

Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria. Revisión

Use of *Bacillus thuringiensis* products as alternative method of control against important veterinary parasitic nematodes. Review

Alejandro Vázquez-Pineda^a, Alejandra Bravo-de-la-Parra^b, Pedro Mendoza-de-Gives^c, Enrique Liéban-Hernández^c, Ismael Hernández-Linares^c, Nandy Yáñez-Pérez^c, Liliana Aguilar-Marcelino^c, Gabriel Ramírez-Vargas^c, Elías Hernández-Castro^a, Isidro Gutiérrez-Segura^a, Ma. Eugenia López-Arellano^c

RESUMEN

La bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* produce cristales proteicos con actividad citotóxica en contra de insectos y nematodos. La toxicidad de *B. thuringiensis* en plagas agrícolas es ampliamente conocida, pero poco se conoce acerca de su actividad en contra de nematodos parásitos. Recientemente, la actividad nematocida de las proteínas derivadas de *B. thuringiensis* se demostró en parásitos de mamíferos como *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Nippostrongylus*, y *Ancylostoma*, y en nematodos de plantas, *Globodera* y *Meloidogyne*. Entre el grupo de *B. thuringiensis* con efecto nematocida, las proteínas de la cepa IB-16 han mostrado actividad letal de 50 a 100 % en contra de diferentes estadios del principal género de rumiantes, *Haemonchus contortus*. Asimismo, los géneros de nematodos de vida libre, *Panagrellus redivivus* y *Caenorhabditis elegans* han sido blanco de estudios de la acción nematocida de *B. thuringiensis*. Por ejemplo, el efecto tóxico de la proteína Cry5B de *B. thuringiensis* se observó en las células intestinales de *C. elegans*, además esta acción parece involucrar receptores celulares específicos, similares a los que se han notificado en contra de plagas agrícolas. Asimismo, la unión de la proteína Cry5B ocurre en receptores específicos, como moléculas de carbohidratos, las cuales están presentes en la membrana de las células de intestino de los nematodos, ocasionando daño y muerte. A través de este tipo de estudios, los derivados de *B. thuringiensis* podrían considerarse una alternativa de control en nematodos que afectan a los animales domésticos, como rumiantes, así como en contra de otros nematodos patógenos de mamíferos e incluso de plantas agrícolas.

PALABRAS CLAVE: Nematodos, *Bacillus thuringiensis*, Control.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic bacterium that produces crystal-proteins with cytotoxic activity against insects and nematodes. *B. thuringiensis* toxicity on agriculture pests is widely recognized; however, there is little information about the lethal action of *B. thuringiensis* against nematodes. Recently, the nematocidal activity of *B. thuringiensis* proteins was showed against *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Nippostrongylus*, and *Ancylostoma* genera of mammals, and against the plant parasitic nematodes, *Globodera* and *Meloidogyne*. From a list of *B. thuringiensis* strains with nematocidal effect, selected proteins from the IB-16 isolate showed 50 to 100 % nematocidal efficacy against different developing stages of *H. contortus*. Additionally the *in vitro* assay showed evidence about the lethal activity of this strain against the free-living nematodes *Panagrellus redivivus* and *Caenorhabditis elegans*. The Cry5B protein of *B. thuringiensis* caused tissue damage on the *C. elegans* mid-gut and its action probably involves specific gut-receptor, similar to reporte with nematodes of importance in agriculture. Also, Cry5B protein-receptors link appears to involve carbohydrate moieties on intestinal cells, and cause tissue damage and nematodes death. Through these studies, selected *B. thuringiensis* proteins could be considered in future trials as potential alternative tools of control against parasitic nematodes of domestic animals, such as ruminants and other pathogens of mammals and even from agriculture crops.

KEY WORDS: Nematodes, *Bacillus thuringiensis*, Control.

^a Unidad de Sistemas de Producción Agrícola, Unidad Tuxpan, Km 25.5 Carr. Iguala-Tuxpan, Iguala Guerrero. México.

^b Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

^c Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Cuernavaca-Cuautla #8534, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, México. mlopez_arellano@hotmail.com. Correspondencia al último autor.

INTRODUCCIÓN

La bacteria *B. thuringiensis* es un bacilo Gram (+) que se localiza en diferentes hábitats del medio como cadáveres de insectos, semillas y granos. El interés por estudiar *B. thuringiensis* como uno de los principales métodos alternativos de control en plagas, se debe a las propiedades citotóxicas que le confieren las d-proteínas, Cry y Cyt. A la fecha, existen más de 160 cepas de *B. thuringiensis* que producen estas proteínas, clasificadas con base a la homología en la secuencia de aminoácidos y por su especificidad en contra de plagas agrícolas⁽¹⁾. Entre estas cepas, algunas de ellas tienen actividad tóxica hacia nematodos de vida libre y nematodos parásitos de plantas y animales⁽²⁻³⁾. El modo de acción nematicida de las cepas de *B. thuringiensis* no ha sido aún determinado, pero algunos de sus derivados han mostrado inhibir el desarrollo de larvas y causar la muerte de adultos. En estudios previos, se observó que la acción nematicida de las d-proteínas de *B. thuringiensis* involucra glicoproteínas y proteasas como posibles receptores de unión a células de intestino en *C. elegans*⁽⁴⁾.

Por medio de los resultados de estos estudios, se puede explorar a futuro el potencial de *B. thuringiensis* en contra de nematodos parásitos. Además, el modo de acción de *B. thuringiensis* en nematodos podría implicar otros mecanismos, tomando en cuenta la biología de nematodos parásitos de plantas y mamíferos, diferente a lo que se conoce hasta la fecha en insectos. La presente revisión contempla los estudios realizados hasta la fecha, los cuales nos permiten examinar una nueva alternativa de control biológico y sus derivados en contra del Phylum Nematoda.

NEMATODOS PARÁSITOS DE IMPORTANCIA EN MEDICINA VETERINARIA

La parasitología es una amplia rama de estudio que involucra diversos organismos patógenos que infectan plantas, animales y al hombre. Para facilitar su estudio y para lograr una mejor comprensión de su actividad biológica, los parásitos se han dividido en tres grandes grupos: Protozoarios, Artrópodos y Helminths. Este último grupo, comprende a su vez al Phylum Platyhelminthes (gusanos planos) y Phylum Nematelminthes (gusanos redondos)⁽⁵⁾.

INTRODUCTION

Bacillus thuringiensis is a Gram (+) bacterium, localized in different environmental habits such as insect corps, seeds and grains. The cytotoxic properties of *B. thuringiensis* d-proteins, Cry and Cyt previously reported, motivate workers to keep on studying in this area searching for the possible use of such proteins as an alternative method of control against agriculture pests. At date, there are more than 160 *B. thuringiensis* strains that synthesize proteins that have been classified on their amino acid sequence homology and specificity against agriculture pests⁽¹⁾. Among these strains, some are toxic against free-living and parasitic nematodes of plants and animals⁽²⁻³⁾. The nematicide mechanism of *B. thuringiensis* Cry and Cyt proteins has not being well determined, but some proteins delayed the developmental larva stages and caused the adult nematode death. A previous study notified the nematicide action of *B. thuringiensis* d-protein that comprises glycoproteins and proteases as possible receptors to intestinal cells of *C. elegans*⁽⁴⁾.

Through these studies, the possible antagonist effect of *B. thuringiensis* strains against parasitic nematodes offers good expectations for the near future. The mode of action might implicate other mechanisms specific to the biology of parasitic nematodes from plants and mammals, different to the mechanisms notified on insects. This review considers a number of studies, which have been carried out until now with *B. thuringiensis*, looking for new alternatives of biological control against the Phylum Nematoda.

IMPORTANCE OF PARASITIC NEMATODES IN VETERINARY MEDICINE

Parasitology is a diverse science of study, which includes pathogens infective to plants, animals and human. Also, parasites have been classified in three main groups to have a much better understanding on their biological activity as: Protozoa, Arthropods and Helminths. The last group includes parasites from Phylum Platyhelminthes (flatworms) and Phylum Nematelminthes (roundworms)⁽⁵⁾.

El Phylum Nematelminthes presenta gran diversidad de géneros que forman los complejos de nematodos, cuyos procesos patológicos provocan severos daños a sus hospederos^(5,6). Durante su evolución y adaptación, los nematodos han desarrollado múltiples mecanismos genéticos, a través de los estadios de vida libre y estadios de vida parásita para poder adaptarse a diferentes hábitats en clima tropical, templado y seco^(5,7,8). Además, en los últimos años, el cambio climático en el planeta ha influido para incrementar la población de helmintos que afectan a los animales domésticos⁽⁹⁾. Por ejemplo, en algunas regiones de Escocia, donde anteriormente se observaba baja prevalencia de helmintos, la situación se ha invertido, convirtiéndose en zonas de riesgo a parásitos por el incremento de temperatura y humedad⁽⁷⁾.

El tratamiento en contra de las nematodiasis se realiza con diferentes antihelmínticos y es hasta la fecha, el único método de control en el mercado. Sin embargo, varios géneros de nematodos han generado mecanismos de resistencia antihelmíntica hacia los principales compuestos químicos disponibles en el mercado, permitiendo de esta forma la continuidad de las nematodiasis en animales domésticos y en el hombre^(10,11).

La causa principal de la resistencia antihelmíntica es la respuesta genética ante la presión de selección causada por la continua exposición de los parásitos a los antihelmínticos⁽¹²⁾. Se han identificado múltiples factores que actúan como desencadenantes de la resistencia antihelmíntica en los parásitos como son: frecuencia de tratamientos, aplicación de dosis incorrectas, uso erróneo de antihelmíntico, combinación de compuestos, etc., los cuales impactan negativamente los costos de producción en forma directa e indirecta. Por otro lado, las normas oficiales sobre el uso de drogas en animales para consumo son muy claras, enfatizando que los derivados alimenticios de origen animal deben estar libres de residuos tóxicos y de patógenos^(13,14). Los rumiantes domésticos, aves y cerdos son considerados la principal fuente de alimento a nivel mundial; sin embargo, existen muchos patógenos que los afectan; entre ellos los nematodos, que al

The Phylum Nematelminthes has an extensive number of parasites that integrate the complex of nematodes with pathological process responsible of the severe host damage^(5,6). Through their evolution and adaptation, nematodes have developed multiple genetic mechanisms from free-living to parasitic stages to survive in tropical, temperate and dry regions^(5,7,8). Also, global changes have affected our planet, increasing the population of Helminths that have affected domestic animals, in the last years⁽⁹⁾. For instance, number of Scottish paddocks used to have low helminthic prevalence; however, they were notified as risky paddocks, after environmental changes such as high temperature and humidity, increasing the number of Helminths⁽⁷⁾.

Nowadays, treatments against nematodes are carried out with different anthelmintic drugs, which is the unique method of control currently available in market. But, different nematode genera have developed anthelmintic resistance to the main chemical commercial drugs, promoting the continuous nematode infection in domestic animals and humans^(10,11).

The continuous expositions of parasite to anthelmintic drugs have caused genetic mutations and anthelmintic resistance⁽¹²⁾. Multiply husbandry procedures were responsible of anthelmintic parasite resistance, *i.e.* frequent treatments, misused of anthelmintic dose and products, etc., which adversely have affected the economy of the livestock production. On the other hand, official guidelines about the use of chemotherapeutic drugs on domestic animals, clearly emphasizes that food from domestic animals must be both toxic waste and pathogens free^(13,14). Domestic ruminants, poultry and pigs are the main source of animal protein for human consumption worldwide; however, several pathogens (including parasitic nematodes) have developed genetic strategies to evade the host immune response and to survive to the lethal effect of chemotherapeutic anthelmintic compounds^(13,15-18).

Within the parasitic nematode complex, the blood-feeding genera *Ancylostoma*, *Bunostomum*, *Ostertagia*, *Teladorsagia* and *Haemonchus* are

invadir a sus hospederos, estos inician cambios genéticos que les permiten evadir la respuesta inmune, y tolerar el efecto tóxico de compuestos químicos antihelmínticos^(13,15-18).

Dentro del complejo que forman los nematodos parásitos, los géneros que poseen hábitos hematófagos como *Ancylostoma*, *Bunostomum*, *Ostertagia*, *Teladorsagia* y *Haemonchus*, son considerados los principales patógenos en rumiantes domésticos, porque afectan la producción ganadera al cursar como enfermedad de tipo crónico o agudo, en esta última la severidad del daño conduce rápidamente a la muerte^(19,20). Por otro lado, la transmisión de otros géneros de nematodos al ser humano es considerada un grave problema de salud causada por patógenos como *Trichinella spiralis*, *Oesophagostomum bifurcum*, *Toxocara vitulorum*, y *Strongyloides* spp, por contaminación de alimentos de origen animal, cuyo porcentaje de prevalencia ha incrementado en los últimos años, razón por la cual son objeto de estrictas medidas preventivas de diagnóstico y control⁽²¹⁻²⁶⁾.

Con el uso de nuevas alternativas de control como son los derivados de *B. thuringiensis*, se espera que esta bacteria contribuya a fortalecer los programas sanitarios en contra de nematodos parásitos que afectan a mamíferos y a plantas. Las d-proteínas de *B. thuringiensis* han mostrado ser inocuas al ser humano y a otros mamíferos, y aunque su efecto nematocida es poco conocido, *B. thuringiensis* es una herramienta de control con posible potencial tóxico en contra de nematodos de importancia veterinaria y agrícola.

FACTORES DE VIRULENCIA DE *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria aerobia, Gram (+), formadora de endosporas que sintetiza cuerpos microscópicos que adquieren la forma de cristal de naturaleza proteica⁽²⁷⁾. El cristal de *B. thuringiensis* está conformado por diferentes proteínas y metabolitos de importancia en contra de plagas agrícolas como son las d-endotoxinas, quitinasas, fosfatasa, hemolisinas, etc. Dentro de este grupo, las d-endotoxinas son las principales proteínas

consideradas como patógenos peligrosos para rumiantes domésticos, ya que causan síntomas agudos y crónicos, afectando la producción de ganado y hasta la muerte del huésped^(19,20). Por otro lado, la transmisión de nematodos parásitos de animales a humanos se considera un problema de salud pública por patógenos como *Trichinella spiralis*, *Oesophagostomum bifurcum*, *Toxocara vitulorum* y *Strongyloides* spp a través de alimentos contaminados, cuya prevalencia ha aumentado en los últimos años. Estas son algunas razones por las que medidas preventivas y métodos de diagnóstico y control deben establecerse⁽²¹⁻²⁶⁾.

El uso de nuevas alternativas de control como son los derivados de *B. thuringiensis* y sus proteínas, estas bacterias podrían apoyar programas de salud sostenibles contra mamíferos y plantas nematodos. Las d-proteínas de *B. thuringiensis* son inocuas para humanos y otros mamíferos, aunque el efecto nematocida de *B. thuringiensis* es desconocido, su uso como método de control podría tener eficacia contra importantes nematodos veterinarios y de plantas.

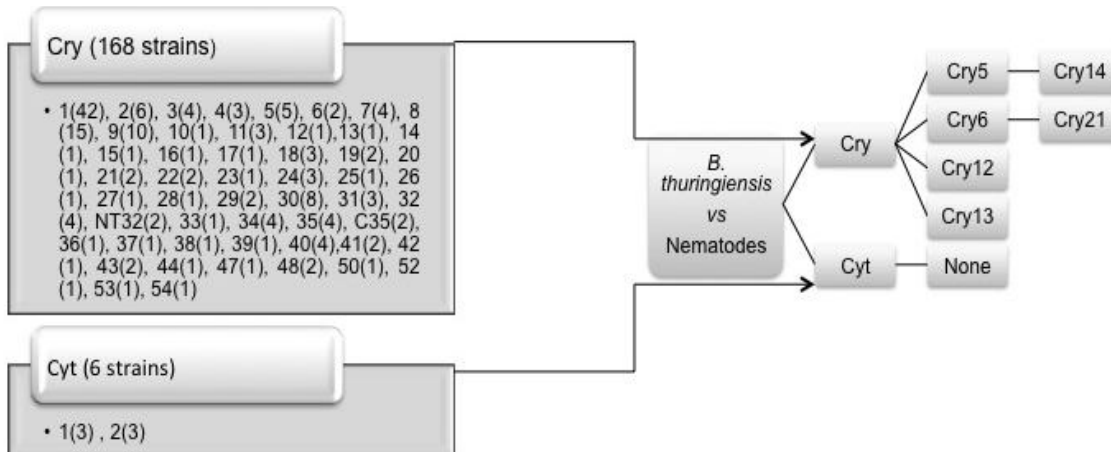
VIRULENT FACTORS FROM *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis is an aerobic Gram (+) bacterium, forming endospores that synthesize microscopic crystal bodies of pertinacious nature⁽²⁷⁾. *Bacillus thuringiensis* crystals synthesize different proteins and metabolites with important lethal activity against agriculture pests, such as d-endotoxins, chitinases, phosphatase, hemolysin, etc. But, d-endotoxins are the main toxic group synthesized by crystal-proteins from *B. thuringiensis*, also known as Cry and Cyt. The nomenclature of d-endotoxins was built using the percentage of homology among the amino acid sequence of *cry* and *cyt* gene family (Figure 1)⁽²⁸⁾.

Due to the importance of Cry and Cyt proteins as possible biological control agents they have been widely studied as potential pesticides in the agriculture industry. In the last years, their toxic effect against mosquitoes, as vectors of pathogens able to kill humans are also being reported⁽²⁸⁻³⁰⁾. Since more than 50 yr ago, *B. thuringiensis* Cry proteins have been used against agriculture pests as main commercial products. In contrast, the

Figura 1. Nomenclatura de las proteínas Cry y Cyt de *Bacillus thuringiensis* clasificada con base en la secuencia de aminoácidos con efecto letal en insectos y nematodos

Figure 1. Nomenclature of the Cry and Cyt *Bacillus thuringiensis* proteins classification base on their amino acid sequences with lethal effect on insects and nematodes



Six groups of Cry strains with nematocidal proteins were identified, in contrast no-one Cyt strains has been identified, until now (Crick *et al.*,1998, 2010). On the other hand, numbers outside brackets are indicating the known strains, for instance Cry1; and numbers into brackets represent existing isolates by each strain, *i.e.* Cyt 2 has three strains.

derivadas del cristal, también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Estas proteínas se clasifican con base al porcentaje de homología determinado por la secuencia de aminoácidos dentro de la gran familia de genes *cry* y *cyt*⁽²⁸⁾. Figura 1.

Por su importancia como agentes de control biológico, las proteínas Cry y Cyt son las únicas que han sido ampliamente estudiadas como plaguicidas en el área agrícola. En los últimos años también se ha reconocido su efecto tóxico en mosquitos vectores que transmiten agentes infecciosos a humanos capaces de causar la muerte⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Las Cry son el único grupo de proteínas derivadas de las cepas de *B. thuringiensis* que se utilizan en forma comercial, desde hace más de 50 años en contra de diferentes plagas agrícolas. En contraste, las cepas de *B. thuringiensis* con efecto nematocida aún requieren ser estudiadas a profundidad para establecer su posible aplicación en el campo. A la fecha, importantes avances se han obtenido acerca del efecto tóxico de *B. thuringiensis*, así como el estudio de su mecanismo de acción en nematodos,

nematocidal effect of *B. thuringiensis* strains against nematodes requires more studies to be able to establish their possible practical use under field conditions. Nowadays, important advances about *B. thuringiensis* toxicity and its mechanisms of action against nematodes are being achieved; these studies are being carried out using free-living and parasitic nematodes from plants and mammals as biological model.

Crystal-proteins from *B. thuringiensis* are considered biodegradable and bio-safe products for humans and other mammals, even for non-target insects, which are beneficial for the environment. So, the lethal action of *B. thuringiensis* strains can be targeted and specific to pest insects and does not affect other beneficial insects. Currently, *B. thuringiensis* strains are being well accepted into the agriculture market because of their high insecticidal efficacy^(30,31).

The lethal specificity showed by d-proteins of *B. thuringiensis* to target insect was the main characteristic considered to establish the first *B.*

tomando como modelos biológicos a nematodos parásitos y de vida libre, tanto de plantas como de mamíferos.

Los derivados del cristal de *B. thuringiensis* son productos biológicos biodegradables, inocuos para el ser humano y otros mamíferos, así como para plantas e invertebrados benéficos al medio. La acción letal de las cepas de *B. thuringiensis* es altamente específica, y han sido encontradas con actividad en contra de los patógenos blanco para los cuales fueron dirigidas, sin afectar a otros organismos. Hasta la fecha, el mercado agrícola ha mostrado buena aceptación por su efectividad en contra de plagas^(30,31).

La especificidad letal que han mostrado las d-proteínas de *B. thuringiensis* en contra de insectos blancos, sin alterar a otras especies, fue la principal característica que se usó para formar la primera nomenclatura de *B. thuringiensis*⁽³²⁾. Sin embargo, la adición de nuevas cepas con la misma actividad tóxica en contra de diversos insectos blanco, causó confusión. Posteriormente, se modificó la primera nomenclatura y se formó una segunda clasificación con base en el nivel de identidad de las secuencias de aminoácidos para cada cepa nueva, generándose un árbol filogenético nuevo para las d-proteínas⁽³³⁾. Hasta la fecha, 168 proteínas Cry y dos tipos de proteínas Cyt han sido clasificadas, entre las cuales seis grupos de genes *cry* que codifican proteínas con posible acción nematocida han sido identificados; sin embargo, no se ha reconocido alguna proteína Cyt con posible actividad letal en contra de nematodos^(1,28,33). Figura 1.

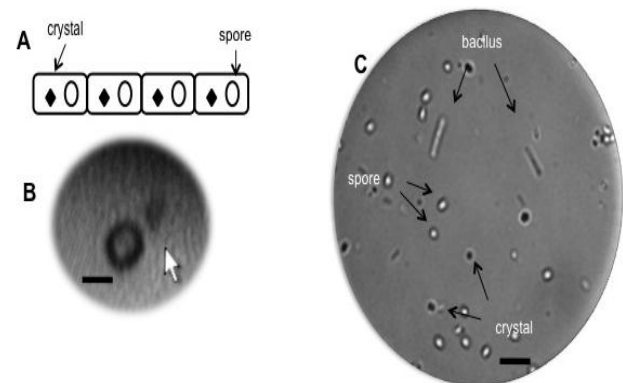
El efecto letal de las d-endotoxinas, Cry y Cyt de *B. thuringiensis* en plagas agrícolas ha sido ampliamente estudiado en géneros de insectos Lepidópteros, Dípteros y Coleópteros⁽²⁷⁾. Además, diferentes notificaciones han demostrado el mecanismo de toxicidad en la interacción de proteínas Cry (por ejemplo, Cry1Aa) en insectos blanco a través de receptores específicos, identificados algunos como N-aminopeptidasa, alfa-amilasa, lipoproteínas y glicoproteínas, los cuales se localizan en la membrana de células de intestino^(29,34). La unión de receptores de proteínas

thuringiensis nomenclature⁽³²⁾. However, other *B. thuringiensis* strains with the same lethal action against same insect targets were identified which caused confusion with the pre-established nomenclature. Then, the first nomenclature was modified and a second nomenclature was built based on the amino acid sequence homology for each new *B. thuringiensis* strains. In this way, a novel phylogenetic tree for d-proteins was established⁽³³⁾. So far, 168 Cry and two Cyt proteins from *B. thuringiensis* have been classified, and six groups of genes from the Cry list are being associated to nematocidal activity; however, the possible toxicity of Cyt proteins against nematodes are not being yet identified (Figure 2)^(1,28,33).

The lethal damage from Cry and Cyt *B. thuringiensis* d-endotoxins against agriculture pests including insects such as Lepidoptera, Diptera and Coleoptera individuals, has been largely studied⁽²⁷⁾. Also, different reports have shown the mode of action of Cry proteins (*i.e.*, Cry1Aa) on target insects through specific receptors, some of them are being identified as N-amino peptidase, alfa-amilase, lipoproteins and

Figura 2. Imagen del cristal y las espores de la cepa IB-16 de *Bacillus thuringiensis*

Figure 2. Crystal and spore picture of IB-16 *Bacillus thuringiensis* strain



A. Design of *B. thuringiensis* crystal and spore localization. B. Microphotography showing localization of small crystals (indicated by arrow) and spores, this last one is displaying major size into bacillus bacterium (100x). C. Photograph showing crystals and spores on culture media (40x).

Cry a la membrana de células intestinales, provoca una serie de cambios osmóticos (intercambio de iones Na^+ y K^+) que llevan a la formación de vacuolas en el citoplasma, formando orificios o poros en la membrana plasmática. La formación de poros en las células de intestino inhibe la absorción de nutrientes, causando la muerte en insectos blanco por inanición^(35,36-38).

En contraste, los estudios de toxicidad de las proteínas de *B. thuringiensis* en nematodos son relativamente recientes, debido a que se interrumpieron aproximadamente por una década. Sin embargo, importantes avances se han logrado al mostrar el posible potencial terapéutico de los derivados de *B. thuringiensis* en contra de nematodos parásitos de plantas y mamíferos.

TOXICIDAD DE *B. thuringiensis* EN CONTRA DE NEMATODOS

A partir de los estudios realizados por Gill *et al*⁽³⁹⁾, diferentes proteínas de las cepas de *B. thuringiensis* han mostrado toxicidad en contra de géneros de nematodos de vida libre como son: *Acrobeloides* sp, *Distolabrellus veechi*, *Prisionchus pacificus*, *Panagrellus redivivus* y *Caenorhabditis elegans*; así como en contra de nematodos parásitos de mamíferos, por ejemplo, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Teladorsagia circumcincta* y *Haemonchus contortus*^(2,40-43) y en los nematodo de plantas, *Globodera pallida* y *Meloidogyne incognita*^(44,45).

Asimismo, los logros obtenidos hasta la fecha, sugieren que las proteínas Cry también son el grupo más importante en contra de nematodos. Además, el modo de acción de las proteínas Cry parece ser similar a la forma cómo actúan las toxinas en contra de la Clase Insecta. Así lo demuestra la acción letal de *B. thuringiensis* en *C. elegans* al interactuar con diferentes toxinas Cry (5A y 5B, 6A y 6B, 12A, 14A y 21A). Al ingerir *C. elegans* la proteína Cry recombinante, los autores observaron procesos degenerativos en intestino y formación de vacuolas en las células del intestino medio de *C. elegans* adultos y del cuarto estadio larvario (L₄) por la acción de *B. thuringiensis*, comparado con el grupo control, el cual no mostró ninguno de

glycoproteins, localized into the intestinal cell membrane^(29,34). The affinity of Cry-protein receptors to mid-gut cells caused osmotic changes (Na^+ and K^+ ion exchanges), and as result, cytoplasmic vacuole and pore formation were observed on the cytoplasmic membrane. The pore formation on the insect intestinal cells causes inhibition of the nutrient absorption, starvation and death⁽³⁵⁻³⁸⁾.

In contrast, studies of *B. thuringiensis* protein toxicity on nematodes are relatively new, and only a few research works were reported about this subject during the last decades. However, an important scientific development has being achieved, since the potential therapeutic use of *B. thuringiensis* products against parasitic nematodes from plants and mammals has being shown.

TOXICITY OF *B. thuringiensis* AGAINST NEMATODES

Since the first *B. thuringiensis* studies were carried out by Gill *et al*⁽³⁹⁾, various proteins has shown toxicity on different groups of nematodes including: free-living nematodes *i.e.*, *Acrobeloides* sp, *Distolabrellus veechi*, *Prisionchus pacificus*, *Panagrellus redivivus* and *Caenorhabditis elegans*; and parasitic nematodes from mammals, *i.e.*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*^(2,40-43), and also against plant parasitic nematodes such as *Globodera pallida* and *Meloidogyne incognita*^(44,45).

The results obtained so far, suggest that *B. thuringiensis* Cry proteins are the most important group of proteins against nematodes. Likewise the mode of action of Cry proteins against nematodes appears to be similar to the effect caused by *B. thuringiensis* against the Insecta Class. This has been observed by *B. thuringiensis* lethal activity against *C. elegans* with different Cry toxins (5A and 5B, 6A and 6B, 12A, 14A and 21A). A degenerative process onto *C. elegans* mid-gut cells and vacuole formation were observed through the feeding of adults and fourth larvae stages (L₄) exposed to *B. thuringiensis* proteins compared with a control group, which did not show any degenerative mid-gut cell process. Also, same authors notified

estos procesos degenerativos. Los mismos autores, notificaron la inhibición del desarrollo de L₄ y disminución de la fecundidad en adultos de *C. elegans* por el efecto de proteínas Cry^(2,4). Además, los estudios de toxicidad de la proteína Cry5B de *B. thuringiensis* sobre *C. elegans*, sugieren que glicoproteínas y lipoproteínas actúan como receptores a nivel de intestino para activar el daño celular y causar la muerte de *C. elegans*⁽⁴⁶⁾.

El modo de acción de proteínas Cry en nematodos de vida libre, podría ser similar en nematodos parásitos, tomando en cuenta que la mayoría de los géneros comparten características de ontogenia, fisiología y morfología altamente similares. Por ejemplo, los estadios de nematodos de vida libre consumen bacterias y detritus del medio (excremento, tierra), durante todo su desarrollo, hasta alcanzar su fase infectiva^(5,47,48). A través del cambio de vida libre a nematodos parásitos, los hábitos alimenticios de los parásitos, cambian, se convierten en nematodos obligados para adquirir nutrientes del hospedero a partir de la invasión tisular, hasta que mueren. En esta etapa de la infección, el efecto de los derivados de *B. thuringiensis* podría tener acción sobre los nematodos parásitos de mamíferos.

Entre los nematodos de importancia veterinaria, el género *Haemonchus contortus* ha sido utilizado como modelo biológico para estudiar el efecto de *B. thuringiensis* debido a su importancia en la salud de ruminantes domésticos a nivel mundial. En la última década, se realizaron diversos estudios para determinar el efecto nematicida de las cepas de *B. thuringiensis* en contra de *H. contortus* tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo*. Recientemente en nuestro país, se realizó un estudio molecular con 40 cepas mexicanas de *B. thuringiensis* con posible potencial nematicida que identificó cinco principales cepas de *B. thuringiensis* con base a la secuencia de aminoácidos. Las selección se realizó con las cepas que contenían proteínas Cry, codificadas por los genes *cry1*, *cry3* y *cry5*, denominadas PS86Q3 (Q3), PS14OE2 (E2) y PS211B2 (B2); respectivamente; así como también por dos cepas más, las cuales fueron seleccionadas a través de bioensayos, debido a que no mostraron alinearse a ninguna de las secuencias diseñadas para

inhibition of *C. elegans* L₄ developmental stages and low fecundity of the adult stages^(2,4). Additionally, studies about the *B. thuringiensis* Cry5B toxicity on *C. elegans* also suggested the possible role of glycoproteins and lipoproteins as intestinal receptors to enter into the cell membrane damaged and cause the death of *C. elegans*⁽⁴⁶⁾.

Considering that most of these nematodes share similarities in ontogeny, physiology and morphological characteristics the Cry-proteins activity against free-living nematodes and parasitic nematodes might be similar. For instance, the free-living stages of parasitic nematodes also ingest bacteria and faecal debris from the environment (*i.e.* soil) through the evolutive process until they become as infective stages^(5,47-48). Once this fact occurs, the free-living stages feeding-behaviour changes, becoming strictly a parasite, in which nematodes acquire nutrients from its host, until the host die. In this stage of infective process, *B. thuringiensis* proteins might have a lethal action against mammal parasitic nematodes.

Within the nematodes of importance in veterinary parasitology *Haemonchus contortus* has being used as a suitable biological model to study the effect of *B. thuringiensis* due to its importance in health of ruminants worldwide. During the last decade, a number of studies were performed to investigate the nematocidal effect of *B. thuringiensis* strains against *H. contortus* either *in vitro* or *in vivo* assays. Recently, in Mexico a molecular survey was carried out with 40 Mexican *B. thuringiensis* to identify strains with lethal activity on nematodes; the results indicated that five strains were associated with the nematocidal activity based on the aminoacid sequence. The selection of strains was based on the strains containing the Cry proteins, which codified by *cry1*, *cry3* and *cry5* genes; designed as PS86Q3 (Q3), PS14OE2 (E2) and PS211B2 (B2) respectively; as well as two more strains which were selected through bio-assays, due to they did not matched with none of the sequences pre-designed for this study and they were eventually called as "odd strains"^(43,49).

Soluble proteins (group of protein-complex) from this experimental study were used with and free-living parasitic stages of *H. contortus* by same

su estudio, por lo cual se les considero cepas "raras", denominadas cepas IB-61 e IB-16^(43,49).

Los autores de este estudio, utilizaron la proteína soluble, la cual es el complejo de proteínas, compuesta por cinco cepas de *B.thuringiensis*, así como estadios de vida libre de *H. contortus*. La efectividad letal de las proteínas solubles, que forman parte del cristal de las cepas en estudio de *B. thuringiensis* sobre *H. contortus*, varió entre 20 y 100 % (Cuadro 1). Las cepas PS86Q3 (Q3), PS14OE2 (E2) y PS211B2 (B2) mostraron el efecto más bajo de toxicidad; resultados contrarios, se obtuvieron al analizar las cepas IB-61 e IB-16, cuya toxicidad fue mayor en contra de los diversos estadios de vida libre de *H. contortus*. Asimismo, se observó que el efecto letal de la toxina soluble de IB-16 fue inhibir la eclosión de huevo a larva de *H. contortus*; al mismo tiempo, las larvas que lograron eclosionar, murieron en un periodo muy corto (12 h) y el movimiento de las mismas fue disminuyendo en forma visible, hasta quedar muertas⁽⁴³⁾.

authors. The *B. thuringiensis* crystal protein with nematocidal percentage against *H. contortus* was variable, and a range from 20 to 100 % was observed (Table 1). The PS86Q3 (Q3), PS14OE2 (E2) and PS211B2 (B2) *B. thuringiensis* strains showed the lowest toxicity; in contrast, IB-16 and IB-61 strains showed a higher toxicity against *H. contortus* eggs and free-larvae stages. Likewise, *H. contortus* eggs and larvae development was inhibited by the lethal action of IB-16 soluble proteins, and also some larvae that were able to survive after hatching, died in a short period (12 h), showing slow movement, which was decreasing until they died⁽⁴³⁾.

Moreover, small gerbils and Pelibuey lambs infected with *H. contortus* were treated with IB-16 soluble protein through the systemic route. The nematode reduction of both histotropic larvae and adult parasites in stomach resulted ranged from 50 to 70 % when compared with control group⁽⁵⁰⁾.

On the other hand, the electrophoretic profile of *B. thuringiensis* IB-16 strain showed five main protein-

Cuadro 1. Porcentaje de efectividad de diversas proteínas de cepas de *B. thuringiensis* en contra de los diferentes estadios del nematodo *H. contortus* en ensayos efectuados *in vitro* e *in vivo*.

Table 1. Percentage of the lethal efficacy of diverse *B. thuringiensis* strains against the nematode *H. contortus*, different stages either *in vitro* or *in vivo* assays

Toxins	Larvae stages	Effectivity (%)	Reference
PS86Q3	Eggs	100	Lopez-Arellano <i>et al.</i> , 2002 (43)
	L ₃	22	
PS14OE2	Eggs	20.4	Lopez-Arellano <i>et al.</i> , 2002 (43)
	L ₃	30.14	
PS211B2	Eggs	99	Lopez-Arellano <i>et al.</i> , 2002 (43)
	L ₃	21.2	
IB-16	Eggs	99.5	Lopez-Arellano <i>et al.</i> , 2002 (43)
	L ₃	98.9	
	L ₄	100	
IB-61	Adults	73.4	Lopez <i>et al.</i> , 2006 (50)
	Eggs	100	
1B-61	L ₃	85.9	Lopez-Arellano <i>et al.</i> , 2002 (43)
	L ₄	98	
	L ₄	98	
*70 kDa	L ₄	65	Vázquez-Pineda <i>et al.</i> 2010 (51)
*25 kDa	L ₄	25	Vázquez-Pineda <i>et al.</i> , 2010 (51)

L₃= Infective larvae; L₄= Histiotropic larvae; L₅= Young adults; *Purify proteins by HPLC and Sephadex G-50.

Asimismo, gerbos y corderos Pelibuey infectados con *H. contortus* fueron tratados por vía sistémica con proteínas solubles de la cepa IB-16, los cuales mostraron reducción de larvas histiotrópicas en estómago y de nematodos adultos en un rango de 50 a 70 %⁽⁵⁰⁾.

La cepa IB-16 de *B. thuringiensis* sintetiza cinco proteínas con peso molecular de 25, 45, 55, 70 y 100 kilodaltons (kDa) en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y por proteínas de 25 kDa y 70 kDa detectadas en geles no desnaturalizantes (NATIVE-PAGE). A través de la separación de proteínas de la cepa IB-16 de *B. thuringiensis* por HPLC se determinó la efectividad letal de la proteína de 70 kDa *in vitro*, como el principal componente de la cepa IB-16⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. Asimismo, la proteína de 70 kDa está conformada por glicoproteínas y la proteína de 25 kDa contiene proteasas, pero el efecto letal de esta última fue muy bajo en contra de larvas de *Haemonchus*⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Actualmente, diversos estudios de la cepa IB-16 de *B. thuringiensis* continúan realizándose para identificar el gen que codifica la proteína de 70 kDa para su posible aplicación como agente recombinante. Por medio de estos estudios se pretende abrir nuevas expectativas de control utilizando herramientas biotecnológicas, diferentes a los antihelmínticos comerciales. Por otro lado, la actividad letal de cepas experimentales de *B. thuringiensis* sobre estadios de vida libre de *H. contortus*, podría ser otro método de control biológico, cuya aplicación se realice sobre potreros contaminados, para contribuir a disminuir la prevalencia de nematodos gastrointestinales de vida libre a mediano plazo, así como a reducir los problemas de resistencia de tipo múltiple a los antihelmínticos en regiones de riesgo debido a la prevalencia de nematodos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONACYT por haber apoyado los proyectos número 28802 y 23953-48875-Z.

bands with molecular weight of 25, 45, 55, 70 and 100 kilo Daltons (kDa) in denaturing polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and also two proteins with molecular weights around 25 and 70 kDa were identified on native gels.

The 70 kDa protein bands from *B. thuringiensis* IB-16 strain was obtained through the HPLC fractioning and it was associated to the *in vitro* lethal activity against nematodes, and also was considered as the main component of *B. thuringiensis* IB-16⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. Biochemical characterization of a 70 kDa fraction showed glycoproteins as main moieties and proteases were identified on fraction of 25 kDa as principal component; however, this one showed low lethal efficacy against *Haemonchus* larvae⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Many studies about *B. thuringiensis* IB-16 strain are still under process to identify the possible effect of IB-16 as a recombinant agent and the gene (s) involved in the expression of the 70 kDa protein. These studies are focused to investigate the possible use of *B. thuringiensis* IB-16 as a new alternative of control, different to commercial anthelmintics, supported by biotechnological tools. Therefore, the nematocidal activity of *B. thuringiensis* strains against free-living stages of *H. contortus* could be used as an additional alternative of control on infected paddocks and also to reduce the problems of anthelmintic resistance in nematodes to multiple drugs in risky areas with a high parasitic prevalence.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was financially support by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexican grants Project Numbers 29902 and 23952-48875-Z.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean DH. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2010). [on line]: http://www-lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/. Accessed Jun 15, 2010.

2. Wei J-Z, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang S-Ch, *et al.* *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Microbiol* 2003;100:2760-2765.
3. López-Arellano ME. Experiencias en el uso de *Bacillus thuringiensis* en contra del nemátodo *Haemonchus contortus*. En: Fernández RM. Perspectivas de control biológico parasitario y nuevas alternativas en el sector pecuario. México DF, INIFAP. 2010.
4. Marroquin LD, Elyassnia D, Griffiths JS, Feitelson JS, Aroian RV. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155;1693-1699.
5. Soulsby E JL, Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals. London, UK: Bailliere Tindal; 1982.
6. Brooker S. Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: Adding up the numbers - A review. *Int J Parasitol* 2010;40(10):1137-1144.
7. Kenyon F, Sargison ND, Skuce PJ, Jackson F. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Vet Parasitol* 2009;163:293-297.
8. Malakhov VV. Nematodes. Structure, development, classification, and phylogeny. Washington, USA: Smithsonian Institution Press; 1994.
9. Kutz SJ, Jenkins EJ, Veitch AM, Ducrocq J, Polley L, Elkin B, Lair S. The Arctic as a model for anticipating, preventing, and mitigating climate. *Vet Parasitol* 2009;163:217-228.
10. Geary TG, Woo K, McCarthy JS, Mackenzie CD, Horton J, Prichard RK *et al.* Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiases of humans. *Int J Parasitol* 2010;40(1):1-13.
11. James CE, Hudson AL, Davey MW. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol* 2009;25(7):328-335.
12. Köhler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol* 2001;31:336-345.
13. Campbell WC, George Conder A, Marchiondo AA. Future of the animal health industry at a time of food crisis. *Vet Parasitol* 2009;163:188-195.
14. Waller PJ. From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Vet Parasitol* 2006;139(1-3):1-14.
15. Gómez-Muñoz MT, Canals-Caballero A, Almeria S, Pasquali P, Zarlenga DS, Gasbarre LC. Inhibition of bovine T lymphocyte responses by extracts of the stomach worm *Ostertagia ostertagi*. *Vet Parasitol* 2004;120:199-214.
16. Else KJ. Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system? *Parasite Immunol* 2005;27:407-415.
17. Graham SP, Trees AJ, Collins RA, Moore DM, Guy FM, Taylor MJ, Bianco A. Down-regulated lymphoproliferation coincides with parasite maturation and with the collapse of both Gamma Interferon and Interleukin-4 responses in a bovine model of Onchocerciasis. *Infect Immun* 2001;7:4313-4319.
18. International Federation for Animal Health Product categories distribution of world market for animal health products. [on line]: http://ifahsec.org/fr_report.htm. Accessed Jun 28, 2009.
19. Fox MT. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Vet Parasitol* 1997;72(3-4):285-97.
20. Vázquez-Prats VM, Flores-Crespo J, Santiago-Valencia C, Herrera-Rodríguez D, Palacios-Franquez A, Liébano Hernández E, *et al.* Frecuencia de nemátodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Tec Pecú Méx* 2004;42:237-245.
21. Davila G, Irsik M, Greiner EC. *Toxocara vitulorum* in beef calves in North Central Florida. *Vet Parasitol* 2010;168(3-4):261-263.
22. Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel SI. Emerging food-borne parasites. *Vet Parasitol* 2009;163:196-206.
23. Itoh N, Kanai K, Hori Y, Hoshi F, Higuchi S. Prevalence of *Giardia intestinalis* and other zoonotic intestinal parasites in private household dogs of the Hachinohe area in Aomori prefecture, Japan in 1997, 2002 and 2007. *J Vet Sci* 2009;10(4):305-308.
24. Kobayashi I, Kajisa M, Farid AS, Yamanaka A, Horii Y. Paralytic ileus and subsequent death caused by enteric parasite, *Strongyloides papillosus*, in Mongolian gerbils. *Vet Parasitol* 2009;162:100-105.
25. Pozio E, Darwin K, Murrell. Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. *Adv Parasitol* 2006;63:367-439.
26. Youn H. Review of zoonotic parasites in medical and veterinary fields in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 2009;47:S133-S141.
27. De Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trend Genet* 2001;17:167-231.
28. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, *et al.* *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:775-806.
29. Fernandez-Luna MT, Lanz-Mendoza H, Gill SS, Bravo A, Soberon M, Miranda-Rios J. An alpha-amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ Microbiol* 2010;12(3):746-757.
30. Kumar S, Chandra A, Pandey KCJ. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *Environ Biol* 2008;29(5):641-53.
31. Sanders ME, Morelli L, Tompkins TA. Sporoformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus*. *Comprehen Rev Food Sci Food Safety* 2003;2:101-110.
32. Hofte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 1989;53(2):242-255.
33. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:807-813.
34. Arenas I, Bravo A, Soberón M, Gómez I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem* 2010;285(17):12497-12503.
35. Aranda E, Sánchez J, Peferoen M, Güereca L, Bravo A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Invertebr Pathol* 1996;68:203-212.
36. Bravo A, Jansens S, Perferoen M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystals proteins in intoxicated insects. *J Invertebr Pathol* 1992;60:237-246.
37. Bravo A, Miranda R, Gómez I, Soberon M. Pore formation activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochim Biophys Acta* 2002;1562:63-69.

38. Gill SS, Cowles EA, Pletratonio PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu Rev Entomol* 1992;37:615-636.
39. Gill SS, Hornung JM, Ibarra JE, Singh GJP, Federici BA. Cytolytic activity and immunological similarity of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* isolate PG-14 toxins. *Appl Environ Microb* 1987;1251-1256.
40. Botjer K, Bone L. Changes in morphology of *Trichostrongylus colubriformis* eggs and the juveniles caused by *Bacillus thuringiensis*. *J Nematol* 1987;19:282-286.
41. Cappello M, Bungiro RD, Harrison LM, Bischof LJ, Griffiths JS, Barrows BD, Aroian RV. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. *PNAS* 2006;103(41):15154-15159.
42. Koetze AC, Grady JO, Gough JM, Pearson R, Bagnall NH, Kemp DH, *et al.* Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *Int J Parasitol* 2005;35:1013-1022.
43. López-Arellano ME, Flores-Crespo J, Mendoza-de-Gives P, Bravo-de-la-Parra A, Herrera-Rodríguez D, Liébano-Hernández D, *et al.* *In vitro* lethal activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. *Int J Nematol* 2002;12:66-72.
44. Rake J, Sikora RA. Influence of plant health-promoting rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* and *Bacillus sphaericus* on *Globodera pallida* root infection of potato and subsequent plant growth. *J. Phytopath (Phytopathologische Zeitschrift)* 1992;134:198-208.
45. Mohammed SH. Saedy MAE, Enan MR, Ibrahim NE, Ghareeb A, Moustafa SA. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J Cell Mol Biol* 2008;7(1):57-66.
46. Griffiths JS, Huffman DL, Whitacre JL, Barrows BD, Marroquin LD, Iler RM, *et al.* Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J Biol* 2003;278(46):45594-45602.
47. Dieterich C, Sommer RJ. How to become a parasite - lessons from the genomes of nematodes. *Trends Genet* 2009;25(5):203-209.
48. Johnson TE, Wood WB. Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:6603-6607.
49. Ontiveros FEG, 1997. Evaluación del efecto nematotóxico de toxinas de *Bacillus thuringiensis* sobre la viabilidad de *Haemonchus contortus* *in vitro* [tesis licenciatura]. Morelos, México. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 1997.
50. López ME, Flores J, Mendoza P, Vázquez V, Liébano E, Bravo A, *et al.* Use of *Bacillus thuringiensis* toxin as alternative method of control against *Haemonchus contortus*. *Ann NY Acad Sci* 2006;1081:347-354.
51. Vázquez-Pineda A, Yáñez-Pérez NG, López-Arellano ME, Mendoza-de-Gives P, Liébano-Hernández E, Bravo-de-la-Parra A. Biochemical characterization of two purified proteins of the IB-16 *Bacillus thuringiensis* strains and their toxicity against the sheep nematode *Haemonchus contortus* *in vitro*. *TBED* 2010;57:111-114.
52. Yáñez-Pérez NG. Evaluación de dos componentes proteínicos que conforman la cepa IB-16 de *Bacillus thuringiensis* contra *Haemonchus contortus* [tesis licenciatura]. Morelos, México. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2009.
53. Hernández-Linares I, López-Arellano ME, Mendoza-de-Gives P, Liébano-Hernández E, Bravo-de-la-Parra A. Lethal activity of two *Bacillus thuringiensis* toxins against *Haemonchus contortus* histiotropic larvae. *Ann NY Acad Sci* 2008;1149:177-179.