



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE FACTORES DE
RESISTENCIA DEL BOVINO PARA SU USO EN EL CONTROL
DE LA MOSCA DE LOS CUERNOS**

Dr. Martín Breijo Dotta, MSc.

TESIS DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2017



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE FACTORES DE
RESISTENCIA DEL BOVINO PARA SU USO EN EL CONTROL
DE LA MOSCA DE LOS CUERNOS**

Dr. Martín Breijo Dotta, MSc.

Ana Meikle, DMV. MSc. PhD.

Directora de Tesis

2017

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**Prof. Andrés Gil
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay**

**Prof. Gonzalo Suarez
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República – Uruguay**

**Prof. Otto Pritsch
Instituto Pasteur Montevideo
Universidad de la República – Uruguay**

2017

FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS
DE DOCTORADO EN SALUD ANIMAL

“Identificación y evaluación de factores de resistencia del bovino
para su uso en el control de la Mosca de los Cuernos”

Por: Mag. Martín BREIJO DOTTA

Directora de Tesis: Dra. Ana Meikle

Tribunal

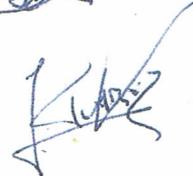
Presidente: Dr. Andrés Gil



Segundo Miembro: Dr. Otto Pritsch



Tercer Miembro: Dr. Gonzalo Suárez



Fallo del Tribunal:

APROBADA CON MENCIÓN

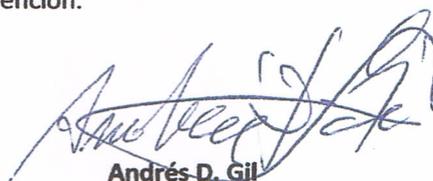
Anfiteatro de Anatomía, 3 de agosto de 2017

La Tesis defendida el día tres de agosto del año dos mil diecisiete por el Dr. Martín Breijo, la cual se titula "*Identificación y Evaluación de factores de resistencia del bovino para su uso en el control de la mosca de los cuernos*", analiza distintos aspectos vinculados a la problemática parasitaria originada por *Haematobia irritans*.

En su conjunto el desarrollo de la tesis demuestra ser sólida en su planificación, ejecución y redacción final. Asimismo, mantiene una coherencia lógica en la línea de tiempo, lo cual demuestra una continuidad entre las conclusiones de un experimento y las hipótesis del siguiente. El documento escrito refleja una correcta exposición de una metodología apropiada y aplicable en la evaluación de las diferentes variables en estudio.

Los resultados obtenidos son novedosos y generan una contribución científica original, la cuál es de rápida aplicación en el desarrollo de metodologías de identificación y evaluación de factores relacionados a la resistencia del bovino a *Haematobia irritans*. Deja sentadas las bases para nuevas investigaciones y próximos desarrollos en el campo de la búsqueda de alternativas inmunológicas (vacunas) que contribuyan a la problemática de la parasitosis. En términos de escritura del documento, el mismo es conciso y preciso. La estructura planteada es acorde al formato de presentación, en donde cada capítulo es respaldado por su correspondiente publicación. En síntesis, la tesis incluye cuatro trabajos de investigación como primer autor (2013; 2016; 2017 y un manuscrito en preparación) en revistas indexadas (Factor impacto en el rango de 1.809 – 1.824). La exposición se ajustó a los tiempos pautados, siendo la misma clara, tanto en los recursos visuales como expositivos. El estudiante respondió con solvencia a las preguntas del tribunal e hizo referencia en cada instancia a las principales hipótesis y conclusiones alcanzadas.

En suma, el tribunal en forma unánime, considera que el Dr. Martín Breijo ha realizado un excelente trabajo de Tesis Doctoral y por lo anteriormente expresado se le otorga la calificación de Aprobado con mención.



Andrés D. Gil

Presidente del Tribunal



“El nivel de la solución nunca está a nivel del problema”

Deepak Chopra

*“La ciencia no sólo es una disciplina de la razón, sino también del
romance y de la pasión”*

Stephen Hawking

Agradecimientos

Este trabajo es el cierre de un camino que empezó hace mucho tiempo, subido al estribo de un tubo de ganado junto a un pequeño grupo de estudiantes de Facultad de Veterinaria. Algunos de ellos quizá ya no recuerden que fueron quienes ayudaron a encender el motor que culmina con este trabajo. Quiero agradecer especialmente a Valeria Anastasia, Mariana Balducci con quienes iniciamos el camino de entender el manejo y la biología de la moscas de los cuernos. En los cruces de camino fuimos encontrando investigadores muy valiosos que hicieron aportes significativos al desarrollo de este trabajo. Entre ellos quiero agradecer a Cecilia Fernández, Lucía Pastro, Carmen Bolatto y Anderson Sa Nunes. Por otra parte, agradezco mucho el apoyo invaluable de dos guerreros en el trabajo de campo y laboratorio como lo fueron Sergio “Gabriel” Rocha y Ximena Ures con quienes caminamos juntos hasta el final de este trabajo. Agradezco al INIA 33, especialmente a Walter Ayala que junto a Gimena Brito me brindaron todo su apoyo para el desarrollo de parte de los trabajos de campo.

Un párrafo especial se lo dedico a mi tutora y amiga Ana Meikle, para decirle que es gracias a ella, que este trabajo llega a su finalización. Su guía inteligente, su capacidad de priorización, su metodología científica, su presencia y su fuerza cada vez que las energías disponibles decaían, hicieron de un camino difícil, un camino transitable con una cinta esperando al final de la meta.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros de URBE, Medicina (Mariela, Marcelo, Federico, Pablo y Luis) y de Técnicas Nucleares, Veterinaria (Victoria, Gretel, Isabel, Claudia) por ayudarme y compartir momentos que son parte de este trabajo.

Finalmente, quiero decir que este trabajo también es gracias a mi esposa Paula y a mi familia Breijo Pessina, con quienes trabajamos juntos para que nuestros hijos vean que del trabajo y del esfuerzo siempre salen las mejores cosas.

Artículos I a IV

La presente Tesis está basada en los siguientes artículos, a los cuales se referirá en el texto por su numeración romana (I-IV):

- I. Breijo, M., S. Rocha, X. Ures, G. Pedrana, P. Alonzo, and A Meikle. 2013. Accessibility of blood affects the attractiveness of cattle to horn flies. *Med. Vet. Entomol.* 3414: 1–6
- II. Breijo, M., L. Pastro, S. Rocha, X. Ures, P. Alonzo, M. Santos, C. Bolatto, C. Fernández, and A. Meikle. 2016. A Natural Cattle Immune Response Against Horn Fly (Diptera: Muscidae) Salivary Antigens May Regulate Parasite Blood Intake. *J. Econ. Entomol.* 109: 1–6.
- III. Breijo, M., S. Rocha, X. Ures, L. Pastro, P. Alonzo, C. Fernández, and A. Meikle. 2017. Evaluation of Hematobin as a Vaccine Candidate to Control *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) Loads in Cattle. *J. Econ. Entomol.* 110: 1390–1393.
- IV. Breijo, M., A. Meikle, B. Bizarro; E. Esteves; S. Rocha, X. Ures, G. Brito, W. Ayala, L. Pastro, C. Fernández and A. Sa Nunes. An insight on the functionality of two novel *H. irritans* salivary antigens: Hematobin and Irritans 5 (IT5). Assessment of IT5 as vaccine candidate to control loads in cattle. Manuscrito en preparación.

Los *Artículos I, II, III*, se reproducen con el permiso de la revista correspondiente.

Índice

Introducción, 1

Hipótesis, 7

Objetivos, 7

Objetivo general, 7

Objetivos específicos, 7

Materiales y Métodos, 8

Diseños experimentales, 8

Determinación de las cargas de moscas, 10

Determinación del contenido de hemoglobina de las moscas, 11

Determinación del espesor de epitelio de bovinos, 11

Producción de HTB y IT5 recombinante, 12

Determinación de anticuerpos anti HTA y anti IT5 por ELISA, 12

Determinación de nitritos y citoquinas en sobrenadante de cultivo de macrófagos, 13

Determinación semi-cuantitativa de óxido nítrico sintetasa (iNOS) inducible en macrófagos tratados con IT5 y HTB, 14

Evaluación de los efectos de las proteínas HTB o IT5 sobre la proliferación de linfocitos, 14

Análisis estadísticos, 15

Resultados principales, 16

Discusión general, 27

Conclusiones, 34

Referencias, 35

Anexos, 41

Resumen

La mosca de los cuernos, *Haematobia irritans* es un díptero hematófago de distribución mundial que afecta al ganado bovino generando pérdidas en la ganancia de peso, en la producción lechera y en la calidad de los cueros obtenidos. El control de este parásito se ejerce principalmente en base al uso de insecticidas, lo que ha llevado al desarrollo de resistencia disminuyendo la eficiencia de los sistemas de control. En la búsqueda de nuevas herramientas de control del parásito, en la presente tesis nos abocamos a explorar posibles mecanismos de resistencia innata o adaptativa del bovino a las moscas de los cuernos. En el **artículo I**, demostramos que la carga de las moscas está relacionada –al menos en parte- con la facilidad de acceso que éstas tienen al alimento. El mayor número de moscas observadas en bovinos oscuros se asoció a un mayor consumo de sangre de las moscas que los parasitaban y a un espesor de epitelio más fino. En el **artículo II**, se caracterizaron las variaciones estivales de la carga de mosca y el consumo de hemoglobina y se presentaron evidencias de que el bovino podría regular el consumo de sangre y la oferta de moscas en el rodeo a partir de la generación de respuestas inmunes adaptativas dirigidas contra diferentes antígenos salivales. En los **artículos III y IV**, los ensayos de vacunación a campo con Hematobina (HTB) e Irritina 5 (IT5) (dos antígenos salivales de *H. Irritans*), mostraron reducciones de las cargas de moscas de 30% y 20% respectivamente, confirmando que la vacunación puede ser una herramienta potencial de control. Finalmente en el **artículo IV**, se exploró la capacidad de las proteínas recombinantes HTB e IT5 de modular el sistema inmune del hospedador, utilizando macrófagos y linfocitos murinos y se demostró que ambos antígenos son capaces de controlar la producción de óxido nítrico y de interleuquinas. En la presente tesis se demuestra que el bovino cuenta con recursos innatos y adaptativos para la regulación de las cargas parasitarias de las moscas de los cuernos y que la inducción de respuestas inmunes contra antígenos salivales podría ser una herramienta alternativa de control.

Summary

The horn fly, *Haematobia irritans* is a blood sucking diptera of worldwide distribution that affects bovines provoking loss of body weight, milk production and leather quality. The control of this parasite is mainly based in insecticides; this has induced drug resistance, decreasing in this manner the efficiency of the control. With the aim of searching new strategies to control this parasite, in the present thesis we explore mechanisms of innate or adaptative resistance to the horn fly. In **article I**, we demonstrated that fly load is associated –at least in part- to accessibility to blood intake. A greater fly load was found in dark bovines which was associated with a greater fly blood intake and a thinner epithelium. In **article II**, variations in fly loads and hemoglobin intake were characterized during the fly season and immune responses to different salival antigens were observed. In **articles III** and **IV**, vaccination field trials with Hematobin (HTB) and Irritin 5 (IT5) (two salival antigens of *H. Irritans*), achieved reductions of 30% and 20% of fly loads respectively, confirming that vaccination can be an alternative tool for the control of *Haematobia irritans*. Finally, in **article IV**, the capacity of recombinant proteins HTB and IT5 to modulate the immune system by using murine macrophages and lymphocytes was tested. Both antigens were able to regulate the production of nitric oxide and interleukin secretion. In the present thesis we demonstrated that the bovine has innate and adaptative resources to regulate the load of horn fly and that the induction of immune responses to salival antigens could be an alternative to fly horn control.

Abreviaciones

AIF: Adyuvante incompleto de Freund

HTB: Hematobina

IFN γ : Interferón gamma

IL6: Interleuquina 6

IL10: Interleuquina 10

IL12: Interleuquina 12

IT5: Irritina 5

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

LPS: Lipopolisacárido

NO: Óxido nítrico

PVDF: Polyvinylidene fluoride

rHTB: Hematobina recombinante

rIT5: Irritina 5 recombinante

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

Introducción

La mosca de los cuernos, *Haematobia irritans* (Linnaeus 1758) es un díptero hematófago que afecta principalmente al ganado bovino, originaria de Europa y 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 y 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.

Las moscas miden de 3 a 5 mm, tienen un cuerpo de color grisáceo o negro y se caracterizan por tener una importante probóscide picadora/chupadora. Las moscas de los cuernos recibieron este nombre debido a su hábito de agruparse alrededor de los cuernos del ganado, aunque prefieren generalmente colocarse en el lomo de los bovinos en los períodos más frescos del día y en el vientre de los mismos durante las horas más cálidas. 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 de *H.irritans* es entre 3 y 7 semanas (Butler 1999) y transcurre principalmente sobre el cuerpo del animal. La hembra adulta inicia la oviposición depositando racimos que contienen entre 3-14 huevos en las materias fecales frescas de los bovinos y repitiéndolo 3-4 veces durante los 10 minutos que dura el período de postura, alcanzando de 200 a 400 huevos en su vida reproductiva (Wilkerson 1974). 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. 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 y Combs 1971, Lysyk y Moon 1994).

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 (Campbell 1976, Haufe 1982, Kinzer et al. 1984, Guglielmone et al. 1999). Los bovinos de raza Holando expuestos a cargas superiores a las 500 moscas incrementaron el tiempo que permanecieron de pie, pastorearon menos, caminaron más y movieron sus colas más frecuentemente (Savio et al. 1976, Harvey y Launchbaugh 1982). 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). Torres et al. (1993) definieron las lesiones epiteliales como pequeños cráteres o pozos en las áreas donde la mosca se alimenta. 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; bajas cargas de moscas son suficientes para generar cambios significativos en el cuero (Guglielmone et al. 1999). Además, varios autores han analizado los riesgos de transmisión de patógenos como consecuencia de las infestaciones por *H. irritans*. Es transmisor de *Stephanofilaria stilesi*, un nemátode presente en América del Norte y Asia, que afecta principalmente la dermis de los bovinos (Hibler 1966). Buxton et al. (1985) demostró que son suficientes 100 probóscides de *H. irritans* alimentadas de bovinos con Leucosis Bovina, para inducir la seroconversión de ovejas y terneros negativos a la enfermedad. En Uruguay, se ha diagnosticado la presencia del virus de la Leucosis Bovina en moscas que estaban parasitando bovinos seropositivos a la enfermedad (García y Herrera 2016).

Basados en datos experimentales se han establecido umbrales de cargas parasitarias por encima de los cuales se recomienda la implementación de medidas de control para la mosca de los cuernos. El ganado lechero y sus terneros son los más sensibles a la presencia de moscas, sugiriendo medidas de control con cargas superiores a las 50 moscas, mientras el ganado de carne pueden tolerar hasta 200 moscas por animal sin afectar su performance productiva (Schreiber y Campbell 1986, Hogsette et al.

1991). 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. 2002). 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). Se han reportado casos de resistencia a piretroides, organofosforados y lactonas macrocíclicas en diferentes poblaciones de *H. irritans* en el mundo (Barros et al. 2013, Domingues et al. 2014). La aparición de resistencia al control químico y la dificultad en el desarrollo de nuevas moléculas con efecto insecticida, ha disparado la búsqueda de metodologías alternativas de control parasitario. Dentro de las estrategias posibles se ha explorado con diferentes grados de éxito, el uso de trampas mecánicas (Watson et al. 2002), controladores biológicos (Holderman et al. 2017), la selección de animales resistentes y/o el desarrollo de vacunas (Tozer y Sutherst 1996, Cupp et al. 2004). Las trampas mecánicas son una forma de control no químico, basadas en el diseño de dispositivos de paso por donde circula el ganado y donde quedan atrapados los insectos. Estos dispositivos han demostrado reducir hasta un 80% las cargas de moscas que afectan el ganado (Watson et al. 2002). Ensayos recientes realizados en la estación de INIA la Estanzuela, Colonia, Uruguay, mostraron una efectividad similar en el control de las moscas (Miraballes et al. 2017). Además, se han ensayado diferentes predadores naturales, patógenos y competidores de la mosca de los cuernos como controladores de estadios larvarios o adultos como escarabajos de la familia *Staphylinidae* y *Histeridae* (Hu y Frank 1996, Oyarzún et al. 2008) y hongos entomopatógenos (Sahagun et al. 2005). Sin embargo, estas metodologías son difíciles de instrumentar debido a dificultades asociadas a la siembra de estos controladores sobre las heces bovinas que están dispersas en los establecimientos y/o a la ruptura de equilibrios ecológicos o efectos secundarios asociados al uso de estos agentes biológicos.

La selección de animales resistentes como alternativa de control de las cargas parasitarias ha sido poco estudiada. Sin embargo, la carga de *H. irritans* en animales de un mismo rodeo no se distribuye homogéneamente (Pruett et al. 2003). Varios factores se han asociado a esta atracción diferencial de los insectos por sus hospederos. Por ejemplo, existe una relación positiva entre la condición corporal de los animales con la cantidad de moscas que lo parasitan (Castro 2003). Los animales

de color oscuro atraen mayor número de moscas que los claros y los machos son más atractivos para las moscas que las hembras (Franks et al. 1963, Rodríguez-Gallegos y Acosta-Rodríguez 2011). Se ha reportado que los bovinos con una piel con mayor densidad de pelos y un mayor componente graso atraen menos moscas (Steelman et al. 1997). En suma, la información disponible permite aseverar que hay animales menos susceptibles a *H. irritans* que otros. Sin embargo, es necesario conocer con mayor profundidad cuales son las verdaderas bases de esta resistencia diferencial. Sólo así, se podrán diseñar estrategias de control basadas en la selección de animales resistentes.

Un mecanismo de resistencia alternativo podría estar vinculado a la capacidad del bovino de regular la presencia de la mosca de los cuernos mediante una respuesta inmune adaptativa contra antígenos de la mosca. Se ha reportado que existen variaciones en la carga parasitaria de los bovinos a lo largo del año (Guglielmone et al. 2002, 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 y 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. El estudio de la respuesta inmune natural del bovino a las moscas y el desarrollo de vacunas experimentales podría ayudar a confirmar estas sugerencias.

El desarrollo de vacunas se ha visto favorecido gracias a la existencia de nuevas herramientas moleculares, que permiten secuenciar genomas y realizar a través de técnicas bioinformáticas la búsqueda de moléculas candidatas (Lew-Tabor y Rodríguez Valle 2016). Hasta la fecha son escasas las vacunas comerciales contra parásitos hematófagos que utilizan tecnologías moleculares. Sin embargo, existen presentaciones de vacunas contra *Rhipicephalus microplus* (Gavac, CIGB, Cuba &

Tickgard, Intervet, Australia), que utilizan proteínas recombinantes que fueron obtenidas a partir de secuencias presentes en células de intestino. Particularmente, en la mosca de los cuernos, el desarrollo de vacunas comerciales parece ser una aspiración un poco más lejana, desde el momento que son muy pocas las moléculas de *H. irritans* que han sido identificadas. Thrombostasin (molécula con actividad anticoagulante) es la única molécula descrita, que es secretada por la saliva de *H. irritans* (Zhang et al. 2002). Esta ha sido evaluada como candidato de vacuna y se ha visto que terneros inmunizados con Thrombostasin son capaces de inducir una respuesta inmune capaz de reducir el consumo de alimento de las moscas (Cupp et al. 2010). Estos resultados abren la puerta a una posible utilidad del uso de antígenos salivales para el control de la mosca de los cuernos. En este sentido, debemos considerar que 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 y De Oliveira 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).

Los parásitos hematófagos para alimentarse de sus hospedadores enfrentan dos grandes desafíos, el primero asociado a las barreras hemostáticas representadas por plaquetas, factores de coagulación y tono vascular. Para contrarrestar dichos mecanismos existen en la saliva de éstos parásitos, una variedad de anticoagulantes, anti agregantes plaquetarios y vasodilatadores (Sá-Nunes y De Oliveira 2011). El segundo desafío es controlar el sistema inmune del hospedador que se activa una vez que el aparato bucal del parásito quiebra la barrera epitelial. Dependiendo del tipo de relación parásito hospedador en la saliva de parásitos hematófagos se han reportado moléculas con actividad de unión a citoquinas, inmunoglobulinas, inhibidores de moléculas de adhesión o moléculas que participan en la señalización celular (Sá-Nunes y De Oliveira 2011).

Tal como mencionamos anteriormente, Thrombostasin era la única molécula descrita en la saliva de *H. irritans* la cual presenta actividades anticoagulantes (Cupp

et al. 2004). Recientemente, nuestro grupo de trabajo, a partir de la realización de un sialotranscriptoma identificó dos nuevos componentes salivales de la mosca de los cuernos los cuales están registrados en el Genebank como Hematobina (HTB, KP185122) e Irritina 5 (IT5, KU991662). HTB es un supuesto parálogo (cerca de un 40% de identidad global) de una proteína de *Stomoxys calcitrans*, que exhibe similitudes con proteínas de la familia HYP 16 que han sido encontradas en sialotranscriptomas de mosquitos (Wang et al. 2009). Aun cuando las propiedades biológicas se mantienen desconocidas, las proteínas de la familia HYP 16 tienen la capacidad de secuestrar agonistas de la inflamación (Calvo et al. 2006). La secuencia de HTB codifica un polipéptido que cuando es secretado tiene un peso de 12.3 kDa. IT5 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas denominada Ag5 que está presente en la saliva de mosquitos, garrapatas y animales venenosos (Assumpção et al. 2013). El peso molecular de IT5 es 26 kDa y tiene un 80% de homología con Ag5 de *Stomoxys calcitrans* (Wang 2009). La función de IT5 es desconocida aunque se sabe que Ag5 de *S. calcitrans* tiene propiedades de unión a inmunoglobulinas (Ameri et al. 2008). El estudio del potencial farmacológico de estas moléculas puede ser de utilidad tanto para la evaluación de su potencial como candidatos para vacunas como para evaluar su aplicación en medicina humana o veterinaria.

En el presente trabajo de tesis, se pretende explorar estrategias alternativas de control de la mosca de los cuernos, focalizando especialmente en investigar metodologías vinculadas al manejo de las capacidades del hospedador de controlar las cargas parasitarias. Para ello estudiaremos con mayor profundidad las interacciones entre *H. irritans* y el bovino, buscando entender las bases de los mecanismos de resistencia no inmunológicos del ganado a las infestaciones con mosca de los cuernos, así como la existencia de mecanismos de resistencia inmunológicos capaces de incrementar la resistencia natural de los animales a esta mosca hematófaga. La manipulación de los mecanismos naturales o adquiridos de resistencia parasitaria, podría apoyar la batería de metodologías disponibles, tendientes al diseño de programas de control de las moscas de los cuernos, con costos bajos e impactos reducidos sobre el medioambiente.

Hipótesis

Existen mecanismos de resistencia innatos o adquiridos del hospedador a la mosca de los cuernos y estos están asociados a su capacidad de regular el consumo de sangre de *H. irritans*. Por otra parte, es posible potenciar dicha resistencia natural, diseñando vacunas contra antígenos secretados por la saliva de la mosca que poseen potencial farmacológico y utilizarlas como herramienta de control.

Objetivos

Objetivo General

Identificar mecanismos de resistencia innata o adquirida del bovino a la mosca de los cuernos. Contribuir al desarrollo de estrategias para reducir las cargas parasitarias de *H. irritans*.

Objetivos específicos

- I. Identificar y evaluar factores innatos de resistencia de bovinos a la mosca de los cuernos (**artículo I**).
- II. Identificar y evaluar respuestas adaptativas de bovinos naturalmente parasitados capaces de regular las cargas parasitarias (**artículo II**).
- III. Evaluación de vacunas experimentales construidas a partir de antígenos de la saliva de la mosca de los cuernos (**artículos III y IV**).
- IV. Explorar el potencial farmacológico de antígenos salivales sobre células del sistema inmune del hospedador (**artículo IV**).

Materiales y Métodos

Los ensayos con bovinos 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) y en el campo Villa Sara, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Treinta y Tres, Uruguay (33° 15' S, 54° 25' W). Los ensayos con ratones fueron realizados en el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de San Pablo, Brasil. Todos los protocolos donde se utilizaron animales vertebrados fueron previamente aprobados por las Comisiones de Ética en el Uso de Animales de Experimentación (CEUAs) correspondientes de la UdelaR (Exp. 071140-000611-10); del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Treinta y Tres, Uruguay (Exp. 010153-000527-16) y del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de San Pablo.

Diseños experimentales

a) Ensayos *in vivo*

Artículo I

Con el fin de identificar factores innatos de resistencia de los bovinos a la mosca de los cuernos (**objetivo específico I**), se seleccionaron 30 bovinos de biotipo carnívoros, cruza de las razas Hereford, Aberdeen Angus y Limousin. Los animales fueron clasificados según su sexo y color de manto en: machos de color oscuro, machos de color claro, hembras de color oscuro y hembras de color claro. A los mismos se les realizó semanalmente por el término de 4 semanas, el conteo del número de moscas/ animal, la determinación del contenido de hemoglobina de las moscas. A un total de 12 bovinos pertenecientes al grupo inicial (6 machos y 6 hembras), se les realizó una biopsia de piel en la parrilla costal, para la posterior determinación del espesor del epitelio de los bovinos.

Con el fin de aportar más información, al **objetivo específico I**, se seleccionaron 7 bovinos cruza Hereford, machos y de pelaje oscuro, con un peso entre 389-493 kg. A los mismos se le registró la carga de moscas durante la estación estival en 9

oportunidades cada 10 días y se le realizó una biopsia de piel al final de las determinaciones. Estos datos no han sido publicados.

Artículo II

Con el fin de identificar y evaluar respuestas adaptativas de bovinos naturalmente capaces de regular las cargas parasitarias (**objetivo específico II**), se utilizaron 15 bovinos cruza de Hereford, Aberdeen Angus y Limousin. Se registró la carga de *H.irritans*, la concentración de hemoglobina por mosca y el título de anticuerpos séricos anti HTB y IT5 durante la estación estival (Diciembre - Marzo). El sangrado de los animales se realizó mediante punción de la vena coccígea.

Artículos III y IV

Con el fin de evaluar vacunas experimentales construidas a partir de antígenos salivales (**objetivo específico III**), se realizaron dos ensayos independientes.

Para la evaluación de HTB como inmunógeno se utilizaron 8 bovinos machos, cruza Hereford Angus de pelaje oscuro, de 24- 36 meses de edad, con un peso entre 243 y 375 kg. Los animales fueron manejados en un potrero de 15 hectáreas con pastura y agua *ad libitum*. Antes del ensayo todos los animales fueron identificados con caravanas, pesados y asignados en forma aleatoria a uno de los siguientes grupos: vacunado (n=4) y control (n=4). El grupo vacunado recibió dos dosis de 1ml de 100µg de HTB emulsificada con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF, Sigma) separadas por 4 semanas (semanas 0 y 4). Este ensayo se inició en el mes de diciembre, cuando las *H.irritans* ya estaban presentes en el rodeo. El grupo control recibió 1 ml de agua destilada emulsificada en AIF. Las cargas parasitarias y el contenido de hemoglobina de las moscas fue registrada semanalmente por 15 semanas. Los títulos de anticuerpos específicos anti HTB en el grupo vacunado y control fueron determinados en el suero de los animales la semana 0 y 6 (15 días posteriores a la segunda dosis de vacuna).

La evaluación de IT5 como inmunógeno fue realizada durante el período de mayor concentración de moscas en el rodeo (entre noviembre y enero). El esquema de vacunación (dos dosis separadas de 30 días) fue realizado en los meses de setiembre y octubre, de manera tal que todos los animales estuvieran inmunizados antes de la presencia del mayor pico de moscas en el rodeo. En esta oportunidad se utilizaron 24

bovinos cruce Hereford Angus, de pelaje oscuro, de 36 meses de edad pesando entre 278 y 449 kg. Los animales fueron alojados juntos en un predio de 30 hectáreas con agua y forraje *ad libitum*. Los animales fueron previamente identificados con caravanas, pesados y asignados aleatoriamente en dos grupos: vacunado (n=12) y control (n=12). Los animales vacunados recibieron 100µg de IT5 por vía subcutánea en AIF, mientras que el grupo control recibió agua destilada en AIF. Cada 15 días se realizó el registro de cargas parasitarias y el consumo de hemoglobina de las moscas. Por otra parte, se obtuvieron muestras de suero de animales vacunados y controles cada 15 días para la determinación del título de anticuerpos anti IT5.

b) Ensayos *in vitro*

Artículo IV

Para explorar el potencial farmacológico de las proteínas de la saliva de la mosca de los cuernos sobre células del sistema inmune del hospedador (**objetivo específico IV**), ratones Balb/cJ machos de siete semanas de edad fueron inyectados por vía intraperitoneal con 1mL de una solución estéril de Thioglycolato (BD Pharmigen, USA). Luego de 4 días, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los macrófagos fueron obtenidos a través de un lavado peritoneal con RPMI, con 10% de suero fetal bovino (FBS, Sigma) y 1% de ampicilina (BD Pharmigen, USA). Los macrófagos obtenidos fueron sembrados en placas e incubados con diferentes concentraciones de IT5 o HTB (125 a 1000nM) y estimulados con una mezcla de 10ng/mL de LPS (Sigma, Suiza) y 10 ng/mL de IFN γ (BD Pharmigen, USA). Luego de una incubación a 37°C por 48 hs, se evaluó la producción de óxido nítrico (NO) y la producción de citoquinas (IL6, IL10, IL12, y TNF α) en el sobrenadante del medio.

Determinación de las cargas de las moscas

La determinación de la carga de moscas por animal se realizó a través de la toma de fotos digitales que cubrieron el dorso y los laterales del bovino, desde la base de la cabeza a la base de la cola. Esta determinación se realizó entre las 7.00 y las 10.30 horas momento en el cual la mayoría de las moscas se encuentran en el dorso del

animal. En el laboratorio, el número de moscas por animal se contó utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, USA.)

Determinación del contenido de hemoglobina de las moscas

Una porción de moscas presentes en cada bovino 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 que fueron colocadas 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, España), se agitó e incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. La suspensión fue 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, Argentina). Como blanco se utilizaron moscas cultivadas *in vitro* alimentadas con una solución de glucosa al 10%. Con esta metodología se obtuvo 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 los bovinos

Las biopsias de piel de los bovinos fueron tomadas del lado izquierdo de la región dorsal del tórax (área donde normalmente se concentra la mayor cantidad de moscas). Para ello, se seleccionó una región de 10 cm² la cual fue previamente depilada. Se realizó una anestesia regional con lidocaína al 2% para luego proceder a la extracción de una muestra de piel rectangular de 2 cm por 1 cm, por 0,3 cm de profundidad. Estas muestras fueron inmediatamente fijadas en formol al 4%, para luego ser incluidas en parafina. El análisis histológico se realizó a través de cortes histológicos de 7 µm de espesor que fueron teñidos con hematoxilina y eosina. De cada corte obtenido, se tomaron 20 fotos a 40 aumentos, y en cada foto se realizaron

5 determinaciones del grosor de epitelio que fue estimado utilizando el software Image J (National Institutes of Health, USA).

Producción de HTB y IT5 recombinante

Las secuencias codificantes para la HTB y IT5 madura (sin el péptido señal) se clonaron en un vector de expresión de la serie pQE (pQE-30, QUIAGEN) utilizando protocolos convencionales. En este sistema, la proteína 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 el método Bradford (BioRad). Para evaluar la similitud antigénica entre las proteínas recombinantes (rHTB y rIT5) y sus correspondientes moléculas nativas presentes en la saliva de *H.irritans*, se produjeron antisueros en conejos contra las recombinantes y contra extracto de glándula salival. Estos antisueros fueron evaluados por inmunoblott contra las proteínas recombinantes y contra el extracto de glándula salival confirmando la similitud antigénica entre ellas (datos no mostrados).

Determinación de anticuerpos anti HTA y anti IT5 por ELISA

Las placas de ELISA (Greiner Bio-one, Germany) fueron sensibilizadas con 100µl por pozo de una solución de 1 µg/ml de rHTB o rIT5 en PBS (0.01 M, pH 7.4) a 4°C durante la noche. Las placas fueron bloqueadas con PBS con un 1% de proteína de soja (PBS-S) durante 45 minutos a 37°C. Luego se adicionaron las muestras de suero y los controles (1/1000 a 1/64000) diluidas en una solución conteniendo PBS-S y 0.05% de Tween-20) las cuales se incubaron por 45 minutos a 37°C. Un pool de sueros bovinos con altos títulos fue utilizado como control positivo y el suero de un bovino no expuesto a la mosca de los cuernos como control negativo. Luego se lavaron las placas con una solución de PBS 0,05% de Tween-20 y se procedió a la

incubación de una anti IgG bovina conjugada a peroxidasa (Sigma, Suiza) diluida 1/10000 en PBS-S –Twen 20 durante 45 minutos a 37°C. Finalmente, luego de lavar la placa tal como se describió previamente se procedió al agregado del sustrato tetramethylbenzidina (TMB; Sigma) y H₂O₂ (100 µl/pozo). La reacción colorimétrica se midió a 450nm en un lector de ELISA (Multiskan EX, Thermo, China). Los niveles de anticuerpos se expresaron en unidades arbitrarias (UA/ml) determinados en función de la curva estándar.

Determinación de nitritos y citoquinas en sobrenadante de cultivo de macrófagos.

Luego de obtenido el sobrenadante del cultivo de macrófagos activados con diferentes tratamientos se procedió a la determinación de la concentración de nitritos en el mismo. Para ello se utilizó el reactivo de Griess (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras y una curva estándar (Promega, USA) se colocaron en placas de 96 hoyos por cuadruplicado a razón de 50µl/pozo. Luego se agregó 50µl de solución de sulfanilamida, se incubó por 10 minutos y se agregó una solución de N-1-naphthylethylenediamina dihydrochloride. Finalmente, luego de una nueva incubación de 30 minutos, el desarrollo de color se determinó a 520 nm en un lector de ELISA (Thermo, China).

Por otra parte, la determinación de las concentraciones de citoquinas (TNF α , IL6, IL10, IL12) en el sobrenadante de los cultivos se realizó con kits de ELISA comerciales (BD Pharmingen, USA). Brevemente, primero se sensibilizaron las placas Nunc Maxisorb™ con la correspondiente anti-citoquina purificada durante la noche a 4°C, luego se agregó una solución de bloqueo de la placa y se incubó a 37°C por una hora. Posteriormente se lavaron las placas 3 veces con una solución PBS-Tween y se agregaron las muestras (cuadruplicado) y el estándar (triplicado) diluidos en solución de bloqueo a razón de 100µl por pozo. Se incubaron por 2 horas a 37°C, se volvió a lavar las placas 3 veces con PBS-Tween y se agregó 100µl/pozo de una anti citoquina conjugada a Biotina por una hora a 37°C. Luego de los correspondientes lavados, se agregó Streptavidina conjugada a peroxidasa y se incubó por 1 hora a 37°C. Luego de los lavados finales, se agregó el sustrato TMB con 3% de H₂O₂. El desarrollo de color se midió a 405nm en un lector de ELISA (Thermo, China).

Determinación semi-cuantitativa de óxido nítrico sintetasa (iNOS) inducible en macrófagos tratados con IT5 y HTB

Se estimularon macrófagos peritoneales murinos con una combinación de LPS y $INF\gamma$ y se incubaron con 1 μ g de HTB o IT5 por 48 hs. Posteriormente los macrófagos fueron removidos y un extracto de células fue preparado resuspendiendo las mismas en un buffer de lisis (50mM Tris-HCl, pH 7.5; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 20mM NaF; 0.5% NP-40; and 1% Triton X-100) conteniendo un inhibidor de fosfatasa (Sigma) y un inhibidor de proteasas (GenDEPOT, TX, USA). Al extracto se le determinó la concentración de proteínas mediante un ensayo Bradford. Posteriormente, se realizó una separación electroforética en un gel al 10% de acrilamida y luego el gel fue transferido a una membrana de polyvinylidene fluoride (PVDF). Las membranas de PVDF previamente sensibilizadas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en buffer Tris con un 0,1% de Tween 20 (TBST) por 1 h. Posteriormente fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos anti- iNOS (Abcam, UK) y anti-B actina (Abcam, UK) diluídos 1/1000 en 5% de leche descremada en TBST. Luego de lavar las membranas con TBST, se agregó una dilución 1/5000 en 5% de leche descremada en TBST de anti inmunoglobulina de conejo conjugado a peróxido y se incubó por una hora a 37°C. Luego se lavó nuevamente y se realizó la detección de las bandas de reacción antígeno anticuerpo con el sustrato 3,3' Diaminonezidina (Sigma Aldrich).

Evaluación de los efectos de las proteínas HTB o IT5 sobre la proliferación de linfocitos

Se extrajo el bazo de los ratones Balb/cJ que fueron sacrificados y se preparó una suspensión de células (libre de glóbulos rojos) conteniendo 10⁶ células/mL. Las células fueron divididas en alícuotas de 100 μ l en placas de 96 pozos. Luego 50 μ l de diferentes concentraciones de rIT5 o rHTB (125 a 1000 nM) fueron agregados al cultivo e incubado por 30 minutos. Luego de dicha incubación, se agregó 50 μ l de Concanavalina A por pozo (concentración final 0.5 μ g/pozo) y se incubó por 72 hs a 37°C y 5% de CO₂. La proliferación de linfocitos fue evaluada usando el método de resazurina (Vega y Pugsley 2011). Brevemente, 20 horas antes del final de la

incubación se agregaron 25µl/pozo de una solución de 0,01% de resazurina (Invitrogen, USA). El desarrollo de color fue medido en un lector de microplacas a 530-560 nm (Thermo, China).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS (Sistema de análisis estadístico, SAS institute, Cary, NC, USA). Se realizó un análisis preliminar para identificar valores atípicos y verificar la distribución de los residuales (Proc Univariate, SAS). A aquellas variables que no se ajustaban a una distribución normal se les realizó una transformación logarítmica.

En los ensayos *in vivo*, los estudios de las cargas de moscas, la concentración de hemoglobina y títulos de anticuerpos, se analizaron por un procedimiento mixto (Proc Mixed, SAS) utilizando un modelo que incluyó los efectos del sexo (machos y hembras), el color del manto (claro y oscuro), las observaciones y sus interacciones como efectos fijos, mientras que 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.

En los ensayos *in vitro*, el análisis de las diferencias entre medias de los grupos experimentales fue realizado utilizando el test de Student o el análisis de varianzas (ANOVA) seguido por Tukey como post test (para tres o más grupos). Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

Resultados principales

Objetivo específico I: Identificar y evaluar factores innatos de resistencia de bovinos a la mosca de los cuernos (artículos I y II)

Con el objetivo de identificar factores innatos de resistencia de los bovinos a la mosca de los cuernos, exploramos en primera instancia, si las diferencias de color de manto, el sexo y/o el peso de los animales, estaban asociadas a variaciones en las cargas de moscas que los parasitaban. Se encontró que los animales oscuros presentaron una mayor carga de moscas que los claros (432 ± 34 vs 255 ± 27 moscas por animal, $P<0.0001$; **Figura 1A, artículo I**), mientras que la carga de moscas en los machos fue similar al de las hembras (368 ± 27 vs 319 ± 34 ; $P=0.26$). En un segundo ensayo experimental (**artículo II**) observamos que los animales oscuros nuevamente presentaron más moscas que los de manto claro (291 ± 15 vs 153 ± 12 , $P<0.0001$) y en esta oportunidad los machos presentaron una carga levemente superior al de las hembras (242 ± 12 vs 202 ± 15 , $P<0.05$). En los **artículos I, II, III y IV**, la covariable peso vivo sobre las cargas parasitarias fue significativa. En el **artículo I** se observó que la carga de moscas se incrementó a razón de $2.98 (\pm 0.59)$ moscas por cada kg de peso vivo. La correlación entre peso vivo y carga fue de $r=0.382$, $n=119$, $P<0.0001$.

Al estudiar si la preferencia de los bovinos por determinados fenotipos estaba asociada con el consumo de sangre de las moscas, se encontró que la concentración de hemoglobina fue mayor en bovinos oscuros ($P<0.0001$, **Figura 1C, artículo I**), y no hubo diferencias acorde al sexo (**Figura 1D**). 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 $0.00143 \mu\text{g/ml} (\pm 0.000586)$.

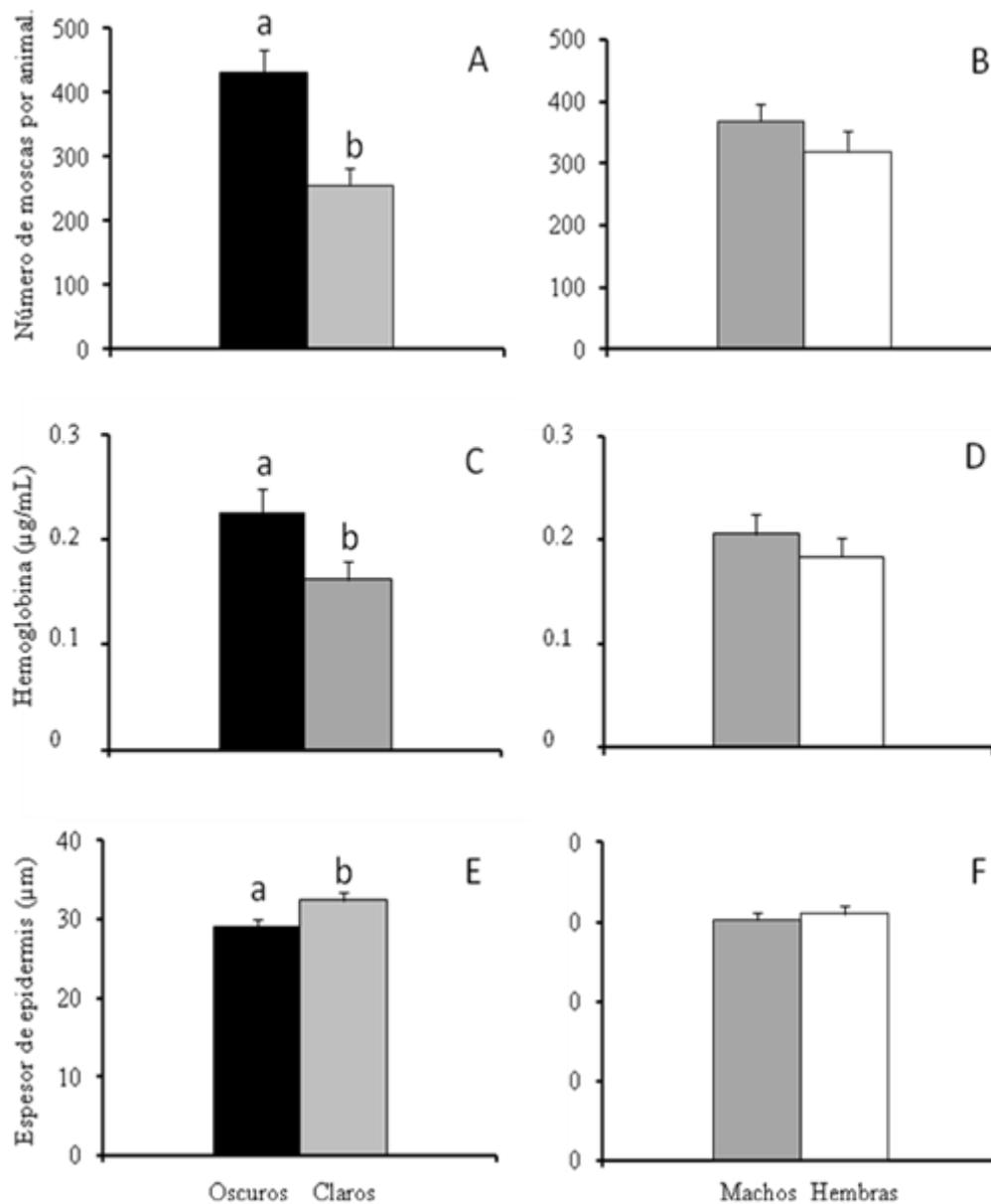


Figura 1. Número de moscas por animal (A, B), hemoglobina / mosca (C, D) y espesor de la epidermis (E, F) de acuerdo a color de manto (A, C, E) y sexo (B, D, F). Letras diferentes dentro del mismo gráfico indican diferencias significativas $P < 0.05$.

Por último, estudiamos si las preferencias de las moscas por determinados fenotipos estaban asociadas a cambios en el espesor de la epidermis de los bovinos. En el **artículo I** observamos que los animales oscuros presentaron un epitelio más fino que los animales claros ($28,9 \pm 1$ vs $32,4 \pm 1$ µm respectivamente) (**Figura 1E**, **Figura**

2 C, D, E, F), y no encontramos diferencias asociadas al sexo. El espesor de la epidermis se incrementó $0.04558 \mu\text{m} (\pm 0.0056)$ por kg de peso vivo.

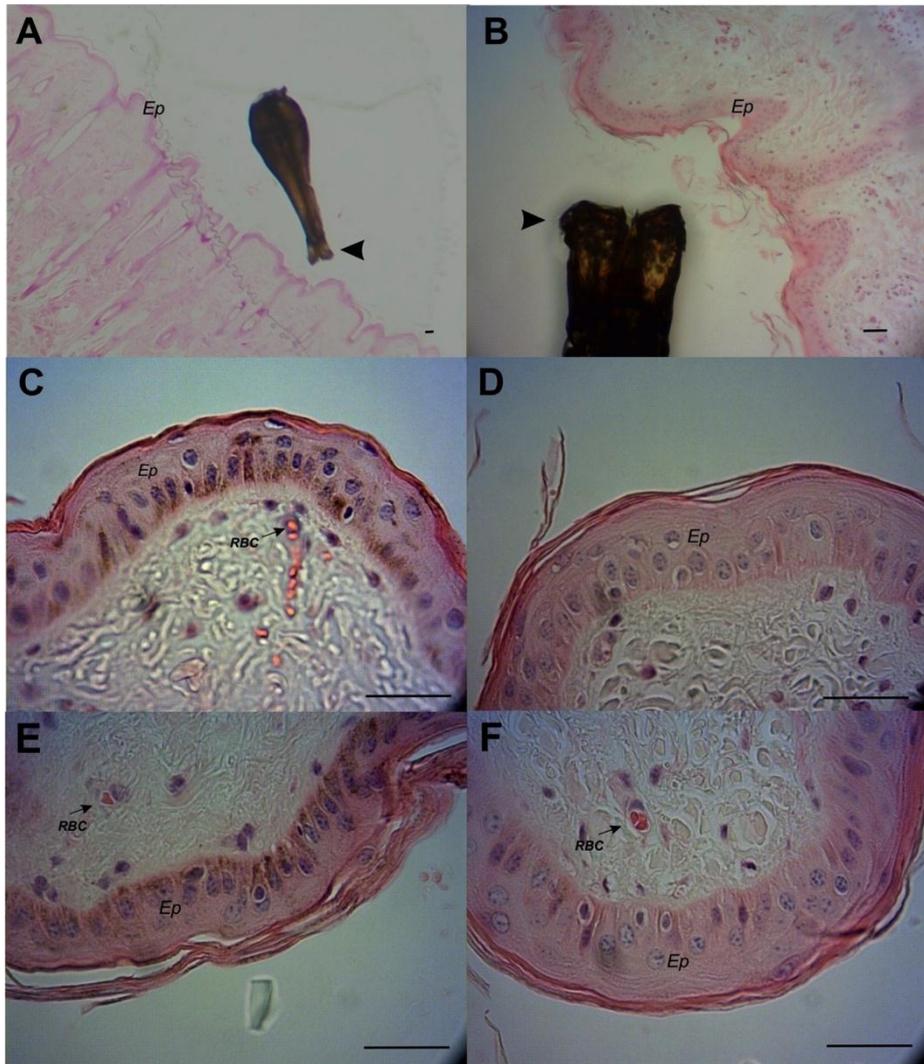


Figura 2. Comparación del tamaño del aparato bucal de *H. irritans* y el espesor de la epidermis del bovino (A,B). Epidermis de macho de color oscuro (C), macho de color claro (D), hembra de color oscuro (E) y hembra de color claro (F). Flecha indica el aparato bucal de *H. irritans*; RBC; glóbulos rojos; Ep, epidermis. Barras equivalen a $50 \mu\text{m}$.

En un experimento independiente (**estos datos no han sido publicados**), utilizando solo machos cruza Hereford de manto oscuro, observamos una correlación negativa entre espesor de epitelio y carga de moscas ($r^2 = -0.11$, $P < 0.0001$). La carga de moscas de los animales fue afectada por el peso vivo ($P = 0.006$) y el espesor de epitelio ($P = 0.0002$). El epitelio nuevamente fue $0,0453 \mu\text{m}$ más grueso por cada kg de peso vivo.

Objetivo específico II. Identificar y evaluar respuestas adaptativas de bovinos naturalmente parasitados capaces de regular las cargas parasitarias (artículo II)

En búsqueda de evidencias experimentales de que el bovino ejerce alguna presión regulatoria sobre las cargas de moscas de los cuernos, se estudió la distribución de las cargas de moscas en el rodeo a lo largo de la estación estival y el consumo de hemoglobina de las moscas en bovinos naturalmente parasitados. Aun cuando las temperaturas medias (máximas y mínimas) no variaron significativamente, las poblaciones de moscas fluctuaron entre las observaciones ($P < 0.0001$, **artículo II**). La mayor carga de moscas se registró a mediados del mes de diciembre (469 ± 37 moscas por animal, semana 3), seguido por fluctuaciones de menor amplitud en los meses de febrero (semana 9) y marzo (semana 12) (**Figura3**).

Todos los picos de moscas fueron de corta duración (1-2 semanas) y fueron seguidos de intervalos de bajas cargas parasitarias (menor a 200 moscas por animal). Este patrón de fluctuaciones, donde existen alternancias entre períodos de alta oferta de moscas, con períodos de bajas cargas de moscas por animal, ha sido confirmado en sucesivos ensayos de campo realizados en el marco de la presente tesis (**artículos II, III, IV y datos no publicados**).

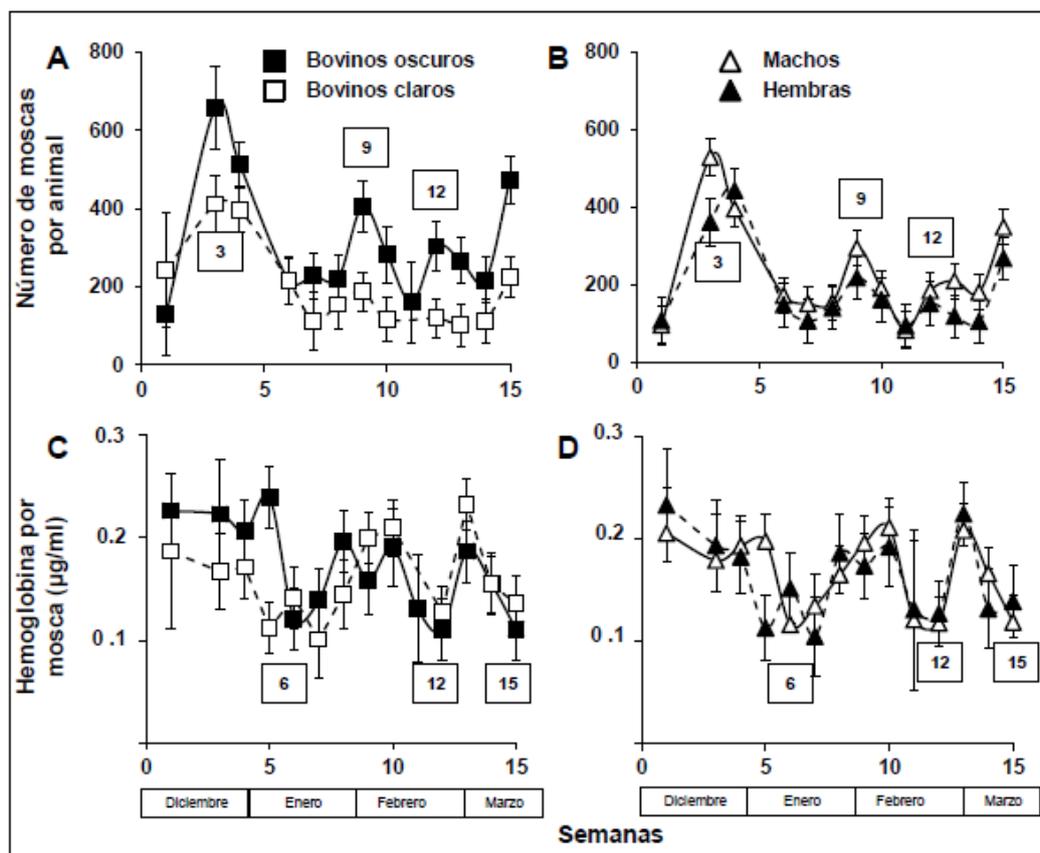


Figura 3. Variaciones en las cargas parasitarias y el consumo de hemoglobina de acuerdo al color de manto o al género. A,C: Bovinos agrupados por color de manto (línea sólida: oscuro; línea punteada: claros). B, D: Bovinos agrupados por género (línea sólida: machos; línea punteada: hembras). Cajas 3, 6, 9, 12 y 15 corresponden a semanas de observación.

El consumo de hemoglobina de las moscas varió a lo largo del ensayo ($P < 0.01$, **artículo II**). Se observó que el consumo de sangre se redujo significativamente luego de pasadas 3 semanas de haber observado un pico de oferta de moscas (**Figura 3 C, D** semanas 6, 12 y 15). Una fluctuación similar en el consumo de hemoglobina se observó en el **artículo 4**, cuando cayó significativamente pocas semanas después del registro del pico de moscas presentes en el rodeo.

La exposición natural a la mosca de los cuernos indujo en los bovinos la producción de anticuerpos IgG contra los antígenos salivales HTB e IT5 (**artículos II, III y IV**). En el **artículo II** encontramos que esta respuesta varió en función del antígeno

salival estudiado, observando que los títulos de anticuerpos variaron en función de los caracteres fenotípicos de los bovinos y el momento de la observación (**Figura 4**).

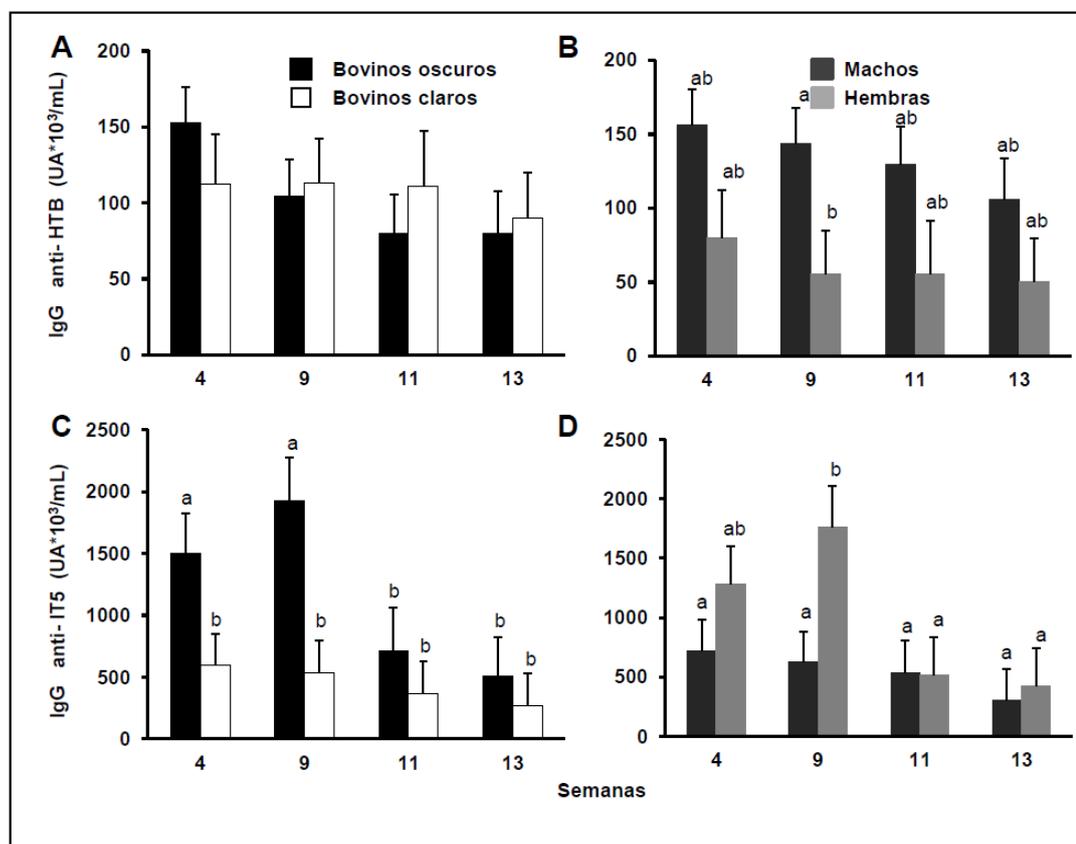


Figura 4. Respuesta de anticuerpos frente a la exposición natural de bovinos contra HTB eIT5 en función del color y el género. A, C. bovinos agrupados por color B, D. bovinos agrupados por género. Letras diferentes dentro del mismo gráfico indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

No se observó relación entre la respuesta anti HTB y el consumo de hemoglobina de las moscas o carga de moscas (**Figura 5 A, C, artículo II**). Sin embargo, se encontró una correlación positiva entre títulos de anticuerpos anti IT5 y carga de moscas ($r^2 = 0.34$; $P = 0.0085$), mientras que hubo una correlación negativa entre títulos anti IT5 y consumo de hemoglobina ($r^2 = 0.44$; $P = 0.0032$) (**Figura 5 B, D**).

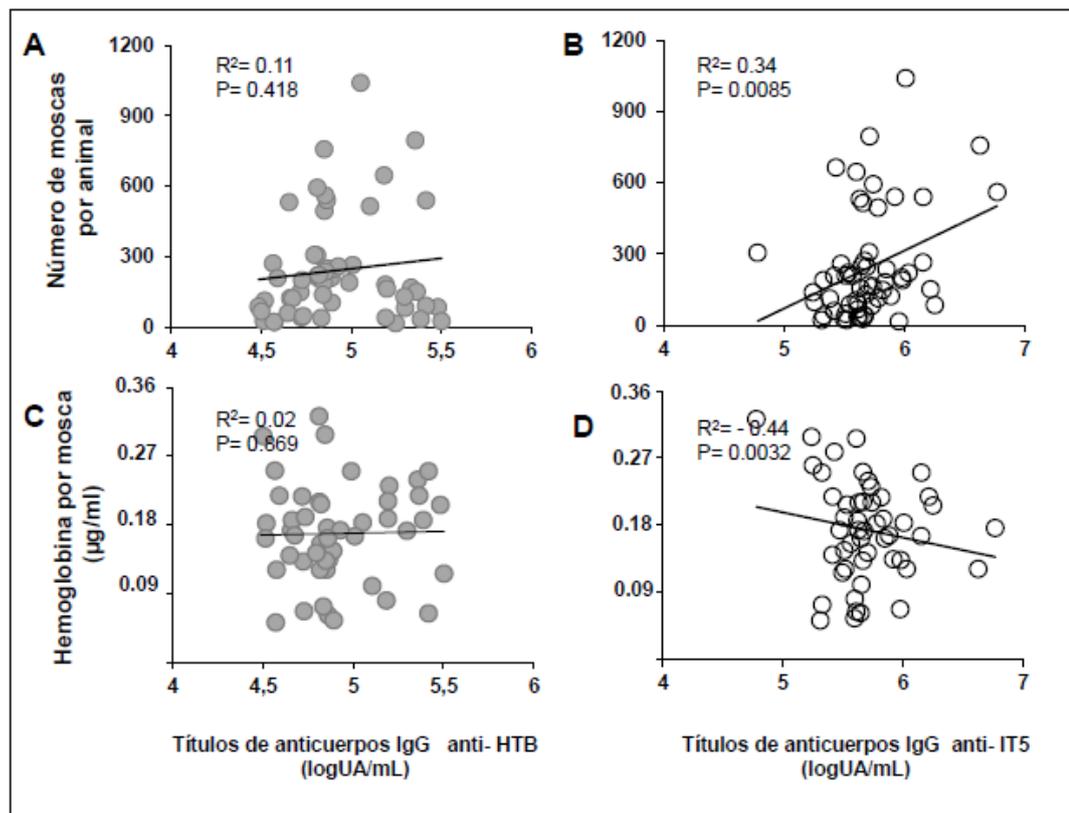


Figura 5. Relación entre cargas parasitarias (A,B) o contenido de hemoglobina (C,D) y títulos de anticuerpos anti-HTB o anti-IT5. A,C: Anticuerpos anti HTB B,D: anticuerpos anti-IT5.

Los títulos de anticuerpos contra ambas proteínas fueron indetectables a finales de mayo, cuando las moscas ya no estaban presentes en el rodeo. Por otra parte en el **artículo 4** pudimos apreciar que los títulos anti IT5 de los bovinos antes del inicio de la estación de moscas fue indetectable.

Objetivo específico III. Evaluación de vacunas experimentales monovalentes construidas a partir de antígenos salivales (artículos 3 y 4)

El ensayo de vacunación con HTB se realizó entre los meses de diciembre a marzo, iniciándose cuando las moscas estaban presentes en el rodeo (**artículo III**). La vacunación logró reducir las cargas de moscas en comparación con el grupo control (206 ± 23 vs 285 ± 23 , $P < 0.05$, grupo vacunado y control respectivamente) (**Figura 6**). No se observaron diferencias en el consumo de sangre entre las moscas de ambos grupos.

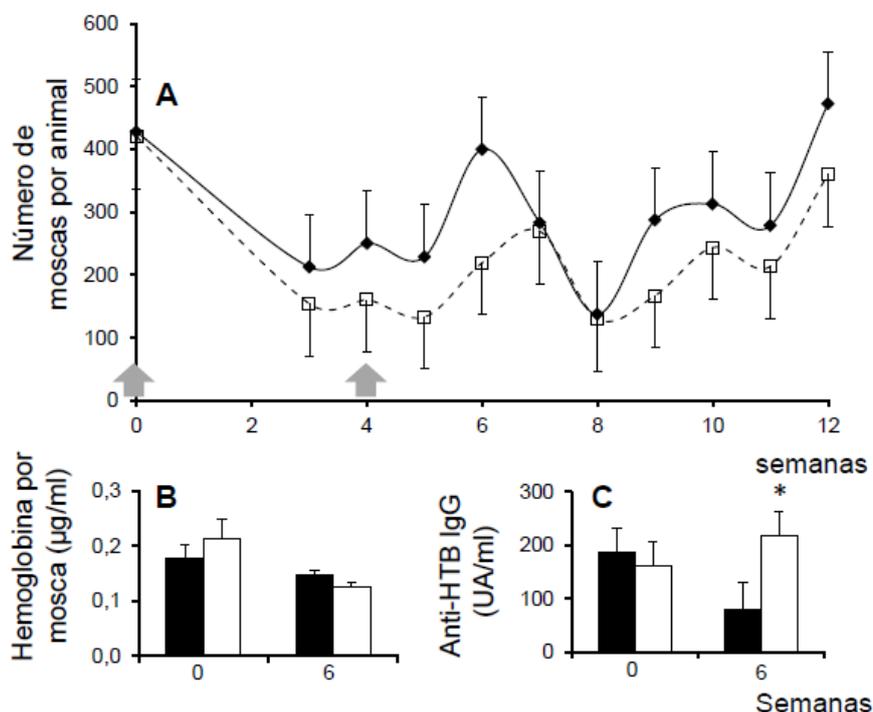


Figura 6. Efectos de la vacunación de bovinos con HTB sobre la carga de *H. irritans* y su consumo de sangre. A. Número de moscas en bovinos vacunados (línea punteada) y control (línea sólida) durante el ensayo. B. Contenido de hemoglobina encontrado en moscas capturadas en bovinos vacunados (Barra Blanca) y controles (Barra Negra). C. Títulos de IgG anti-HTB en bovinos vacunados (Barra Blanca) y controles (Barra Negra). Flechas; primera y segunda dosis de vacuna HTB. *P<0,05.

Por otra parte, el ensayo de vacunación con IT5 se realizó entre los meses de setiembre y enero, realizando la vacunación previamente a la aparición de moscas en el rodeo (**artículo IV**). La vacunación redujo las cargas parasitarias en comparación con el grupo control (162±16 vs 124±12, P<0,05) (**Figura 7**). No se encontraron diferencias en el consumo de hemoglobina entre los grupos.

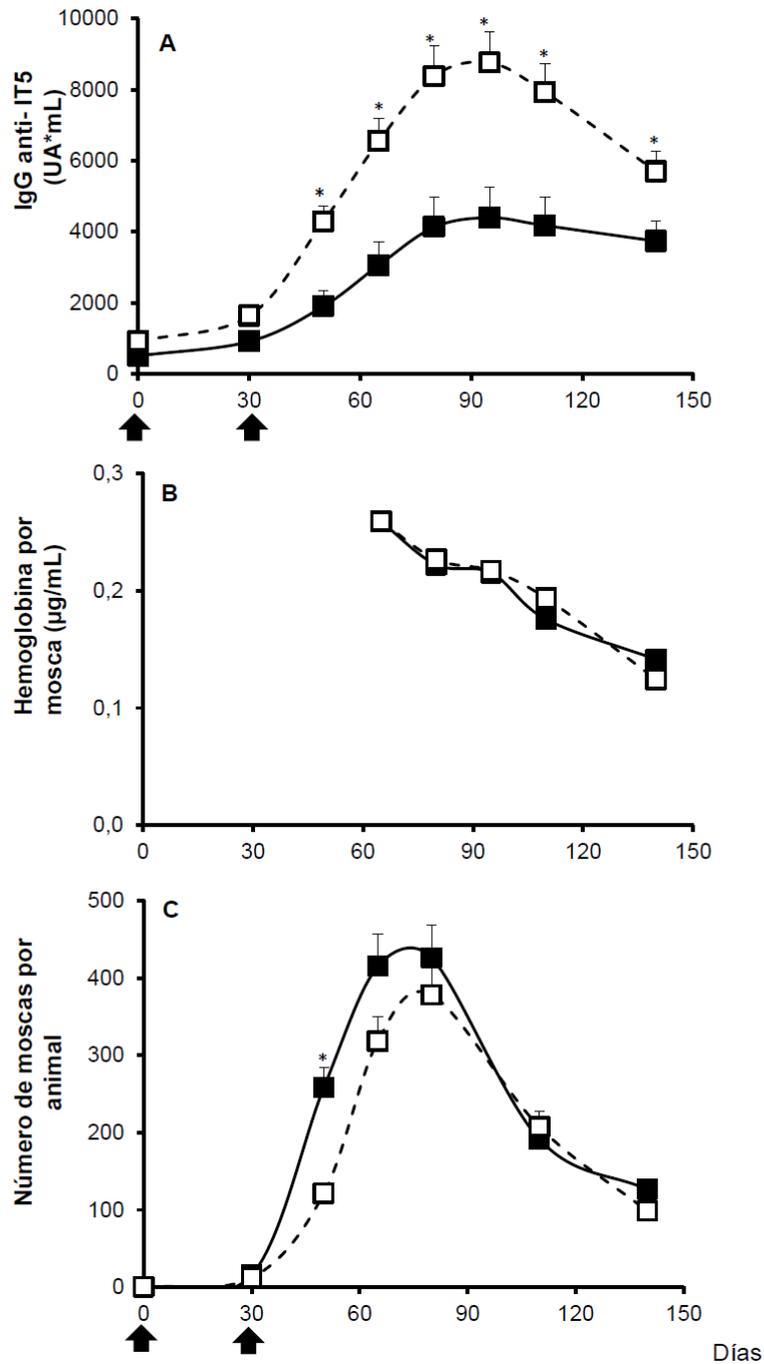


Figura 7. Cargas y consumo de hemoglobina de *H. irritans* luego de la vacunación de bovinos con IT5. A. Títulos de anticuerpos anti IT5 en animales vacunados y controles. B. Contenido de hemoglobina en bovinos vacunados y controles C. Cargas de *H.irritans* presentes en bovinos controles y vacunados. Grupo vacunado (línea punteada), grupo control (línea sólida). Flechas, indican la primera y segunda dosis de vacunación. *P<0.05.

Objetivo específico IV. Determinar la actividad biológica de extractos de saliva y de las moléculas identificadas en el sialotranscriptoma (artículo IV)

Las proteínas IT5 y HTB modificaron la producción de óxido nítrico y las citoquinas secretadas por macrófagos activados con LPS/INF γ (**Figura 8**).

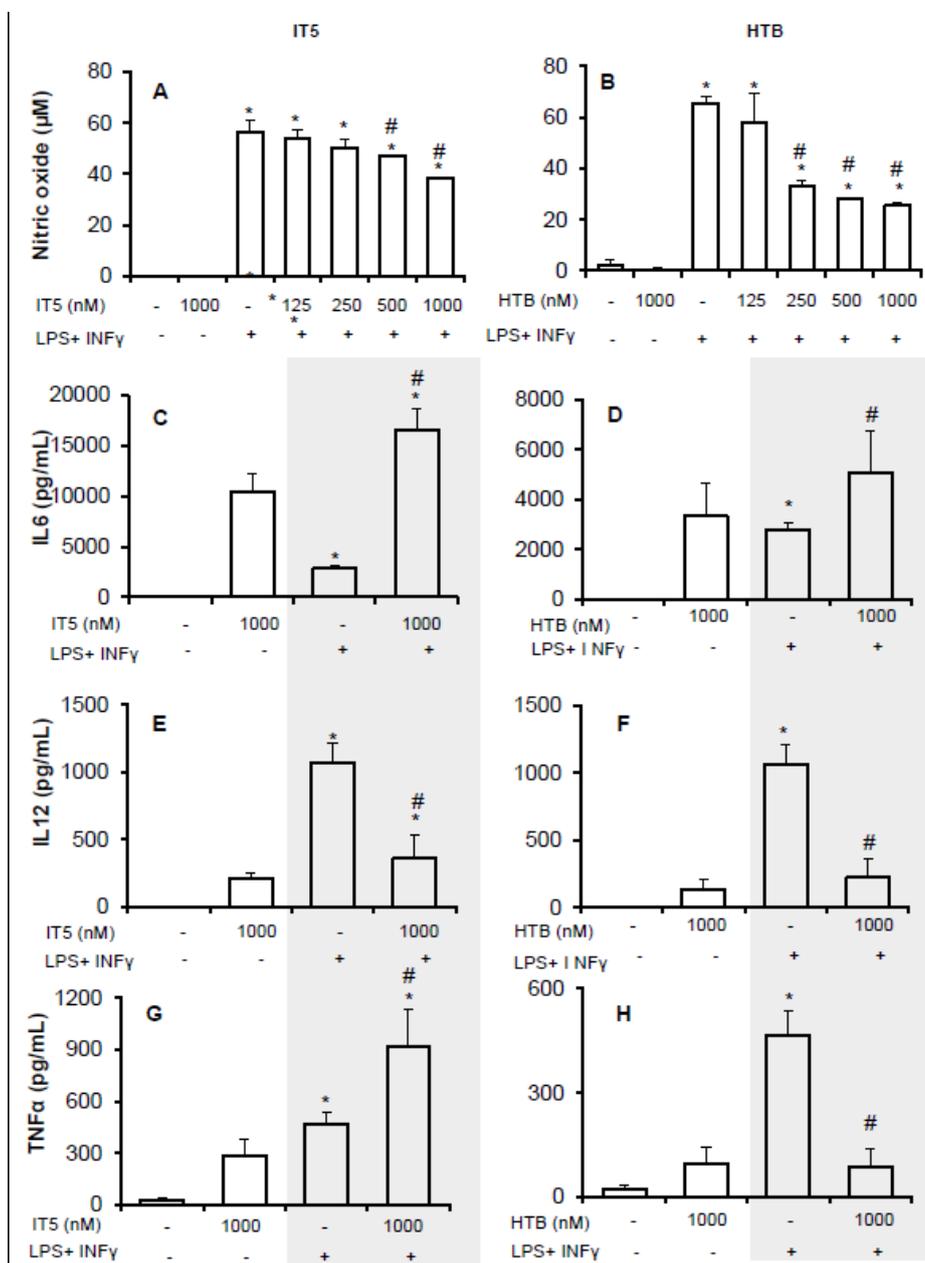


Figura 8. Efectos de IT5 y HTB sobre macrófagos murinos estimulados con LPS+INF γ . A,B) Producción de óxido nítrico (μ M); C,D) Citoquina IL6 (pg/mL), E,F) Citoquina IL12 (pg/mL); G,H) Citoquina TNF α (pg/mL). Los datos son expresados como medias \pm SD (n=4). *P<0.05 versus control negativo; #P<0.05 versus control positivo (LPS+IFN- γ).

Los macrófagos activados redujeron hasta un 30% la producción de óxido nítrico cuando se cultivaron en presencia con IT5 y hasta un 60 % cuando se cultivaron con HTB. Paralelamente, la síntesis de iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) fue inhibida con la adición de HTB (**Figura 9**), no observando cambios frente a la presencia de IT5 (datos no mostrados).

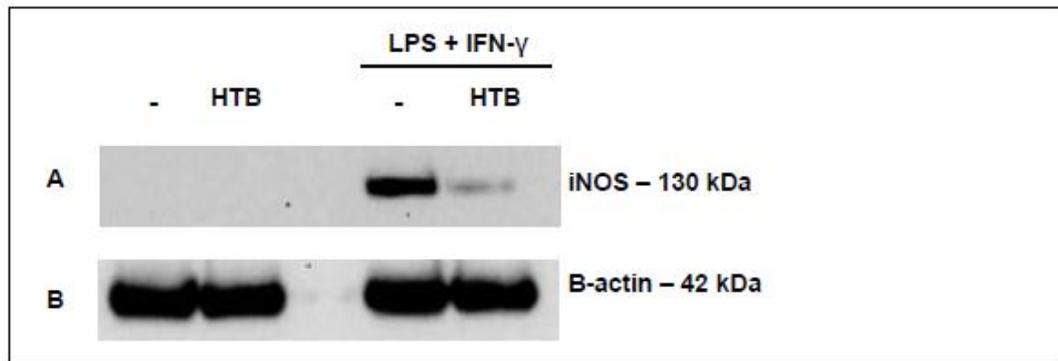


Figura 9. Presencia de iNOS en macrófagos estimulados con LPS/IFN γ por western blott. A) iNOS en macrófagos activados y controles, B) β - actina en macrófagos activados y controles (utilizado como control interno del ensayo).

Cuando analizamos la producción de citoquinas, tanto HTB como IT5 incrementaron la producción de IL6 e inhibieron la producción de IL12 ($P < 0.05$) y no modificaron la producción de IL10. Por otra parte, la producción de TNF α fue incrementada por la adición de IT5 e inhibida por HTB ($P < 0.05$).

Finalmente, la proliferación de linfocitos no fue modificada por la adición de ninguna de las dos proteínas salivales recombinantes analizadas.

Discusión general

La presente tesis doctoral ha permitido incrementar el conocimiento actual que se posee sobre la interacción entre el hospedero y la *H. irritans*. Específicamente, hemos aportado información respecto a cómo factores fenotípicos como color del manto, sexo y peso influyen en la carga de las moscas y el consumo de hemoglobina y su asociación con el espesor del epitelio. Además, describimos las variaciones estacionales de las cargas de las moscas y el consumo de sangre, así como también la respuesta inmune a antígenos específicos de la saliva de la mosca novedosos (HTB e IT5). Finalmente, describimos la actividad farmacológica y las respuestas a los ensayos de vacunación con estos antígenos específicos constituyendo la primera vacunación “a campo” (en sistemas de producción) en bovinos de carne.

Basadas en una variedad de estímulos visuales, gustativos, olfatorios o físicos, las moscas de los cuernos son especialmente atraídas por algunos bovinos. Esta preferencia de *H. irritans* determina la presencia de animales más susceptibles o resistentes. Varios trabajos experimentales reportaron la asociación entre caracteres fenotípicos de los bovinos (raza, color, sexo, condición corporal) y las cargas de moscas que parasitan los animales (Franks et al. 1963, Castro et al. 2008, Rodríguez-Gallegos y Acosta-Rodríguez 2011). Sin embargo, estos trabajos no analizaron en un mismo experimento aquellos caracteres fenotípicos que están relacionados entre sí, como lo son el sexo y el peso de los bovinos o el color y la raza de los mismos. Por esa razón nuestro primer objetivo fue determinar el efecto del color, sexo y peso sobre la carga de las moscas conjuntamente con otras variables que pudieran explicar esta atracción diferencial en un mismo experimento. En los **artículos I y II**, observamos que el color del manto tiene una gran influencia sobre las cargas parasitarias, siendo los animales claros más resistentes que los oscuros (**Figura 1**). Por otra parte, si bien el sexo no fue significativo en la carga de las moscas en el **artículo I**, en el **artículo II** se observó una menor carga en las hembras, probablemente debido a un mayor número de observaciones en este último trabajo. Es interesante observar que las diferencias de cargas de mosca acorde a estos efectos (color del manto: aprox. 150 moscas y sexo: aprox. 50 moscas) son consistentes entre ambos trabajos. Estos fenotipos también se han asociado a la

resistencia a garrapatas, donde bovinos claros (Martinez et al. 2006, Gasparin et al. 2007) y en menor medida las hembras (Martinez et al. 2006) han demostrado ser más resistentes. Por otro lado hemos observado una preferencia de las moscas por los animales más pesados, la cual fue comprobada en todos los diseños experimentales realizados (**artículos I, II, III y IV**). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores que observaron que las moscas eran más atraídas por animales de mayor condición corporal (Castro 2003).

Cuando analizamos el consumo de sangre de las moscas que parasitaban bovinos con diferentes fenotipos, observamos que aquellas que se alimentaban de bovinos oscuros tomaban más sangre que las moscas que parasitaban bovinos claros (**Figura 1**). Por otra parte, no observamos diferencias en el consumo de sangre de moscas que se alimentaron de bovinos de distintos sexos (**Figura 1**). Este reporte fue el primero que asoció la mayor preferencia de *H.irritans* por bovinos oscuros, con un mayor consumo de sangre. Esta hipótesis si bien había sido previamente formulada por Pruet et al. (2003), cuando sugería que la preferencia de *H.irritans* por determinados fenotipos podría estar asociada a la capacidad de obtener alimento de los mismos no había sido demostrada.

El mayor éxito en el consumo de sangre de *H.irritans* en bovinos oscuros podría estar asociado a cambios vasculares y/o anatómicos que favorecen la toma de alimento. Los animales oscuros en zonas tropicales mantienen una mayor temperatura en la piel en relación a los claros (Silva et al. 2011), lo que podría estimular una mayor vasodilatación capilar y un mayor flujo de sangre en la dermis. Como hipótesis alternativa, estudiamos si el espesor de epitelio podría jugar un rol de resistencia al acceso de la mosca a la sangre del bovino. Nuestros resultados señalaron que la epidermis de los animales oscuros es más delgada que la de los claros (**Figuras 1 y 2**). Un epitelio más fino en animales oscuros es consistente con el mayor contenido de hemoglobina en las moscas (mayor consumo de sangre) observado en estos animales. El desarrollo de una epidermis más gruesa en animales claros, podría ser una forma de adaptación de la piel como consecuencia de la ausencia de melanina (**Figura 2**). La melanina confiere a la epidermis un efecto de pantalla solar y brinda protección frente a la acción de los rayos ultravioletas (Brenner y Hearing 2008). 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. En este sentido, en un segundo ensayo utilizando únicamente bovinos machos oscuros, observamos una correlación negativa entre espesor del epitelio y carga parasitaria, confirmando lo sugerido en el experimento anterior (**artículo I**). Estos resultados, señalan el uso potencial uso del espesor de epitelio como marcador para la selección de bovinos más resistentes a la mosca de los cuernos.

Las variaciones en la carga de moscas de los bovinos a lo largo del año que no se explican por las condiciones favorables de temperatura y la humedad (Castro et al. 2008), sugiere la existencia de factores vinculados al hospedador capaces de regular las cargas de moscas en el rodeo. El estudio de la respuesta inmune natural del bovino a las moscas y el desarrollo de vacunas experimentales podría ayudar a confirmarlo. Basados en estos antecedentes, trabajamos sobre la hipótesis de que el bovino es capaz de participar en la regulación de la carga de las moscas. Para ello, en primera instancia analizamos la distribución de moscas a lo largo de la estación estival y su consumo de sangre (**artículo II**). Las cargas de moscas fluctuaron durante el curso del ensayo. Se registraron tres picos de moscas de corta duración (más de 200 moscas /animal) (**Figura 3 A, B**). Muchos autores concuerdan que factores abióticos como temperatura y humedad explican cerca del 50% de la dinámica de las poblaciones (de Souza et al. 2005, Castro et al. 2008). Sin embargo, son necesarios otros factores reguladores, para poder explicar las variaciones en las poblaciones de *H.irritans* cuando los factores abióticos no cambian significativamente (de Souza et al. 2005, Galindo-Velasco et al. 2008). Por otro lado, fue interesante observar que el consumo de hemoglobina varió a lo largo del ensayo (**Figura 3, C, D**). Tres semanas luego del primer pico de oferta de moscas, se observó una caída en el consumo de sangre. Este fenómeno se repitió luego de los picos de oferta de moscas posteriores (más de 200 moscas por animal). Este hallazgo es novedoso, convirtiéndose el primero en el cual se describen las variaciones en el consumo de sangre en bovinos naturalmente parasitados durante la estación de moscas. Ensayos de laboratorio han demostrado que una reducción en el consumo de sangre de *H.irritans* afecta negativamente el desarrollo de los ovarios y la ovoposición (Kuramochi 2000). Por lo tanto es posible que las variaciones en la

oferta de moscas en el campo estén al menos en parte, asociadas a caídas en la ovoposición secundarias a una reducción en el consumo de sangre.

Estos cambios en el consumo de alimento podrían estar asociados a factores vinculados a la interacción parásito-hospedador. El hospedador a través de la neutralización de moléculas salivales relevantes en el proceso de alimentación, podría reducir la eficiencia del mismo. Cuando analizamos la respuesta de anticuerpos de bovinos naturalmente parasitados contra antígenos salivales de *H.irritans* (**artículos II, III y IV**), observamos que todos los bovinos desarrollaron una respuesta humoral contra HTB y IT5, la que se hace indetectable cuando las moscas desaparecen del rodeo. Respuestas humorales contra antígenos salivales de insectos han sido largamente descritas (Rizzo et al. 2014), sin embargo, la utilidad de estas respuestas en la regulación de las cargas ha generado controversias. La respuesta natural de anticuerpos contra extractos de *H.irritans* no se relacionó con las cargas de moscas presentes en los bovinos (Kerlin y Allingham 1992).

Cuando analizamos la respuesta natural de IgG de los bovinos contra HTB y IT5 observamos que estas tuvieron perfiles diferentes (**artículo II**). Las cargas parasitarias correlacionaron positivamente con los títulos anti-IT5, pero no lo hicieron con la respuesta anti-HTB. Respuestas inmunes diferenciales entre antígenos salivales han sido descritas también en mosquitos (*Anopheles gambiae*) y las moléculas más inmunogénicas han sido utilizadas como bio-marcadores de exposición a la picadura de los mosquitos (Rizzo et al. 2014). Por otro lado, observamos que la respuesta natural contra IT5 correlacionó negativamente con el consumo de sangre (**Figura 5**). Una reducción en el consumo de sangre de *H.irritans* había sido previamente reportada, cuando estas moscas fueron alimentadas con sangre de terneros inmunizados con Thrombostasin (molécula anticoagulante descrita en la saliva de *H.irritans*, Cupp et al. 2004). El resultado obtenido en esta tesis es la primera evidencia que a través de la respuesta humoral contra IT5, el bovino de manera natural ejerce algún control sobre la biología del parásito.

Una vez confirmado el potencial del bovino como un factor biótico de regulación de la oferta de *H.irritans*, investigamos la vacunación con antígenos salivales con el fin de controlar las cargas de *H.irritans* en el bovino (**artículos III y IV**). Hasta la

fecha, no habían sido reportados ensayos de vacunación en sistemas productivos. Los antecedentes inmediatos fueron ensayos de vacunación con Thrombostasin, realizados en conejos y terneros en condiciones de laboratorio (con un muy bajo número (n=3) de animales en ambos experimentos, Cupp et al. 2004, 2010). Los ensayos de vacunación se realizaron con bovinos machos de pelaje oscuro dado que son los fenotipos más susceptibles a *H. irritans*. El esquema de vacunación (dos dosis separadas de 30 días), buscó potenciar la respuesta humoral de IgG y el número de células de memoria frente a estos antígenos. Este esquema ha sido utilizado en ensayos de vacunación contra *Rhipicephalus microplus* en bovinos (Vargas et al. 2010). La evaluación de HTB se realizó en el mes de diciembre, estando las moscas presentes en el rodeo al inicio del ensayo y presentando altos títulos de anticuerpos anti-HTB antes de la vacunación en los bovinos, mientras que en el segundo ensayo (vacunación con IT5) se realizó antes del ingreso de las moscas al rodeo. La vacunación experimental con HTB (**artículo III**) provocó una reducción del 30% en las cargas parasitarias del grupo vacunado en relación al grupo control. Además, las cargas de moscas se mantuvieron por debajo del umbral de las 200 moscas por animal en la mayoría de las observaciones (**Figura 6**). Por otra parte, la vacunación con IT5 (**artículo IV**) provocó una reducción aproximadamente del 20% de las cargas parasitarias del grupo vacunado en relación al grupo control (**Figura 7**). En ninguno de los dos ensayos se observaron diferencias en el consumo de hemoglobina entre los grupos vacunado y control.

Estos resultados demuestran en primera instancia que las respuestas inmunes desarrolladas por los bovinos contra antígenos salivales, tienen el potencial de reducir las cargas de *H. irritans* presentes en los mismos. A su vez, podrían explicar –al menos en parte– las fluctuaciones de la oferta de moscas observadas en el rodeo cuando los factores abióticos (temperatura y humedad) no cambian significativamente. Por otra parte, confirman que la vacunación de bovinos contra antígenos de *H. irritans* en un futuro podría ser una alternativa de control al uso de insecticidas. Si bien la eficacia de ambas vacunas fue reducida, la combinación de las mismas o su combinación con nuevos inmunógenos podrían hacerlas más eficaces. Las vacunas comerciales utilizadas para el control de *R. microplus* han demostrado afectar el desarrollo y la puesta de huevos de las hembras, estimando que su eficacia es menor al 50% (Andreotti 2006). Finalmente, algunas proteínas

secretadas en la saliva de la mosca de los cuernos presentan diferentes isoformas (Cupp et al. 2010). Estas podrían diferir en estructura de manera tal que una respuesta dirigida a una de ellas podría no ser capaz de reconocer otras variantes (Hull y Dlamini 2014). Las isoformas podrían ser utilizadas como mecanismos de evasión de *H. irritans* de la respuesta inmune del hospedador. En este sentido, *Ixodes scapularis* inyecta selectivamente proteínas funcionalmente similares pero antigénicamente distintas cada 24 horas como mecanismo de evasión de la respuesta del hospedador (Kim et al. 2016). En trabajos preliminares realizados a partir de una nueva genoteca de glándula salival obtenida por RNAseq, hemos detectado que HTB y IT5 presentan diferentes isoformas (datos no mostrados). Futuros estudios permitirán determinar si estas proteínas son utilizadas sistemáticamente como mecanismo de evasión de *H. irritans* a la repuesta inmune del bovino. De confirmarse esta hipótesis, estas variaciones deberían ser consideradas a la hora del diseño de nuevas vacunas experimentales.

El potencial de HTB y IT5 como blanco de vacunas probablemente esté relacionado con la actividad farmacológica de estas moléculas en su hospedador. Por tal razón, evaluamos si las proteínas recombinantes HTB y IT5 tienen la habilidad de modular la respuesta de macrófagos y linfocitos (**artículo IV**). Cuando macrófagos murinos activados fueron expuestos a HTB e IT5, la producción de óxido nítrico se redujo en un 60% y 30% respectivamente (**Figura 8**). Esta actividad regulatoria ha sido también reportada en moléculas salivales de garrapatas *Rhipicephalus appendiculatus* (Gwakisa et al. 2001) y tábanos (Wei et al. 2015). Nuestros datos son también consistentes con los reportes de *Caenorhabditis elegans*, que a través de mecanismos gustativos detiene su consumo de alimento si este contiene especies reactivas del oxígeno con el fin de prevenir el daño tisular (Bhatla et al. 2015). El control de especies reactivas del oxígeno a través de la saliva de parásitos hematófagos ha sido reportado (Das et al. 2001). El NO es producido por la enzima NO sintetasa la cual presenta diferentes isoformas, que en neuronas y células endoteliales están presentes en forma constitutiva (nNOS, eNOS), mientras que en macrófagos son inducibles (iNOS) por la presencia de estímulos inflamatorios como LPS o citoquinas (Förstermann y Sessa 2012). El exceso de producción de NO en combinación con anión superóxido (O_2^-), genera la formación de peroxinitritos ($ONOO^-$), que son potentes oxidantes que provocan daños en las células del

hospedador y del parásito (Förstermann y Sessa 2012). La adición de HTB a macrófagos activados inhibió la producción de iNOs (**Figura 9**), no observando este efecto con IT5. Estos resultados explican al menos en parte, la mayor capacidad de HTB de regular la síntesis de NO.

Por otra parte, HTB y IT5 fueron capaces de modular la producción de citoquinas en macrófagos murinos (**Figura 8**). Cuando ambas proteínas fueron añadidas a macrófagos activados, estos incrementaron la producción de IL6, redujeron la producción de IL12 y no modificaron la producción de IL10. La producción de TNF α fue inhibida por HTB y estimulada frente a la adición de IT5. Estas citoquinas cuando son liberadas por macrófagos participan en la respuesta inflamatoria temprana jugando un rol importante en la diferenciación y migración de células al sitio de inflamación y condicionan el perfil de la respuesta adaptativa generada por el hospedador (Kim y Kang 2016). En los resultados obtenidos es interesante observar que ambas proteínas inhiben la síntesis de IL12. Esta es una citoquina que determina la diferenciación de las células TCD4 en células TCD4 de tipo I productoras de INF γ , las cuales activan la rama celular de la respuesta inmune activando macrófagos (Kim y Kang 2016). Esta inhibición podría sugerir que *H.irritans* intenta a través de su saliva evadir dicho tipo de respuesta. De hecho, *Ixodes scapularis* evita con su saliva una respuesta TCD4 tipo I y así la infiltración celular de la piel, promoviendo una respuesta TCD4 de tipo II (Vesely et al. 2009). Por otra parte, ambas proteínas generaron efectos disimiles en relación a la producción de TNF α en macrófagos. Los efectos pro-inflamatorios de TNF α se asocian a la inducción de moléculas de adhesión a nivel endotelial y el reclutamiento de leucocitos en el sitio dañado (Bradley 2008). Por otra parte, el TNF α está también involucrado en el desarrollo de hiperalgesia secundaria a la injuria y a la percepción del dolor a nivel del sistema nervioso central (Hess et al. 2011).

Basados en estos resultados HTB presenta un marcado perfil antiinflamatorio, regulando en mayor medida la producción de NO e inhibiendo la síntesis de TNF α . Este perfil antiinflamatorio podría explicar su menor inmunogenicidad en relación a IT5, expresada por la ausencia de correlación entre carga de moscas y títulos de anticuerpos en bovinos naturalmente parasitados (**Figura 5**). Por otra parte, el mayor control de las cargas parasitarias observada con la vacuna con HTB, podría ser

consecuencia de la neutralización de la función antiinflamatoria por parte de la respuesta inmune del bovino.

Conclusiones

- Existen bovinos más o menos resistentes a la mosca de los cuernos, y ésta menor susceptibilidad está relacionada a factores fenotípicos como el color del manto, el peso y en menor grado, el sexo. La resistencia que ofrece la epidermis a la alimentación de la mosca es un factor de regulación del consumo de sangre de las mismas y por ende de modulación de la atracción por determinados hospedadores.
- La carga de moscas en bovinos naturalmente parasitados y el consumo de sangre de *H.irritans* varían a lo largo de la estación estival. Estas variaciones podrían ser consecuencia de respuestas inmunes del bovino contra antígenos salivales.
- En ensayos de campo, las vacunas experimentales con HTB e IT5 lograron reducir hasta en un 30% las cargas de moscas en bovinos. Estos resultados demuestran que la vacunación con antígenos de *H.irritans* puede ser potencialmente útil como herramienta de control.
- Los antígenos salivales HTB e IT5 modulan la respuesta inflamatoria del hospedador. HTB demostró tener una fuerte capacidad antiinflamatoria a través del control de la producción de NO, la expresión de la enzima responsable de su síntesis y de TNF α .

Referencias

- Abrahamovich, A. H., A. C. Cicchino, O. H. Prieto, P. R. Torres, and J. L. Nuñez. 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. Rev. Med. Vet. (Bogota)*. 75: 382–388.
- Ameri, M., X. Wang, M. J. Wilkerson, M. R. Kanost, and A. B. Broce. 2008.** An immunoglobulin binding protein (antigen 5) of the stable fly (Diptera: Muscidae) salivary gland stimulates bovine immune responses. *J. Med. Entomol.* 45: 94–101.
- Andreotti, R. 2006.** Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Rev Bras Parasitol Ve.* 15: 97–100.
- Assumpção, T. C. F., D. Ma, A. Schwarz, K. Reiter, Jaime M Santana, J. F. Andersen, J. M. C. Ribeiro, G. Nardone, L. L. Yu, and I. M. B. Francischetti. 2013.** Salivary antigen-5/CAP Family members are Cu²⁺-dependent antioxidant enzymes that scavenge O₂⁻ and inhibit collagen-induced platelet aggregation and neutrophil oxidative burst. *J. Biol. Chem.* 288: 14341–14361.
- Barros, A. T. M., T. T. S. Schumaker, W. W. Koller, G. M. Klafke, T. A. de Albuquerque, and R. Gonzalez. 2013.** Mechanisms of pyrethroid resistance in *Haematobia irritans* (Muscidae) from Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária.* 22: 136–142.
- Bhatla, N., R. Droste, S. R. Sando, A. Huang, and H. R. Horvitz. 2015.** Distinct neural circuits control rhythm inhibition and spitting by the myogenic pharynx of *C. elegans*. *Curr Biol.* 25: 2075–2089.
- Bradley, J. 2008.** TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214: 149–160.
- Brenner, M., and V. J. Hearing. 2008.** The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem Photobiol.* 84: 539–549.
- Bruce WG. 1938.** A practical trap for the control of horn flies on cattle. *J. Kansas Entomol. Soc.* 11: 88–93.
- Butler J. F., O. J. S. 1999.** The horn fly, *Haematobia irritans* (L.): review of programs on natural history and control. *In* InBurger J. F. (ed.), *Contrib. to Knowl. Diptera a Collect. Artic. Diptera Commem. Life Work Graham B. Fairchild.* Associated Publishers, Gainesville, FL.
- Buxton, B. A., N. C. Hinkle, and R. D. Schultz. 1985.** Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *Am. J. Vet. Res.* 46: 123–6.

- Byford, R. L., M. E. Craig, and B. L. Crosby. 1992.** A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *J. Anim. Sci.* 70: 597–602.
- Calvo, E., B. J. Mans, J. F. Andersen, and J. M. C. Ribeiro. 2006.** Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J. Biol. Chem.* 281: 1935–42.
- Campbell, J. B. 1976.** Effect of horn fly control on cows as expressed by increased weaning weights of calves. *J. Econ. Entomol.* 69: 711–2.
- Castro, E. 2003.** Mosca de los cuernos: efecto en ganado de carne en Uruguay. *Rev. del Plan Agropecu.* 46–47.
- Castro, E., A. Gil, J. Piaggio, L. Chifflet, N. a Farias, M. a Solari, and R. D. Moon. 2008.** Population dynamics of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), on Hereford cattle in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 151: 286–99.
- Cupp, M., E. Cupp, C. Navarre, N. Wisnewski, K. Brandt, G. Silver, D. Zhang, and V. Panangala. 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., E. W. Cupp, C. Navarre, D. Zhang, X. Yue, L. Todd, and V. Panangala. 2010.** Salivary gland thrombostasin isoforms differentially regulate blood uptake of horn flies fed on control- and thrombostasin-vaccinated cattle. *J. Med. Entomol.* 47: 610–7.
- Das, S., G. Banerjee, K. Deponte, N. Marcantonio, F. S. Kantor, and E. Fikrig. 2001.** Salp25D , an *Ixodes scapularis* Antioxidant , Is 1 of 14 Immunodominant Antigens in Engorged Tick Salivary Glands. *J. Infect. Dis.* 184: 1056–1064.
- Domingues, L. N., F. D. Guerrero, and L. D. Foil. 2014.** Simultaneous Detection of Pyrethroid, Organophosphate, and Cyclodiene Target Site Resistance in *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *J. Med. Entomol.* 51: 964–970.
- Förstermann, U., and W. C. Sessa. 2012.** Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* 33: 829–837.
- Franks, R., E. Burns, and N. England. 1963.** Color preference of the horn fly, *Haematobia irritans*, on beef cattle. *J. Econ. Entomol.* 57: 371–372.
- Galindo-Velasco, E., C. Cruz-Vázquez, R. Lezama-Gutiérrez, W. Reyes-Velázquez, S. Aguilar-Espinoza, and A. Pescador-Rubio. 2008.** Fluctuación poblacional de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en un hato bovino en Tecoman, Colima, México. 39: 181–186.
- Garcia, A., and V. Herrera. 2016.** Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UdelaR “Deteccion del virus de leucosis bovina enzootica en la mosca *Haematobia irritans* (mosca del cuerno) por la tecnica de PCR”.
- Gasparin, G., M. Miyata, L. L. Coutinho, M. L. Martinez, R. L. Teodoro, J. Furlong,**

- M. A. Machado, M. V. G. B. Silva, T. S. Sonstegard, and L. C. A. Regitano. 2007.** Mapping of quantitative trait loci controlling tick [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. *Anim. Genet.* 38: 453–459.
- Guglielmone, A. A., M. E. Castelli, M. M. Volpogni, O. S. Anziani, and A. J. Mangold. 2002.** Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the horn fly, *Haematobia irritans*. *Med. Vet. Entomol.* 16: 310–5.
- Guglielmone, A. A., E. Gimeno, J. Idiart, W. F. Fisher, M. M. Volpogni, O. Quaino, O. S. Anziani, S. G. Flores, and O. Warnke. 1999.** Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. *Med. Vet. Entomol.* 13: 324–9.
- Gwakisa, P., K. Yoshihara, T. Long To, H. Gotoh, F. Amano, and E. Momotani. 2001.** Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. *Vet. Parasitol.* 99: 53–61.
- Hajnická, V., I. Vančová-Štibrániová, M. Slovák, P. Kocáková, and P. A. Nuttall. 2011.** Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *Int. J. Parasitol.* 41: 213–23.
- Hargett, L., and R. Goulding. 1962.** Rearing the Horn Fly, *Haematobia irritans*. *J. Econ. Entomol.* 55: 565–566.
- Harvey, T. L., and J. L. Launchbaugh. 1982.** Effect of Horn Flies on Behavior of Cattle. *J. Econ. Entomol.* 75: 25–27.
- Haufe, W. . 1982.** Growth of range cattle protected from horn flies *Haematobia irritans* by ear tags impregnated with fenvalerate. *Can. J. Anim. Sci.* 62: 567–573.
- Hess, A., R. Axmann, J. Rech, S. Finzel, C. Heindl, S. Kreitz, and M. Sergeeva. 2011.** Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *PNAS.* 108: 3731–3736.
- Hibler, C. 1966.** Development of *Stephanofilaria stilesi* in horn fly. *J. Parasitol.* 52: 890–898.
- Hoelscher, C. E., and R. L. Combs. 1971.** The horn fly, I. Seasonal incidence of diapause in Mississippi. *Econ. Entomol.* 64: 256–259.
- Hogsette, J., D. Prichard, and J. Ruff. 1991.** Economic effects of horn fly (Diptera: Muscidae) populations on beef cattle exposed to three pesticide treatment regimes. *J. Econ. Entomol.* 84: 1270–1274.
- Holderman, C. J., L. A. Wood, C. J. Geden, and P. E. Kaufman. 2017.** Discovery, Development, and Evaluation of a Horn Fly-Isolated (Diptera: Muscidae) *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordyciptaceae) Strain From Florida, USA. *J. Insect Sci.* 17: 1–6.
- Hu, G. Y., and J. H. Frank. 1996.** Effect of the Arthropod Community on Survivorship of

- Immature *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in North Central Florida. *Florida Entomol.* 79: 497–502.
- Hull, R., and Z. Dlamini. 2014.** The role played by alternative splicing in antigenic variability in human endo-parasites. *Parasit. Vectors.* 7: 1–19.
- Jones, S. R., and S. E. Kunz. 1996.** Effects of immersion in water on survival of preimaginal stages of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* 33: 27–31.
- Kerlin, R. L., and P. G. Allingham. 1992.** Acquired immune response of cattle exposed to buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). *Vet. Parasitol.* 43: 115–129.
- Kim, K. Y., and H. Kang. 2016.** Sakuranetin Inhibits Inflammatory Enzyme, Cytokine, and Costimulatory Molecule Expression in Macrophages through Modulation of JNK, p38, and STAT1. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2016: 1–8.
- Kim, T. K., L. Tirloni, A. F. M. Pinto, J. Moresco, J. R. Yates, I. da Silva Vaz, and A. Mulenga. 2016.** *Ixodes scapularis* Tick Saliva Proteins Sequentially Secreted Every 24 h during Blood Feeding. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10: 1–35.
- Kinzer, H. G., W. E. Houghton, J. M. Reeves, S. E. Kunz, J. D. Wallace, and N. S. Urquhart. 1984.** Influence of horn flies on weight loss in cattle with notes on prevention of loss by insecticide treatment. *Southwest. Entomol.* 9: 212–217.
- Kuramochi, K. 2000.** Survival, ovarian development and bloodmeal size for the horn fly *Haematobia irritans irritans* reared in vitro. *Med Vet Entomol.* 14: 201–6.
- Lew-Tabor, A., and M. Rodriguez Valle. 2016.** A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis.* 7: 573–585.
- Lysyk, T. J., and R. D. Moon. 1994.** Diapause induction in the horn fly (Diptera: Muscidae). *Can. Entomol.* 126: 949–959.
- Martínez, M. L., M. A. Machado, C. S. Nascimento, R. L. Teodoro, J. Furlong, A. L. Campos, and R. S. Verneque. 2006.** Association of BoLA-DRB3 . 2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *5: 513–524.*
- Miraballes, C., D. Buscio, A. Diaz, A. Saravia, and E. Castro-Janer. 2017.** Trampa de Paso para el Control de Mosca de los Cuernos. ([http://inia.uy/Documentos/Públicos/INIA La Estanzuela/Trampa mosca cuernos divulgacion final.pdf](http://inia.uy/Documentos/Públicos/INIA_La_Estanzuela/Trampa_mosca_cuernos_divulgacion_final.pdf)).
- Oyarzún, M. P., A. Quiroz, and M. A. Birkett. 2008.** Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Med. Vet. Entomol.* 22: 188–202.
- Pruett, J. H., C. D. Steelman, J. A. Miller, J. M. Pound, and J. E. George. 2003.** Distribution of horn flies on individual cows as a percentage of the total horn fly population. *Vet. Parasitol.* 116: 251–8.

- Rizzo, C., F. Lombardo, R. Ronca, V. Mangano, S. B. Sirima, I. Nèbiè, G. Fiorentino, D. Modiano, and B. Arcà. 2014.** Differential antibody response to the *Anopheles gambiae* gSG6 and cE5 salivary proteins in individuals naturally exposed to bites of malaria vectors. *Parasites & Vector.* 7: 1–10.
- Rodríguez-Gallegos, C. E., and R. Acosta-Rodríguez. 2011.** GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS INFLUENCING THE RESISTANCE OF TERMINAL CROSS CALVES TO TICK *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* AND HORN FLY *Haematobia irritans*. *Trop. Subtrop. Agroecosystems.* 13: 437–444.
- Sá-Nunes, A., and C. J. F. De Oliveira. 2011.** Sialogenins and immunomodulators derived from blood feeding parasites, pp. 131–152. *In* *Toxins Hemost. From Bench to Bedside.*
- Sahagun, C. A. ., E. Al, C. a Angel-Sahagún, R. Lezama-Gutiérrez, J. Molina-Ochoa, E. Galindo-Velasco, M. López-Edwards, O. Rebolledo-Domínguez, C. Cruz-Vázquez, W. P. Reyes-Velázquez, S. R. Skoda, J. E. Foster, C. A. . Sahagun, and E. Al. 2005.** Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hypomycetes). *J. Insect Sci.* 5: 1–8.
- Savio, T. J., H. D. Johnson, L. Hahn, and G. . Thomas. 1976.** Effect of horn flies on vanilmandelic acid excretion of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 59: 318.
- Schreiber, E. T., and J. Campbell. 1986.** Horn fly (Diptera: Muscidae) distribution on cattle as influenced by host color and time of day. *Environ. Entomol.* 15: 1307–1309.
- Schwinghammer, F. W., K. A. Knapp, J. A. Boling, and K. K. Schillo. 1986.** Physiological and Nutritional Response of Beef Steers to Infestations of the Horn Fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 79: 1010–1015.
- Silva, R. G., A. S. C. Maia, L. L. Macedo Costa, and J. P. A. F. Queiroz. 2011.** Latent heat loss of dairy cows in an equatorial semi-arid environment. *Int. J. Biometeorol.* 56: 927–932.
- de Souza, A. P., V. Bellato, C. I. Ramos, C. A. Dalagnol, and G. D. S. Henschel. 2005.** [Seasonal variation of *Haematobia irritans* in the Santa Catarina State plateau and efficiency of the “Directed Control”]. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 14: 11–5.
- Steelman, C., M. Brown, E. Gbur, and G. Tolley. 1997.** The effects of hair density of beef cattle on *Haematobia irritans* horn fly populations. *Med Vet Entomol.* 11: 257–64.
- Tarelli, G. 2004.** Mosca de los cuernos. *Haematobia irritans* (L.). *Biología, comportamiento y control.*, 1st ed. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- Torres, P. R., A. C. Cicchino, and A. H. Abrahamovich. 1993.** Damage in the skin and leather caused by the horn fly (Diptera: Muscidae) in Argentina. XXI IULTS Congr. Proc. 2: 543–550.
- Tozer, R. S., and R. W. Sutherst. 1996.** Control of horn fly (Diptera: Muscidae) in Florida with an Australian trap. *J. Econ. Entomol.* 89: 415–20.

- Vargas, M., C. Montero, D. Sánchez, D. Pérez, M. Valdés, A. Alfonso, M. Joglar, H. Machado, E. Rodríguez, L. Méndez, R. Leonart, M. Suárez, E. Fernández, M. P. Estrada, A. Rodríguez-mallón, and O. Farnós. 2010.** Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavac plus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus)* microplus induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Vet. Res.* 6: 1–8.
- Vesely, D. L., D. Fish, M. J. Shlomchik, D. H. Kaplan, and L. K. Bockenstedt. 2009.** Langerhans cell deficiency impairs *Ixodes scapularis* suppression of Th1 responses in mice. *Infect. Immun.* 77: 1881–1887.
- Wang, X. 2009.** An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2009. 9: 19–22.
- Wang, X., J. M. C. Ribeiro, A. B. Broce, M. J. Wilkerson, and M. R. Kanost. 2009.** An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39: 607–14.
- Watson, D. W., S. M. Stringham, S. S. Denning, S. P. Washburn, M. H. Poore, and A. Meier. 2002.** Managing the Horn Fly (Diptera: Muscidae) Using an Electric Walk-Through Fly Trap. *J. Econ. Entomol.* 95: 1113–1118.
- Wei, L., C. Huang, H. Yang, M. Li, J. Yang, X. Qiao, L. Mu, F. Xiong, J. Wu, and W. Xu. 2015.** A potent anti-inflammatory peptide from the salivary glands of horsefly. *Parasit. Vectors.* 8: 556.
- Wilkerson, G. G. 1974.** A Population Model for the Horn Fly, *Haematobia irritans* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae), in North Central Florida. MS thesis; University of Florida.
- Zhang, D., M. S. Cupp, and E. W. Cupp. 2002.** Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 321–30.

Anexos

Artículo I

Artículo II

Artículo III

Artículo IV

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Doctorado

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Anfiteatro de Anatomía, 3 de agosto de 2017

TRIBUNAL: Dr. Andrés Gil (Presidente), Dr. Otto Pritsch, Dr. Gonzalo Suárez

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
2.652.894-7	BREIJO DOTTA, Martín	S.S.S.	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Andrés Gil (Presidente)

Dr. Otto Pritsch

Dr. Gonzalo Suárez

FIRMA



NOTA: La calificación mínima para aprobar el examen es B.B.B (6)