloruro de sodio	5 g	2,5 g
Extracto de carne	5 g	2,5 g
Agar agar	15 g	7,5 g

Disolver 40 g de gelatina en una pequeña cantidad de agua hirviendo, mezclar con la solución de agar agar y el resto de los ingredientes. Esterilizar 20' a 120°C.

Revelado: con un reactivo precipitante de proteínas (Cloruro ácido mercúrico: Cloruro mercúrico, ácido clorhídrico concentrado, agua destilada).

La presencia de un halo transparente es indicativo de hidrólisis de la gelatina en tanto que un halo blanco indica presencia de gelatina no hidrolizada.

### **Medio de quitina coloidal de Ciarmela, ML** (dato no publicado)

Quitina coloidal	2 g
Agar agua	2%

### **PREPARACIÓN DE QUITINA COLOIDAL** (Lingappa y Lockwood 1962)

1. Lavar la quitina (50g hoy) con NaOH 1N y ClH 1N (5-6 veces) durante 24 horas.
2. Lavar con etanol 95% (3-4 veces) hasta remover la materia extraña. Queda un producto blanco.
3. Humedecer 15 g de quitina limpia con ACETONA y disolver en 100 ml ClH concentrado y frío en agitación 20 minutos en un baño de hielo.
4. El grueso de la solución se filtra por succión a través de almohadilla de lana de vidrio en un embudo de Buchner dentro de 2 litros de agua bien fría agitando (el material precipita como una fina suspensión coloidal).
5. Re disolver el residuo con ClH cc y re filtrarlo (3-4 veces) hasta que no precipite más quitina.
6. La quitina se lava con agua destilada hasta 4-5 veces.
7. Almacenar en heladera.

### **SOLUCIONES DE FLOTACIÓN**

- Solución de Sulfato de Zinc 33 % (p/v)

Se disuelven 330 g de Sulfato de Zinc repta-hidratado en 1000 ml de agua destilada.

- Solución saturada de Sulfato de Zinc

Se disuelven 1100 g de Sulfato de Zinc en 1000 ml de agua destilada.

- Solución saturada de Sacarosa

Se disuelven 1500 g de Sacarosa en 1000 ml de agua destilada.

- Solución de Cloruro de Sodio saturada

Se disuelven 384 g de ClNa en 1000 ml de agua destilada.

## Medio mínimo para cultivo líquido

### ○ Para obtener quitinasas:

pH: 7

Fosfato ácido de potasio	0,7 g
Fosfato diácido de potasio	0,3 g
Sulfato de amonio	0,1 g
Sulfato de magnesio. 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Citrato de sodio	0,05 g
Agua destilada	100 ml
Quitina coloidal	1,5 g
Extracto de levadura	0,2 g

### ○ Para obtener proteasas

pH: 7

Agua destilada	100ml
Leche descremada	5 g

### Solución de Timerosal

Merthiolate	1 g
Borato de sodio	1,4 g
Agua destilada	100 ml

### Azul Coomasie R 250.

Azul Coomasie	0,3 g
Metanol	40ml
Ácido acético	10 ml
Agua destilada	50 l

Guardar en frasco oscuro a temperatura ambiente.