

CARACTERIZACIÓN POR PRIMERA VEZ DE UNA CEPA CUBANA DE GARRAPATAS DEL COMPLEJO *RHIPICEPHALUS SANGUINEUS*. ESTABLECIMIENTO DE UNA COLONIA EN EL LABORATORIO.

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

AUTORES PRINCIPALES: Pedro Enrique Encinosa Guzmán (20%), Alina Rodríguez Mallon (20%), Yamil Bello Soto (20%).

OTROS AUTORES: Pedro Puente (5%), Mario Pablo Estrada García (5%), Carlos Montero (5%), Danny Pérez Pérez (5%), Lillian Gómez Pérez (4%), Lídice Méndez Pérez (4%), Cigry Pérez Pérez (4%), Milagros Vargas (3%), Yamilet Cárdenas Cuellar (1%), Marisdania Joglar Piñeiro (1%), Elsa Rodríguez Rodríguez (1%), Dailenis Abella Matos (1%), Jose Angel Silva Guirado (1%).

AUTORA PARA LA CORRESPONDENCIA:

Dra. Alina Rodríguez Mallon

Jefe del Departamento de Biotecnología Animal

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Ave 31 entre 158 y 190. Cubanacán, Playa. Apartado Postal 6162

Teléfono: 7271 6022 Ext. 5103 ó 7250 4407 email: alina.rodriguez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Las garrapatas son ectoparásitos, vectores de agentes infecciosos causantes de enfermedades humanas y animales que provocan grandes pérdidas económicas en la esfera agropecuaria. El uso de químicos constituye la principal medida para el control de estos ectoparásitos. Su uso intensivo provoca contaminación ambiental, de los alimentos y el desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas. La vacunación es un método alternativo que se considera eficaz y sostenible, pero en la actualidad no existe una vacuna con antígenos protectores contra las infestaciones de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) en perros. El desarrollo de una vacuna contra esta garrapata requiere de un modelo experimental que proporcione los datos biológicos pertinentes. El presente trabajo resume la caracterización morfológica y molecular por primera vez de un aislamiento de una cepa de campo cubana de garrapatas *R. sanguineus*. En el trabajo se demuestra que la cepa cubana está estrechamente relacionada con la especie *R. sanguineus* sensu lato perteneciendo al clado del linaje del norte o especies tropicales. Los resultados sugieren que esta cepa es resistente al amitraz. A partir de este aislamiento de garrapatas se estableció una colonia bajo condiciones controladas en el laboratorio. En estas condiciones el ciclo vital de estas garrapatas se completó en 85 días y después de cada ciclo; el 16% de los huevos iniciales totales son hembras capaces de poner huevos. Estos resultados garantizan el mantenimiento a largo plazo de la colonia y la producción fiable de ejemplares de garrapatas bajo condiciones estandarizadas adecuadas como modelo experimental para diferentes estudios biológicos, incluyendo la identificación con éxito de nuevos candidatos para vacunas anti-garrapatas. Los resultados de esta propuesta están avalados

por publicaciones en dos reconocidas revistas internacionales de alto factor de impacto: International Journal of Acarology (Vol 42(1) (2016) y Veterinary Parasitology (Vol 215:78-87 (2016)). Se han presentado en varios eventos científicos internacionales y cuentan con el aval de importantes especialistas en el tema. El uso de la colonia para la pesquisa de vacunas contra garrapatas se introdujo en los estudios con el candidato derivado de la proteína ribosomal P0 que se encuentra actualmente en fase de desarrollo experimental y se publicó en la revista Vaccine (Vol 30 (2012), pp. 1782-1789).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un modelo experimental de garrapatas para el desarrollo de diferentes ensayos biológicos que permitan dilucidar los complejos mecanismos que subyacen en la interacción de las garrapatas con sus mamíferos hospederos y con los patógenos que ellas transmiten, así como en los ensayos para la pesquisa de nuevos antígenos con una función biológica importante dentro del artrópodo, de manera que la generación de anticuerpos contra ellos, sea fatal para las garrapatas. Para esto se realizó un aislamiento de una cepa cubana de campo de garrapatas *R. sanguineus*. Se partió de la recolección de 10 garrapatas hembras repletas naturalmente desprendidas de un perro en el patio de un propietario particular en el municipio mayabequense de Bejucal, un pueblo cerca de la ciudad de La Habana, Cuba (coordenadas geográficas: 22° 55'58 "N 82° 23'13" W). Las larvas obtenidas a partir de estas hembras se mezclaron y se designaron como el aislamiento de campo "Bejucal 2010".

Hay evidencias de que *R. sanguineus* puede estar compuesta por más de una especie, por lo que su estatus taxonómico es un tema actual de debate mundial. La pobre descripción original de la especie realizada por Latreille, la pérdida del espécimen tipo de la especie y las similitudes morfológicas entre las garrapatas que pertenecen al llamado grupo de especies "*R. sanguineus*" complican su clasificación taxonómica y hacen de la identificación de estos especímenes una tarea difícil, incluso para un taxonomista experimentado. Durante la última década, los estudios moleculares han mostrado la variabilidad genética de diferentes cepas de *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) y han logrado diferenciar taxones estrechamente relacionados dentro del grupo pero provenientes de diferentes localidades geográficas. Estos estudios han demostrado la existencia de dos linajes divergentes dentro de *R. sanguineus* s.l.: el llamado "Linaje sur" o especies de clima templado, que incluyen garrapatas de localidades de Argentina, Uruguay, Chile e Italia y el "Linaje norte" o especies tropicales que incluyen garrapatas de Brasil, Paraguay, Colombia, Sudáfrica, Mozambique y de dos localidades del norte de Argentina. El tamaño, los pesos de las hembras alimentadas, la fecundidad y la duración del ciclo de vida de las garrapatas de esta especie pueden variar para los aislados de las diferentes regiones geográficas. Según la literatura existe una fuerte asociación entre la temperatura ambiente y la población de garrapatas. Las características morfológicas descritas en la literatura, que son distintivas para el género *Rhipicephalus*, se encontraron presentes en los individuos que pertenecen al aislamiento "Bejucal 2010" y las características relevantes para la diferenciación taxonómica de las diferentes especies del género presentes en el aislamiento se muestran en la Figura 1.

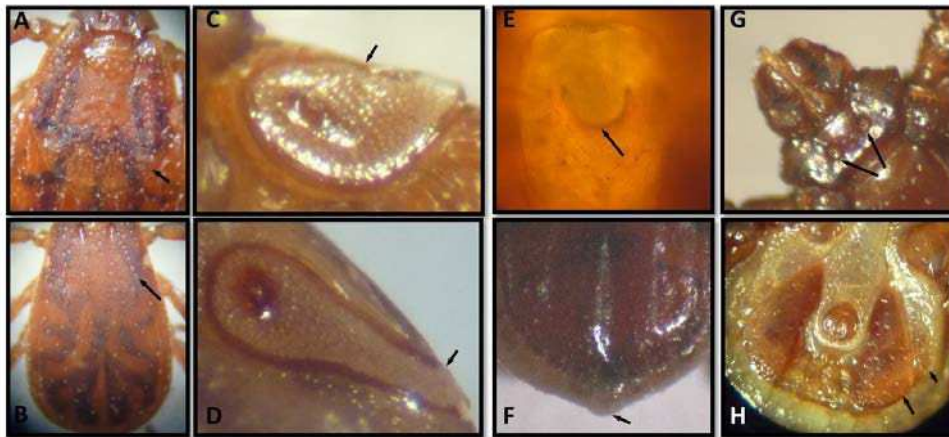


Figura 1. Características morfológicas presentes en los individuos del aislamiento "Bejucal 2010" taxonómicamente relevantes para la diferenciación de *Rhipicephalus* spp. (A) patrón de puntuación moderado y la forma del margen posterior del escudo dorsal en las hembras. (B) Patrón de puntuación moderado del escudo dorsal en los machos (C) Espiráculos grandes en forma de coma en las hembras. (D) Placas espiraculares en forma de coma y con una cola dorsal alargada en los machos. (E) Labios posteriores a la abertura genital en las hembras en forma de U. (F) Proceso caudal corto y ligeramente redondeado en los machos alimentados. (G) Áreas Porosas en las hembras con una distancia de separación mayor con respecto al diámetro de estas áreas. (H) Placas adanales largas y en forma de trapecio en los machos y presencia de placas accesorias vestigiales estrechas. Las flechas señalan las características relevantes de cada imagen.

Las mediciones de las estructuras clave de las garrapatas machos y hembras examinadas en este estudio se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Medidas (media \pm desviación estándar) de las características claves para la diferenciación entre *Rhipicephalus* spp.

Estructura	Hembras (n=15)		Machos (n=15)	
	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Longitud (mm)	Ancho (mm)
Gnatosoma	0.59 \pm 0.04	0.68 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
Base del Capitulo	0.26 \pm 0.04	0.67 \pm 0.06	0.23 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
Hypostoma	0.34 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02	0.13 \pm 0.00
Idiosoma	2.25 \pm 0.09	1.35 \pm 0.06	2.27 \pm 0.06	1.41 \pm 0.03
Escudo	1.22 \pm 0.06	1.20 \pm 0.1	-	-
Placas Espiraculares (PE)	0.3 \pm 0.04	0.2 \pm 0.04	0.36 \pm 0.08	0.18 \pm 0.03
Tallo Dorsal en las PE	-	-	0.39 \pm 0.05	-
Distancia entre áreas porosas	0.35 \pm 0.05	-	-	-
Primer festón	-	0.14 \pm 0.02	-	0.14 \pm 0.02
Placas adanales	-	-	0.53 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03

En la Figura 2 se muestran los árboles filogenéticos obtenidos para las secuencias de los fragmentos de ADN correspondientes a los genes mitocondriales 16S y 12S

ribosomales amplificados por PCR a partir del ADN genómico de las larvas del aislamiento "Bejucal 2010". En ambos casos, los análisis filogenéticos realizados concordaron en agrupar el aislamiento "Bejucal 2010" con la especie *R. sanguineus* s.l. que pertenece al linaje norte o especies tropicales.

La sensibilidad del aislamiento de campo "Bejucal 2010" a amitraz, cumafos y flumetrina se determinó mediante ensayos de inmersión de larvas (LIT) y en el caso del amitraz también se llevó a cabo la prueba del paquete de larvas (LPT) con las modificaciones propuestas por Miller. Según el análisis Probit de los resultados de la mortalidad de los individuos del aislamiento "Bejucal 2010" a diferentes dosis de acaricida obtenida en los bioensayos correspondientes mostrados en la Tabla 2, Flumetrina resultó ser el acaricida más eficaz contra las garrapatas *R. sanguineus* s.l. del aislamiento según el valor de DL50 más bajo observado en el LIT seguido del de cumafos. La DL90 > 0,04%, la pendiente de la recta de regresión < 2 y el porcentaje de mortalidad < 95% a una concentración de 0,03% de amitraz en LPT y LIT sugieren resistencia de las garrapatas del aislamiento al amitraz.

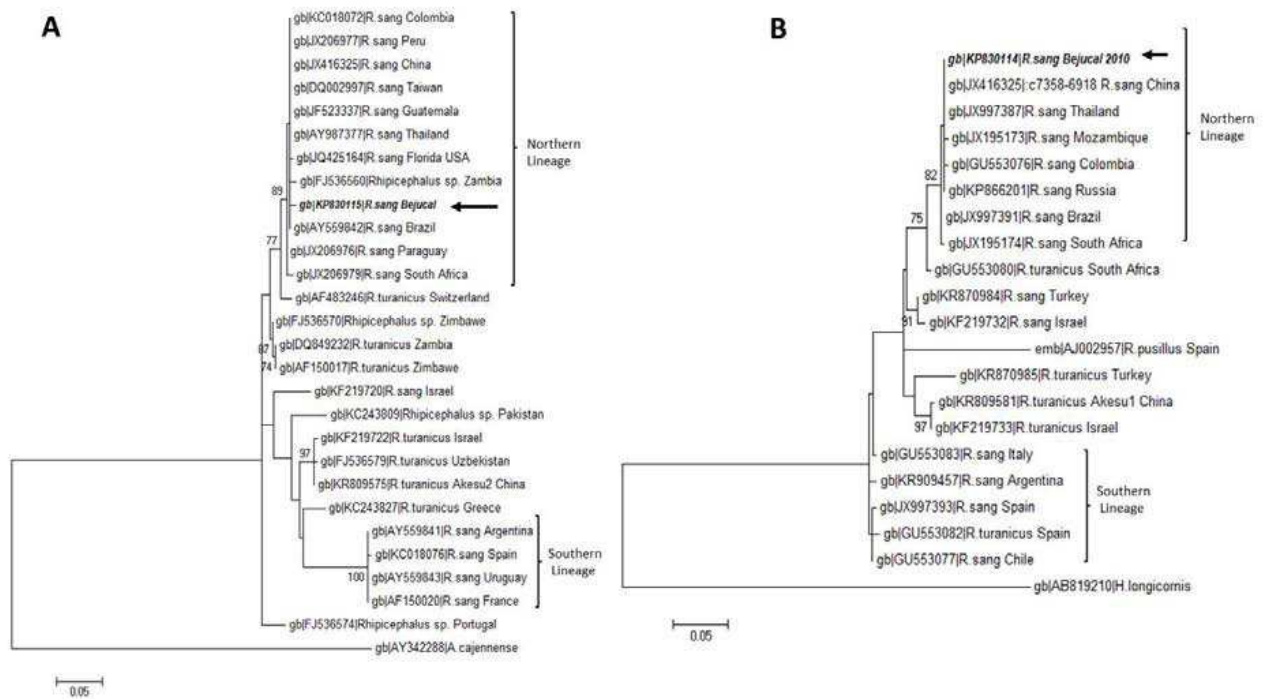


Figura 2. Dendrogramas generados en el análisis filogenético molecular de las secuencias 12S rDNA (A) y 16S rDNA (B) obtenidos para el aislamiento "Bejucal 2010" (aparece en letras negras) y las secuencias de diferentes especies del complejo *Rhipicephalus sanguineus* disponibles en el GenBank para cada gen. Los números de acceso de las secuencias de 12S y 16S del aislamiento "Bejucal 2010" depositadas en la base de datos GenBank son KP830115 y KP830114, respectivamente. La historia evolutiva de estas secuencias se dedujo utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de 3 parámetros de Tamura. Se muestran los árboles con la topología y la longitud de las ramas que maximiza la probabilidad de ajuste de los datos observados al modelo. El porcentaje de árboles en los que los taxones se agrupan juntos se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron mediante la aplicación del método del Vecino más cercano (Neighbour-Joining) a una matriz de distancias entre pares de bases estimadas utilizando el Método de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL- Maximum Composite Likelihood). Una distribución gamma discreta de 5 categorías se utilizó para estimar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios (+ G, el parámetro = 0,3758 y el parámetro = 0,3263 de 12S y 16S, respectivamente). Los árboles están dibujados a escala, con longitudes de rama medidos como el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó a 28 y 21 secuencias de

nucleótidos de 12S y 16S, respectivamente. Se eliminaron todas las posiciones con cobertura de sitio inferior al 95%. Hubo un total de 328 y 356 posiciones en el último conjunto de datos para el 12S y 16S, respectivamente. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA6 [27].

Tabla 2. Resultados de los bioensayos de sensibilidad a acaricidas de las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* del aislamiento "Bejucal 2010".

Acaricida	n	Pendiente (\pm S.E)	DL ₅₀ (95% CL) (%)	DL ₉₀ (95% CL) (%)	X ² (d.f.)
Amitraz (LIT)	4146	1.929 \pm 0.052	0.063 (0.050-0.078)	0.289 (0.215-0.422)	269 (28)
Amitraz (LPT)	5015	0.992 \pm 0.024	0.0315 (0.01433-0.06758)	0.61784 (0.22895-3.89936)	439 (10)
Cumafos (LIT)	3204	1.444 \pm 0.062	0.00037 (0.00020-0.00057)	0.00287 (0.00201-0.00464)	313 (28)
Flumetrina (LIT)	3157	2.069 \pm 0.067	0.00004 (0.00003-0.00005)	0.00016 (0.00014-0.00021)	48 (14)

LIT: Ensayo de Inmersión de Larvas; LPT: Ensayo del Paquete de Larvas

n: número de larvas; S.E.: error estandar; 95% CL: 95% de límite de confianza; x²: valor de chi-cuadrado, d.f.: grados de libertad.

Estos resultados constituyen el primer informe de caracterización de sensibilidad a acaricidas de una especie cubana de garrapatas *R. sanguineus* s.l. La información relativa a la distribución regional y la prevalencia de la resistencia a acaricidas en poblaciones cubanas de *R. sanguineus* es muy escasa. En consecuencia, la selección y el uso de acaricidas en el país se basa en criterios distintos de la eficacia, y las aplicaciones son a menudo insuficientes, lo que puede dar lugar a tratamientos costosos, pero ineficaces. Esto aumenta la probabilidad de desarrollar poblaciones de garrapatas resistentes.

A partir de este aislamiento bien caracterizado, se estableció una colonia en nuestro laboratorio. Todos los estadíos parasitarios de las garrapatas se alimentan sobre perros machos de la raza Beagle (*Canis familiaris*) no sensibilizados contra garrapatas, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), dentro de cámaras elaboradas artesanalmente. Los estadíos fuera del hospedero en las fases no parasíticas, se mantienen en los laboratorios del CIGB, en frascos de vidrio con malla en la tapa a 28°C y un 80% de humedad relativa con un fotoperiodo de 12 h luz: oscuridad. El ciclo biológico de las garrapatas *R. sanguineus* s.l. en la colonia bajo las condiciones establecidas se completó en 85 días como promedio, con un mínimo de 60 días y un máximo de 108 días. Este valor es muy cercano a los valores informados por otros autores. Sobre la base de la mortalidad calculada para cada etapa del ciclo vital, a partir de 1914 huevos puestos por una hembra como promedio, se obtuvieron 306 nuevas hembras capaces de poner huevos, lo que representa el 16% del total de huevos iniciales (Figura 3). Estos resultados garantizan el mantenimiento de la colonia y la producción de ejemplares de garrapatas bajo condiciones estandarizadas las que son útiles para la realización de diferentes ensayos biológicos y como modelo experimental en ensayos de desafío, para determinar la eficacia de nuevos antígenos candidatos a vacuna contra garrapatas.

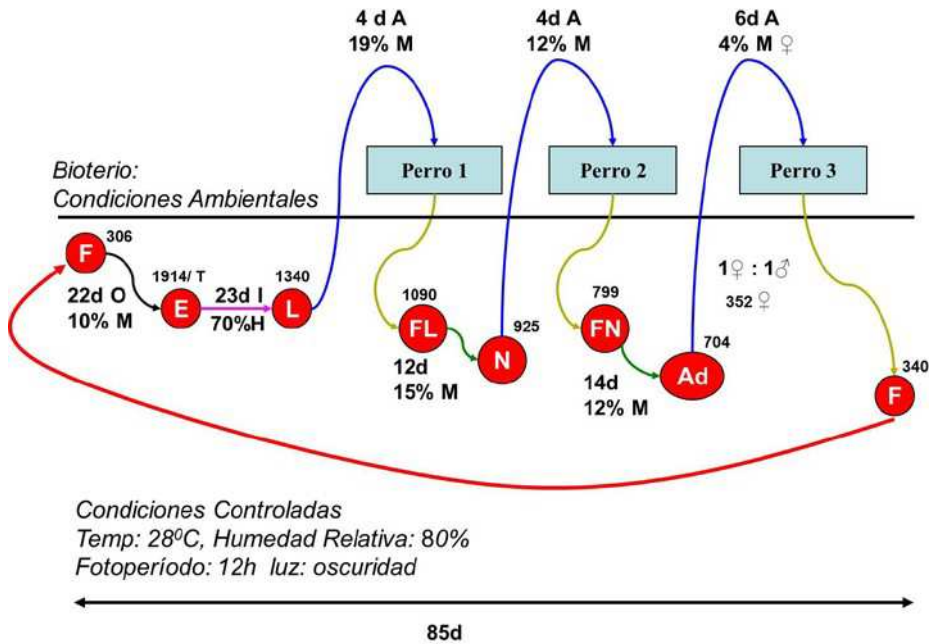


Figura 3. Ciclo parasitario de las garrapatas *R. sanguineus* s.l. en la colonia bajo las condiciones establecidas en el laboratorio. F: hembras repletas, E: huevos, L: larvas, FL: larvas alimentadas, N: ninfas, FN: ninfas alimentadas, Ad: Adultos, d: días, M: mortalidad, O: oviposición, H: eclosión, I: Incubación, A: alimentación, ♀: hembras, ♂: machos.

Este resultado ha sido introducido en el proceso de investigaciones del CIGB en los trabajos desarrollados en el Proyecto para la búsqueda de nuevos antígenos contra garrapatas. Los tres estadios de las garrapatas *R. sanguineus* de la colonia establecida en el CIGB a partir del aislamiento de campo “Bejucal 2010” se usaron en el reto de conejos inmunizados con el candidato a vacuna anti-garrapatas basado en un péptido de la proteína ribosomal P0. Los resultados de este estudio fueron publicados en la revista “Vaccine” y demostraron que esta colonia de garrapatas es útil para este tipo de experimentos de inmunización-desafío.

La validez del sistema conejo - *R. sanguineus* como modelo alternativo adecuado para probar nuevas vacunas contra garrapatas es corroborada además, con la obtención de un efecto similar de los anticuerpos anti- P0 sobre la especie de garrapatas del bovino *R. B. microplus*. Un obstáculo importante de experimentos con nuevos antígenos contra garrapatas para los laboratorios y la industria es el costo de la realización de ensayos en las especies diana. En estos casos, nuestro modelo podría hacer una importante contribución al desarrollo de vacunas contra garrapatas y ectoparásitos en general.

NOVEDAD CIENTÍFICA DEL TRABAJO

Los resultados presentados en este trabajo constituyen el primer estudio de caracterización de la especie de garrapatas *R. sanguineus* en Cuba.

Proporcionan un punto de partida para el estudio de las poblaciones cubanas de estas garrapatas.

✚ Este trabajo es además pionero en el establecimiento de una colonia de esta especie en condiciones de laboratorio en Cuba y aporta conocimientos sobre el comportamiento del ciclo vital de estas garrapatas en diferentes condiciones de humedad y temperatura y alimentado sobre diferentes mamíferos hospederos y esto puede ayudar en el estudio de los complejos mecanismos involucrados en el proceso de infestación de las garrapatas y sus relaciones con el organismo hospedero.

IMPORTANCIA PRÁCTICA PRINCIPAL DEL TRABAJO

✚ Contar con una colonia de garrapatas de esta especie, desde el punto de vista práctico nos permite desarrollar experimentos para comprender los mecanismos involucrados en la compleja interacción entre las garrapatas y sus hospederos y de las garrapatas como vectores de otros parásitos causantes de enfermedades y contar con un modelo experimental para la pesquisa de antígenos útiles para el desarrollo de vacunas contra garrapatas.

✚ Este trabajo aborda una temática de vigencia actual, que constituye un problema no resuelto a nivel mundial. En la actualidad, la lucha contra ectoparásitos continua basada fundamentalmente en el uso de sustancias químicas. Cualquier aplicación de tecnología que ayude a disminuir el uso y abuso de sustancias químicas contaminantes y generadoras de resistencia en los ectoparásitos, será un resultado importante y aplicable que dada la situación actual a la que se enfrenta el planeta, es una tarea de urgente prioridad.

✚ La colonia nos permitió ensayos con el nuevo candidato basado en la proteína ribosomal P0 y permitirá la evaluación de otros antígenos contra garrapatas y el diseño de estrategias más eficientes para el control de garrapatas y enfermedades transmitidas por ellas. La identificación de moléculas útiles contra las infestaciones de garrapatas, su obtención en cantidades suficientes, su inclusión dentro de una formulación vacunal y la demostración de su eficacia en ensayos de inmunización y reto constituyen retos científicos de gran relevancia en este tema.

✚ GAVAC es la única vacuna por técnicas de ADN recombinante contra garrapatas que se encuentra disponible comercialmente. La obtención de un nuevo antígeno que por vías biológicas diferentes pueda potenciar los efectos de GAVAC, es de gran importancia para mejorar la aplicación práctica de la vacuna en la lucha contra garrapatas y ectoparásitos en general y en la realización comercial de estos productos.

✚ Dentro de los problemas que hoy tiene Cuba, la batalla económica que nos disponemos a librar es de las más importantes y dentro de la economía está la producción de alimentos como un renglón fundamental para la subsistencia de los cubanos y para la sustitución de importaciones. La producción de carne y leche es un renglón al que el país presta especial atención pues la leche que importamos para satisfacer la demanda de este producto se hace cada vez más costosa. De manera que si logramos una vacuna contra garrapatas, que mejore el desempeño de la ganadería cubana y disminuya los gastos de la economía cubana en la compra de acaricidas químicos, estaremos haciendo un aporte significativo al país y el hecho de contar con un modelo experimental de garrapatas que sea más factible desde el punto de vista económico que realizar los ensayos sobre especies dianas más costosas es una ventaja que hace el camino más expedito hacia el logro de los objetivos propuestos.

AVALES

✚ Encinosa PE; Bello Y; Rodríguez-Mallon A. Genetic and biological characterization of a Cuban tick strain from *Rhipicephalus sanguineus* complex and its sensitivity to different chemical acaricides. (2016) International Journal of Acarology 42 (1):18-25. DOI: 10.1080/01647954.2015.1113309. **Impact Factor:** 1.28.

✚ Sanches, G.S., Évora, P.M., Mangold, A.J., Jittapalpong, S., Rodríguez-Mallon, A., Encinosa, P.E., Bechara, G.H., Camargo-Mathiasa, M.I. Molecular, biological and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). (2016)

Veterinary Parasitology 215 78–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.007>. **Impact Factor:** 2.5.

PRESENTACIONES EN EVENTOS CIENTÍFICOS

✚ Congreso Biotecnología Habana - 2011, Habana, Cuba. ✚ Fórum de Base de ciencia y Técnica 2013.

✚ Congreso Internacional Labiofam 2014

✚ Taller de Bioinformática sobre Evolución Viral y Epidemiología Molecular (VEME-Cuba)

DISTINCIONES

✚ **2015** Trabajo premiado como Logro Científico-Técnico Anual del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

OTROS AVALES:

✚ Aval del Prof. Gervasio Bechara. Profesor de Patología Animal. Universidad Pontificia Católica de Paraná. Curitiba-PR, Brasil.

✚ Aval del Dr. Mario Pablo Estrada García, Director de Investigaciones Agropecuarias del CIGB donde el resultado ha sido introducido en el proceso de investigaciones.

✚ Aval del Dr. Luis Méndez Mellor, Director del Laboratorio Nacional de Parasitología.

✚ Aval de la Dra. Rafmary Rodríguez Fernández, Presidenta de la Sociedad Cubana de Parasitología Veterinaria.

✚ Publicación de los estudios donde el resultado fue introducido en el proceso de investigación en la Revista Vaccine. Impact Factor: 3.7