



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LA MOSCA DE LOS
CUERNOS Y SU HOSPEDADOR: MECANISMOS NATURALES DE
REGULACIÓN.**

Martín Andrés Breijo Dotta

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2013**

ESTA HOJA VA EN BLANCO



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LA MOSCA DE LOS CUERNOS Y SU HOSPEDADOR: MECANISMOS NATURALES DE REGULACIÓN.

Dr. Martín Andrés Breijo Dotta

**Dra. Ana Meikle
Director de Tesis**

2013

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Presidente: Prof. Dra. Jacqueline Maisonnave. Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

Segundo Miembro: Prof. Dra. Eleonor Castro. Departamento de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

Tercer Miembro: Prof. Dr. Carlos Carmona. Departamento de Biología Celular y Molecular, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL
ACTA DE DEFENSA DE TESIS

En esta hoja va el Informe del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, por financiar el proyecto del cual se desprendió este trabajo. A todo el equipo que llevo a cabo el proyecto FPTA 224, en especial a Lucía Pastro, (Bioquímica, Facultad de Ciencias); Cecilia Fernández (Inmunología, Facultad de Química/Ciencias); Carmen Bolatto (Histología, Facultad de Medicina) y Ana Meikle (Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria).

El presente trabajo se lo dedico a mis maestros de la vida, mis padres (Cristina y Edison), mi esposa (Paula) y mis hijos (Joaquín y Emiliano). Ellos me enseñan todos los días a salir de mis burbujas y a sentir el aire fresco. A mis maestros del camino, Dr. Pablo Spinelli; Dr. Walter Martínez; Dra. Ana Ferreira, Dra. Cecilia Fernández. Ellos con sus paraguas y enseñanzas protegieron y estimularon mi crecimiento como veterinario, docente e investigador. A mi maestra (tutora) Dra. Ana Meikle, por su generosidad al dedicar su luz, intuición y mucho esfuerzo, para que yo pueda avanzar en esta parte de mi trayecto. A mis compañeros de burbujas, compañeros de la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, y del Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, por acompañarme, suplirme y apoyarme. A mis aprendices del camino, en especial a Sergio y a Ximena que con su trabajo ayudaron a fortalecer el mío.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	iv
2. SUMMARY.....	v
3. INTRODUCCIÓN.....	1
4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	3
4.I. Historia, distribución e impacto económico	3
4.II Ciclo biológico y hábitos de vida de la mosca de los cuernos	4
4.III Evasión de parásitos hematófagos a los mecanismos hemostáticos y defensivos del hospedador	7
4.III.1 Mecanismos hemostáticos del hospedador y regulación de los mismos por componentes de la saliva de parásitos hematófagos	7
4.III.2 Respuesta inmune del hospedador y su control por los componentes de la saliva de parásitos hematófagos	10
4.III.3 Reseña de componentes salivales específicamente identificados en la mosca de los cuernos	12
5. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.....	13
6. HIPÓTESIS.....	15
7. OBJETIVOS.....	15
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
8.I. Objetivo específico 1: Desarrollar un método eficiente de cultivos <i>in vitro</i> de larvas y adultos de <i>Haematobia irritans</i>	16
8.II. Objetivo específico 2: Determinar la relación entre carga parasitaria y capacidad de ingesta de las moscas que parasitan bovinos con diferentes caracteres fenotípicos (color de pelaje, sexo y peso vivo)	18

8.III.	Objetivo específico 3: Preparar un antisuero contra una forma recombinante de una proteína (Hematobina, HTAr) deducida de uno de los ADNc identificados en el transcriptoma de la glándula salival de la mosca de los cuernos. Diseñar un enzimoimmunoensayo (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos contra HTAr en el suero de bovinos	19
8.IV	Objetivo específico 4: Estudiar la evolución de la carga parasitaria, el consumo de hemoglobina de las moscas y el perfil de la respuesta de anticuerpos anti HTAr en bovinos naturalmente parasitados durante la estación estival.	21
9.	RESULTADOS.....	22
9.I.	Objetivo específico 1: Desarrollar un método eficiente de cultivos <i>in vitro</i> de larvas y adultos de <i>Haematobia irritans</i>	22
9.II.	Objetivo específico 2: Experimento 1. Determinar la relación entre la carga parasitaria y capacidad de ingesta de las moscas que parasitan bovinos con diferentes caracteres fenotipos (color de pelaje, sexo y peso vivo).	23
9.III	Objetivo específico 3: Preparar un antisuero contra una forma recombinante de una proteína (Hematobina, HTAr) deducida de uno de los ADNc identificados en el transcriptoma de la glándula salival de la mosca de los cuernos. Diseñar un enzimoimmunoensayo (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos contra HTAr en el suero de bovinos.	28
9.IV	Objetivo específico 4: Experimento 2. Evolución de la carga parasitaria, consumo de hemoglobina de las moscas y perfil de la respuesta de anticuerpos anti HTAr en bovinos naturalmente parasitados durante la estación estival.	32
10.	DISCUSIÓN.....	34
11.	CONCLUSIONES.....	38
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
13.	ANEXO I.....	47

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Distribución de moscas en el rodeo.	24
Figura 1.	Ciclo biológico de la mosca de los cuernos.	5
Figura 2.	Mecanismo de formación de coágulo frente al daño vascular.	8
Figura 3.	Activación de la vía extrínseca de la coagulación.	9
Figura 4.	Procedimiento de obtención de diferentes estadios parasitarios de la mosca de los cuernos.	17
Figura 5.	Determinación de la viabilidad de pupas a diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C.	23
Figura 6.	Número de moscas por animal, hemoglobina por mosca y espesor de la epidermis de acuerdo al color de manto y sexo.	25
Figura 7.	Evolución de las variables carga de moscas por animal, concentración de hemoglobina por mosca y espesor de la epidermis en función del peso vivo.	26
Figura 8.	Comparación del tamaño del aparato bucal de <i>H. Irritans</i> y el espesor de la epidermis del bovino.	27
Figura 9.	Análisis por SDS-PAGE de la expresión y purificación de Hematobina recombinante.	28
Figura 10.	Análisis de Hematobina nativa y recombinante por Western blot.	29
Figura 11.	Determinación de la concentración óptima de sensibilización del ELISA anti HTAr.	30
Figura 12.	Representación de dos curvas estándar (control positivo) obtenidas de dos ELISA corridos en forma independiente.	31
Figura 13.	Distribución de la carga parasitaria, ingesta de sangre de las moscas de bovinos naturalmente parasitados y títulos de anticuerpos bovinos anti HTAr en el verano.	33

1. RESUMEN

En el presente trabajo se estudió si los bovinos son capaces de regular naturalmente sus cargas de moscas de los cuernos. Para ello, se pusieron a punto y se desarrollaron metodologías tendientes a estudiar dos hipótesis de trabajo.

La primera hipótesis fue que la elección de la mosca por su hospedador está condicionada por la facilidad de acceso que tiene la mosca a la sangre bovina. Específicamente, se testeó si las cargas parasitarias diferenciales asociadas a caracteres fenotípicos inherentes al hospedador (color, sexo y peso) están asociadas a la dificultad para la obtención del alimento (grosor de epidermis) y al consumo de sangre de las moscas. Bovinos cruzas (n=30) se clasificaron de acuerdo al sexo y color de pelaje. Las cargas de las moscas, la concentración de hemoglobina en las mismas y el grosor de la epidermis bovina fueron analizados por un modelo estadístico que incluyó los efectos del color del pelaje (oscuro vs claro), sexo (macho vs hembra), e interacciones como efectos fijos, y peso vivo como covariable. Los animales oscuros cargaron más moscas, presentaron un epitelio más fino y el consumo de hemoglobina de las moscas que los parasitaban fue mayor en comparación con los animales claros. El incremento de peso vivo, se asoció a una mayor carga parasitaria, a un incremento de espesor de epitelio y a una reducción del consumo de hemoglobina de las moscas. El sexo no afectó ninguna de estas tres variables.

La segunda hipótesis, fue que el consumo de sangre de la mosca es regulado - al menos en parte - por el hospedador. Para ello, durante la estación estival, se estudió la evolución de las cargas de las moscas, el consumo de hemoglobina de las mismas y títulos de anticuerpos contra una proteína salival de la mosca (Hematobina), en 15 bovinos clasificados acorde al color y sexo. Las cargas de parásitos fluctuaron durante la estación: tres picos de 1-2 semanas de altas cargas de moscas (>250 moscas) fueron seguidos por períodos de 3-4 semanas de bajas cargas. El consumo de hemoglobina de las moscas varió entre las semanas, cuya evolución acompañó la evolución de las cargas parasitarias. Los bovinos desarrollaron anticuerpos anti Hematobina frente a la exposición natural de las moscas. Altos títulos de anticuerpos contra Hematobina tendieron a afectar el consumo de hemoglobina de las moscas.

Los resultados obtenidos demuestran que el consumo de sangre de las moscas varía en función de los caracteres fenotípicos de los bovinos y a lo largo de la estación estival. En el presente trabajo se discute como el bovino interviene en esas variaciones del consumo y los efectos de las mismas sobre la dinámica poblacional de estos parásitos.

2. SUMMARY

In the present thesis, we investigated if cattle have the natural ability to regulate their horn fly loads. For this purpose, some methodologies were developed to test two different hypotheses.

The first hypothesis was that the fly selection of the host is conditioned by the fly accessibility to bovine blood. Specifically, it was tested if the differential parasitic loads were associated with some host phenotypic characteristics (color, sex and weight) are related with the difficulty of obtaining blood (epidermis thickness) and the levels of blood intake of flies. Cattle crosses (n =30) were classified according to sex and coat color. Fly loads, fly hemoglobin concentration and the bovine epidermal thickness were analyzed by a statistical model that included coat color (dark vs light), sex (male vs female), and interactions as fixed effects, and bodyweight as a covariate. Dark coat animals had bigger fly loads, showed a thinner epithelium and presented greater hemoglobin consumption of flies than light coated animals. Increases on body weight were associated with an increase of parasite loads, epidermal thickness and with a reduction of fly hemoglobin intake. Sex did not affect any of these three variables.

The second hypothesis was that the fly blood intake is regulated - at least in part- by the host. To test it, the evolution of fly loads, fly hemoglobin consumption and antibody titers against a horn fly salivary protein (Hematobina) were recorded during the summer season in 15 bovines previously classified according to color and sex. Parasite loads fluctuated during the season: three peaks of 1-2 weeks of high fly loads (> 250 flies) were followed by periods of 3-4 weeks with low fly loads. The hemoglobin content also varied between weeks; observing that, fly hemoglobin consumption correlated with the evolution of parasite loads. Natural cattle exposure to horn fly induced an antibody response anti Hematobina. High anti-Hematobina titers tended to affect the hemoglobin consumption of the flies.

These results showed that fly blood intake varied according to cattle phenotypic characteristics and throughout the summer season. In this work, we discuss how the bovine is involved in the variations of the consumption and the collateral effects on the dynamics of fly population.

3. INTRODUCCION

La mosca de los cuernos (*Haematobia irritans irritans*) es una mosca hematófaga de distribución mundial que afecta principalmente al ganado bovino causando importantes pérdidas económicas (Cupp et al. 2004). Su presencia en Uruguay fue diagnosticada en 1991 (Carballo & Martínez 1991) y hoy afecta todo el territorio nacional. El control de este parásito se ejerce principalmente en base al uso de insecticidas, los cuales son aplicados rutinariamente cuando la infestación es masiva (Guglielmone et al. 2002a). Desafortunadamente, su excesiva utilización ha provocado que *H. irritans* desarrolle resistencia a estos compuestos, disminuyendo la eficiencia de los sistemas de control (Oyarzún et al. 2008). Esto ha derivado en la búsqueda de métodos alternativos de control, tales como trampas mecánicas y/o controladores biológicos, selección de animales resistentes o el desarrollo de vacunas (Tozer & Sutherst 1996; Cupp et al. 2004). Para alcanzar el éxito en el desarrollo de éstas u otras metodologías alternativas, se hace necesario investigar en las bases de la interacción parásito hospedador así como en la existencia de mecanismos naturales de control.

Una de las características de esta parasitosis es que el número de moscas presentes en los bovinos difiere entre las razas y entre los individuos, conviviendo simultáneamente animales con altas y bajas cargas de moscas (Castro et al. 2003; de Souza et al. 2005). Esto manifiesta la presencia de criterios de selección de hospedadores por parte de las moscas y/o la existencia de mecanismos de regulación de las cargas parasitarias por parte de los bovinos. Hasta la fecha no se ha podido establecer con exactitud cuáles son esos criterios o mecanismos involucrados y en qué medida son dependientes de la mosca y/o del hospedador. Varios fenotipos bovinos han sido relacionados como responsables de una atracción diferencial de los insectos por sus hospederos, aunque con resultados dispares. Se ha reportado que existe una relación positiva entre el tamaño y condición corporal de los animales con la cantidad de moscas que lo parasitan (Castro 2003). El color oscuro del pelo parece atraer mayor número de moscas que los colores claros (Franks 1963; Rodríguez-Gallegos & Acosta-Rodríguez 2011), aunque otros autores no demostraron estas diferencias (Tugwell 1969; Guglielmone et al. 2002b). Los estudios sobre la relación entre carga parasitaria y características fenotípicas del hospedador son escasos, y generalmente no consideraron la acción simultánea de cada uno de los caracteres fenotípicos relevantes sobre la carga final de moscas. Más allá de lo expuesto, sabemos de la existencia de una atracción diferencial de las moscas por algunos caracteres fenotípicos. Pero, ¿qué es lo que ven las moscas en esas características fenotípicas de los bovinos? Nuestra hipótesis es que, la preferencia de la mosca por determinados fenotipos bovinos, se basa en la facilidad con que ésta accede a su alimento. En el presente trabajo intentaremos aportar información en relación a este tema.

Otro aspecto interesante de la relación entre la mosca de los cuernos y su hospedador, es que la oferta de moscas a lo largo del año no es

homogénea. Varios autores han descrito la ocurrencia de dos picos de oferta de moscas para nuestra región, uno a fines de la primavera y el segundo a principios de otoño (Guglielmone et al. 2002b; Lima et al. 2002). Si bien la oferta de moscas en el rodeo está principalmente asociada a condiciones climáticas (Castro et al. 2008), la distribución bimodal de las moscas se mantiene aun en condiciones climáticas favorables para el desarrollo de estos insectos (Almazán-García et al. 2001), sugiriendo la presencia de factores adicionales de regulación. En este sentido, Castro et al. (2008), demostraron que el crecimiento de las poblaciones de moscas en un rodeo, es inversamente proporcional a la densidad media de moscas presentes en los bovinos. Este trabajo introdujo un nuevo elemento en el camino hacia el entendimiento de la dinámica de la población de moscas y es el que nos lleva a plantearnos nuestra segunda hipótesis de trabajo: ¿son los bovinos capaces de regular la oferta de moscas en el rodeo?. Para responder esta segunda pregunta, el presente trabajo investigará sobre las dinámicas poblacionales de moscas en nuestra región, el comportamiento en el consumo de alimento a lo largo de la estación estival y la respuesta inmunológica de los bovinos contra componentes de la saliva de dichos parásitos.

En suma, a través de dos estrategias experimentales diferentes, se investigaron posibles mecanismos de regulación de la carga parasitaria vinculados al hospedador.

4. ANTECEDENTES

4.1. Mosca de los cuernos: historia, distribución e impacto económico

La mosca de los cuernos, *Haematobia irritans irritans* (Linnaeus 1758) es un díptero hematófago que afecta principalmente al ganado bovino. Esta mosca es originaria de Europa y fue reportada por primera vez en 1885 en España y Francia. En 1887, se confirma su presencia en Estados Unidos (Bruce 1938). A principios de 1900, dicha mosca invadió la mayor parte de Estados Unidos, Canadá y Puerto Rico (Hargett & Goulding 1962). Ingresó a América del Sur en la década del 30 a través de Venezuela y Colombia; luego dicha población de moscas se desplazó hacia el sur diagnosticándose en Argentina y Uruguay en 1991 (Tarelli 2004). En la actualidad la mosca de los cuernos se encuentra en América, Europa, Asia y en regiones del norte de África.

Pocos estudios han sido diseñados específicamente para relacionar las pérdidas económicas en ganado como consecuencia de la presencia o ausencia de ectoparásitos (Byford et al. 1992). Sin embargo, la mosca de los cuernos es considerada una de las ectoparasitosis que más afecta la producción de bovinos en condiciones de pastoreo (Byford et al. 1992). Estas pérdidas están asociadas principalmente a pérdidas en la ganancia de peso, en la producción lechera y en la calidad de los cueros obtenidos (Guglielmone et al. 1999). A estos elementos debemos agregar los costos asociados a su control. Campbell (1976), describió que el peso al destete de terneros machos provenientes de bovinos libres de moscas fue 5,8 kg superior que los terneros destetados de ganado infestado. En este mismo sentido, Haufe (1982) demostró que la ganancia de peso de bovinos tratados con caravanas con fenvalerato fue superior a los bovinos sin tratar. Estos efectos adversos también fueron reportados en novillos de sobreaño, observando una reducción del 12% en la ganancia de peso en animales parasitados (Kinzer et al. 1984). En esta misma categoría de animales, Kunz et al. (1984) reportaron caídas de la ganancia de peso de 0,1 kg/día cuando las cargas parasitarias superaron las 700 moscas por animal.

Se ha reportado que los bovinos parasitados con la mosca de los cuernos modifican su comportamiento como consecuencia de la molestia y la irritación que genera. Bovinos Holando expuestos a cargas superiores a las 500 moscas incrementaron el tiempo que permanecen de pie, pastorearon menos, caminaron más y movieron sus colas más frecuentemente (Savio et al. 1976; Harvey & Launchbaugh 1982). Estos cambios comportamentales se reflejaron en cambios fisiológicos en los bovinos afectados; se encontraron mayores frecuencias cardíaca y respiratoria y temperatura rectal en novillos expuestos entre 100 y 500 moscas por animal respecto a animales libres de moscas (Schwinghammer et al. 1986).

Si bien el efecto de las infestaciones por *H. irritans* sobre la calidad de los cueros no ha sido considerado como un problema mayor, las curtiembres han reportado un incremento de los descartes de cueros como consecuencia de daños generados por el insecto (Guglielmone 1999). Torres et al. (1993),

definieron las lesiones epiteliales como pequeños cráteres o pozos en las áreas donde la mosca se alimenta. Un estudio realizado por Guglielmo et al. (1999), demostró que las áreas de cueros dañadas por la mosca, así como los niveles de infiltración de células mononucleares, y el edema observado en la dermis fue proporcional a la carga de parásitos y que bajas cargas de moscas son suficientes para generar cambios significativos en el cuero. El mayor efecto estaría relacionado al proceso inflamatorio generado por las picaduras, más que por el daño tisular directo generado por el parásito.

Varios autores han analizado los riesgos de transmisión de patógenos como consecuencia de las infestaciones por *H. irritans*. Hibler (1966) demostró que *H. irritans* es transmisor de *Stephanofilaria stilesi*, un nematode presente en América del Norte y Asia, que afecta principalmente la dermis de los bovinos y que genera lesiones macroscópicas y microscópicas en los mismos. El rol de la mosca como vector de enfermedades virales ha sido también objeto de estudio. Tarry et al. (1991), analizaron la capacidad de transmisión de Diarrea Viral Bovina (DVB) de *Stomoxys calcitrans*, *Haematopota pluvialis* y *H. irritans*. Ellos reportaron que *S. calcitrans* y *H. pluvialis* fueron capaces de transmitir la enfermedad a los bovinos receptores, no así *H. irritans*. Fue posible aislar virus en *H. pluvialis* y *S. calcitrans* hasta cuatro días posteriores a la toma de sangre de un animal infectado, mientras que de *H. irritans* sólo se aisló hasta dos horas posteriores a la alimentación. La capacidad de transmisión del virus de Leucosis Bovina a través del aparato bucal de moscas hematófagas fue estudiada (Buxton et al. 1985): son necesarias 50 probóscides de *S. calcitrans* y 100 de *H. irritans* para inducir la seroconversión de ovejas y terneros negativos a la enfermedad. La capacidad que tiene un insecto hematófago de funcionar como vector de enfermedades, es dependiente principalmente de los volúmenes de sangre ingeridos del hospedador y del comportamiento alimenticio del insecto. Los estados adultos de *H. irritans*, permanecen principalmente sobre un único hospedador, lo que disminuye la posibilidad de transmisión de enfermedades de un animal a otro.

En suma, son diversos los perjuicios que este parásito ocasiona a los sistemas de producción bovina. En EUA se considera que esta parasitosis genera pérdidas anuales por 1 billón de dólares (Cupp et al. 2004). En Chile, las pérdidas anuales fueron estimadas en 25 millones de dólares (Velasco et al. 2001). En nuestro país, se la ha asociado con importantes pérdidas en la industria del cuero (Vanzini et al. 1997).

4.II. Ciclo biológico y hábitos de vida de la Mosca de los cuernos

La mosca de los cuernos es un díptero hematófago, de 3 a 5 mm de largo, que tiene una importante probóscide picadora/chupadora. Los estadios adultos de ambos sexos son hematófagos y tienen por hospedador principal al bovino. Para alimentarse succiona sangre por períodos que van de 4 a 10 minutos, repitiendo este procedimiento hasta 30 veces por día (Tarelli 2004). La vida media del adulto es entre 3 y 7 semanas, y transcurre principalmente sobre el cuerpo del animal. La hembra adulta de *H. irritans*, una vez

fecundada, inicia la oviposición, depositando sus huevos en las materias fecales frescas de los bovinos (Figura 1). El período de incubación del huevo es de 16 horas, al cabo del cual nace una larva de primer estadio (L1), esta muda a larva de segundo estadio (L2) en 10 horas y finalmente a larva de tercer estadio (L3) luego de las 18 horas. La L3 completa su desarrollo en 64 horas alcanzando así el estadio de pupa. Una vez completada la pupación (3-8 días), emerge el adulto iniciando un nuevo ciclo (Rodríguez Castro et al. 1993; Figura 1).

El ciclo biológico en condiciones óptimas de temperatura y humedad es aproximadamente de 8 días (Abrahamovich et al. 1993), aunque puede variar frente a condiciones de adversidad climática. Cuando la temperatura es inferior a 15°C, las pupas entran en diapausa pudiendo retrasar su desarrollo hasta 160 días (Hoelscher & Combs, 1971; Lysyk & Moon 1994). La postura de huevos es realizada por las hembras sobre las heces frescas, depositando racimos que contienen entre 3-14 huevos. Este procedimiento se repite 3-4 veces durante los 10 minutos que dura el período de postura. El total aproximado de huevos puestos por hembra, a lo largo de su vida reproductiva varía de 200 a 400 (Wilkerson 1974).

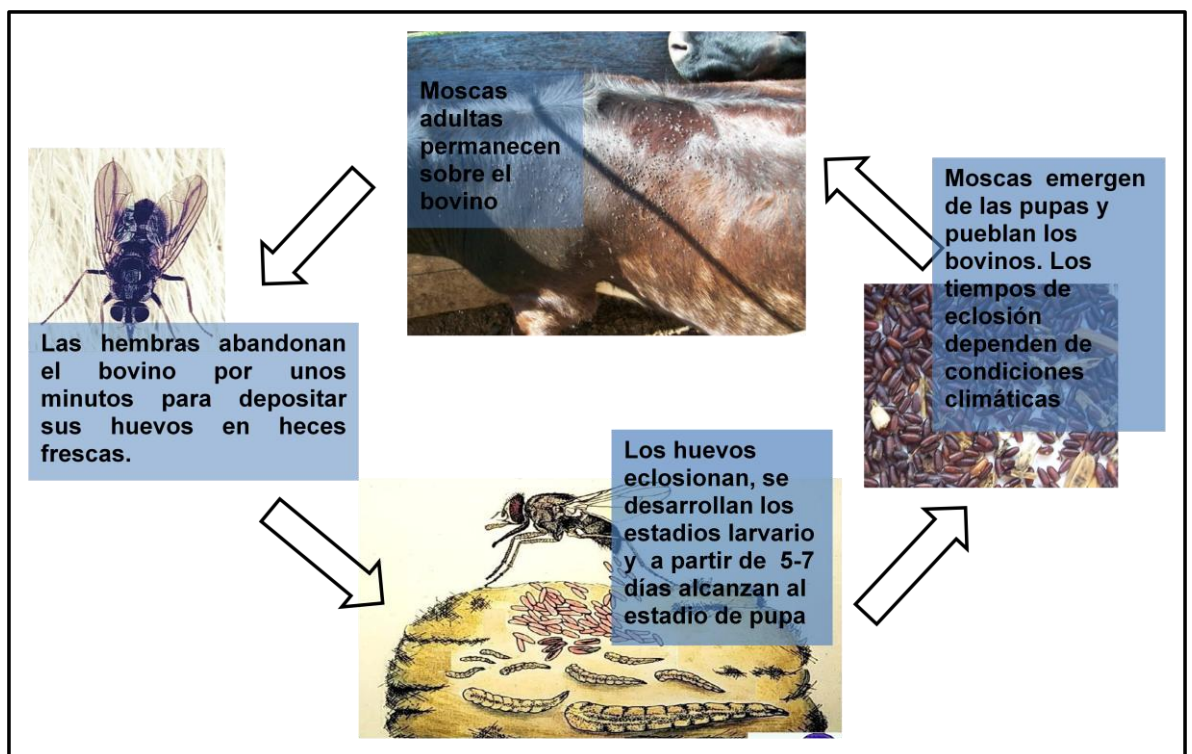


Figura 1. Ciclo biológico de la mosca de los cuernos.

La carga de parásitos adultos en los animales de un mismo rodeo no se distribuye en forma homogénea. Es posible observar simultáneamente animales con altas y bajas cargas de moscas. Varios factores han sido mencionados como responsables de la atracción diferencial de los insectos por sus hospederos, aunque con resultados dispares. Castro (2003) reportó que existe una relación positiva entre el tamaño y condición corporal de los

animales con la cantidad de moscas que lo parasitan. El color oscuro del pelo parece atraer mayor número de moscas que el color claro (Franks 1963). Sin embargo, otros autores (Guglielmone et al. 2002b) no pudieron demostrar estas diferencias. El sexo se ha asociado como factor de atracción, siendo los machos más atractivos para las moscas (Franks 1963; Rodríguez-Gallegos & Acosta-Rodríguez 2011). Post et al. (1987) relacionaron el nivel de testosterona con la carga de moscas al observar que los toros cargaban más moscas que las vacas y los novillos. En estos ensayos las diferencias en peso entre machos y hembras no fueron tenidas en cuenta.

Hasta la fecha no han sido identificados elementos estructurales, moleculares o genéticos, que permitan explicar las bases del vínculo entre los caracteres fenotípicos de los bovinos y la atracción de moscas. Se han identificado componentes volátiles con capacidad quimioatrayente o repelente (Oyarzún et al. 2009), pero ninguno ha sido asociado a características fenotípicas.

Otro punto interesante en la biología de este parásito, es que la oferta de insectos en un rodeo no es homogénea a lo largo del año. Varios autores han descrito la ocurrencia de dos picos de oferta de moscas para la región austral de América del Sur, el primero a fines de la primavera y el segundo a principios de otoño (Lima et al. 2002; Guglielmone et al. 2002b). Sin embargo en Uruguay, Castro et al. (2008) describe un único pico de moscas al final de la estación estival. En América Central, la presencia de moscas es durante todo el año, sin embargo la oferta de moscas es fluctuante; los momentos de mayor infestación se observaron al final de la primavera (Galindo-Velasco et al. 2008). En México, Cruz-Vázquez et al. (2000) reportaron una curva bimodal con picos poblacionales en el verano y en otoño.

Se ha propuesto que esta distribución de oferta de moscas puede ser el resultado de la asociación entre clima, efectos de predadores, competencia por sustrato en estadios larvarios y/o respuesta inmune del hospedador (Blume et al. 1970; Cabrera & Cordo 1997). La temperatura y la humedad ambiente han sido los factores que más se han correlacionado con la oferta de moscas. Almazán-García et al. (2001) reportaron que la correlación entre la población de moscas con la temperatura fue de 0.57, y con las precipitaciones de 0.32 y el análisis de las dos variables en conjunto mostró una correlación de 0.70. Torres et al. (1996) definieron a la temperatura como el principal factor abiótico de la mosca de los cuernos en el norte Argentino. La temperatura también fue definida como un factor que afecta el crecimiento poblacional de moscas en Uruguay (Castro et al. 2008). Este trabajo reportó además, que el crecimiento de las moscas es inversamente proporcional a la densidad media de moscas presentes en los bovinos, introduciendo un elemento nuevo en la dinámica de la población de moscas: la posibilidad de que el hospedador sea un factor de regulación de la carga.

4.III. Evasión de parásitos hematófagos a los mecanismos hemostáticos y defensivos del hospedador

Los parásitos hematófagos para alimentarse están obligados a traumatizar la piel y/o mucosas y la red vascular de su hospedador. El daño tisular ocasionado lleva a la activación de mecanismos homeostáticos que el parásito debe controlar, o de lo contrario su alimentación podría ser bloqueada.

Este control se alcanza por la presencia en la saliva de moléculas farmacológicamente activas, denominadas "sialogeninas" (Sá-nunes & de Olivera 2011). Se ha observado que aquellos parásitos que permanecen más tiempo sobre su hospedador, son los que han desarrollado un armamento farmacológico mayor (Hajnická et al. 2011).

Las sialogeninas, no solo colaboran con el proceso de alimentación del parásito, sino que favorecen la transmisión de algunos patógenos cuando éstos actúan como vectores. A modo de ejemplo, la *Borrelia burgdorferi*, (espiroqueta causante de la enfermedad de Lyme), ingresa al hospedador protegida por una proteína salival que impide la acción citotóxica mediada por los anticuerpos del hospedador (Ramamoorthi et al. 2005).

4.III.1. Mecanismos hemostáticos del hospedador y regulación de los mismos por componentes de la saliva de parásitos hematófagos

La injuria vascular causada por el parásito hematófago al alimentarse activa ineludiblemente el sistema de la coagulación; una cascada enzimática que tiene por objetivos: a) producción de coágulos de fibrina, b) agregación plaquetaria, y c) vasoconstricción de la zona dañada (Chmelar et al. 2012).

Su activación genera trombina, cuya función es transformar el fibrinógeno (factor plasmático soluble) en fibrina (proteína insoluble), capaz de polimerizar y entrecruzarse, formando junto con las plaquetas el coágulo que taponan las heridas (Figura 2).

La cascada de la coagulación puede activarse por 2 vías (intrínseca y extrínseca), ambas tienen como destino activar al factor X, con el que se inicia la vía común de la cascada.

Cuando un parásito hematófago punciona un vaso sanguíneo, la sangre entra en contacto con tejidos lesionados o se mezcla con extractos de tejidos activándose la vía extrínseca (Figura 3). En esta vía se genera muy rápidamente factor Xa, como consecuencia de que la proenzima X es activada por un complejo formado por factor VII, Ca^{2+} y factor tisular unido a fosfolípidos provenientes de las membranas celulares rotas y de las plaquetas. El factor tisular (TF) se encuentra normalmente "secuestrado" en el interior de las células endoteliales y es secretado en respuesta a una lesión, o bajo el efecto de algunas citoquinas proinflamatorias (TNF, IL1).

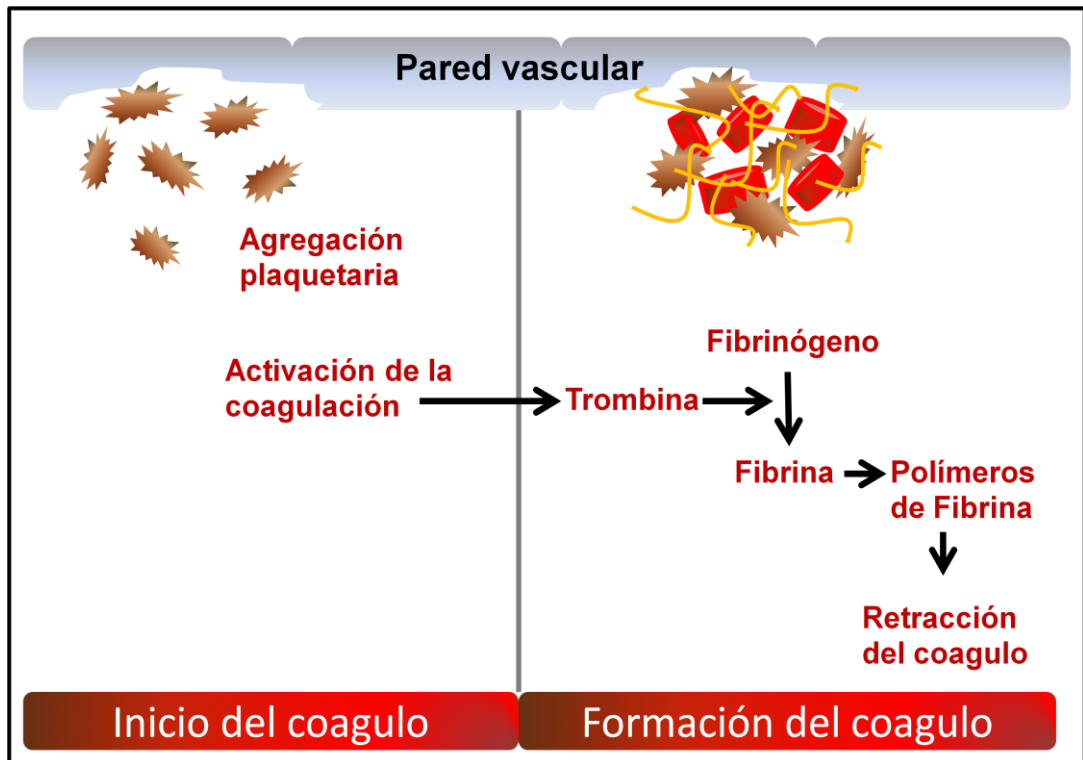


Figura 2. Mecanismo de formación del coágulo frente al daño vascular.

Algunos parásitos han desarrollado moléculas para impedir la formación de coágulos de fibrina. En la saliva de *Ornithodoros moubata*, se aisló una proteasa llamada TAP (tick anticoagulant protein), que es inhibidora del factor Xa (Sanyal et al. 1995). También de la saliva de ixodidos se han aislado inhibidores del TF (Francischetti et al. 2002; Maritz-Olivier et al. 2007), y en *Rhipicephalus microplus* inhibidores directos de trombina que evitan la formación de coágulos (Ciprandi et al. 2006).

En el caso particular de la mosca de los cuernos, se ha aislado una proteína inhibidora de la formación de trombina llamada Thrombostasin (TS). Esta proteína es capaz de reducir significativamente la actividad amidolítica de la trombina, bloqueando así el clivaje del fibrinógeno (Zhang et al. 2002).

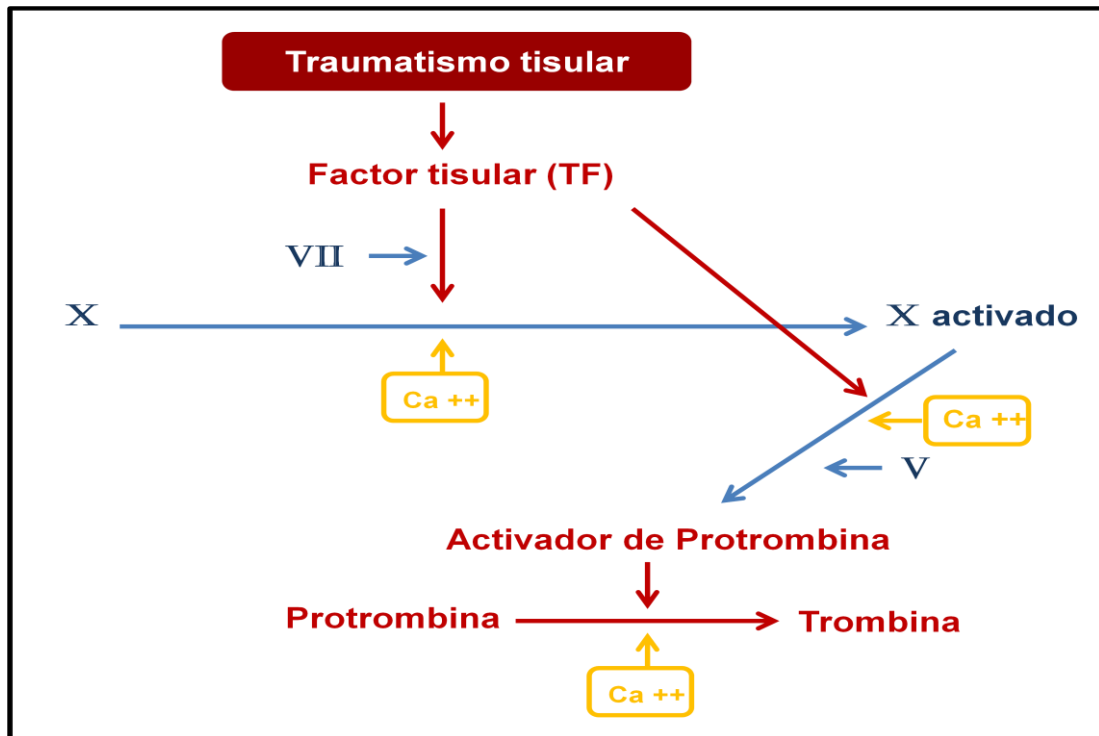


Figura 3. Activación de la vía extrínseca de la coagulación.

Cuando los parásitos se alimentan de pequeños vasos, la toma de sangre podría estar más afectada por la agregación plaquetaria que por la oclusión vascular debido a la fibrina. De hecho, se han identificado enzimas capaces de reducir la formación de trombos en algunos parásitos. Uno de los mecanismos antiagregantes plaquetarios más conocidos es la degradación del ATP y ADP (dos potentes agonistas de agregación plaquetaria) en AMP, a través de la secreción salivar de una enzima llamada apyrasa (adenosine diphosphatasa). Esta enzima fue identificada en la garrapata del bovino *Rhipicephalus microplus* (Liyou et al. 2000) y en *Ornithodoros savignyi* (Stutzer et al. 2009). Un segundo grupo de enzimas que afectan la agregación plaquetaria y la coagulación son las metaloproteasas con actividad fibrinolítica y gelatinasa, que se identificaron en *Ixodes scapularis* (Francischetti et al. 2003).

Se ha identificado que proteínas de la familia de las lipocalinas son capaces de inhibir el factor de agregación plaquetaria inducido por colágeno, así como también de modular la respuesta a la acción de la histamina y serotonina. Por lo tanto, estas proteínas no solo están involucradas en la mejora de la toma de alimento (controlando la agregación plaquetaria y vasoconstricción), sino que controlan la inflamación y la respuesta inmune del hospedador (Mans & Ribeiro 2008). Una lipocalina salival de *Ornithodoros moubata* cuando es administrada en altas dosis es capaz de inhibir la unión de tromboxano A2 (TXA2, agonista de la agregación plaquetaria) a su receptor en las plaquetas (Keller et al. 1993). Cabe señalar que lipocalinas también se han identificado en el sialotranscriptoma de mosquitos *Aedes*

albopictus y *A. sthephensi* (Valenzuela et al. 2002; Arcà et al. 2007) y de *S. calcitrans* (Wang et al. 2009).

4.III.2. Respuesta inmune del hospedador y su control por los componentes de la saliva de parásitos hematófagos

Frente a la identificación de componentes extraños o a la presencia de daño tisular, el sistema inmune del hospedador desarrolla una respuesta con el objetivo de eliminar el agente agresor y reparar el daño generado. Inicialmente, se establece un proceso inflamatorio coordinado por un conjunto de factores celulares y solubles, que componen la respuesta inmune innata. Frente a la presencia de parásitos hematófagos, el sistema complemento y los mediadores proinflamatorios secretados por mastocitos y macrófagos son los principales responsables de dicha respuesta.

El sistema complemento está compuesto por un conjunto de proteínas plasmáticas, que al ser activadas participan en cascadas bioquímicas cuyas funciones son: potenciar la respuesta inflamatoria a través de la liberación de anafilotoxinas (C4a, C3a, C5a), facilitar la fagocitosis a través del marcado de las células blanco con opsoninas (C3b) y lisar células como consecuencia de la formación del complejo de ataque a membrana (C5b-C9). Se ha podido demostrar que la activación del complemento limita la capacidad de toma de alimento de algunas garrapatas y que muchas de ellas han desarrollado moléculas que inhiben el complemento a distintos niveles de la cascada (Ribeiro et al. 1985). En la saliva de *Ixodes* se han identificado moléculas inhibitoras de la activación de la vía alterna del complemento evitando la deposición de C3b y del factor B (Valenzuela et al. 2000; Lawrie et al. 2005). Tyson et al. (2007) demostraron que Salp20, identificada en la saliva de *Ixodes scapularis*, reduce la actividad de la C3 convertasa, uniéndose con alta afinidad a la properdina, proteína clave en la estabilización de esta enzima. La activación de C5, también ha sido un blanco de control; se ha identificado en *Ornithodoros moubata* un inhibidor del clivaje de C5 (denominado OmCI), que evita la formación de la C5 convertasa y la liberación de la anafilotoxina C5a (Nunn et al. 2005).

La histamina es otro factor soluble que juega un rol relevante en los mecanismos de respuesta innata a la agresión; es producida por basófilos y mastocitos residentes en el tejido conectivo, así como por otras células del sistema nervioso y digestivo (Dy & Schneider 2004). Cuando es liberada es causante de prurito, por lo que el hospedador responde con un comportamiento de rascado que puede ser contraproducente para algunos ectoparásitos (Sá Nunes & Freire de Oliveira 2011). A nivel vascular, la liberación de histamina, incrementa la permeabilidad de los capilares, favoreciendo el pasaje de proteínas y células hacia los tejidos. A nivel del sistema inmune adaptativo, la histamina ejerce una importante y compleja acción sobre los patrones de secreción de citoquinas, promoviendo esencialmente una respuesta de tipo Th1 y la secreción de IFN gama (Jutel et al. 2001). Este tipo de respuesta dirigida hacia larvas de cestodos o nematodos se ha asociado con resistencia a la infección (Bautista Garfias 2009). Varios parásitos hematófagos han desarrollado componentes

salivales capaces de bloquear histamina. En la vinchuca, *Rhodnius prolixus*, se describió una lipocalina capaz de unir óxido nítrico y histamina (Andersen & Montfort 2000). Se han identificado proteínas de la familia D7, con propiedades de unión a histamina también en *Anopheles gambiae* y *Aedes aegypti* (Calvo et al. 2006).

Las citoquinas (IL) responsables de la migración celular en los tejidos son también bloqueadas por componentes de la saliva de estos parásitos. La actividad de IL8 es bloqueada por extractos salivales de *Dermacentor reticulatus*, *Amblyomma variegatum* y *Ixodes ricinus* (Hajnická et al. 2001; Kocáková et al. 2003). La actividad quimiotáctica de RANTES, eotaxin, MCP-1, MIP-1 α es bloqueada por la saliva de *Dermacentor reticulatus*, *Amblyomma variegatum*, y *Ixodes ricinus* (Hajnická et al. 2005). En el cDNA de *Amblyomma americanum* fue identificado un homólogo del factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), (Jaworski et al. 2001). Finalmente, se describió que los neutrófilos reducen su migración frente a la presencia de una cisteína proteasa llamada Sialostatin L identificada en la saliva de *I. scapularis* (Kotsyfakis et al. 2006).

La respuesta inmune innata es posteriormente fortalecida por una respuesta humoral y celular diseñada específicamente contra el agente agresor. Esta respuesta, conocida como respuesta inmune adaptativa, tiene como brazos efectores a los linfocitos B y T. El tipo y la calidad de esta respuesta dependen principalmente de la información recibida en los procesos de presentación de antígenos y en la capacidad de proliferación celular.

En la saliva de *Rhipicephalus microplus* y *Ixodes scapularis* se han identificado prostaglandinas E₂ (PGE₂) con propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras (Higgs et al. 1976; Ribeiro et al. 1985). Se ha demostrado que PGE₂ de *Ixodes scapularis* inhibe la maduración de las células dendríticas y por ende la capacidad de inducción de la proliferación de los linfocitos T específicos (Sá-Nunes et al. 2007). La prostaglandina PG_I₂ o prostaciclina que fue aislada de la saliva en una variedad de garrapatas (Ribeiro et al. 1988; Aljamali et al. 2002), es capaz de disminuir la secreción de citoquinas proinflamatorias e incrementar la producción de IL10 generando un efecto inmunosupresor sobre los linfocitos T (Zhou et al. 2007).

Los anticuerpos también pueden contribuir al control de parásitos, ya sea, neutralizando antígenos, promoviendo la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o activando el sistema complemento. Un hecho interesante es que esta actividad se puede continuar en el parásito hematófago, una vez que éste ingirió los anticuerpos contenidos en la sangre del hospedador. A diferencia de los sistemas digestivos de vertebrados, los parásitos hematófagos permiten el pasaje de muchos de los componentes del alimento directamente a su hemolinfa sin ser previamente degradados. Se ha descrito que las inmunoglobulinas ingeridas por parásitos hematófagos alcanzan la hemolinfa y pueden mantener sus propiedades inmunológicas (Fujisaki et al. 1984). Kerlin & Allingham (1992) detectaron IgG bovina en la hemolinfa de las moscas de los cuernos en una concentración que oscilaba entre 2,1 y 7,3 $\mu\text{g/mL}$. La presencia de IgG también ha sido descrita en

pulgas (*Ctenocephalides felis*) (Vaughan et al. 1998), en mosquitos (*Anopheles stephensi*; *Anopheles gambiae*) y en garrapatas (Chinzei & Minoura 1987).

Estudios realizados por Valenzuela (2002) demostraron la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos salivales en la saliva de *Ixodes scapularis*, *A. americanum* y *A. maculatum*, sugiriendo que esas proteínas atravesaron el aparato digestivo y migraron hacia las glándulas salivales.

Se ha demostrado que esta respuesta humoral puede tener efectos deletéreos sobre los parásitos. Bovinos inmunizados con antígenos de la garrapata *Rhipicephalus microplus* inducen una respuesta al menos parcialmente protectora (Pipano et al. 2003). Esta respuesta se traduce en un menor número de garrapatas grávidas, una menor postura de huevos y/o una menor fertilidad de los mismos (Parizi et al. 2012). Se ha descrito que en respuesta a la vacunación de conejos y terneros contra una proteína salival recombinante de la mosca de los cuernos, estos desarrollan una respuesta que es capaz de reducir la ingesta de sangre de las moscas y su desarrollo ovárico (Cupp et al. 2004).

A consecuencia de sus efectos deletéreos, varias proteínas que tienen afinidad por inmunoglobulinas han sido identificadas en la saliva de Ixodidos. Por ejemplo, en la saliva de *Rhipicephalus appendiculatus* fueron identificadas tres proteínas de unión a IgG denominadas IGBP. Cuando garrapatas hembras fueron alimentadas con sangre conteniendo anticuerpos anti IGBP, estas redujeron su peso corporal (Wang & Nuttall 1999).

4.III.3. *Reseña de componentes salivales identificados en la mosca de los cuernos*

Hasta la fecha, la única molécula caracterizada en la saliva de *H. irritans* es el Thrombostasin (TS) (Zhang et al. 2002). Esta molécula demostró tener actividad anticoagulante al reducir significativamente la actividad amidolítica de la trombina. Cupp et al. (2004) desarrollaron una vacuna experimental a partir de la producción de TS recombinante. Cuando conejos y terneros fueron inmunizados con dicha proteína recombinante, desarrollaron una respuesta de anticuerpos que fue capaz de reducir la toma de alimento de las moscas alimentadas con dicha sangre.

A partir de una genoteca de ADNc de glándula salival, nuestro grupo identificó varios transcritos que codifican para proteínas potencialmente secretadas, entre las que podrían encontrarse nuevas sialogeninas y en cuya caracterización estamos trabajando. Entre las proteínas identificadas, se encuentra un polipéptido de 15,6 kDa que denominamos Hematobina, con una similitud del 43% con una proteína de la saliva de *S. calcitrans* (gi/63148848 en Genbank, Wang et al. 2009), que pertenece a la familia HYP16, identificada en mosquitos (Valenzuela et al. 2002; Arcà et al. 2007) y vinchucas (Andersen et al. 2005). Estructuralmente, estas moléculas se relacionan con las lipocalinas y se ha propuesto que participarían en el secuestro de agonistas de la inflamación, por ejemplo óxido nítrico e histamina (Wang et al. 2009).

5. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

Para innovar en estrategias de control de la mosca de los cuernos es necesario generar información respecto de la interacción parásito-hospedador, siendo para ello necesario contar con modelos experimentales que permitan trabajar con la mosca de los cuernos y sus hospedadores en condiciones de laboratorio y de campo.

Las líneas salvajes de la mosca de los cuernos son muy difíciles de mantener en condiciones de laboratorio (Okine 1991). Hasta donde tenemos conocimiento, solo el laboratorio de USDA (Kerville, Texas, USA) ha mantenido una línea de moscas totalmente en cautiverio (Schmidt et al. 1967). Sin embargo, esas moscas presentan diferencias genéticas en relación a las líneas de campo (Guerrero & Kunz 2000), por lo que no serían de primera elección para realizar estudios de la interacción parásito hospedador. Para el cumplimiento del presente proyecto nos planteamos obtener insectos adultos en el laboratorio. La producción de moscas sin componentes del hospedador permite aislar moléculas de insectos sin riesgo de contaminación con componentes sanguíneos del hospedador. Por otra parte, disponer de insectos de edad conocida permite diseñar ensayos de viabilidad y desarrollo parasitario que no es posible en condiciones de campo. Finalmente, cultivando moscas en el laboratorio es posible diferir la estacionalidad de la oferta de moscas del campo y tener insectos en el laboratorio por más tiempo.

El estudio de la interacción parásito hospedador en condiciones de campo requiere del diseño de un modelo experimental, cuya complejidad está determinada por los efectos del medio ambiente tanto en el hospedador como sobre el parásito, es decir, el efecto asociado a las características propias de cada hospedador y al comportamiento alimenticio de la mosca. Por ejemplo, como describimos anteriormente, existe información contradictoria respecto a la distribución uni o bimodal en la oferta de moscas a lo largo de la estación cálida en la región (Guglielmone et al. 2002b; Castro et al. 2008;). Esto puede deberse, a diferencias en los factores abióticos, al uso de diferentes biotipos animales en los respectivos ensayos, a diferentes frecuencias de observación y/o a las metodologías de determinación de las cargas de moscas. Por lo tanto se debe desarrollar una metodología de determinación del número de moscas precisa, con una frecuencia adecuada de observaciones, utilizando animales con características fenotípicas definidas.

Algunos autores han comprobado que factores fenotípicos en rodeos de bovinos como por ejemplo el color del pelo, afectan la carga parasitaria de los animales (Franks 1963), sin embargo, otros no pudieron reproducir esa información (Guglielmone et al. 2002b). Para el desarrollo de modelos de evaluación *in vivo*, los factores fenotípicos como color, peso, sexo deben ser evaluados simultáneamente y considerar su influencia en el análisis de resultados experimentales. Uno de los objetivos del presente proyecto es entender las bases de este fenómeno de preferencia de las moscas por

determinados fenotipos bovinos, tomando la carga de las moscas y la capacidad de ingesta de las mismas como variables de respuesta. Se incluyeron aspectos inherentes a la barrera física que pueden limitar el acceso al alimento para la moscas en los ensayos experimentales. Esta información nos permitirá diseñar modelos experimentales más controlados, que permitan a futuro evaluar la potencia de métodos alternativos de control. Por otro lado, en la actualidad, la principal herramienta utilizada para controlar la mosca de los cuernos son los insecticidas, pero la generación de resistencia a estos productos ha sido reportada en varios países (Oyarzun et al. 2008). Este problema ha llevado a investigar sobre métodos de control alternativos amigables con el medio ambiente como las vacunas anti-parásitos hematófagos. Un producto de estas características sería fácil de administrar, específico de especie y amigable con el medio ambiente (Kay & Kemp 1994). La utilización de moléculas presentes en la saliva de *Haematobia* como candidatos a inmunógenos ha sido descrita. La inmunización de conejos y terneros con Thombostasin ha demostrado afectar el consumo de sangre de las moscas en ensayos de laboratorio (Cupp et al. 2010). Poco se sabe sobre el rol de la respuesta adaptativa del hospedador contra los componentes de la saliva. Si bien se ha descrito que el bovino es capaz de generar una respuesta inmune (Kerlin & Allingham 1992; Baron & Lysyk 1995), no se ha podido definir esa respuesta en términos de su perfil inmunológico y su importancia con las variaciones estacionales de la carga parasitaria. Recientemente, a partir de la construcción de una genoteca de glándula salival, nuestro grupo de trabajo ha secuenciado moléculas, que son secretadas por dicha glándula (datos aún no publicados). La identificación de nuevos antígenos en la saliva de la mosca de los cuernos, permite aportar información respecto al perfil de la respuesta inmune del huésped y su relación con la fluctuación de las cargas parasitarias reportadas en la comunidad científica internacional (Guglielmone et al. 2002b; Lima et al. 2002).

En suma, el diseño del proyecto apuntó a incrementar las bases de conocimiento sobre un parásito que afecta la producción agropecuaria de nuestra región. A partir del conocimiento ya existente se planteó, en primera instancia el montaje de una plataforma de producción de distintos estadios parasitarios y en segunda instancia la creación de modelos experimentales a campo para la evaluación la interacción parásito-hospedador. Esta construcción experimental, permitirá incorporar nuevos conocimientos sobre la biología del parásito y su interacción con el hospedador.

6. HIPOTESIS

El acceso al alimento para la mosca de los cuernos es un factor que condiciona la elección de su hospedador y el desarrollo de sus poblaciones en el rodeo. Para sostener dicha hipótesis nos planteamos que las cargas parasitarias diferenciales asociadas a caracteres fenotípicos inherentes al hospedador (color, sexo y peso) están vinculadas a la barrera física para la obtención del alimento por parte de las moscas (grosor de epidermis) y a la cantidad de sangre presente en el aparato digestivo de las mismas.

Por otro lado, hipotetizamos que el bovino desarrolla una respuesta inmune adaptativa contra componentes de la saliva de la mosca de los cuernos que es capaz, al menos en parte, de regular negativamente la toma de alimento y la carga parasitaria.

7. OBJETIVOS

Objetivo General

Contribuir a la comprensión de la interacción de la mosca de los cuernos con el hospedador.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar un método eficiente de cultivos *in vitro* de larvas y adultos de *Haematobia irritans*.
2. Determinar la relación entre la carga parasitaria y capacidad de ingesta de las moscas que parasitan bovinos con diferentes caracteres fenotípicos (color de pelaje, sexo y peso vivo).
3. Preparar un antisuero contra una forma recombinante de una proteína (Hematobina, HTAr) deducida de uno de los ADNc identificados en el transcriptoma de la glándula salival de la mosca de los cuernos. Diseñar un enzimoimmunoensayo (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos contra HTAr en el suero de bovinos.
4. Estudiar la evolución de la carga parasitaria, el consumo de hemoglobina de las moscas y el perfil de la respuesta de anticuerpos anti HTAr en bovinos naturalmente parasitados durante la estación estival.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

Los ensayos con animales fueron realizados en el Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Canelones, Uruguay (34°38'S, 55° 55'W). Todos los protocolos que utilizaron animales vertebrados fueron previamente aprobados por Comisión de ética en el uso de animales de experimentación (exp. 071140-000611-10). Los trabajos de campo del presente trabajo se realizaron entre noviembre 2010 y julio de 2011.

8.1. *Objetivo específico 1: Desarrollar un método eficiente de cultivos in vitro de larvas y adultos de Haematobia irritans*

El cultivo de larvas y adultos se realizó a partir de la adaptación de los procedimientos descritos previamente en la literatura (Schmidt 1967; Okine 1991). Se capturaron insectos adultos a partir de bovinos naturalmente parasitados utilizando redes entomológicas (Figura 4A₁). Luego fueron colocados en jaulas de transporte (cajas de 20 cm de lado cubiertas de malla plástica), donde se mantuvieron hidratados a través de una toalla de algodón embebida en solución de glucosa al 10%. En el laboratorio, el lote de moscas fue anestesiado en una campana con una atmósfera de CO₂ por 15 min para luego ser distribuidas en jaulas para la inducción de la ovoposición. Las jaulas fueron colocadas por 48 horas sobre un medio de cultivo de moscas (Figura 4A₃). El medio de cultivo sembrado con huevos de moscas, fue mantenido en una sala aislada de insectos, acondicionada térmicamente a 25± 2°C por una semana. Al día 7, las pupas fueron retiradas del medio. Para ello, se agregó agua al medio de cultivo (cuyo aspecto al día 7 fue de una masa semiseca) y con la ayuda de las manos se disgregó el material, permitiendo la liberación de las pupas atrapadas en el medio. Las pupas liberadas tienen la capacidad de flotar en el agua, por lo que fue posible identificarlas y cosecharlas con una espátula. Posteriormente, las pupas cosechadas fueron lavadas con agua destilada y secadas con papel absorbente (Figura 4C_{1,2,3}). Las pupas obtenidas, fueron colocadas para su eclosión en jaulas, sobre un algodón levemente humedecido con agua destilada. Entre las 60 - 72 horas fueron obtenidas las moscas adultas.

Los medios de cultivo de moscas testeados fueron dos: a) heces bovinas frescas, obtenidas inmediatamente luego de su deposición y b) una mezcla de heces frescas (obtenidas de igual manera), cáscara de arroz, alfalfa seca molida y agua destilada (proporciones 1000g, 100g, 100g y 200 mL respectivamente). Ambos medios se colocaron en bandejas de plástico de 40 cm de largo por 20 cm de ancho y 20 cm de altura.



Figura 4. Procedimiento de obtención de diferentes estadios parasitarios de la mosca de los cuernos. *Bloque A.* Captura de insectos adultos y siembra de huevos. *A1* Captura de moscas de bovinos parasitados, *A2* Preparación de medio de cultivo de larvas, *A3* Colocación de jaulas con insectos para la siembra de huevos. *Bloque B.* Cultivo de larvas y producción de pupas, *B1* inspección de la presencia de larvas a las 96 hs, *B2* y *B3* Larvas de 96 hs de cultivo. *Bloque C.* Cosecha de pupas, *C1* Disgregación del medio y cosecha de pupas por flotación, *C2* y *C3* Lavado y secado de pupas para su almacenamiento o eclosión.

Por otra parte se testeó la sobrevivencia de las pupas a 4°C, como una forma alternativa de almacenamiento de insectos. Para ello 300 pupas fueron almacenadas el día 0 a 4°C. A los días 0, 7, 12, 21, 26 y 40 post almacenamiento, se tomaron 50 pupas al azar y se incubaron en estufa a 25°C por 72 hs. Al término de la incubación se contabilizó el número de moscas adultas obtenidas y se determinó el porcentaje de eclosión del lote de pupas a distintos tiempos de incubación a 4°C.

8.II. *Objetivo específico 2: Determinar la relación entre la carga parasitaria y capacidad de ingesta de las moscas que parasitan bovinos con diferentes caracteres fenotipos (color de pelaje, sexo y peso vivo).*

Para cumplir con este objetivo, se realizó un trabajo experimental que denominaremos diseño experimental 1.

Diseño experimental 1

Se seleccionaron 30 bovinos de biotipo carnícer, cruza de las razas Hereford, Aberdeen Angus y Limousin. El grupo de los animales tenía entre 24 y 36 meses de edad y el peso de los mismos estuvo entre 243 y 428 kg. Los animales fueron clasificados según su sexo y color de manto en machos de color oscuro (n= 8); machos de color claro (n=10); hembras de color oscuro (n=4) y hembras de color claro (n=8). El conteo de moscas en el grupo de bovinos se realizó en base a una modificación de lo descrito por Lima et al. (2002). Se hicieron 4 observaciones, separadas de una semana entre noviembre y diciembre de 2010. El registro se realizó entre las 7.00 y 10.30 horas, a través de la toma de tres fotos digitales consecutivas de la región dorso lateral de los bovinos desde la cabeza a la base de la cola. El análisis de las imágenes para obtener el número final de moscas se realizó utilizando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.).

Determinación del contenido de hemoglobina de las moscas

Inmediatamente después de tomadas las fotos para el registro de carga parasitaria, una porción de moscas presentes en el animal fueron capturadas usando redes entomológicas, e inmediatamente colocadas a 4°C, hasta su llegada al laboratorio. A partir del lote de moscas obtenidas de cada bovino se tomaron 45 moscas al azar para la determinación del contenido de hemoglobina modificando la metodología descrita por Cupp et al. (2004). El grupo de 45 moscas, fue dividido en grupos de 10, 15 y 20 moscas colocándolas en tubos de vidrio de 10 mL. Las moscas fueron homogeneizadas vigorosamente utilizando una varilla de vidrio. Luego se agregó a cada tubo 2 mL de reactivo de trabajo del kit de hemoglobina (Biosystem S.A, Barcelona, España), se agitó y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. La suspensión fue luego centrifugada a 2500 g por 5 minutos. Finalmente la absorbancia del sobrenadante fue medida a 540 nm (Multiscan Thermo, China). La correlación de la concentración de hemoglobina y absorbancia fue realizada utilizando una solución estándar de hemoglobina (Wiener, Santa Fe, Rosario, Argentina). Como blanco se utilizaron moscas cultivadas *in vitro* alimentadas con una solución de glucosa al 10%. Con esta metodología pudimos obtener de cada lote de 45 moscas tres valores de hemoglobina que luego fueron corregidos por el número de moscas por grupo. Las determinaciones con un coeficiente de variación superior al 15% fueron repetidas.

Determinación del espesor de epitelio de bovinos

Se obtuvo una biopsia de piel de un subgrupo de 12 bovinos (6 machos y 6 hembras; 5 de manto negro y 7 de manto claro) pertenecientes al grupo anteriormente descrito. Todas las muestras fueron tomadas del lado izquierdo de la región dorsal del tórax (área donde normalmente se concentran la mayor cantidad de moscas). Para efectuar la cirugía, la región seleccionada de 10 cm² fue previamente afeitada, para luego realizar una anestesia regional con lidocaína al 2%. Luego se realizó la extracción de una muestra rectangular de 2 cm por 1 cm, por 0,5 cm de profundidad. Estas muestras fueron inmediatamente fijadas en formol al 4%, para su posterior procesamiento histológico. Las biopsias fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes histológicos de 7 µm de espesor. Para el análisis histológico las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina. De cada corte obtenido, se tomaron 20 fotos a 40 aumentos, y en cada foto se realizaron 5 determinaciones. El grosor de epitelio fue estimado utilizando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.).

Análisis estadístico

La carga de moscas y la concentración de hemoglobina fueron analizadas utilizando un modelo estadístico que incluyó los efectos del sexo (machos y hembras); el color del manto (claros y oscuros), las observaciones y sus interacciones como efectos fijos (Mixed procedure, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El peso fue incluido como covariable. El grosor del epitelio fue analizado por un procedimiento similar utilizando el sexo y color de manto y sus interacciones como efectos fijos y peso como covariable. Las medias fueron consideradas diferentes cuando $P < 0,05$, y $P < 0,1$ fue considerada una tendencia.

8.III. Objetivo específico 3: Preparar un antisuero contra una forma recombinante de una proteína (Hematobina, HTAr) deducida de uno de los ADNc identificados en el transcriptoma de la glándula salival de la mosca de los cuernos. Diseñar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos contra HTAr en el suero de bovinos.

Expresión y purificación de Hematobina recombinante

La secuencia codificante para la Hematobina madura (sin el péptido señal) se clonó en un vector de expresión de la serie pQE (pQE-30, QUIAGEN) utilizando protocolos convencionales. En este sistema, la recombinante se obtiene fusionada a una extensión N-terminal de poli-histidina que facilita su purificación. Se cultivaron células *E.coli* M15 transformadas con los plásmidos recombinantes en caldo LB (Amresco, USA) con 50µg/ml de ampicilina. Los cultivos fueron inducidos con 0.1mM de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma) por 2 horas a 37°C. La purificación se realizó utilizando una matriz de Niquel-NTA-agarosa (Ni-NTA, QUIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas fueron dializadas contra buffer fosfato salino (PBS), y su concentración final determinada por absorbancia a 280 nm. Para visualizar la eficiencia de la purificación se realizó un SDS-Page 15%.

Evaluación de la similitud antigénica entre Hematobina nativa y recombinante

Se evaluó la similitud antigénica entre las Hematobinas recombinante (HTAr) y nativa, es decir, presente en un extracto soluble de glándula salival. Para ello, se produjeron 2 antisueros en conejo: anti HTAr y anti glándula salival que luego fueron enfrentados a los mismos antígenos, (HTAr y extracto soluble de glándula salival) por inmunoblott.

A) Producción de antisueros

Para la producción de suero anti HTAr se inoculó (día 0) un conejo de 12 semanas de edad con 100 µg de la preparación de HTAr eluida de la matriz de Ni-NTA diluida en 500 µl de PBS (10 mM, pH 7.4, 0.15 M NaCl) y emulsionada 1:1 con adyuvante completo de Freund (Sigma) por vía intradérmica. Se realizaron otras dos inoculaciones de 100 µg de proteína en PBS y emulsionada 1:1 con adyuvante incompleto de Freund, por vía intramuscular, separadas 20 días. Al conejo se le extrajo 20 ml sangre de la vena central de la oreja el día 0 y 15 días posteriores a la última inoculación. La misma se centrifugó a 2500 g por 5 minutos, y el suero se guardó a -20°C hasta su utilización.

Para la producción de suero anti glándula salival, se disecaron moscas bajo lupa estereoscópica y se obtuvieron 50 pares de glándulas salivales. Las glándulas fueron colocadas en una solución de PBS, se lisaron por ultrasonido y se centrifugaron 5000g por 10 minutos. Al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración total de proteínas por el método de Bradford (BioRad). La inmunización del conejo con el extracto, se realizó con 200 µg de proteína por inoculación, utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

B) Inmunoblott con los sueros anti HTAr y anti glándula salival.

Se separaron HTAr y un extracto de glándula salival por SDS-PAGE y los geles se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad, Hercules, CA) siguiendo procedimientos estándar. Las membranas fueron bloqueadas en PBS-Soja al 1% por 1 hr a 37°C. Luego fueron incubadas 1hr a 37°C con suero anti HTAr o anti glándula salival diluído 1/1000 en PBS.ST 0,05%, utilizando los sueros de conejo preinmunes como controles de los respectivos antisueros. Luego de lavados con PBS-Tween 0,05%; los anticuerpos unidos fueron detectados utilizando una dilución 1/10000 de anti IgG de conejo hecho en cabra conjugado a peroxidasa (Sigma) y el sustrato DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (Sigma).

Desarrollo de un test de ELISA para la determinación en bovinos de anticuerpos anti HTAr.

El desarrollo de un ensayo de ELISA para la determinación de la respuesta de anticuerpos específicos en bovinos contra dichas proteínas, implicó determinar entre otras cosas la concentración óptima de sensibilización con

HTAr, preparar controles positivos y negativos y determinar el rango de diluciones de los sueros adecuadas. Se tomó como punto de partida, el purificado de proteína recombinante y el suero hiperinmune anti HTAr hecho en conejo.

- a) Concentración óptima de sensibilización del ELISA. Las placas Greiner bio-one (Germany) fueron sensibilizadas con 100µL/pozo de soluciones de proteína recombinante conteniendo 1, 2,5 y 5 µg/mL en PBS. Luego del bloqueo con solución de PBS-Soja al 5% (PBS-S), fueron incubadas con diferentes concentraciones (500, 250 y 125 Unidades) de suero anti HTAr (título arbitrario). Cada muestra se procesó por duplicado. El revelado se realizó con un anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma) y TMB (Sigma).
- b) Selección de controles positivos y negativos. Para la selección del control positivo y del control negativo del test de ELISA, se realizó un screening primario por ELISA de los sueros de bovinos naturalmente expuestos a las moscas y de sueros de terneros nacidos en invierno que no fueron previamente expuestos a dichos insectos.
- c) Determinación del rango de linealidad del control positivo y de las diluciones de trabajo de los sueros problemas. En las placas de ELISA previamente sensibilizadas con 1µg/mL de proteína, los controles fueron agregados en diluciones al medio entre 1/500 a 1/64000 (entre 500 y 8 Unidades antiHTAr/pozo) y la unión antígeno anticuerpo fue revelada utilizando anti IgG de bovino conjugada a peroxidasa y TMB (Sigma).

8.IV. Objetivo específico 4: Estudiar la evolución de la carga parasitaria, el consumo de hemoglobina de las moscas y el perfil de la respuesta de anticuerpos anti HTAr en bovinos naturalmente parasitados durante la estación estival.

Para el desarrollo del presente objetivo específico se desarrolló un trabajo experimental que denominamos diseño experimental 2.

Diseño experimental 2

A partir de 15 bovinos cruzas de Hereford, Aberdeen Angus y Limousin, (9 machos y 6 hembras; 6 negros y 9 de pelo claro) pertenecientes al rodeo del Campo Experimental de Facultad de Medicina, Uruguay; se analizó la carga parasitaria, la concentración de hemoglobina por mosca y el título de anticuerpos anti HTAr, en el período comprendido entre el 15 de diciembre de 2010 y julio de 2011. Los procedimientos se realizaron siguiendo los protocolos realizados en el experimento 1. El comportamiento de estas variables se analizó en función del sexo, color y peso del animal.

Entre el 15/12/2010 y el 16/3/2011, una vez por semana entre las 7.30 y 10.00 am, se registró la carga parasitaria de todos los bovinos y se capturaron moscas de cada animal. Por otra parte, tanto al inicio del ensayo (semana 0), como en las semanas 3, 6, 8, los bovinos fueron sangrados de

la vena coccígea para determinación del título de anticuerpos. A fines del mes de mayo y julio de 2011 se realizó una toma adicional de sangre para la determinación de anticuerpos en ausencia de moscas.

Evaluación de títulos de anticuerpos contra HTAr de bovinos naturalmente parasitados

La determinación de los anticuerpos específicos en bovinos contra HTAr, se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con 1µg/mL de HTAr en PBS (0,01M, pH 7,4 a 4°C toda la noche. Luego de retirar la HTAr no adherida a la placa, se agregó una solución de PBS-S como bloqueante y se incubó a 37°C por 45 minutos. Los sueros bovinos y los controles (positivos y negativos) fueron diluidos en PBS-S conteniendo 0,05% Tween 20 (PBS-ST). Luego fueron incubados por 45 minutos a 37°C y la placa lavada 3 veces con PBS conteniendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Las inmunoglobulinas bovinas unidas a HTAr fueron detectadas utilizando anti IgG bovina conjugada a peroxidasa (Sigma, St Louis, MO) a una dilución 1/10000 en PBS-ST, la cual se incubó por 45 minutos a 37°C. Luego de tres nuevos lavados con PBS-T, se agregó el sustrato TMB (100µL/pozo; Sigma St Louis, MO) y H₂O₂. La reacción colorimétrica se detuvo con una solución 50µL/pozo de H₂SO₄ (0,5M). La densidad óptica en estas condiciones fue medida a 450 nm en un lector de ELISA (Multiskan EX, Thermo, China).

Análisis estadístico

La carga de moscas, la concentración de hemoglobina y los títulos anti HTAr fueron analizados utilizando un modelo estadístico que incluyó los efectos del sexo (machos y hembras); el color del manto (claros y oscuros), las observaciones y sus interacciones como efectos fijos (Mixed procedure, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El peso y los títulos de anticuerpos anti HTAr al inicio del ensayo fueron incluidos como covariables. Para la evolución de los títulos anti HTAr se analizó también sin ajustar por los títulos al inicio del ensayo. Las medias fueron consideradas diferentes cuando P<0,05, y P<0,1 fue considerada una tendencia.

9. RESULTADOS

9.1. Objetivo específico 1: Desarrollar un método eficiente de cultivos in vitro de larvas y adultos de Haematobia irritans

Se desarrolló en el presente trabajo una metodología que permite obtener a partir de moscas de los cuernos capturadas en el campo, los distintos estadios larvarios del parásito e insectos adultos (Figura 4). A su vez, los insectos adultos obtenidos pueden ser mantenidos en el laboratorio al

menos por 7 días si son alimentados con una solución de glucosa al 10% o con sangre bovina anti coagulada con citrato de sodio.

La eficiencia del cultivo de los huevos, sobre heces bovinas frescas colocadas en bandejas plásticas, se incrementó en más de 10 veces cuando colocamos la misma cantidad de huevos de moscas en el medio de cultivo diseñado en el laboratorio (30 ± 20 pupas/kg de heces bovinas vs 450 ± 150 pupas/kg de medio).

Cuando estudiamos si era posible conservar las pupas de moscas viables a 4°C , los resultados señalaron que al día 0, el 95% de las pupas eclosionaron en insectos adultos, sin embargo la viabilidad de las pupas fue decayendo conforme pasaron los días de almacenamiento, no obteniendo moscas viables, cuando las moscas fueron mantenidas por 40 días en dichas condiciones (Figura 5).

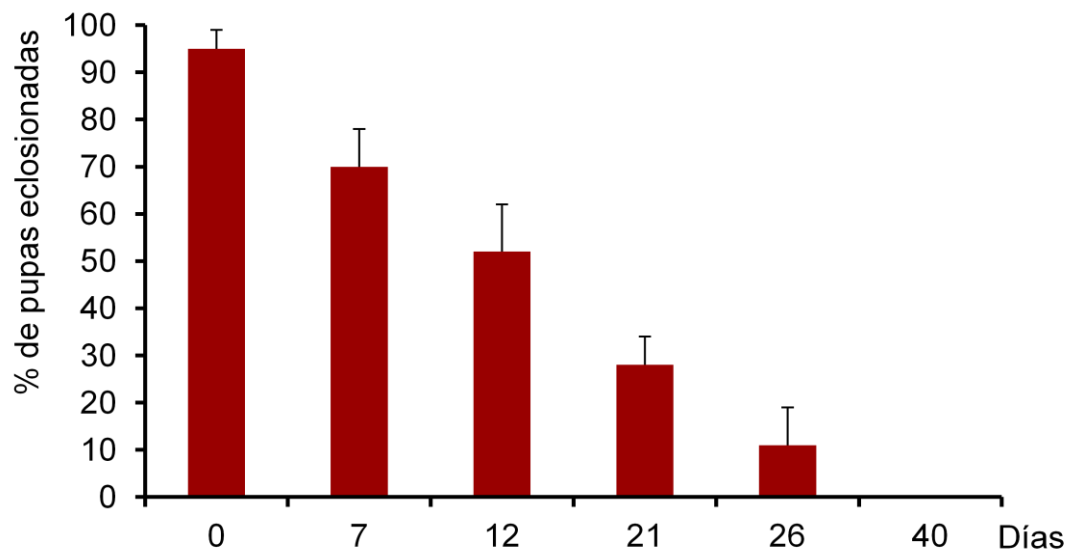


Figura 5. Determinación de la viabilidad de pupas a diferentes tiempos de almacenamiento a 4°C .

9.II. *Objetivo específico 2: Experimento 1. Determinar la relación entre la carga parasitaria y capacidad de ingesta de las moscas que parasitan bovinos con diferentes caracteres fenotipos (color de pelaje, sexo y peso vivo).*

Evaluación de la carga parasitaria

La distribución de las moscas en el rodeo no fue homogénea, 43.4 % de las observaciones presentaron cargas por debajo de las 200 moscas por animal,

40.1% presentaron cargas entre 200 y 600 moscas y el 16.5 % mayores a 600 moscas (Tabla 1).

Número de moscas/animal	N° de observaciones	Porcentaje
0 – 99	29	24.2
100 – 199	23	19.2
200 – 299	21	17.5
300 – 399	8	6.7
400 – 499	11	9.2
500 – 599	8	6.7
600 – 699	3	2.5
700 – 799	7	5.8
800 – 899	3	2.5
>900	7	5.7

Tabla 1. Distribución de moscas en el rodeo. Número de moscas/animal presentes en las observaciones realizadas durante el estudio y descripción del porcentaje observaciones con las diferentes cargas parasitarias.

Se encontró un efecto significativo del color de manto, ($P < 0.0001$) y semana de observación en el número de moscas ($P < 0.0001$), pero el sexo no tuvo efecto. La covariable peso afectó el número de moscas ($P < 0.0001$).

El fenotipo oscuro presentó mayor número de moscas (432 ± 34 moscas por animal) que los claros (255 ± 27 moscas por animal) ($P < 0.0001$; Figura 6A). Los números de moscas en machos (368 ± 27) fueron similares que en las hembras (319 ± 34), $P = 0.26$ (Figura 6B).

El estimador para peso vivo fue de 2.98 (± 0.59) moscas por cada kg de peso vivo, es decir, el menor PV del rodeo fue de 273 kg, y un aumento de 100 kg (373 kg) implicó una carga extra de 298 moscas. La correlación entre peso vivo y carga fue de $r = 0.382$, $n = 119$, $P < 0.0001$ (Figura 7A).

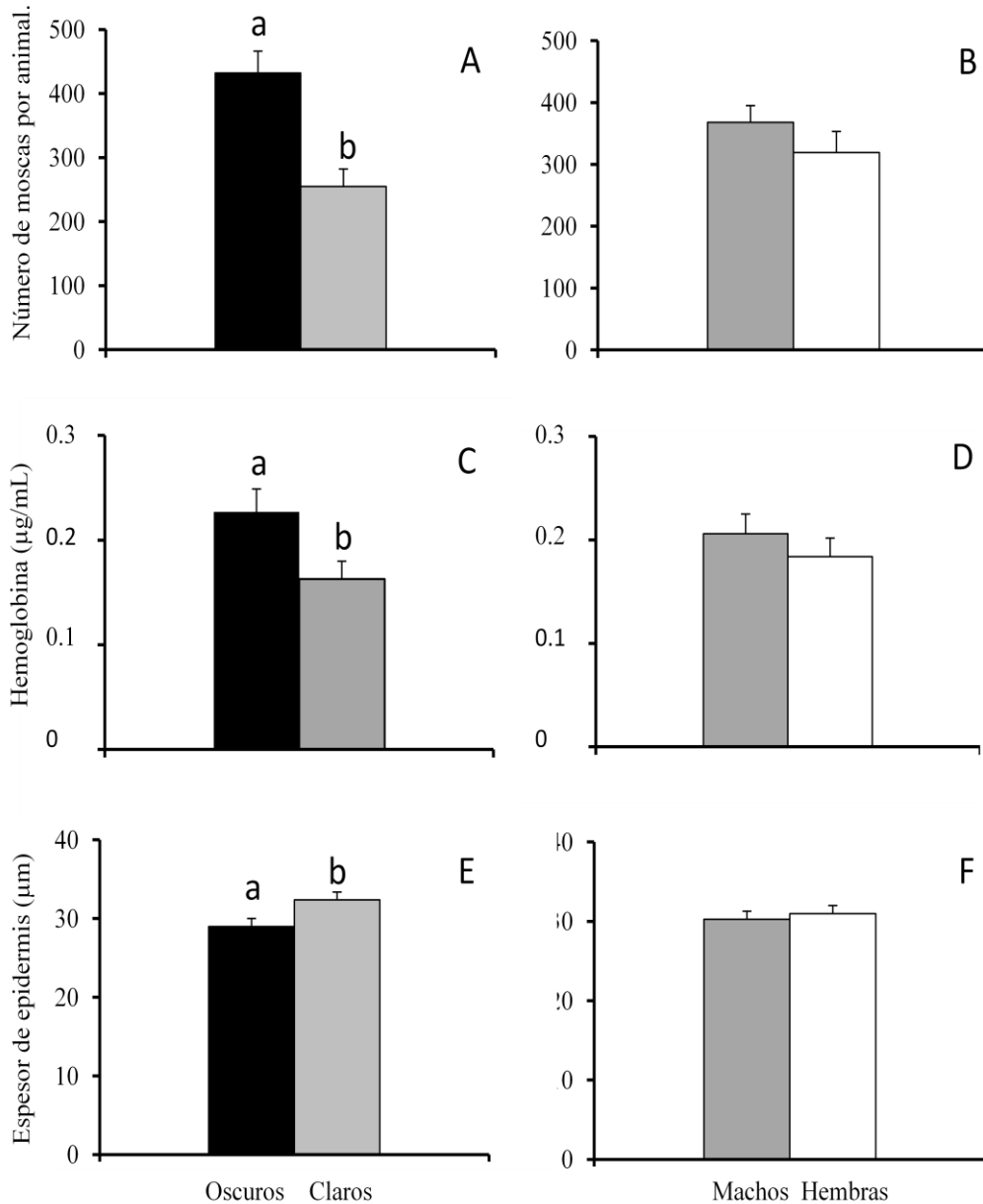


Figura 6. Número de moscas por animal (A, B), hemoglobina / mosca (C, D) y espesor de la epidermis (E, F) de acuerdo a color de manto (A, C, E) y sexo (B, D, F). Letras diferentes dentro del mismo gráfico indican diferencias significativas $P < 0.05$.

Determinación de la concentración de hemoglobina en la mosca de los cuernos

El contenido de hemoglobina en la mosca varió entre 0.18 $\mu\text{g/ml}$ y 0.23 $\mu\text{g/ml}$. La ingesta de sangre por el parásito fue afectada por el fenotipo bovino, ya que parásitos de bovinos oscuros presentaron mayor concentración de hemoglobina que los que parasitaron bovinos claros ($P < 0.0001$, Figura 6C), pero no hubo diferencias acorde al sexo (Figura 6D).

El peso vivo de los animales afectó la cantidad de hemoglobina ($P=0.017$); cada kilogramo de peso vivo implicó una disminución en el contenido de hemoglobina de $0.00143 \mu\text{g/ml}$ (± 0.000586) (Figura 7B).

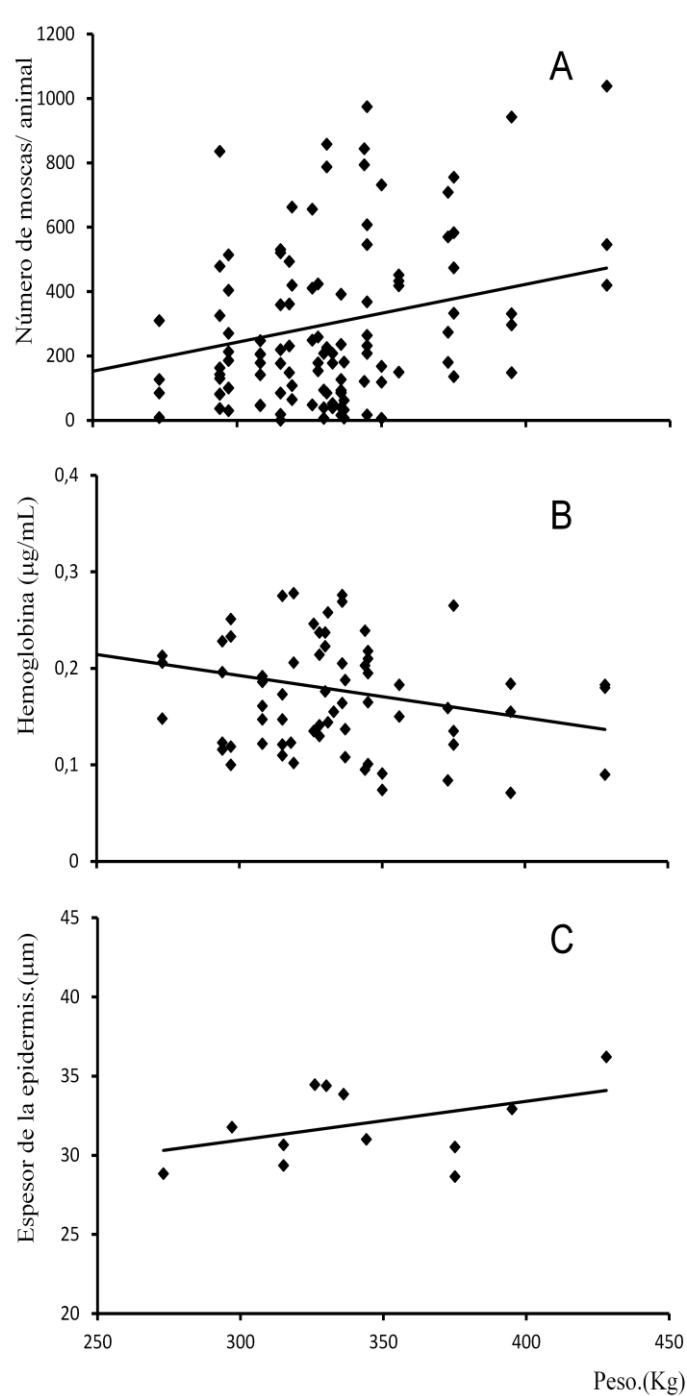


Figura 7. Evolución de las variables (A) carga de moscas/animal; (B) concentración de hemoglobina/mosca y (C) espesor de epitelio en función del peso vivo.

Determinación del espesor de epidermis de los bovinos

La relación entre el tamaño de las probóscides y el epitelio bovino se muestra en la Figura 8. El color del manto afectó el grosor de la epidermis ($P < 0.0001$), mientras que no se encontró un efecto del sexo. Los animales oscuros presentaron un epitelio más fino que los animales claros (Figura 6E, Figura 8C, D, E, F). La covariable de peso vivo fue significativa; el grosor de epitelio fue $0.04558 \mu\text{m} (\pm 0.0056)$ más grueso por kg de peso vivo (Figura 7C).

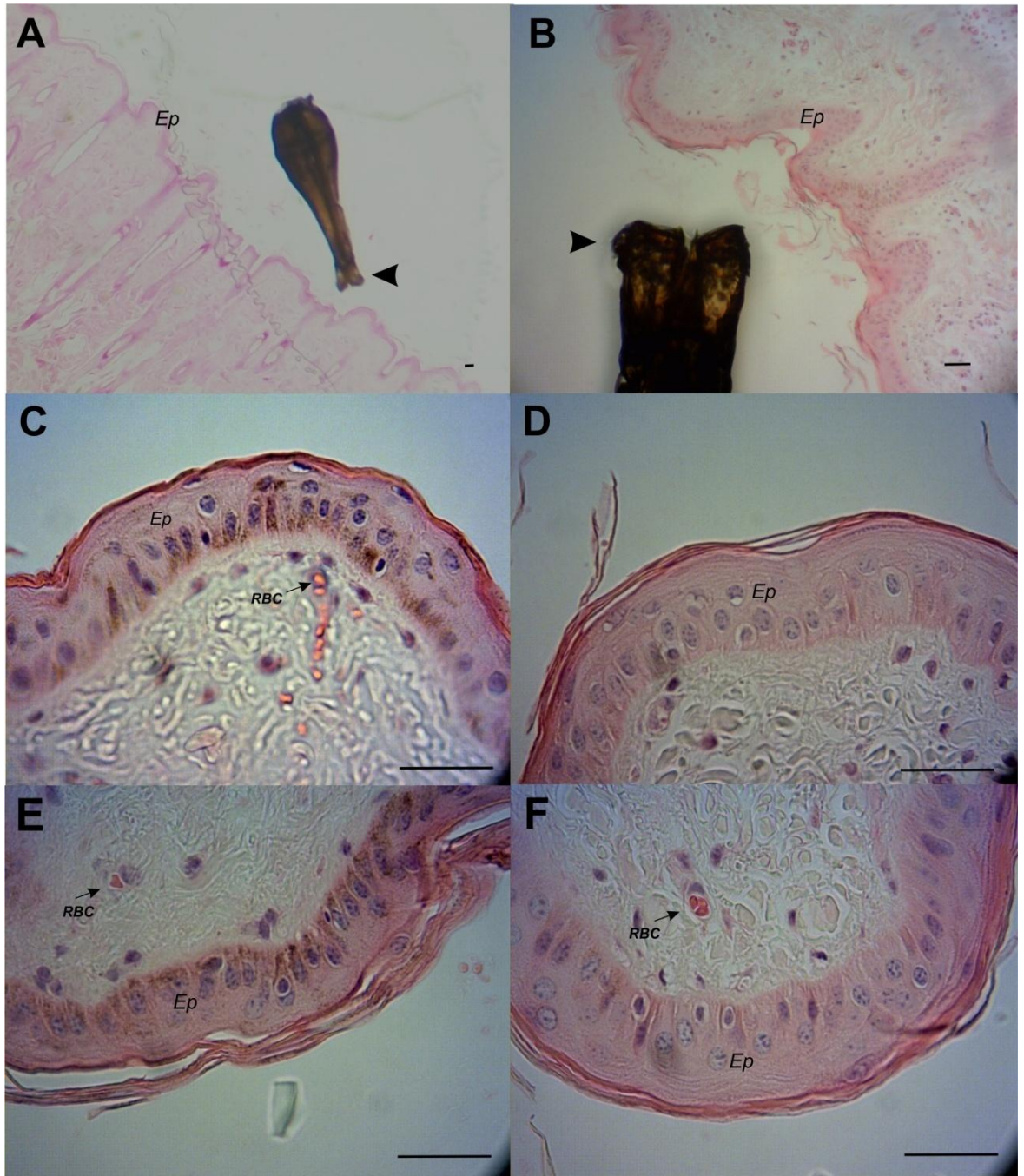


Figura 8. Comparación del tamaño del aparato bucal de *H. irritans* y el espesor de la epidermis del bovino. (A,B). Epidermis de macho de color

oscuro (C), macho de color claro (D), hembra de color oscuro (E) y hembra de color claro (F). Flecha indica el aparato bucal de *H. irritans*; RBC; glóbulos rojos; Ep, epidermis. Barras equivalen a 50 μm .

9.III. *Objetivo específico 3: Preparar un antisuero contra una forma recombinante de una proteína (Hematobina, HTAr) deducida de uno de los ADNc identificados en el transcriptoma de la glándula salival de la mosca de los cuernos. Diseñar un enzimoimmunoensayo (ELISA) para evaluar la presencia de anticuerpos contra HTAr en el suero de bovinos.*

Expresión y purificación de Hematobina recombinante

Fue posible clonar y transformar células bacterianas para la producción de proteínas recombinantes con la secuencia codificante de la Hematobina madura (sin péptido señal). Como se puede observar en la Figura 9, se logró un alto nivel de expresión de la recombinante cuando al cultivo de bacterias transformadas se le agregó IPTG (carriles 3, 4 y 5). A su vez luego de la purificación por afinidad en la columna de Niquel agarosa, se obtuvo una preparación compuesta mayoritariamente por una proteína que migra como una banda de aproximadamente 15 kDa, es decir que posee un tamaño similar al predicho para la HTAr (15,6 kDa).

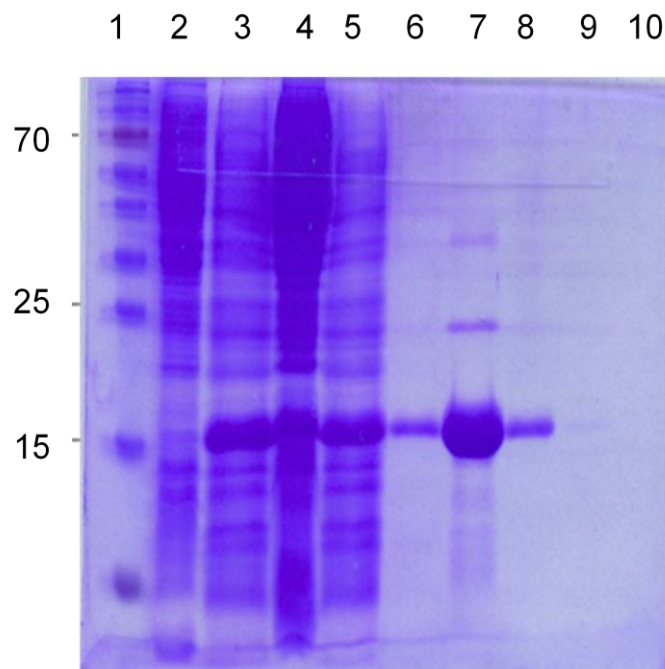


Figura 9. Análisis por SDS-PAGE de la expresión y purificación de Hematobina recombinante. Las muestras se corrieron reducidas en un gel de poliacrilamida 12% que se tiñó con azul de Coomassie. *Carril 1*, marcador de peso molecular (#SM0671, Fermentas); *carril 2*, extracto bacteriano total previo a la inducción; *carril 3*, extracto bacteriano total luego de la inducción; *carril 4*, fracción insoluble del lisado bacteriano; *carril 5*, fracción no retenida en la matriz de afinidad; *carril 6*, lavado; *carriles 7 al 10*, fracciones recogidas al eluir con un tampón de pH 4,5.

Evaluación de la similitud antigénica entre Hematobina nativa y recombinante

Como podía esperarse, el suero anti HTAr reconoció componentes de la preparación de HTAr con la cual fue inmunizado el conejo (Figura 10). Se observó la presencia de dos bandas predominantes de 15 y 30 KDa. El peso molecular predicho para HTA fue de 15 KDa, por lo cual la presencia de la banda de 30 kDa podría deberse a que se hubieran formado agregados de la proteína que no se haya separado durante la preparación de la muestra. (Figura 10 carril 2). Las bandas de menor intensidad, corresponden a componentes de *E. coli* presentes en la preparación. Cabe mencionar que el suero anti glándula salival también reconoció las bandas de 15 y 30 KDa presentes en la preparación de HTAr (Figura 10 carril 4), esto indica que la proteína nativa y la recombinante son antigénicamente similares. Finalmente, el suero anti HTAr reconoció una única banda de peso molecular similar al esperado para HTA en el extracto soluble de glándula salival que correspondería a la proteína nativa presente en dicho extracto. (Figura 10 carril 6).

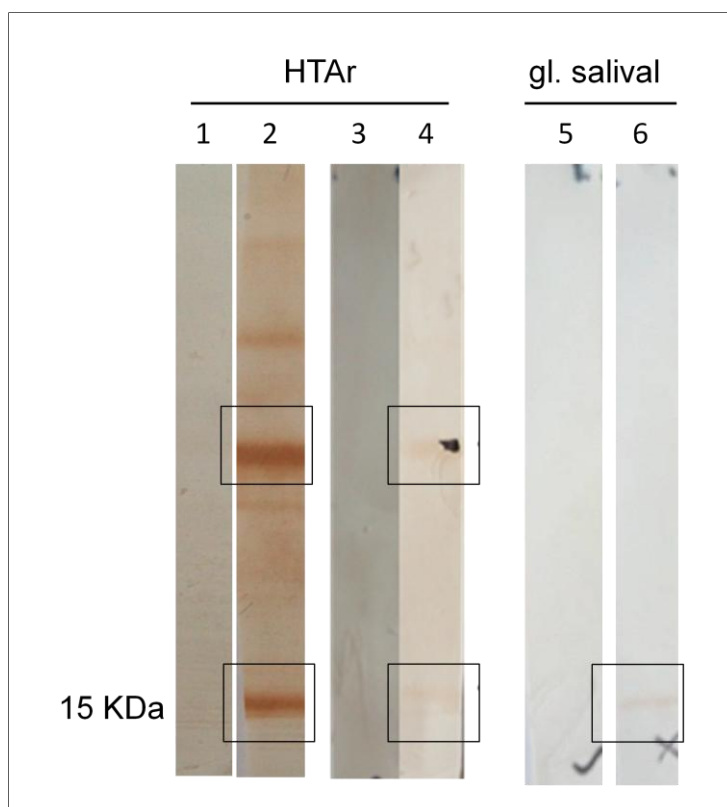


Figura 10. Análisis de Hematobina nativa y recombinante por Western blot. Muestras de HTAr (carriles 1 a 4) y extracto glándula salival (carriles 5 y 6) se corrieron en SDS-PAGE; el gel se transfirió a una membrana de PVDF, que se enfrentó con: *carril 1* suero preinmune; *carril 2* suero anti HTAr; *carril 3* suero preinmune; *carril 4* suero anti glándula salival; *carril 5* suero preinmune, *carril 6* suero anti HTAr.

Desarrollo de un test de ELISA para la determinación en bovinos de anticuerpos anti HTAr.

En el proceso de puesta a punto de un test de ELISA, en primer término se concluyó que la concentración óptima de sensibilización de las placas fue 1 µg/ml. Como se puede observar en la Figura 11, la concentración menor de sensibilización de la placa ensayada, fue la que permitió desarrollar mayor señal colorimétrica en el ensayo.

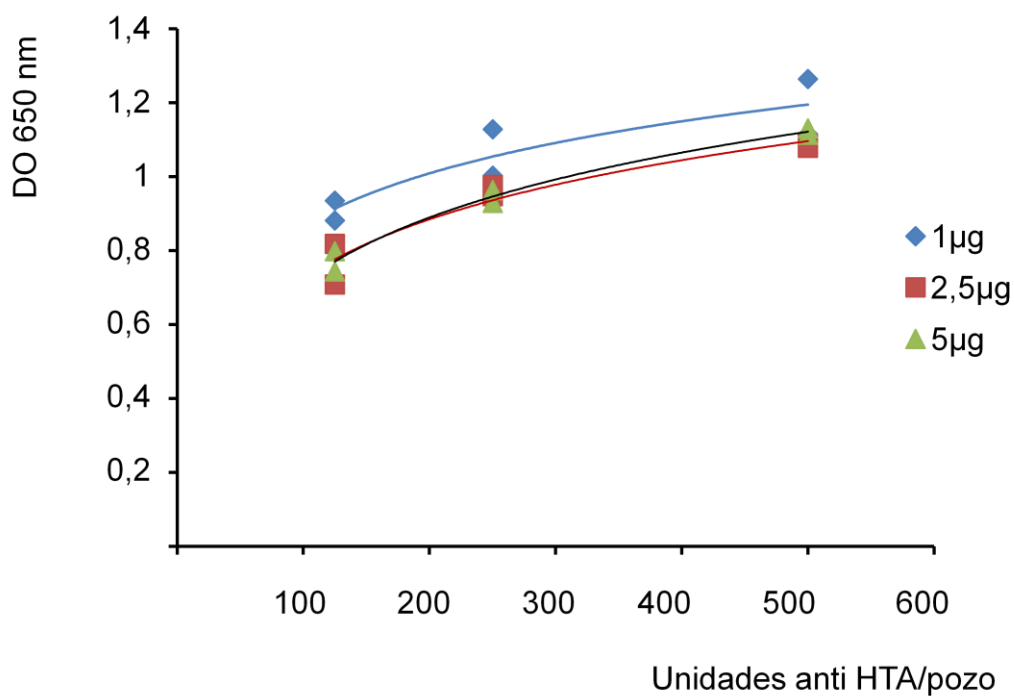


Figura 11. Determinación de la concentración óptima de sensibilización de ELISA anti HTAr. Absorbancias obtenidas en placas sensibilizadas con 1, 2,5 y 5 µg/mL de HTAr.

Se analizaron los sueros bovinos para determinar los controles positivos y negativos a ser utilizados en el test. En función de los resultados obtenidos se eligió un suero altamente reactivo como control positivo y como control negativo uno de los sueros de los bovinos no expuestos previamente a las moscas. Posteriormente se procedió a determinar el rango de dilución de los sueros a ser utilizado en el test. En función de los resultados, para obtener la mayor cantidad de datos dentro del rango de linealidad del estándar, los sueros problemas se diluyeron a partir de 1/1000 (Figura 12).

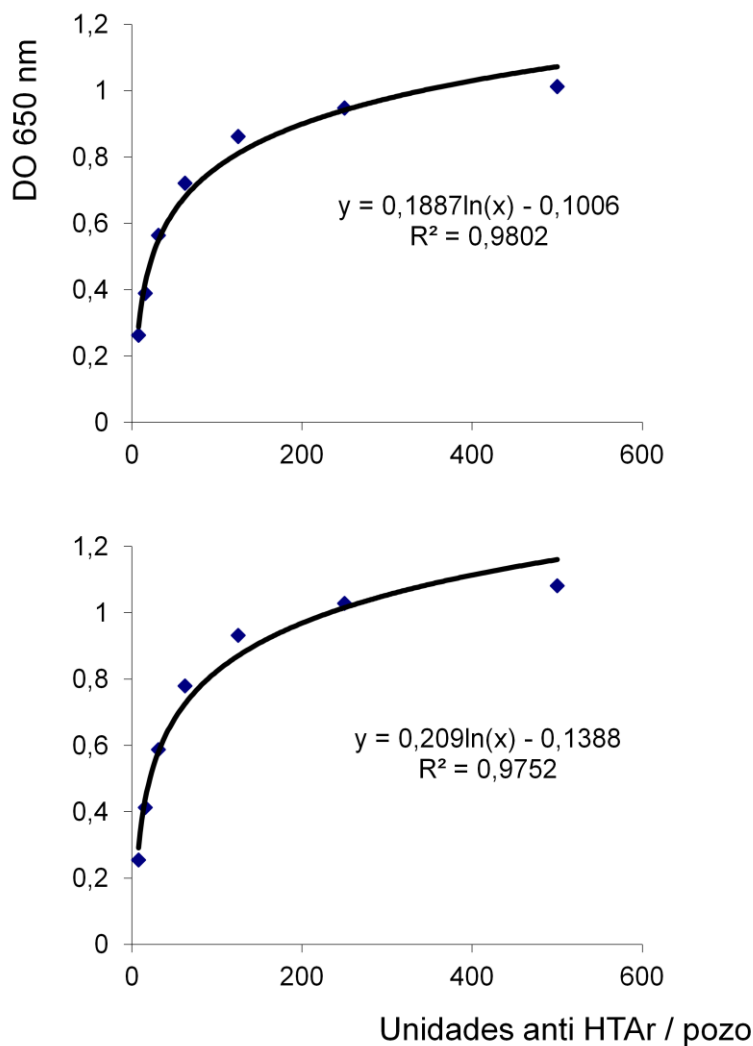


Figura 12. Representación de dos curvas estándar (control positivo) obtenidas de dos ELISA corridos en forma independiente.

9.IV *Experimento 2. Evolución de la carga parasitaria, consumo de hemoglobina de las moscas y perfil de la respuesta de anticuerpos anti HTAr en bovinos naturalmente parasitados durante la estación estival.*

Evolución de la carga parasitaria y el consumo de hemoglobina de las moscas

Los animales oscuros portaron más moscas que los claros (254 ± 18 y 144 ± 13 respectivamente, $P < 0,001$). Los animales más pesados tuvieron mayores cargas parasitarias ($P < 0,001$) y los machos portaron más moscas que las hembras (254 ± 12 y 201 ± 16 respectivamente; $P < 0,01$).

En el período de diciembre a marzo, la media de las temperaturas máximas diarias fue de $26,9 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,3^\circ\text{C}$ y no se identificaron variaciones en la temperatura ambiente por períodos prolongados (Figura 13A). Sin embargo, las cargas parasitarias fluctuaron durante el ensayo ($P < 0,0001$); tres picos cortos de cargas superiores a 250 moscas/animal (de 1-2 semanas de duración) fueron detectados, que fueron seguidos por períodos de bajas cargas parasitarias (Figura 13). La mayor carga parasitaria fue registrada a mediados de diciembre (469 ± 37 moscas/animal), seguido por picos a principios de febrero (271 ± 34 moscas/animal) y mitad de marzo (323 ± 34 moscas/animal) (Figura 13B).

El contenido de hemoglobina no fue afectado por los fenotipos bovinos estudiados (color de manto, sexo y peso corporal), pero varió a lo largo de las observaciones ($P < 0,01$). La sangre ingerida se redujo en las semanas 5 y 6 ($P < 0,03$, Figura 13B). El contenido de hemoglobina se incrementó nuevamente en la semana 7 y permaneció alto hasta la semana 9 y disminuyó en la semana 10. Finalmente, se encontraron altos niveles de hemoglobina en la semana 12, los que decayeron a la semana 14.

Determinación de anticuerpos anti HTAr en bovinos naturalmente parasitados

Al inicio del ensayo todos los bovinos presentaron altos títulos de IgG específica contra HTAr. Esta respuesta no se modificó significativamente entre las primeras 12 semanas de ensayo (Figura 13C). A fines del mes de mayo, con la ausencia de moscas en el rodeo, la respuesta anti HTAr se redujo significativamente (6644 UA/mL), siendo en el mes de julio indetectable para la mayoría de los bovinos.

Los machos presentaron mayores títulos de anticuerpos anti HTAr que las hembras (134011 ± 12627 y 60018 ± 16574 unidades respectivamente; $P < 0,0008$). No se observaron diferencias en los títulos de anticuerpos según el peso y color de pelo. Los títulos de anticuerpos anti HTAr encontrados al inicio del ensayo tendieron a afectar negativamente la carga de la mosca ($P = 0,063$); por cada 10000 UA de anti HTAr la carga de las moscas disminuyó en 2,9 moscas. El consumo de hemoglobina tendió a estar afectado por los anticuerpos anti HTAr al inicio del ensayo ($P = 0,066$), cada 10000 UA de incremento de títulos de anticuerpos implicó una disminución en el contenido de hemoglobina $0,0014 \mu\text{g/mL}$.

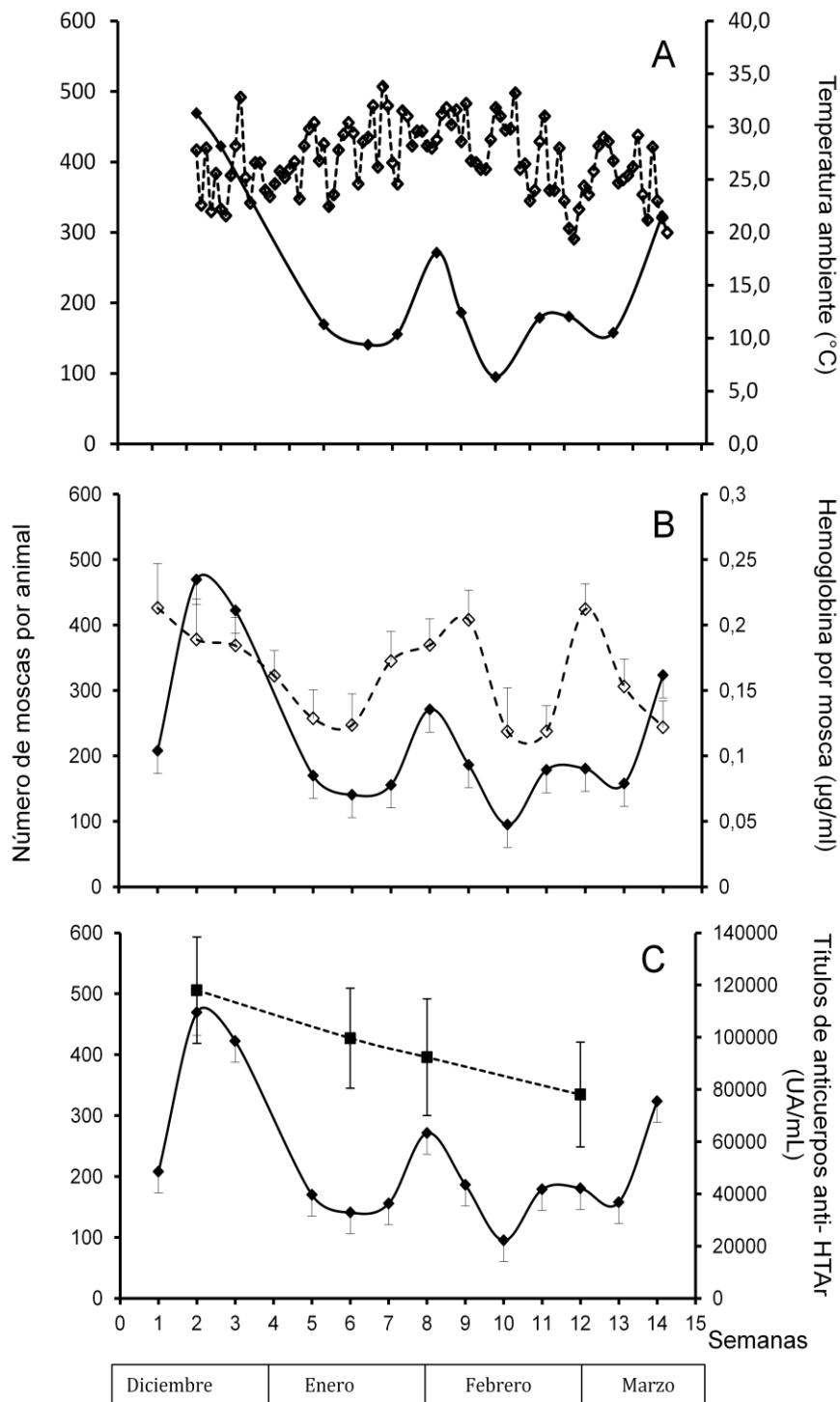


Figura 13. Distribución de la carga parasitaria, ingesta de sangre en bovinos naturalmente parasitados y títulos de anticuerpos anti HTAr en el verano. A. *Línea continua.* Carga parasitaria. *Línea punteada.* Temperatura ambiente máxima registrada (Estación Carrasco, Meteorología- Uruguay). B *Línea continua.* Carga parasitaria. *Línea punteada.* Concentración de hemoglobina por mosca. C. *Línea continua.* Carga parasitaria. *Línea punteada.* Títulos de anticuerpos anti HTAr.

10. DISCUSIÓN

Se ha descrito que las moscas, basadas en una variedad de estímulos visuales, gustativos, olfatorios o físicos, aun no claramente determinados, son especialmente atraídas por determinado tipo de bovinos. La mayor parte de los trabajos reportados coinciden en que los bovinos machos (Post et al. 1987; Rodríguez-Gallegos & Acosta-Rodríguez 2011) y aquellos con manto de color oscuro (Franks 1963; Rodríguez-Gallegos & Acosta-Rodríguez 2011) portan más moscas. Esta preferencia de las moscas por determinados individuos, provoca una distribución heterogénea en el rodeo. A nivel nacional (Castro et al 2003) y a nivel regional (de Souza et al. (2005), registraron que aproximadamente el 30% de los animales albergaron entre el 50 - 70% de la población de moscas de un rodeo. Otros autores describieron que estas diferencias relativas entre animales con altas y bajas cargas se mantienen aún cuando cambia la oferta de moscas en el rodeo (Pruett et al. 2003). En el ensayo 1, obtuvimos datos similares; el 30% de las observaciones tuvieron cargas superiores a 400 moscas por animal y las diferencias entre animales altamente parasitados y con bajas cargas se mantuvieron durante las observaciones. Esta suma de datos confirman la existencia de factores de susceptibilidad y/o resistencia individual a la carga de moscas, pero hasta la fecha no existe información que postule las bases fisiológicas de esta preferencia o resistencia de las moscas por determinados fenotipos.

El planteo de nuestra primera hipótesis de trabajo fue que el acceso al alimento es para la mosca de los cuernos un factor que condiciona la elección del hospedador. Por esta razón, en la primera etapa de esta tesis analizamos simultáneamente el efecto de tres características fenotípicas en la distribución de moscas en el rodeo (color, sexo y peso corporal) y su relación con el espesor del epitelio bovino y el nivel de consumo de hemoglobina de las moscas.

En el ensayo 1, cuando analizamos específicamente la relación entre la carga de moscas y el color de manto, observamos una mayor atracción de las moscas por los animales de pelo oscuro, confirmando los reportes previos (Franks 1963; Shreiber & Campbell 1986; Rodríguez-Gallegos & Acosta-Rodríguez 2011). Estos resultados fueron consistentes con el mayor contenido de hemoglobina en moscas alimentadas de los animales oscuros respecto las de los claros. Hasta la fecha, esta ha sido la primera evidencia experimental que establece que el consumo de sangre difiere según el fenotipo del animal y que el color oscuro favorece la ingesta de sangre. Esto podría estar asociado a la mayor retención de los rayos solares de los colores oscuros y a la consecuente mayor temperatura de la piel de bovinos oscuros respecto de los claros cuando son mantenidos en climas cálidos (Silva et al. 2011). Este cambio de temperatura podría generar una mayor vasodilatación de los capilares en la piel de los bovinos y un mayor acceso de las moscas a la sangre. Si bien en bovinos no hemos encontrado información al respecto, se ha descrito en humanos, que el calor aplicado en un área de la piel provoca una vasodilatación local de sus microvasos (Minson 2010). Por otro lado, la resistencia de la epidermis a la prosobécide

de la mosca podría ser una limitante para el acceso a la sangre. Nuestros resultados señalaron que la epidermis de los animales oscuros es más delgada que la de los claros. Esta es la primera descripción experimental de que el espesor de la epidermis varía según el color en bovinos de biotipo carnívoros. Una epidermis más delgada en animales oscuros fue consistente con un mayor contenido de hemoglobina en las moscas (mayor consumo de sangre). Estos resultados sugieren que el espesor de la epidermis es un factor de resistencia al consumo de sangre de las moscas y puede condicionar la presencia de moscas en los bovinos.

El peso de los animales tuvo una fuerte correlación positiva con la carga parasitaria, incrementándose el número de moscas con cada kg de peso del animal. No hemos encontrado trabajos que evalúen la carga parasitaria y utilicen el peso como covariable. Castro, (2001) describió una relación positiva entre carga, tamaño y condición corporal, ambas variables están asociadas al peso vivo de los bovinos. Cuando estudiamos el consumo de sangre de las moscas, observamos que se redujo con el incremento de peso. No hemos encontrado en bovinos, reportes que mencionen cambios en la microcirculación vascular de la piel en relación al peso. Sin embargo en humanos, se ha observado que la vasodilatación del endotelio está asociada negativamente con la grasa corporal (Khan et al 2003). Si existiera en bovinos un mecanismo similar, éste podría explicar en parte la reducción del consumo. Cuando medimos el espesor de la epidermis, observamos que se incrementó con el peso, sugiriendo que la piel de los animales más pesados es más resistente a la acción del aparato succionador de la mosca. Esta idea es consistente con la reducción del consumo de sangre de las moscas al incrementarse el espesor del epitelio. Sin embargo, la preferencia de las moscas por los animales más pesados se mantuvo a pesar de que estas consumen menos sangre de estos animales. Este resultado sugiere que además de la facilidad de acceso de las moscas a la sangre, existen otros factores que condicionan la preferencia de las moscas por los bovinos más pesados. Doornenbal et al. (1988) describieron que la concentración de proteínas plasmáticas así como la concentración de nitrógeno ureico se incrementan con el peso corporal, por lo tanto la calidad nutritiva del plasma varía con el peso del animal. En función de lo expuesto, proponemos que la cantidad y también la calidad nutritiva de la sangre pueden ser factores de atracción.

El sexo no demostró efecto sobre las cargas parasitarias en el ensayo 1 (368 vs 319 para machos y hembras respectivamente). Sin embargo, en el ensayo 2 con un número de observaciones mayor, determinamos que los machos portaron más moscas que las hembras (254 vs 201 para machos y hembras respectivamente). Las diferencias de cargas parasitarias entre sexos fue escasa no superando las 50 moscas/animal. En trabajos con terneros, Rodríguez- Gallegos et al. (2011), observaron que terneros machos tenían mayores cargas de moscas que las hembras (358 ± 9.5 vs 316 ± 10.7 moscas/animal), sin embargo, el efecto del peso en esta observación no fue determinado. El sexo y el peso corporal están fuertemente asociados en los bovinos. Se ha descrito que bajo condiciones ambientales y nutricionales similares, la ganancia de peso es mayor en machos que en hembras (de Olivera, 1979), por lo que según nuestros resultados, sólo por el efecto peso,

los machos tienden a tener más moscas que las hembras. Los trabajos disponibles hasta la fecha, sobre la influencia del sexo en la carga de moscas, no utilizaron el peso como covariable, por lo que pudieron sobrevalorar las diferencias entre sexos. Cuando analizamos el consumo de hemoglobina y el espesor del epitelio, no encontramos diferencias significativas entre los sexos; estos resultados están en concordancia con las escasas diferencias observadas en las cargas parasitarias.

En suma con el ensayo 1, se incorporan nuevos elementos al conocimiento de la interacción parásito hospedador. Se determinó que el consumo de sangre de las moscas varía según las características fenotípicas del hospedador y que el espesor de la epidermis condiciona dicho consumo. Estos elementos abren nuevos caminos en la búsqueda de estrategias alternativas de control.

El planteo de nuestra segunda hipótesis de trabajo, fue que el bovino es capaz de participar en la regulación de sus cargas de moscas. En el ensayo 2, observamos que la población de moscas varió a lo largo de este ensayo. Se registraron períodos cortos de 1-2 semanas con altas cargas de moscas (mayores a 250 moscas), seguidos por intervalos de 3-4 semanas con bajas cargas de moscas. Variaciones en la carga parasitaria habían sido descritas previamente (Guglielmone et al. 2002a; Castro et al. 2008) y se ha propuesto que se deben a cambios en los tiempos de sobrevivencia de los adultos, de las larvas y/o en la cantidad de los huevos producidos por las moscas (Pruett et al. 2003). Varios autores demostraron que las condiciones favorables de temperatura y la humedad se correlacionan positivamente con el crecimiento del número de moscas en el rodeo (Jones & Kunz 1996; de Souza et al. 2005), aunque no explican en su totalidad la dinámica de estas poblaciones. Castro et al. (2008) observaron la existencia de una correlación negativa entre la densidad de moscas presentes en el hospedador y el crecimiento de la población de moscas en el rodeo. Dentro de las interpretaciones posibles de este fenómeno, se sugiere la existencia de factores vinculados al hospedador capaces de regular las cargas de moscas en el rodeo.

A partir de esta información nosotros nos preguntamos, si el consumo de hemoglobina de las moscas varió durante la estación estival. Efectivamente, luego de tres registros similares de consumo de hemoglobina al inicio de las observaciones, éste decreció luego de la aparición del primer pico de moscas en el rodeo. Posteriormente, las recuperaciones del consumo de hemoglobina así como las caídas acompañaron el perfil de la evolución de la carga parasitaria. Esta es la primera observación de variaciones en el consumo de sangre de la mosca de los cuernos en una infección natural. Trabajos previos realizados por Cupp et al. (2010), demostraron que las moscas reducen el consumo de sangre de terneros vacunados con Thrombostasin. Por lo tanto, el origen de las variaciones naturales en el consumo puede ser secundario al desarrollo de una respuesta inmune frente a la exposición natural capaz de neutralizar los componentes salivales del parásito. En efecto, se ha descrito que bovinos naturalmente parasitados con *H. irritans*, desarrollaron una respuesta inmune contra extractos somáticos de la mosca (Kerlin & Allingham 1992; Baron & Lysyk, 1995).

En el presente trabajo se describe por primera vez una respuesta inmune natural específica contra una proteína de la saliva de la mosca de los cuernos. La Hematobina resultó ser inmunogénica para los bovinos naturalmente parasitados: la totalidad de los bovinos tenían altos títulos de anticuerpos al inicio del ensayo. Solo los sueros bovinos utilizados como controles negativos en el ELISA (obtenidos de bovinos no expuestos a la mosca) no desarrollaron señal colorimétrica en el ELISA. Los títulos anti Hematobina se mantuvieron incambiados mientras las moscas estuvieron presentes en el rodeo. En el mes de mayo, frente a la caída de la población de moscas, los títulos anti Hematobina se redujeron significativamente y en el mes de julio la mayoría de los animales no presentaban niveles detectables de anticuerpos. Si bien el protocolo experimental realizado no nos permitió detectar el inicio de la respuesta de anticuerpos frente a la aparición de las moscas en el rodeo, la caída de los mismos en el invierno pueden sugerir que el crecimiento de las poblaciones de moscas en la primavera siguiente no encontrará presencia de una respuesta inmune del hospedador capaz de afectarla hasta que la población de moscas alcance niveles capaces de inducir una nueva respuesta.

Los títulos de anticuerpos anti Hematobina alcanzados luego del mayor pico de moscas tendieron a afectar el consumo de hemoglobina y la carga de las moscas. Esta información preliminar permite sugerir que la respuesta inmune contra esta proteína, al igual que se observó previamente con Thrombostasin (Cupp et al. 2004), puede colaborar en la reducción del consumo de sangre de la mosca. Este resultado transforma a la Hematobina en un potencial candidato para la construcción de vacunas. La reducción del consumo de hemoglobina inducida por el hospedador, podría explicar por qué el crecimiento de la población de moscas es inversamente proporcional a la densidad según observaron Castro et al. (2008). Un menor consumo de sangre lleva a un menor desarrollo ovárico de las moscas (Cupp et al. 2004) y por consiguiente a una menor deposición de huevos en el campo y oferta de moscas. En este mismo sentido, la observación de que aun cuando las condiciones climáticas son favorables, los altos niveles de moscas se observan por cortos períodos, podría ser por la misma causa: la regulación del consumo de sangre de las moscas por parte del hospedador.

En relación a la respuesta anti HTAr, pudimos observar que los títulos de anticuerpos de los bovinos machos fueron mayores que el de las hembras, mientras que no se observaron diferencias según el color y peso vivo. El efecto del sexo en la presencia de mayores títulos de anticuerpos anti HTAr, podría ser explicado por la mayor carga de moscas observadas en los machos. Sin embargo, podrían existir elementos adicionales que serían interesantes de explorar. No hemos encontrado trabajos que expliquen diferencias significativas en el título de anticuerpos en los diferentes sexos en bovinos. Sin embargo, el efecto de las hormonas sexuales sobre la activación de las células efectoras del sistema inmune ha sido largamente demostrado. La progesterona (hormona predominante durante el ciclo estral) reduce la presentación de antígenos, la producción de inmunoglobulinas y la respuesta celular a la agresión en distintas especies (Kaushic et al. 2003; Liang et al. 2006).

11. CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología de reproducción del ciclo de la mosca de los cuernos, en condiciones de laboratorio.

La capa oscura y el peso vivo, y en menor grado el sexo afectan la carga de las moscas de los cuernos en los bovinos.

La facilidad de acceso a la sangre es un factor determinante en el nivel de atracción de las moscas por su hospedador. El espesor de la epidermis bovina es para la mosca una barrera física que limita su alimentación.

El consumo de alimento de las moscas y la carga de las mismas fluctúa durante la estación estival.

El bovino desarrolla una respuesta inmune específica frente a la exposición natural a la Hematobina, proteína salival de la mosca de los cuernos.

Altos títulos anti Hematobina tendieron a reducir el consumo de sangre y la carga de de las moscas, lo que la transforma en un potencial candidato para el diseño de vacunas para el control de la mosca de los cuernos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamovich, A. H., Cicchino, A. C., Prieto, O. H., Torres, P. R., & Nuñez, J. L. (1993). Mosca de los cuernos, *Haematobia irritans irritans* (L.1758) (Diptera:Muscidae). Contribuciones para su conocimiento en la Argentina. III: Aspectos morfológicos básicos de los estados preadultos. Ciclo Biológico. *Revista de Medicina Veterinaria*, 75(5), 382–388.
- Aljamali, M., Bowman, A. S., Dillwith, J. W., Tucker, J. S., Yates, G. W., Essenberg, R. C., & Sauer, J. R. (2002). Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), as assessed by radio-immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(3), 331–341.
- Almazán-García, C., Castillo Salas, S., Loredó Osti, J., & García Vazquez, Z. (2001). Dinámica poblacional de *Haematobia irritans* en un hato de bovinos de Soto la Marina, Tamaulipas, México. *Vet Méx*, 32(2), 149–152.
- Andersen, J. F., & Montfort, W. R. (2000). The crystal structure of nitrophorin 2. A trifunctional antihemostatic protein from the saliva of *Rhodnius prolixus*. *The Journal of biological chemistry*, 275(39), 30496–503.
- Andersen, J., Gudderra, N., Francischetti, I., & Ribeiro, J. (2005). The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol.*, 58(2), 97–105.
- Arcà, B., Lombardo, F., Francischetti, I. M. B., Pham, V. M., Mestres-Simon, M., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M. C. (2007). An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(2), 107–27.
- Baron, R. W., & Lysyk, T. J. (1995). Antibody responses in cattle infested with *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of medical entomology*, 32(5), 630–5.
- Bautista Garfias, C. (2009). Parasitic helminths of veterinary concern: host immune response regulation and potential use for the treatment of inflammatory diseases. *Vet Méx*, 40(3), 283–292.
- Blume, R. R., Kunz, S. E., Hogan, B. F., & Matter, J. J. (1970). Biological and ecological investigations of horn flies in central Texas: influence of other insects in cattle manure. *J. Econ. Entomol.*, 63, 1121–1123.
- Bruce WG. (1938). A practical trap for the control of horn flies on cattle. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 11, 88–93.
- Buxton, B. A., Hinkle, N. C., & Schultz, R. D. (1985). Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *American journal of veterinary research*, 46(1), 123–6.
- Byford, R. L., Craig, M. E., & Crosby, B. L. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *Journal of animal science*, 70(2), 597–602.
- Cabrera, G., & Cordo, H. (1997). Coprophilous arthropod community from Argentina with species of potential use as biocontrol agents against pest flies. *Environ. Entomol.*, 26, 191–200.

- Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M. C. (2006). Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *The Journal of biological chemistry*, 281(4), 1935–42.
- Campbell, J. B. (1976). Effect of horn fly control on cows as expressed by increased weaning weights of calves. *Journal of economic entomology*, 69(6), 711–2.
- Carballo, M., & Martinez, M. (1991). Hallazgo de *Haematobia irritans* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 27, 20–21.
- Castro, E. (2001). *Flutuação populacional de Haematobia irritans (Diptera:Muscidae) e impacto produtivo da infestação sobre um rebanho de cria no Uruguai*. (Universidade Federal de Pelotas, Ed.), Brasil.
- Castro, E. (2003). Mosca de los cuernos: efecto en ganado de carne en Uruguay. *Revista del Plan Agropecuario*, 46–47.
- Castro, E., Gil, A., Solari, M.A., Farias, N. A. Distribución de *Haematobia irritans* en un rodeo de vacas cruza Aberdeen Angus por Hereford (2003). IV Jornadas Técnicas de Facultad de Veterinaria, pág 309.
- Castro, E., Gil, a, Piaggio, J., Chifflet, L., Farias, N. a, Solari, M. a, & Moon, R. D. (2008). Population dynamics of horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), on Hereford cattle in Uruguay. *Veterinary parasitology*, 151(2-4), 286–99.
- Chinzei, Y., & Minoura, H. (1987). Host immunoglobulin G titre and antibody activity in haemolymph of the tick, *Ornithodoros moubata*. *Medical and veterinary entomology*, 1(4), 409–16.
- Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J. H. F., Francischetti, I. M. B., & Kotsyfakis, M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of proteomics*, 75(13), 3842–54.
- Ciprandi, A., de Oliveira, S. K., Masuda, A., Horn, F., & Termignoni, C. (2006). *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental parasitology*, 114(1), 40–6.
- Cruz-Vázquez, C., Bautista, H., Vitela, M., Ramos, P., M., Q., & García-Vázquez, Z. (2000). Distribución anual de *Haematobia irritans* (L.) (Diptera:Muscidae) en tres establos lecheros de Aguascalientes, México. *Vet Méx*, 31, 195–199.
- Cupp, M., Cupp, E., Navarre, C., Wisnewski, N., Brandt, K., Gary, M., Dunhua, Z., Panangala, V. (2004). Evaluation of a recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. *Vaccine*, 22, 2285–97.
- Cupp, M. S., Cupp, E. W., Navarre, C., Zhang, D., Yue, X., Todd, L., & Panangala, V. (2010). Salivary gland thrombostasin isoforms differentially regulate blood uptake of horn flies fed on control- and thrombostasin-vaccinated cattle. *Journal of medical entomology*, 47(4), 610–7.
- de Olivera, J.A., Valle, A., Moura Duarte, F.A. (1979). Estimación de la Heredabilidad para la ganancia de peso en bovinos Chanchim. *Agronomía Tropical*, 29(6), 491-502.
- de Souza, A. P., Bellato, V., Ramos, C. I., Dalagnol, C. A., & Henschel, G. D. S. (2005). Seasonal variation of *Haematobia irritans* in the Santa Catarina State plateau and efficiency of the “Directed Control. *Rev Bras Parasitol Vet*, 14(1), 11–5.

- Doornenbal, H., Tong, a K., & Murray, N. L. (1988). Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. *Can J Vet Res*, 52(1), 99–105.
- Dy, M., & Schneider, E. (2004). Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(5), 393–410.
- Francischetti, I. M. B., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M. C. (2003). Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(4), 869–75.
- Francischetti, I. M. B., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M. C. (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*, 99(10), 3602–12.
- Franks, R., Burns, E., & England, N. (1963). Color preference of the horn fly, *Haematobia irritans*, on beef cattle. *Journal of economic entomology*, 57(3), 371–372.
- Fujisaki, K., Kamio, T., & Kitaoka, S. (1984). Passage of host serum components, including antibodies specific for *Theileria sergenti*, across the digestive tract of argasid and ixodid ticks. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 78(4), 449–50.
- Galindo-Velasco, E., Cruz-Vázquez, C., Lezama-Gutiérrez, R., Reyes-Velázquez, W., Aguilar-Espinoza, S., & Pescador-Rubio, A. (2008). Fluctuación poblacional de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en un hato bovino en Tecomán, Colima, México, 39(2), 181–186.
- Guerrero, F., & Kunz, S. E. (2000). Laboratory rearing conditions select for differences in gene expression between laboratory and wild type horn flies. *Southwest. Entomol.*, 25(2), 123–129.
- Guglielmone, A. A., Gimeno, E., Idiart, J., Fisher, W. F., Volpogni, M. M., Quaino, O., Warnke, O. (1999). Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. *Medical and veterinary entomology*, 13(3), 324–9.
- Guglielmone, A. A., Castelli, M. E., Volpogni, M. M., Anziani, O. S., & Mangold, A. J. (2002a). Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the horn fly, *Haematobia irritans*. *Medical and veterinary entomology*, 16(3), 310–5.
- Guglielmone, A. A., Volpogni, M. M., Castro, H., Mangold, A. J., & Anziani, O. S. (2002b). A study of relative horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), abundance on Holstein steers and steers of two Holstein crosses. *Veterinary parasitology*, 109(1-2), 141–5.
- Hajnická, V, Kocáková, P., Sláviková, M., Slovák, M., Gasperík, J., Fuchsberger, N., & Nuttall, P. A. (2001). Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite immunology*, 23(9), 483–9.
- Hajnická, V, Vancová, I., Kocáková, P., Slovák, M., Gasperík, J., Sláviková, M., Nuttall, P. A. (2005). Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology*, 130(Pt 3), 333–42.

- Hajnická, V, Vančová-Štibrániová, I., Slovák, M., Kocáková, P., & Nuttall, P. A. (2011). Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *International journal for parasitology*, 41(2), 213–23.
- Hargett, L., & Goulding, R. L. (1962). Studies on The Behavior of the Horn Fly. Technical Bulletin 61 Eds. Agricultural Experiment Station, Oregon State University Corvallis, 3-26
- Harvey, T. L., & Launchbaugh, J. L. (1982). Effect of Horn Flies on Behavior of Cattle. *Journal of Economic Entomology*, 75(1), 25–27.
- Haufe, W. (1982). Growth of range cattle protected from horn flies *Haematobia irritans* by ear tags impregnated with fenvalerate. *Canadian Journal of Animal Science*, 62, 567–573.
- Hibler, C. (1966). Development of *Stephanofilaria stilesi* in horn fly. *Journal of Parasitology*, 52, 890–898.
- Higgs, G. ., Vane, J. R., Hart, R. J., Porter, C., & Wilson, R. G. (1976). Prostaglandins in saliva of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini)(Acarina:Ixodidae). *Bull. Entomol.Res*, 66, 665–670.
- Hoelscher, C. E., & Combs, R. L. (1971). The horn fly, I. Seasonal incidence of diapause in Mississippi. *Econ. Entomol.*, 64, 256 – 259.
- Jaworski, D. C., Jasinskas, A., Metz, C. N., Bucala, R., & Barbour, A. G. (2001). Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect molecular biology*, 10(4), 323–31.
- Jones, S. R., & Kunz, S. E. (1996). Effects of immersion in water on survival of preimaginal stages of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of medical entomology*, 33(1), 27–31.
- Jutel, M., Watanabe, T., Klunker, S., Akdis, M., Thomet, O. A., Malolepszy, J., Akdis, C. A. (2001). Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*, 413(6854), 420–5.
- Kaushic, C., Ashkar, A. A., Reid, L. A., & Rosenthal, K. L. (2003). Progesterone increases susceptibility and decreases immune responses to genital herpes infection. *Journal of virology*, 77(8), 4558–65.
- Kay, B. H., & Kemp, D. H. (1994). Vaccines against arthropods. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 50(6 Suppl), 87–96.
- Keller, P. M., Waxman, L., Arnold, B. A., Schultz, L. D., Condra, C., & Connolly, T. M. (1993). Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *The Journal of biological chemistry*, 268(8), 5450–6.
- Khan, F., Green, Forsyth, J., Greene, S., Morris, A., Belch, J. (2003). Impaired microvascular function in normal children: effects of adiposity and poor glucose handling. *The Journal of physiology* 551, 705–711.
- Kerlin, R. L., & Allingham, P. G. (1992). Acquired immune response of cattle exposed to buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). *Veterinary parasitology*, 43(1-2), 115–29.
- Kinzer, H. G., Houghton, W. E., Reeves, J. M., Kunz, S. E., Wallace, J. D., & Urquhart, N. S. (1984). Influence of horn flies on weight loss in cattle with notes on prevention of loss by insecticide treatment. *Southwestern entomologist*, 9(2), 212–217.
- Kocáková, P., Sláviková, M., Hajnická, V., Slovák, M., Gasperík, J., Vancová, I., Nuttall, P. A. (2003). Effect of fast protein liquid chromatography

- fractionated salivary gland extracts from different ixodid tick species on interleukin-8 binding to its cell receptors. *Folia parasitologica*, 50(1), 79–84.
- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M. B., Mather, T. N., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M. C. (2006). Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry*, 281(36), 26298–307.
- Kunz, S. E., Miller, J. A., Sims, P. L., & Meyerhoeffer, D. C. (1984). Economics of controlling horn flies (Diptera Muscidae) in range cattle management. *J. Econ. Entomol.*, 77, 657- 660.
- Lawrie, C. H., Sim, R. B., & Nuttall, P. a. (2005). Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Molecular immunology*, 42(1), 31–8.
- Liang, J., Sun, L., Wang, Q., & Hou, Y. (2006). Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. *International immunopharmacology*, 6(5), 830–8.
- Lima, L. G. F., Prado, A. P., & Perri, S. H. V. (2002). Comparison of two methods (visual estimates and filming) for counts of horn flies (*Haematobia irritans irritans*) (L.) (Diptera: Muscidae). *Veterinary parasitology*, 103(3), 227–35.
- Liyou, N., Hamilton, S., Mckenna, R., Elvin, C., & Willadsen, P. (2000). Localisation and functional studies on the 5'-nucleotidase of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental & applied acarology*, 24(3), 235–46.
- Lysyk, T. J., & Moon, R. D. (1994). Diapause induction in the horn fly (Diptera: Muscidae). *Can. Entomol.*, 126, 949 – 959.
- Mans, B. J., & Ribeiro, J. M. C. (2008). Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(9), 841–52.
- Maritz-Olivier, C., Stutzer, C., Jongejan, F., Neitz, A. W. H., & Gaspar, A. R. M. (2007). Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in parasitology*, 23(9), 397–407.
- Minson, C. T. (2010). Thermal provocation to evaluate microvascular reactivity in human skin. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 109(4), 1239–46.
- Nunn, M. A., Sharma, A., Paesen, G. C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A. C., & Nuttall, P. A. (2005). Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(4), 2084–91.
- Okine, J. S. (1991). *Aspects of Oogenesis in the Horn Fly, Haematobia Irritans (Linnaeus) (Diptera: Muscidae)*. University of Florida, Ed.(p. 270).
- Oyarzún, M. P., Palma, R., Alberti, E., Hormazabal, E., Pardo, F., Birkett, M. A., & Quiroz, A. (2009). Olfactory response of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) to cattle-derived volatile compounds. *Journal of medical entomology*, 46(6), 1320–6.
- Oyarzún, M. P., Quiroz, A., & Birkett, M. A. (2008). Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Medical and veterinary entomology*, 22(3), 188–202.

- Parizi, L. F., Reck, J., Oldiges, D. P., Guizzo, M. G., Seixas, A., Logullo, C., Vaz, I. da S. (2012). Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. *Vaccine*, *30*(48), 6912–7.
- Pipano, E., Alekceev, E., Galker, F., Fish, L., Samish, M., & Shkap, V. (2003). Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. *Experimental & applied acarology*, *29*(1-2), 141–9.
- Post, T. B., Christensen, H. R., & Seifert, G. W. (1987). Reproductive performance and productive traits of beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. *Theriogenology*, *27*(2), 317–28.
- Pruett, J. H., Steelman, C. D., Miller, J. A., Pound, J. M., & George, J. E. (2003). Distribution of horn flies on individual cows as a percentage of the total horn fly population. *Veterinary parasitology*, *116*(3), 251–8.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Fikrig, E. (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, *436*(7050), 573–7.
- Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R., & Spielman, A. (1985). Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *The Journal of experimental medicine*, *161*(2), 332–44.
- Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., & Robinson, D. R. (1988). *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. *The Journal of parasitology*, *74*(6), 1068–9.
- Rodríguez-Gallegos, C. E., & Acosta-Rodríguez, M. R. (2011). Genetic and environmental factors influencing the resistance of terminal cross calves to tick *Rhipicephalus (boophilus) microplus* and horn fly *Haematobia irritans*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *13*, 437 – 444.
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B. (2007). Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(3), 1497–505.
- Sá-nunes, A. & Freire de Oliveira C.J (2011). Sialogenins and immunomodulators derived from blood feeding parasites. En:Toxins and Hemostasis. Editores, R. Manjunatha Kini; K.J. Clemetson; F.S. Markland, M.A. Maclane, T. Morita. ed. Springer science Cap. 9, 131–152.
- Sanyal, G., Marquis-Omer, D., Waxman, L., Mach, H., Ryan, J. a, O'Brien Gress, J., & Middaugh, C. R. (1995). Spectroscopic characterization of tick anticoagulant peptide. *Biochimica et biophysica acta*, *1249*(1), 100–8.
- Savio, T J, Johnson, H. D., Hahn, L., & Thomas, G. D. (1976). Effect of horn flies on vanilmandelic acid excretion of dairy cattle. *Journal of dairy science*, *59*(2), 318–20.
- Schmidt, C. D., Harris, R. L., & Hoffman, A. (1967). Mass rearing of the horn fly, *haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in the laboratory. *Ann. Entomol. Soc. Amer*, *60*, 508–510.

- Schwinghammer, K. A. Knapp, F. W., Boling, J. A., & Schillo, K. K. (1986). Physiological and nutritional response of beef steers to infestations of the horn fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 79(4), 1010–1015.
- Silva, R. G., Maia, A. S. C., Macedo Costa, L. L., & Queiroz, J. P. A. F. (2011). Latent heat loss of dairy cows in an equatorial semi-arid environment. *International Journal of Biometeorology*, 56(5), 927–932.
- Stutzer, C., Mans, B. J., Gaspar, A. R. M., Neitz, A. W. H., & Maritz-Olivier, C. (2009). *Ornithodoros savignyi*: soft tick apyrase belongs to the 5'-nucleotidase family. *Experimental parasitology*, 122(4), 318–27.
- Tarelli, G. (2004). Mosca de los cuernos. *Haematobia irritans* (L.). Biología, comportamiento y control. Editorial Hemisferio Sur. 1ed. Buenos Aires.
- Tarry, D. W., Bernal, L., & Edwards, S. (1991). Transmission of bovine virus diarrhoea virus by blood feeding flies. *The Veterinary record*, 128(4), 82–4.
- Torres, P. R., Cicchino, A. C., & Abrahamovich, A. H. (1993). Damage in the skin and leather caused by the horn fly (Diptera: Muscidae) in Argentina. *XXI IULTS Congress Proceedings*, 2, 543–550.
- Torres, P. R., Cicchino, A. C., Abrahamovich, A. H., Nuñez, J. L., & Prieto, O. H. (1996). Influence of abiotic factors on horn fly (*Haematobia irritans irritans*, L. 1758) (Diptera: Muscidae) abundance and the role of native grass as a resting site in N.W. Santa Fe Province (Argentina). *Braz. J. Vet. Parasitol.*, 5, 15–22.
- Tozer, R. S., & Sutherst, R. W. (1996). Control of horn fly (Diptera: Muscidae) in Florida with an Australian trap. *Journal of economic entomology*, 89(2), 415–20.
- Tugwell, P.E., Burns, E.C., Turner, J.W. (1969). Brahaman breeding as a factor affecting the attractiveness or repellency of cattle to the horn fly. *J. Econ. Entomol.*, 62, 57-57.
- Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E., & de Silva, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect molecular biology*, 16(4), 469–79.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M. (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry*, 275(25), 18717–23.
- Valenzuela, J. G., Pham, V. M., Garfield, M. K., Francischetti, I. M. B., & Ribeiro, J. M. C. (2002). Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(9), 1101–22.
- Valenzuela, J. G. (2002). High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), 1199–209.
- Vanzini, G., Tourni, R., & Llovet, L. (1997). Daños ocasionados por ectoparasitos en la industria del cuero. *Therios*, 26, 84–88.
- Vaughan, J. A., Thomas, R. E., Silver, G. M., Wisnewski, N., & Azad, A. F. (1998). Quantitation of cat immunoglobulins in the hemolymph of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) after feeding on blood. *Journal of medical entomology*, 35(4), 404–9.

- Velasco, R., Gonzalez, J., Morales, G., & Ortega, E. (2001). Daño económico y costos de control en bovinos: mosca de los cuernos. *Informativo agropecuario. Bioleche - INIA Quilamapu*, 14, 4–7.
- Wang, H., & Nuttall, P. A. (1999). Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 56(3-4), 286–95.
- Wang, X., Ribeiro, J. M. C., Broce, A. B., Wilkerson, M. J., & Kanost, M. R. (2009). An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39(9), 607–14.
- Wilkerson, G. G. (1974). *A Population Model for the Horn Fly, Haematobia Irritans (Linnaeus) (Diptera: Muscidae), in North Central Florida*. University of Florida, Ed. (p. 222).
- Zhang, D., Cupp, M. S., & Cupp, E. W. (2002). Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(3), 321–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804804>
- Zhou, W., Hashimoto, K., Goleniewska, K., O'Neal, J. F., Ji, S., Blackwell, T. S., Peebles, R. S. (2007). Prostaglandin I₂ analogs inhibit proinflammatory cytokine production and T cell stimulatory function of dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 178(2), 702–10.