

# MOSCA DE LOS CUERNOS: ESTUDIOS HACIA EL DESARROLLO DE VACUNAS COMO MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONTROL

**Proyecto FPTA- 224. Identificación y obtención de antígeno de la saliva de mosca de los cuernos (*Haematobia irritans irritans*). Evaluación de los mismos como blancos de vacunas**

**Responsable del Proyecto:** Martín Breijo\*

**Equipo de trabajo:** Martín Breijo. Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, UdelaR.  
Carmen Bolatto. Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UdelaR.  
Cecilia Fernández. Cátedra de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias, UdelaR.

**Personal contratado:** Lucía Pastro; Malvina Ocampo, Sergio Rocha, Valeria Anastasia, Mariana Balducci, Mariana Curto.

\*DMTV, Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, UdelaR.

**Título:** Mosca de los cuernos: estudios hacia el desarrollo de vacunas como métodos alternativos de control

**Responsable del Proyecto:** Martín Breijo

**Equipo de trabajo:** Carmen Bolatto  
Cecilia Fernández  
Martín Breijo

**Personal contratado:** Lucía Pastro; Malvina Ocampo, Sergio Rocha, Valeria Anastasia, Mariana Balducci, Mariana Curto

**Serie:** FPTA N° 49

© 2013, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia del Tecnología del INIA

Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay  
<http://www.inia.org.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

---

## Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente

D.M.T. V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente



D.M.V. Álvaro Bentancur

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino



Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti





## FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.



# CONTENIDO

## Página

ANTECEDENTES .....	9
DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS .....	10
1. Desarrollo de un sistema de producción y mantenimiento de moscas de los cuernos en condiciones de laboratorio .....	10
2. Identificación de los componentes secretados por la saliva de la mosca de los cuernos.....	11
3. Pruebas de campo: evaluación de cargas de bovinos naturalmente parasitados y su respuesta inmune natural e inducida a las proteínas identificadas en la saliva.....	14
CONCLUSIONES .....	15
BIBLIOGRAFÍA .....	15



Carmen Bolatto\*  
Cecilia Fernández\*\*  
Martín Breijo\*\*\*

\*Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UdelaR.

\*\*Cátedra de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias, UdelaR.

\*\*\*Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, UdelaR.

# Mosca de los cuernos: estudios hacia el desarrollo de vacunas como métodos alternativos de control

Proyecto FPTA 224

Período de Ejecución: Feb. 2007-Feb. 2010

## ANTECEDENTES

La mosca de los cuernos es un parásito hematófago que afecta principalmente al ganado bovino. Si bien su distribución es mundial, la llegada a la región de los grandes productores de carne de América Latina (Argentina, Chile y Uruguay) fue en la década de los años 90 (Oyarzun *et al.*, 2008).

Cargas superiores a las 200 moscas por animal llevan a que los mismos sufran un importante estrés, reduciendo sus ganancias de peso, su producción de leche e incrementando la susceptibilidad a problemas sanitarios (Haufe *et al.* 1982). Se han reportado en Uruguay, que solo las pérdidas en la industria del cuero alcanzan los 3.5 millones de dólares por cada millón de cueros procesados (Vanzini *et al.*, 1997). En Estados Unidos, las pérdidas económicas alcanzan el billón de dólares (Cupp *et al.*, 2004).

En la actualidad la principal herramienta para el control de este parásito es el uso de insecticidas, sin embargo la generación de resistencia y los grandes costos asociados al desarrollo de nuevos productos, ha llevado a varios grupos de investigadores a buscar métodos alternativos de control. La disponibilidad de vacunas contra insectos hematófagos tendría como ventajas, su fácil administración, su especificidad de especie y sería un método mucho más amigable con el medio ambiente.

Se han descrito en la saliva de los insectos hematófagos, componentes con propiedades farmacológicas (principalmente anticoagulantes y antiinflamatorias). Estos componentes son utilizados para neutralizar los mecanismos naturales de defensa y así poder alimentarse de la sangre su hospedero (Ribeiro, 1995).

Pocas han sido las moléculas descritas en la saliva de los dípteros hematófagos que afectan nuestra producción agropecuaria. Recientemente describieron en la saliva de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*) un total de 9 moléculas, algunas anticoagulantes y otras con capacidad de bloquear la respuesta inflamatoria (Wang *et al.*, 2009). En la mosca de los cuernos hasta la fecha solo se ha descrito una molécula denominada trombostasin; la misma posee actividad anticoagulante (Cupp *et al.*, 2004).

En función de estos antecedentes, nuestro grupo se planteó una estrategia de trabajo (Figura 1) con el objetivo de encontrar nuevos componentes en la saliva de la mosca de los cuernos y evaluar si estos pueden ser útiles para la construcción de vacunas contra este parásito. Este grupo está integrado por un equipo multidisciplinario (Biólogos, Químicos y Médicos Veterinarios) de la Universidad de la República.

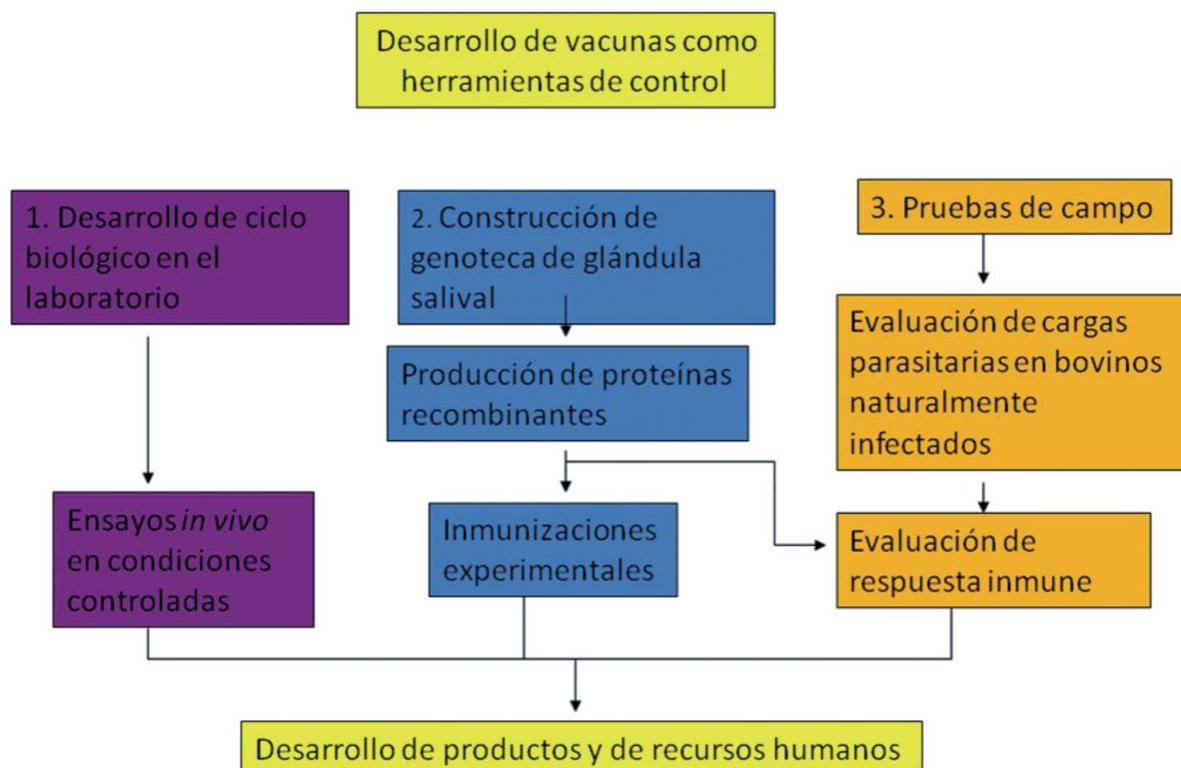


Figura 1. Estrategia experimental desarrollada por el equipo de investigadores del proyecto INIA FPTA 224.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

### 1. Desarrollo de un sistema de producción y mantenimiento de moscas de los cuernos en condiciones de laboratorio

En el ciclo biológico de la mosca de los cuernos, los parásitos adultos permanecen sobre sus hospedadores, abandonándolos solo para poner sus huevos. En las heces frescas de los bovinos, se efectúa la ovoposición y el desarrollo larvario hasta el estado de pupa, de donde emergen nuevos insectos adultos (Figura 2). En condiciones adecuadas de temperatura y humedad el ciclo dura entre 10-14 días, aunque puede alargarse hasta 50 días en condiciones climáticas adversas (Mendes y Linhares, 1999).

Para nuestra estrategia de trabajo, era fundamental disponer de los diferentes estadios larvarios e insectos adultos en condiciones de laboratorio. Esto nos

permitiría realizar ensayos *in vivo*, tomar muestras de tejidos y disponer de moscas adultas a lo largo del año. En nuestro laboratorio, logramos optimizar un sistema de cultivo de larvas, pupas y adultos vírgenes, basado en el desarrollo de un medio de cultivo a partir de una mezcla de alfalfa, cascara de arroz y heces bovinas (Figura 3).

Paralelamente, en el Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, se construyeron dos boxes adaptados para mantener bovinos parasitados con moscas. Esto permitió que se pudieran desarrollar ensayos de investigación sobre la biología del parásito. Por ejemplo, evaluamos si las moscas podían ser vectores de enfermedades virales como la Rinotraqueítis Bovina Infecciosa (IBR). En ese marco, tres bovinos fueron estabulados y dos de ellos fueron infectados experimentalmente con  $10^7$  partículas infectante de cultivo de tejido 50 (TCID<sub>50</sub>) de Herpesvirus bovino 1 (BoHV-1.1). Desde el día 0 hasta el día 12 posinfección, se realizó diariamente la captura de aproximadamente 2000 moscas en el rodeo del campo, las cuales

fueron liberadas en el box de los bovinos infectados. A las 24 h de estar en contacto con los bovinos infectados, las moscas fueron recapturadas y se procedió a la identificación de partículas virales en las mismas así como en las secreciones nasales y oculares tomadas de los bovinos. Como se puede observar en la figura 4, si bien pudimos identificar virus en las secreciones nasales y oculares de los bovinos desafiados, no pudimos demostrar la presencia del virus en moscas que parasitaban los animales enfermos. Estos resultados señalan que la probabilidad de que la mosca oficie de vector de este patógeno es muy reducida.

## 2. Identificación de los componentes secretados por la saliva de la mosca de los cuernos

Las fuentes de información para poder identificar los componentes de la saliva de la mosca de los cuernos básicamente fueron dos: el aislamiento de la glándula salival y la propia obtención de saliva de la mosca.

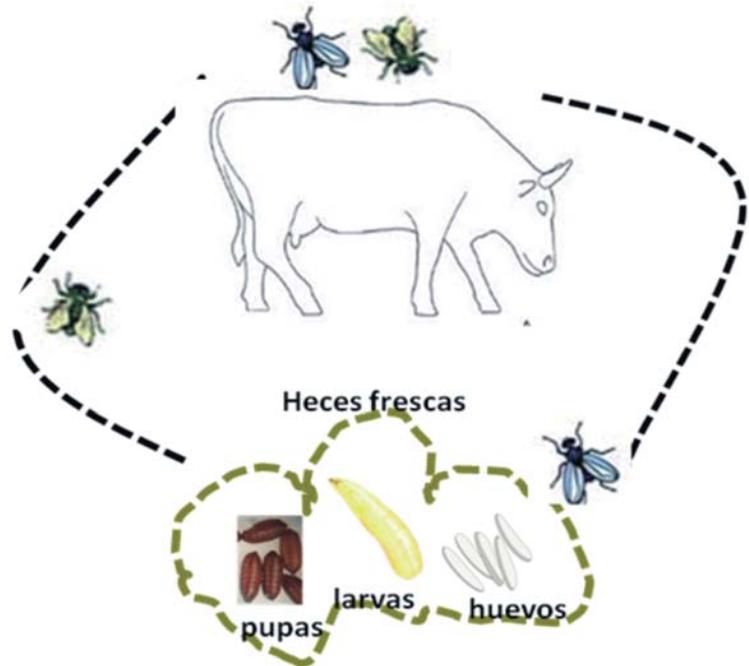


Figura 2. Ciclo biológico de la mosca de los cuernos.

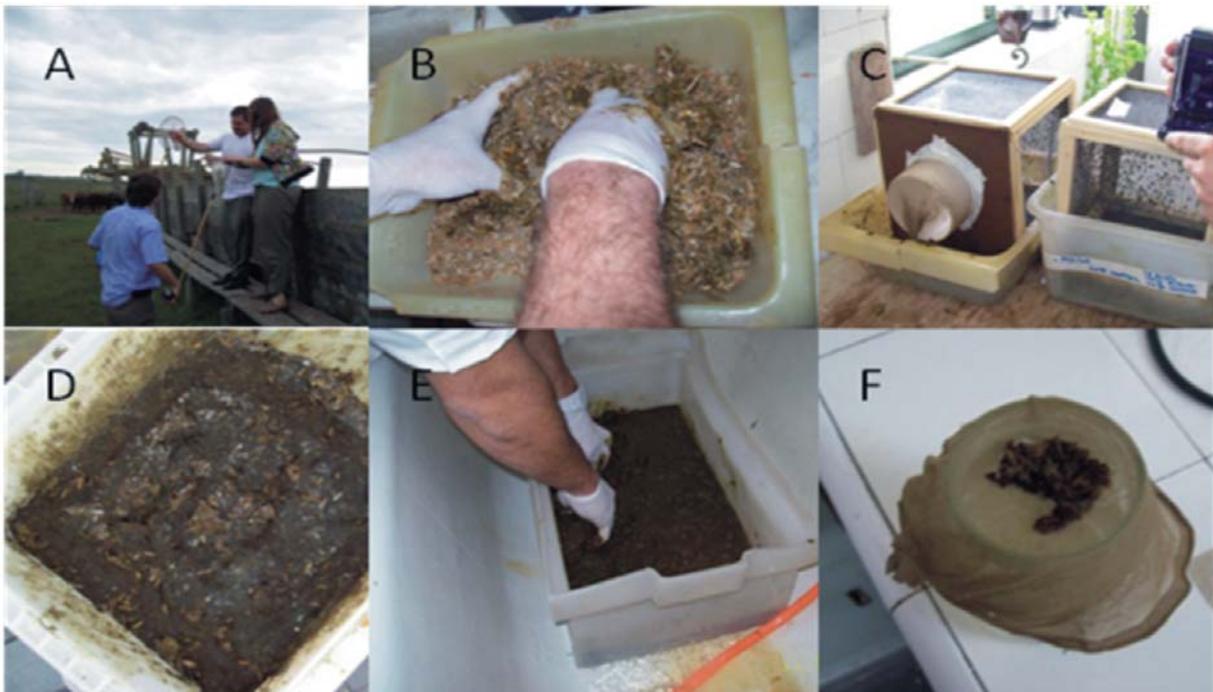
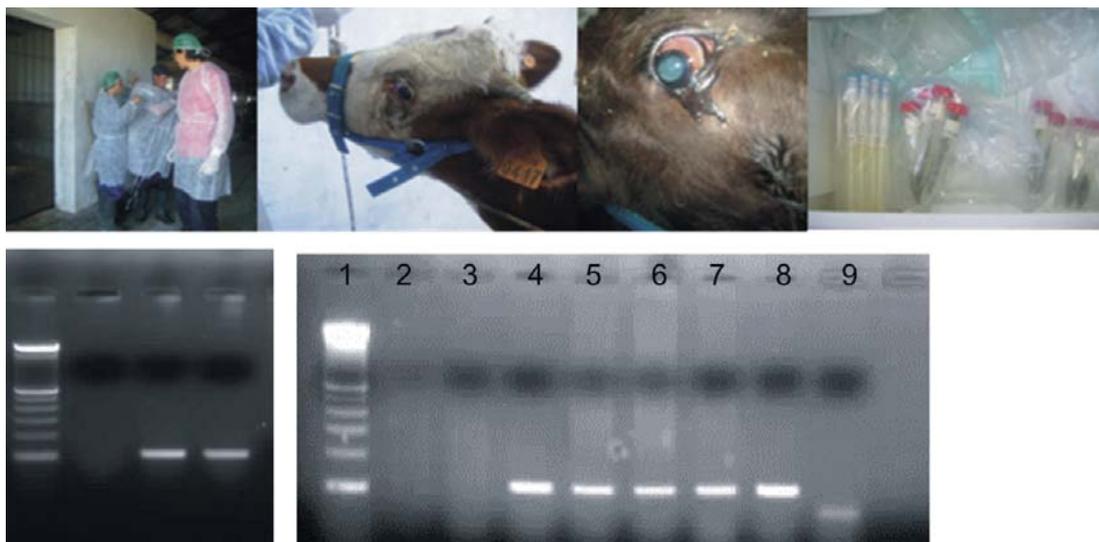


Figura 3. Producción de moscas de los cuernos en el laboratorio. A. captura de moscas salvajes; B. preparación de medio de cultivo de larvas; C. puesta de huevos de moscas; D., E. y F. procedimiento de recuperación de pupas por flotación.



**Figura 4.** Evaluación de la mosca de los cuernos como vector de IBR en bovinos 1. Imágenes de infección experimental 2.A) PCR convencional de controles positivos. Carril 1, marcador 100pb Invitrogen; carril 2, control negativo (H<sub>2</sub>O); carril 3, control positivo 50ng de ADN viral; carril 4, control positivo 100ng de ADN viral. 2.B) PCR convencional de muestras de infección experimental. Carril 1, marcador 100pb; carril 2,3, moscas infectadas 423; carril 4,5, hisopo ocular 423; carril 6,7, hisopo ocular 417; carril 8, control positivo; carril 9, control negativo.

Las glándulas salivales de la mosca de los cuernos, fueron identificadas como dos estructuras tubulares de aproximadamente 2 mm de longitud adosadas a los costados del intestino. Histológicamente, están compuestas por una monocapa de células poliédricas que tapizan un único conducto interno. Cuando analizamos esa estructura por microscopía electrónica de transmisión, observamos que las células se encuentran organizadas formando un tubo simple que presenta un lumen central dentro del cual la saliva es aparentemente secretada (Figura 5).

Una vez identificadas las glándulas, se procedió a la construcción de una genoteca de glándula salival según el procedimiento descrito por Fernández *et al.*, 2002. Brevemente, a partir de 90 pares de glándulas, se realizó la extracción de ARN total, el cual se utilizó en una única reacción de «oligo-capping» (GeneRacer, Invitrogen). Una vez obtenido el ARN con «oligo-cap», se preparó ADN copia y se lo amplificó en su totalidad por PCR. El producto amplificado fue clonado en el vector TOPO, y una alícuota de la mezcla de ligación se utilizó para transformar *E. coli* TOP 10. Se obtuvieron varios clones de ADN copia ligadas a



**Figura 5.** Identificación de la glándula salival de la mosca de los cuernos. A. mosca previo a su disección; B. apertura de abdomen e identificación de glándulas salivales (flecha); C. corte de glándula salival por microscopía de transmisión.

**Cuadro 1.** Proteínas identificadas en la glándula salival de *H. irritans*. Fueron denominadas PS y Ag5 a las secuencias 4 y 5 respectivamente obtenidas a partir de la genoteca de glándula salival.

Proteína	Familia	Posible función	Identificada en
1	Q-rich secreted protein	activación de factores de transcripción	<i>Drosophila</i>
2, 3	Thrombostasin	anti coagulante (anti trombina)	<i>H. irritans</i>
4	PS HYP 16	antiinflamatoria	<i>Aedes stephensi</i> <i>Aedes albopictus</i>
5	Ag5 Antígeno 5	Bloqueadores de canales iónicos, unión a inmunoglobulinas	<i>Stomoxys calcitrans</i>

TOPO con las bacterias transformadas químicamente. Un total de 120 clones se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación de Macrogen (Korea).

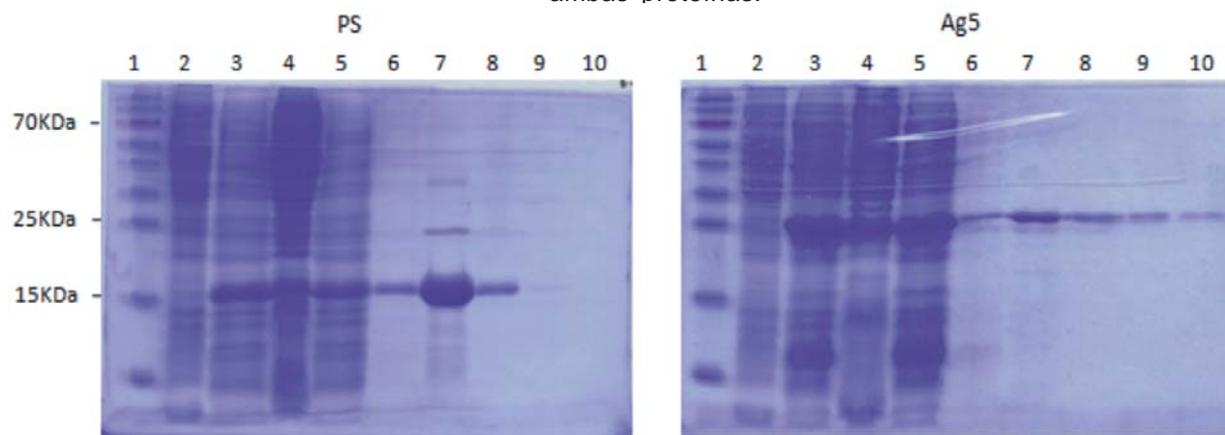
Las secuencias obtenidas (ESTs), fueron ensambladas y agrupadas, para poder identificar finalmente 5 secuencias completas de cDNA con distintos grados de homología con antígenos de glándula salival de *Stomoxys calcitrans* y otros insectos (Cuadro 1).

Luego de analizar desde el punto de vista teórico, el potencial farmacológico e inmunógeno de las secuencias, definimos en una primer etapa, producir las proteínas recombinantes de dos de ellas: PS (familia HYP16) y Ag5 (familia Antígeno 5).

Para ello se diseñaron parejas de primers con los que se amplificaron por PCR las secuencias codificantes y los productos de estas reacciones fueron

clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega). Se transformaron células competentes y se confirmó la presencia de los insertos correspondientes por PCR de las colonias seleccionadas.

Las bacterias transformadas fueron cultivadas y se indujo la expresión de las recombinantes con IPTG. El análisis por SDS-PAGE (12% de acrilamida) de extractos totales de los cultivos mostró que, en los cultivos inducidos, se observan bandas, de aproximadamente 28 kDa y 17 kDa, que no están presentes en los cultivos no inducidos. El tamaño de estas bandas fue similar al esperado para las recombinantes correspondientes a Ag5 (27 kDa) y PS (16 kDa), respectivamente. Las proteínas recombinantes fueron purificadas por afinidad con matrices de Ni<sup>2+</sup>-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). En la Figura 6 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las purificaciones de ambas proteínas.



**Figura 6.** Análisis por SDS-PAGE de la purificación de Ag5 y PS (geles de poliacrilamida 12% teñidos con azul de Coomassie). **Carril 1**, marcador de peso molecular (Fermentas); **carril 2**, extracto bacteriano total previo a la inducción; **carril 3**, extracto bacteriano total, luego de la inducción; **carril 4**, fracción insoluble del extracto total luego de la inducción; **carril 5**, fracción no retenida en la matriz de afinidad; **carril 6**, lavado; **carriles 7 al 10**, cada una de cinco eluciones realizadas a pH 4,5.

### 3. Pruebas de campo: evaluación de cargas de bovinos naturalmente parasitados y su respuesta inmune natural e inducida a las proteínas identificadas en la saliva

Con el fin de estudiar el potencial de PS y Ag5 como blancos de vacunas, se realizaron ensayos de campo donde se registro la carga de moscas de los bovinos y se determino su respuesta de anticuerpos contra estas proteínas. Para la identificación de los anticuerpos específicos, se sensibilizaron placas de ELISA con las respectivas proteínas recombinantes.

Un total de 15 bovinos biotipo carniceiro (cruzas Hereford, Aberdeen Angus y Limousin) entre 24 y 36 meses de edad fueron alojados en el Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina Canelones, Uruguay (34°38'S, 55° 55'W). Entre los meses de noviembre 2009 y mayo 2010, la carga de moscas de cada animal fue registrada semanalmente a través de un registro fotográfico y el posterior análisis del mismo por procesadores de imagen. Paralelamente, cada 15 días a esos bovinos se les extrajo sangre para evaluar el desarrollo de anticuerpos específicos contra antígenos salivales.

Tal como fue descrito por otros autores, observamos que la carga de parásitos está influenciada fundamentalmente por el peso y el color, teniendo una menor incidencia el sexo.

El número de moscas a lo largo de la estación estival resultó no ser homogéneo. La oferta de moscas se inició en octubre, alcanzando su pico máximo en diciembre (promedio de  $487 \pm 322$  moscas por animal). Luego los valores medios de moscas cayeron significativamente en los meses de enero y febrero (promedios de  $209 \pm 156$  and  $133 \pm 103$  respectivamente). En el mes de marzo, observamos un nuevo incremento de moscas significativamente mayor a febrero pero menor al de diciembre ( $233 \pm 221$ ) (Figura 7).

Cuando analizamos los títulos de anticuerpos específicos contra Ag5 y PS demostramos por primera vez, que todos los bovinos desarrollaron respuestas específicas contra dichos antígenos. Los mayores títulos se alcanzaron en el mes de diciembre y luego fueron declinando hasta desaparecer completamente en el mes de julio (Cuadro 2).

No pudimos encontrar una correlación entre carga de moscas y título de anticuerpos, por lo cual no hallamos evidencia de que la respuesta inmune frente a la exposición natural de bovinos a las moscas sea capaz de reducir directamente las cargas parasitarias.

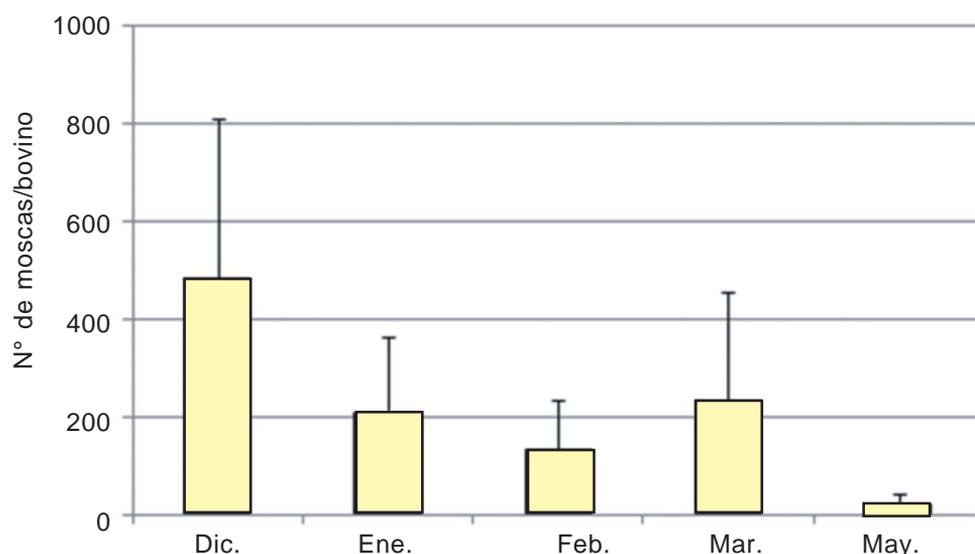


Figura 7. Distribución de cargas de moscas de los cuernos en la época estival.

**Cuadro 2.** Niveles de anticuerpos específicos contra PS y Ag5 de bovinos naturalmente parasitados.

Mes	Niveles de anticuerpos (UA)		
	Nº bovinos	Anticuerpos Anti rPS	Anticuerpos anti rAg5
Diciembre	15	133 ( $\pm$ 82)	965 ( $\pm$ 1000)
Enero	15	110 ( $\pm$ 71)	1002 ( $\pm$ 1450)
Febrero	15	97 ( $\pm$ 87)	513 ( $\pm$ 276)
Mayo	15	4 ( $\pm$ 5)	51 ( $\pm$ 35)

Sin embargo, la respuesta de anticuerpos contra antígenos salivales de la mosca podría contribuir a explicar las variaciones en la oferta de parásitos en el campo a lo largo de la estación estival, tal como fue planteado por otros autores (Harvey y Launchbaugh, 1982; Baron y Lysyk, 1995).

Nuestros resultados señalan que luego que los bovinos alcanzan su pico máximo de anticuerpos, la oferta de moscas cae en el rodeo general. Además existe un segundo pico en marzo (menor al inicial), luego de la reducción parcial del título de anticuerpos en el rodeo en el mes de febrero (donde 80% y 60% de los animales redujo su título para Ag5 y PS respectivamente).

Un elemento adicional es que ha sido descrito que las hembras de la mosca de los cuernos reducen su puesta de huevos, si se les reduce la oferta de sangre (Cupp 2004). Si consideramos que los anticuerpos específicos contra antígenos salivales podrían bloquear la acción de los mismos, podría haber una limitación de la capacidad de alimentarse cuando los anticuerpos llegan a sus niveles máximos.

Para evidenciar que los antígenos de la saliva pueden controlar el desarrollo de la ofertas de moscas en un rodeo, deberemos continuar realizando estudios.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha alcanzado la identificación de moléculas presentes en la saliva de la mosca de los cuernos.

Estas moléculas para las moscas tienen un rol preponderante a la hora de

tomar su alimento del bovino, por lo cual debemos seguir estudiando su potencial como blancos de vacunas.

Si bien en el presente estudio, no observamos que la respuesta de anticuerpos contra dos de los antígenos identificados controlara directamente la carga parasitaria de los animales, existen indicios que podría existir una regulación de la oferta de moscas en un rodeo a partir de una elevación de la respuesta de anticuerpos. Para confirmar esto, nuevos estudios serán necesarios.

## BIBLIOGRAFÍA

- BARON, R.W.; LYSYK, T.J.** 1995. Antibody responses in cattle infested with *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). J Med Entomol 32, 630-635.
- CUPP, M.S.; CUPP, E.W.; NAVARRE, C.; WISNEWSKI, N.; BRANDT, K.S.; SILVER, G.M.; ZHANG, D.; PANANGALA, V.** 2004. Evaluation of a recombinant salivary gland protein (Thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. Vaccine 22, 2285-2297.
- FERNÁNDEZ, C.; GREGORY, W.F.; LOKE, P., MAIZELS, R.M.** 2002. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. Mol Biochem Parasitol 122, 171-180.
- HAUFE, W.O.** 1982. Growth of range cattle protected from horn flies (*Haematobia irritans*) on behavior of cattle. Journal of Animal Science 62: 567-573.
- HARVEY, T.L.; LAUNCHBAUGH, J.L.** 1982. Effect of horn flies on behavior on

- cattle. *J. Econ. Entomol.* 75: 27-127.
- MENDES, J.; LINHARES, A.X.** 1999. Diapause, pupation sites and parasitism of the horn fly, *Haematobia irritans*, in south-eastern Brazil. *Med Vet Entomol* 13, 185-190.
- OYARZUN, M.P.; QUIROZ, A.; BIRKETT, M.A.** 2008. Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Med Vet Entomol* 22, 188-202.
- RIBEIRO, J.M.** 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4, 143-152.
- VANZINI, G. L.; TOURNI, R.; LLOVET, L.** 1997. Danos ocasionados por ectoparásitos en la industria del cuero. *Therios* 26: 84-88.
- WANG, X.; RIBEIRO, J.M.; BROCE, A.B.; WILKERSON, M.J.; KANOST, M.R.** 2009. An insight into the transcriptome and proteome of the salivary gland of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem Mol. Biol.* 39, 607-614.