



“Prevalencia de *trypanosoma vivax* en moscas hematófagas recolectadas en distintas zonas del Ecuador con previos reportes de enfermedades hemotrópicas”

Jumbo Valencia, Jefferson German

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Armando Reyna Bello Ph.D.

14 Septiembre de 2021



Document Information

Analyzed document	Jefferson Jumbo_Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE_Biotecnologia.pdf (D112508963)
Submitted	9/13/2021 7:38:00 PM
Submitted by	
Submitter email	jgjumbo@espe.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	us.fannypoza.unia@analysis.orkund.com

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**ARMANDO
REYNA**

.....

Armando Reyna Bello, Ph.D.

C.C.: 1758891830

Director de proyecto de investigación



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación “**Prevalencia de *trypanosoma vivax* en moscas hematófagas recolectadas en distintas zonas del ecuador con previos reportes de enfermedades hemotrópicas**”, fue realizado por el señor **Jumbo Valencia Jefferson German**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 14 de septiembre de 2021

Firma:



Firmado electrónicamente por:

**ARMANDO
REYNA**

.....
Armando Reyna Bello, Ph.D.

C. C.: 1758891830

Director de proyecto de investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Jumbo Valencia Jefferson German**, con cédula de ciudadanía N°2350279739, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: es de mi autoría y responsabilidad, "**Prevalencia de *trypanosoma vivax* en moscas hematófagas recolectadas en distintas zonas del Ecuador con previos reportes de enfermedades hemotrópicas**" cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 14 de septiembre de 2021

Firma

Jumbo Valencia Jefferson German

C.C.: 2350279739



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Jumbo Valencia Jefferson German**, con cédula de ciudadanía N° 2300288350, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Prevalencia de *trypanosoma vivax* en moscas hematófagas recolectadas en distintas zonas del ecuador con previos reportes de enfermedades hemotrópicas"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 14 de septiembre de 2021

Firma

Jumbo Valencia Jefferson German

C.C.:2350279739

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico especialmente a mis padres Ángel Jumbo y Rosa Valencia, quienes fueron los pilares fundamentales durante mi formación académica. Infinitas gracias a ellos que me han brindado su apoyo y amor incondicionales.

A mis hermanos Angie y Leonardo quienes me han apoyado en cada etapa de mi vida.

Al resto de mi familia y amigos quienes siempre han estado dándome alientos en los momentos más difíciles de mi vida.

Jefferson.

Agradecimientos

Gracias a Dios y a mis padres por haberme permitido desarrollar mis estudios universitarios, y por ser piezas fundamentales para la consecución de este logro. Quiero recalcar el esfuerzo que realizó mi madre Rosa Valencia durante la realización de mi proyecto de investigación, muchas gracias por su colaboración.

Especiales agradecimientos al Dr. Armando Reyna por permitirme desarrollar mi proyecto en el laboratorio de biología molecular, por sus conocimientos impartidos durante la etapa universitaria y por su apoyo incondicional brindado durante la elaboración del proyecto.

Gracias igualmente a mis profesores Ing. Natasha Baer, Ing. Pedro Puente e Ing. Pablo Álvarez, por ayudarme en mi formación académica y por su amistad brindada.

Quiero agradecer de igual forma al Dr. Jorge Ron y a la Ing. Cristina Cholota por el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto y por haber compartido conmigo sus conocimientos.

De igual forma quiero agradecer a mis amigos de la universidad, Mateo, Hugo, Jorge C., Jorge A., Harrison, Brandon, Jhonny, y Jordan por haber compartido los mejores momentos de amistad, y por hacer de mi etapa universitaria una de las mejores experiencias, espero que nuestra amistad perdure con el tiempo.

Mención de agradecimientos a mis compañeras Raquel y Pamela por los grandes momentos compartidos, las llevaré presentes en mi mente por siempre.

Jefferson.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Análisis urkund	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Resumen.....	13
Abstract	14
Capítulo I.....	15
Introducción.....	15
Formulación del problema.....	15
Justificación del problema	18
Daños ocasionados por los insectos hematófagos	18
Daños directos.....	18
Daños indirectos.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivos	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos	20
Capítulo II.....	21
Revisión de literatura	21
Tabanidae.....	21
Ciclo de vida	23
Taxonomía.....	24
Trampa Nzi	25
Vector mecánico	25
Vector biológico	25
Tripanosomosis.....	25
Generalidades	25
Sintomatología de la tripanosomosis por Trypanosoma vivax	26
Trypanosoma vivax	26

Características y morfología de <i>T. vivax</i>	27
Ciclo biológico de <i>T. vivax</i>	28
Transmisión.....	29
Diagnóstico	29
Reacción en Cadena de la Polimerasa	29
Catepsina L una cisteína proteasa empleada para la detección de <i>T. vivax</i>	30
Capítulo III.....	31
Metodología.....	31
Sitios de estudio.....	31
Recolección de los insectos.....	32
Determinación de la familia de la muestra empleando las características morfológicas	34
Extracción de ADN y amplificación PCR.....	34
Secuenciación, alineamiento de secuencias, y análisis filogenético	38
Capítulo IV	40
Resultados	40
Amplificación del gen COI.....	41
Análisis filogenético	43
Detección de <i>trypanosoma vivax</i> mediante TvCatL-PCR.....	46
Capítulo V	47
Discusión.....	47
Detección de <i>T. vivax</i> mediante TviCatL-PCR	47
Amplificación del gen COI.....	48
Análisis filogenético	50
Capítulo VI	51
Conclusiones.....	51
Recomendaciones.....	52
Capítulo VII.....	53
Bibliografía	53

Índice de figuras

Figura 1 <i>Ejemplar de una hembra adulta de Ancala africana</i>	22
Figura 2 <i>Forma de las antenas de los tres géneros de los tabánidos</i>	23
Figura 3 <i>Ciclo de vida del tábano</i>	24
Figura 4 <i>Trypanosoma vivax de Guyana Francesa</i>	27
Figura 5 <i>Variación del ciclo de vida de los distintos tripanosomas Africanos</i>	28
Figura 6 <i>Puntos de muestreo en las provincias de Manabí y Napo</i>	31
Figura 7 <i>Trampa Nzi</i>	32
Figura 8 <i>Colocación de la trampa Nzi para la recolección de las muestras en la provincia del Napo</i>	33
Figura 9 <i>Recolección de muestras en la provincia de Manabí</i>	33
Figura 10 <i>Características morfológicas de las muestras</i>	40
Figura 11 <i>Muestras recolectadas en la provincia del Napo</i>	41
Figura 12 <i>Muestras recolectadas en la provincia de Manabí</i>	41
Figura 13 <i>PCR para la amplificación del gen COI de las muestras recolectadas en Napo</i>	42
Figura 14 <i>Muestras recolectadas en la provincia de Manabí</i>	42
Figura 15 <i>Árbol filogenético de las moscas del Napo y Manabí</i>	44
Figura 16 <i>TviCatL-PCR</i>	46

Índice de tablas

Tabla 1	<i>Cebadores para la amplificación del gen COI de los Dípteros</i>	35
Tabla 2	<i>Concentraciones y reactivos empleados para la amplificación del gen COI ...</i>	35
Tabla 3	<i>Programa PCR para la amplificación del gen COI de los dípteros</i>	36
Tabla 4	<i>Cebadores para la amplificación de la región CatL-like para Trypanosoma vivax.</i>	36
Tabla 5	<i>Concentraciones y reactivos empleados para la amplificación de la región CatL-like para Trypanosoma vivax.</i>	37
Tabla 6	<i>Cebadores para la amplificación de la región CatL-like para Trypanosoma vivax.</i>	37
Tabla 7	<i>Secuencias empleadas en el presente estudio y su origen</i>	39
Tabla 8	<i>Resumen de los resultados arrojados por el BLAST.....</i>	43

Abreviaciones

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
BLAST:	Basic Local Aligment Search Tool
CatL-Like:	Cisteína proteasa catepsina L-like
DNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
	National Center for Biotechnology
NCBI:	Information
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
U:	Unidades
µL:	Microlitros
UV:	Ultravioleta
V:	Voltios
COI:	Citocromo Oxidasa I

Resumen

La familia Tabanidae es un grupo que genera un impacto negativo para la economía del sector ganadero, ya que producen una baja en la producción de carne y leche a través de daños tanto directos como indirectos. Los tábanos son capaces de transmitir varias enfermedades, entre ellas, la tripanosomosis, ocasionada por los protozoarios del género *Trypanosoma* spp. Por esta razón, la presente investigación se centra en la evaluación molecular del tábano, mediante la secuenciación del gen COI y en la prevalencia de *Trypanosoma vivax* en el muestreo. Para este fin, se realizaron recolecciones de moscas en las provincias de Manabí y Napo con previos reportes de hemotrópicos. Posteriormente se realizó la prueba de PCR a las muestras obtenidas para la amplificación del gen COI para fines de caracterización molecular. Las secuencias obtenidas fueron evaluadas con la ayuda de BLAST para analizar la similitud con otras especies de tábanos. La detección de *T. vivax* en las moscas se realizó por TviCatL-PCR. De igual manera se elaboró un análisis filogenético con el software MEGAX. Mediante la PCR para la amplificación del gen COI, se obtuvieron secuencias ~700 pb, mismas que obtuvieron porcentajes de identidad que oscilaron entre el 82,87% y 92,24% con otras especies ya reportadas. Los organismos con los que tuvieron mayor homología fueron: *Tabanus admelanopygus* y *Poeciloderas quadrapunctatus* para las muestras de Napo y Manabí respectivamente. El análisis filogenético arrojó que las secuencias se encontraron relacionadas con especies de América y África y esta es la primera vez que en Ecuador se realiza la caracterización molecular de esta especie. En el caso de la TviCatL-PCR arrojó una prevalencia de *T. vivax* del 28,57% en las muestras analizadas. La presencia de estas moscas hematófagas en zonas con prevalencia de hemotrópicos, es una gran evidencia de que estas juegan un rol principal en la diseminación de las enfermedades parasitológicas.

- Palabras clave:

- **TRYPANOSOMA VIVAX**
- **COI**
- **TÁBANO**
- **VÉCTORES**

Abstract

The Tabanidae family is a group that generates a negative impact for the economy of the livestock sector, since they produce a decrease in the production of meat and milk through both direct and indirect damages. Horseflies are capable of transmitting various diseases, including trypanosomiasis, caused by protozoa of the genus *Trypanosoma* spp. For this reason, this research focuses on the molecular evaluation of horsefly, by sequencing the COI gene and on the prevalence of *Trypanosoma vivax* in sampling. For this purpose, fly collections were carried out in the provinces of Manabí and Napo with previous reports of hemotropics. The PCR test was then performed on samples obtained for the amplification of the COI gene for characterization purposes. The sequences obtained were evaluated through BLAST to analyze the similarity with other species of horseflies. The detection of *T. vivax* in flies was performed by TviCatL-PCR. Similarly, a phylogenetic analysis was performed with the MEGA-X software. Using the PCR for the amplification of the COI gene, ~700 bp sequences were obtained, which showed identity percentages ranging from 82.87% to 92.24% with other species already reported. The organisms with which they had greater homology were: *Tabanus admelanopygus* and *Poeciloderas quadrapunctatus* for the samples of Napo and Manabí respectively. The phylogenetic analysis showed that the sequences were found related to species from America and Africa and this is the first time that the molecular characterization of this species is performed in Ecuador. In the case of TviCatL-PCR, the prevalence of *T. vivax* was 28.57% in the samples analyzed. The presence of these hematophagous flies in areas with prevalence of hemotropics is great evidence that these play a major role in the dissemination of parasitological diseases.

- Key words:

- **TRYPANOSOMA VIVAX**
- **COI**
- **HORSEFLY**
- **VECTORS**

Capítulo I

Introducción

Formulación del problema

La clase insecta es uno de los grupos más numerosos en la Tierra, se estima que contiene alrededor de tres cuartos de un millón de las especies descritas hasta el momento. Se ha estimado que existen 14000 especies de insectos en los cinco órdenes que se alimentan de sangre, los cuales son de mucha importancia en el aspecto sanitario para la humanidad (Adams, 1999).

Estos insectos han tenido un gran impacto en la actividad ganadera, ya que son una de las principales causas en la reducción de la productividad de los animales. En los últimos años se ha estudiado su rol en la transmisión de varias enfermedades parasitológicas; pero pese a ese conocimiento obtenido, aún no se ha logrado controlar de manera eficaz la propagación de dichas enfermedades (Lehane, 2005).

Durante estos años de investigación, se sospechó que los insectos de cierta forma se encontraban involucrados con varias enfermedades febriles que afectaban tanto a humanos como a animales, hecho que posteriormente fue confirmado por la evidencia científica disponible hasta el momento. Por ejemplo, el bacteriólogo alemán Robert Koch, reportó una de las creencias de las tribus de las Montañas Usambara del Este de África, en la cual, los mosquitos que encontraron al descender a las llanuras, eran la causa de la malaria (Nuttal, 1899). En otro caso similar, el señor Richard Burton durante su viaje al Este de África, registró una de las creencias de las tribus de Somalia que contaban que los mosquitos eran los responsables de las enfermedades febriles (Burton, 1860). Adicional a esto, la mayoría de las personas que viven en lugares con presencia de moscas tsetse, las relacionaron con la propagación de la enfermedad del sueño que afecta a los humanos y nagana que es el caso de los animales.

Considerar a los insectos como vectores de enfermedades fue un hecho que se produjo a finales del siglo XIX, cuando el doctor escocés, Patrick Manson

encontró que las fases larvarias de *Wuchereria bancrofti*, se desarrollaban en el mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* (Manson, 1878). Este hecho dio pie a un conjunto de investigaciones por parte de fundaciones médicas y de entomología veterinaria. Entre las principales enfermedades transmitidas por insectos tenemos: malaria, enfermedad del sueño; elefantiasis, leishmaniasis; fiebre amarilla, nagana; surra, lengua azul; souma, anaplasmosis, entre otras.

Todas estas enfermedades generan millonarias pérdidas en el sector ganadero, pero una de las más importantes es la tripanosomosis que es transmitida por la mosca tsetse. Se estima que esta enfermedad genera alrededor de \$4.5 billones en pérdida cada año (Budd, 1999). En ciertas ocasiones los insectos hematófagos pueden estar presentes en considerables cantidades, haciendo que su picadura pueda causar la muerte de los animales afectados, ejemplos de esto fueron observados en Rumania en el año de 1923, donde murieron 16000 animales y en Yugoslavia en el año de 1934, en donde se perdieron en cambio 13900 animales debido al brote de la mosca negra (*Simulium colombaschense*) (Baranov, 1935; Ciurea and Dinulescu, 1924). La picadura de estos insectos genera estrés en el animal debido al dolor que causa, produciendo así una reducción en el rendimiento de leche, en la ganancia de peso o en la eficiencia de la alimentación.

El orden que contiene la mayoría de los insectos más importantes que se alimentan de sangre, es la Díptera. Este grupo tiene una importancia significativa para el hombre desde los puntos de vista económico y de la salud, ya que poseen un rol como vectores de distintos parásitos. Este grupo se caracteriza por tener un solo par de alas, el segundo par de alas ha sido modificado en estructuras conocidas como halteres, mismas que se emplean como órganos de equilibrio. La mayoría de Dípteros adultos poseen una larga y muy móvil cabeza, ojos bien desarrollados que a menudo son más largos en los machos que las hembras, y el aparato bucal de los primeros carece de mandíbulas y sirven solo para succionar en ciertas especies. Estos insectos poseen cuatro etapas durante el desarrollo de su vida, que son: huevos, larva, pupa y adulto (Desquesnes M. & de la Roque S., 1992). En algunas especies las formas larvarias habitan en zonas húmedas, o en la materia orgánica; por otro lado, en otras especies el estado larvario es carnívoro y se alimentan de carne o de órganos internos de

los huéspedes vertebrados. El orden Díptera se encuentra dividido en tres subórdenes, el primero es el Nematocera, en el que se encuentran los mosquitos, moscas de arena y moscas negras. El segundo es el Brachycera, que contiene a los tabánidos y rhagiónidos. El tercero es el Cyclorrhapha, en el cual se encuentran los insectos conocidos como moscas. El grupo que contiene a los tábanos, tiene mucha importancia, ya que son vectores potenciales del protozoario *Trypanosoma* spp., el cual afecta a Sudamérica, América Central y el Caribe, generando pérdidas en la industria ganadera (Cassalett *et al.*, 2011).

Se cree que la tripanosomosis se introdujo en Latino América a inicios de 1830, mediante una embarcación que contenía ganado *Bos indicus* proveniente de Senegal (Dwinger & Hall, 2000). Sin embargo, la enfermedad no se describió sino hasta 1919 en Guyana Francesa, luego de una epizootia en ganado lechero que tuvo un 52% de mortalidad.

Las especies pertenecientes al género *Trypanosoma* spp., son transmitidos mediante los vectores pertenecientes a las familias *Tabanidae* y *Stomoxyidae* (Batista *et al.*, 2011; Birhanu *et al.*, 2015); sin embargo, también pueden ser transmitidos por murciélagos hematófagos y mediante agujas con sangre infectada (Zapata *et al.*, 2009). En el caso de la tripanosomosis originada por *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*), esta puede esparcirse de manera rápida dentro del rebaño, especialmente en aquellos animales que nunca han estado expuestos al protozoario (Cadioli *et al.*, 2012). En este caso, la tripanosomosis durante su etapa prepatente, no genera ninguna manifestación clínica de la enfermedad (Gonzatti *et al.*, 2014). Entre los signos que se pueden apreciar durante el progreso de la enfermedad, están: incremento de la temperatura, anemia producto de la lisis de los eritrocitos, apatía, anorexia, letargo, pérdida de peso, baja condición corporal, membranas mucosas pálidas, incremento en el tamaño de los nódulos linfáticos y disminución en la producción de leche (Dagnachew S. & Bezie M., 2016; Oscar Betancur *et al.*, 2016).

A nivel de Centroamérica y Sudamérica, solo existen dos trabajos sobre los patrones de distribución de los tábanos, realizados por Fairchild en 1969. En el Ecuador, se cuenta con el trabajo realizado por Cárdenas y colaboradores en el 2009 sobre la revisión de la fauna tabánida, en el que registraron 198

especies de tabánidos con dos subespecies y cinco variedades. Sin embargo, no se cuenta con información sobre la caracterización molecular de los insectos pertenecientes a la familia Tabanidae y su importancia como vectores potenciales de enfermedades como la tripanosomosis. Por tal razón, la presente investigación se enfoca en la caracterización molecular de estos insectos recolectados en las provincias de Manabí y Napo, a través de la secuenciación del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I.

Justificación del problema

Daños ocasionados por los insectos hematófagos

Daños directos. Los tabánidos pueden ocasionar disturbio tanto visual como acústico hacia los animales (Raymond, 1982); por otra parte los insectos pertenecientes al género *Stomoxys*, vuelan de manera más silenciosa, pero generan un estrés visual porque lo hacen de manera abundante.

En cuanto a su picadura, producen un dolor considerable hacia el animal, debido a tres factores: el primero es que su aparato bucal es relativamente grande, el segundo es que su picadura genera múltiples brechas en el tejido de la piel, lo que a su vez ocasiona un microhematoma; y por último, tan pronto como la sangre alcanza la probóscide, el insecto inyecta un poco de saliva. La saliva de los tábanos posee características anticoagulantes, pero también es irritante y genera una reacción de inflamación en la piel (Desquesnes M. , 2004).

Este estrés tanto visual como acústico genera una pérdida de energía en el animal, debido a que este debe mover su cola, cabeza y piel como acción defensiva frente a la invasión de estos insectos (Raymond, 1982).

Daños indirectos. Otra consecuencia de la picadura del insecto es que puede generar heridas e infecciones secundarias. Una herida abierta en el animal, constituye un hábitat perfecto para las larvas de *Cochliomya hominivorax*, ya que estas se alimentan del tejido del animal, generando profundas lesiones en los animales. Esto genera pérdidas económicas al productor ganadero, ya que la piel del animal ya no es apta para la industria del cuero; además, debe aplicar fármacos veterinarios para la desinfección del animal cuyo precio puede ser elevado (Desquesnes M. , 2004).

Otro daño indirecto que pueden provocar los insectos hematófagos, es la pérdida en el peso del animal. Esto se debe a que los animales invierten su tiempo en evitar a los insectos en lugar de alimentarse. Según un estudio realizado por Boy y Duncan en 1979, establecieron que durante la temporada de tábanos, los caballos reducen su tiempo de alimentación en un 80% a 40%. Esto de igual forma afecta al ganado bovino lechero, ya que la producción de leche se ve reducida debido a la poca alimentación que realiza el animal.

Otro inconveniente generado por los insectos hematófagos, es la transmisión de parásitos que producen graves enfermedades en los animales de producción. Según una noticia publicada en el diario El Universo, en el mes de noviembre de 2017 en Chone, provincia de Manabí-Ecuador, existió un brote de *Trypanosoma* spp. que produjo la muerte de alrededor de 600 bovinos, hecho que se vinculó con la presencia de tábanos en la zona y que se consideró en su momento que era el agente causante de su diseminación (El Universo, 2017).

Debido a estos hechos, es importante realizar una caracterización molecular para determinar las especies de tábanos que se encuentran estrechamente vinculados con la diseminación de la tripanosomosis, de esta forma se pueden generar actividades de control para la contención de estos insectos.

Hipótesis

¿Existe la presencia de moscas hematófagas en las zonas muestreadas con previos reportes de hemotrópicos y estas pueden portar *Trypanosoma* spp?

Objetivos

Objetivo general

Determinar la prevalencia de *Trypanosoma vivax* en moscas hematófagas de zonas con previos reportes de enfermedades hemotrópicas.

Objetivos específicos

- Colocar trampas Nzi para la captura de los Dípteros en las zonas de estudio que tuvieron previos reportes de la presencia de hemotrópicos.
- Analizar morfológicamente las muestras de Dípteros obtenidas con la ayuda de un microscopio y una clave gráfica.
- Realizar un análisis molecular a las muestras de Dípteros obtenidas, mediante la amplificación del gen COI y aquel que codifica la cisteína proteasa Catepsina L (para la determinación de *Trypanosoma vivax*), ambas por medio de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Capítulo II

Revisión de literatura

Tabanidae

Esta familia consiste en alrededor de 4300 especies de moscas hematófagas cuyo tamaño varía desde medianas hasta grandes, de hecho, se han documentado dentro de este grupo a los insectos más grandes que se alimentan de sangre (Lehane, 2005). La familia *Tabanidae* se divide en tres géneros importantes: *Chrysops*, *Haematopota* y *Tabanus*.

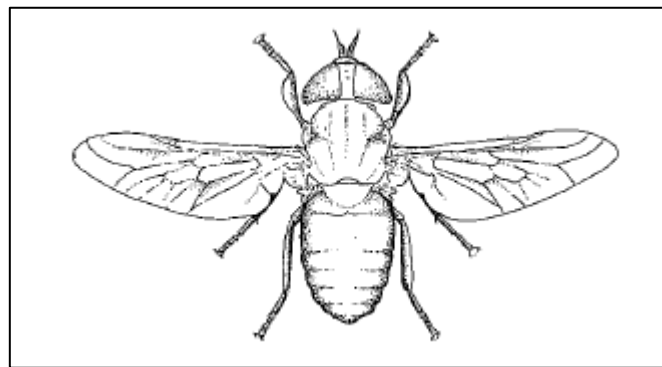
Simplemente el tamaño y el dolor que su picadora puede provocar, son dos factores que no se pueden ignorar fácilmente. Estos insectos pueden llegar a acumularse en grandes cantidades en algunas zonas, y debido al dolor de su picadura, pueden considerarse como plagas tanto para los humanos como para los animales. En el caso del ganado, este puede ser un factor muy preocupante, ya que se pueden tener considerables pérdidas económicas (Lehane, 2005).

Además del estrés que causa la picadura de estos insectos, los tabánidos también son vectores potenciales de enfermedades tanto para los humanos como para los animales. Cuando estas moscas son interrumpidas durante su alimentación, ellas persisten en su picadura al pasar de un animal a otro, lo que hace que sean capaces de propagar de manera más rápida y efectiva una enfermedad parasitológica (Lehane, 2005). Los tabánidos son vectores mecánicos del flagelado *Trypanosoma evansi*, el cual genera una severa enfermedad (surra) en perros, camélidos y caballos, y afecta de manera más leve otros mamíferos, en los cuales se encuentran incluidos los bovinos. Esta enfermedad se desarrolla en zonas tropicales y subtropicales. Además, estos insectos también son capaces de transmitir *T. vivax viennei*, *T. equinum*; *T. simiae*, entre otros parásitos (Lehane, 2005).

Los adultos tabánidos tienen un tamaño que varía de mediano a grande (hasta los 25 mm), y pueden ser de color negro, café, verde y amarillo. Su gran cabeza de forma semilunar, posee ojos prominentes, los cuales poseen un patrón iridiscente de rojo y verde que se pierde al momento de la muerte del insecto (Lehane, 2005).

Figura 1

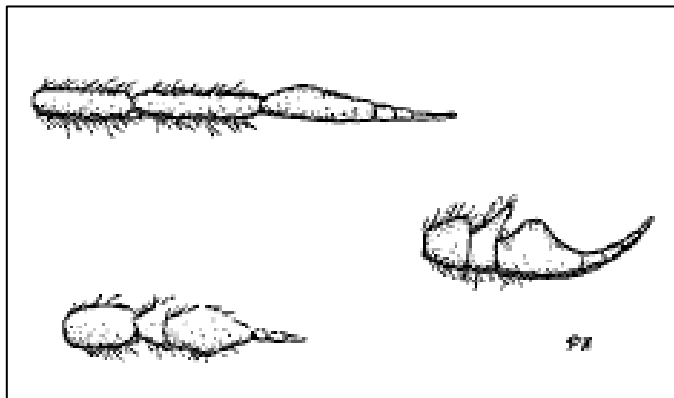
Ejemplar de una hembra adulta de Ancala africana



Nota. Tomado de *Insects and other arthropods of medical importance*. London: British Museum (Natural History, por Smith, 1973).

Figura 2

Forma de las antenas de los tres géneros de los tabánidos



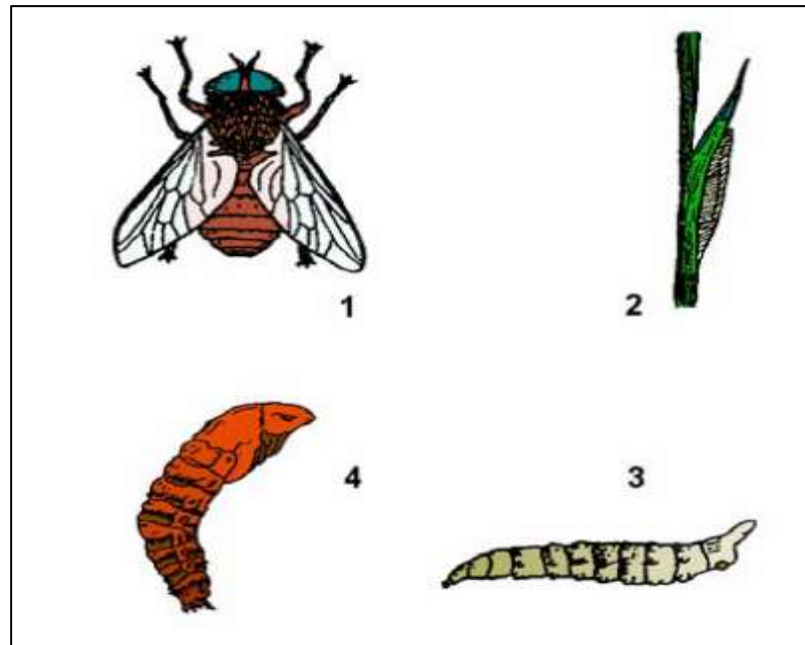
Nota. La antena superior corresponde al género *Chrysops*, la del medio al *Tabanus* y la inferior al *Haematopota*. Tomado del libro *The Biology of Blood-Sucking in Insects* (p.239), por Lehane, 2005. Cambridge University Press.

Ciclo de vida

Los tabánidos poseen una metamorfosis completa, lo que significa que pasan a través de las siguientes fases: huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras ponen entre 100 a 1000 huevos sobre la vegetación o cualquier otra materia orgánica que se encuentre húmeda. Las larvas pueden ser acuáticas, semiacuáticas o terrestres, estas eclosionan a partir de los huevos y se transforman en depredadores de otros invertebrados o vertebrados pequeños. La forma del cuerpo de las larvas, es delgado y cilíndrico, y la cabeza se diferencia por ser ligeramente cónica (Strother, 1999). En esta última posee dos mandíbulas afiladas y delgadas con un canal hueco para transmitir veneno a sus presas. El estado larvario puede sufrir varias mudas mientras se va desarrollando, esta fase puede durar varios meses o años (Strother, 1999). Una vez completada esta etapa, se traslada hacia un lugar más seco para transformarse en pupa. La duración de esta etapa dependerá de la especie, llegando a durar entre 5 y 21 días, posteriormente las moscas adultas emergen del suelo (Strother, 1999).

Figura 3

Ciclo de vida del tábano



Nota. 1. Mosca adulta; 2. Ovoposición, 3. larva y 4. Ninfa. Tomado de Les taons de Guyane biologie, importance vétérinaire et methodes de lutte. Publication CIRAD-EMVT (p.29) por Desquesnes M. & de la Roques, 1992.

Taxonomía

***Tabanus* spp.**

Orden: Diptera

Suborden: Brachycera

Familia: *Tabanidae*

Género: *Tabanus* spp.

Trampa Nzi

Trampa desarrollada por Steeve Mihok, que está comprendida por una entrada de color azul que es atrayente para las moscas y un cono de penetración de color negro que conduce a las moscas hacia una red de forma cónica y que apunta hacia arriba, de esta forma se guía de manera natural a los insectos hacia el embudo y posteriormente hacia una botella plástica (Desquesnes M. , 2004).

Vector mecánico

Se considera como un vector mecánico, al insecto que solo sirve como transmisor del agente patógeno de un huésped vertebrado a otro. En este caso el parásito no se replica o se desarrolla dentro del mismo (Lehane, 2005).

Vector biológico

Es una forma más compleja en la transmisión de un parásito, porque este último lleva a cabo dentro del insecto hematófago un período de replicación o desarrollo (Lehane, 2005).

Tripanosomosis

Generalidades

La tripanosomosis animal es una enfermedad provocada por distintas especies del grupo Salivario del género *Trypanosoma* que afecta al ganado, y de igual forma a otros animales domésticos y salvajes, lo que conlleva a grandes pérdidas económicas en África, y Latinoamérica, además de Asia (Magez & Radwanska, 2014). Sin embargo, esta enfermedad no solo afecta a los animales, sino que también los humanos se han visto afectados. Por ejemplo, en África sub-Sahara, en la década final del siglo XX, se presentaron varios casos alarmantes de la enfermedad del sueño (tripanosomosis Africana humana). En el caso de Latinoamérica se encuentra presente la enfermedad de Chagas (tripanosomosis Americana) considerada como una de las más prevalentes (Michael Barret, *et al.*, 2003).

Sintomatología de la tripanosomosis por Trypanosoma vivax

La sintomatología se divide por períodos, en el primero conocido como prepatente, no se observan manifestaciones clínicas de la enfermedad (Gonzatti *et al.*, 2014). Por su parte en la fase aguda, se puede notar el incremento de temperatura, anemia, apatía, anorexia, letargia, pérdida de peso corporal, baja condición corpórea, disminución en la producción de leche, entre otras (Betancur, 2016). En ciertos casos también se puede observar diarrea, descarga nasal, lacrimación, queratitis y síntomas neurológicos como por ejemplo ataxia. En casos graves puede producirse la muerte espontánea del animal dentro de las primeras dos semanas. La tasa de mortalidad puede alcanzar el 6,5% en vacas adultas, y hasta un 30% en terneros, debido a que son más propensos a la enfermedad y presentan síntomas mucho más severos (Betancur, 2016). En una investigación realizada en Paraíba-Brasil, se observaron abortos y mortalidad perinatal. En otros casos se ha determinado la afectación de ciclo estrual, además de existir problemas en la concepción en vaquillas (Bezerra & Batista, 2008). En el caso de los machos, la tripanosomosis es capaz de afectar a nivel testicular y epididimal, incidiendo seriamente en la calidad del semen y en ciertos casos graves, puede generar casos de infertilidad o esterilidad (Bezerra & Batista, 2008).

Además de las etapas previamente mencionadas, existe una etapa crónica en la que la parasitemia del animal se reduce, por lo que este no llega a presentar síntomas clínicos a excepción de la anemia, convirtiéndose en un reservorio del parásito (Desquesnes M. , 2004).

Trypanosoma vivax

Taxonomía

Clase: Kinetoplastida

Orden: Trypanosomatida

Género: *Trypanosoma*

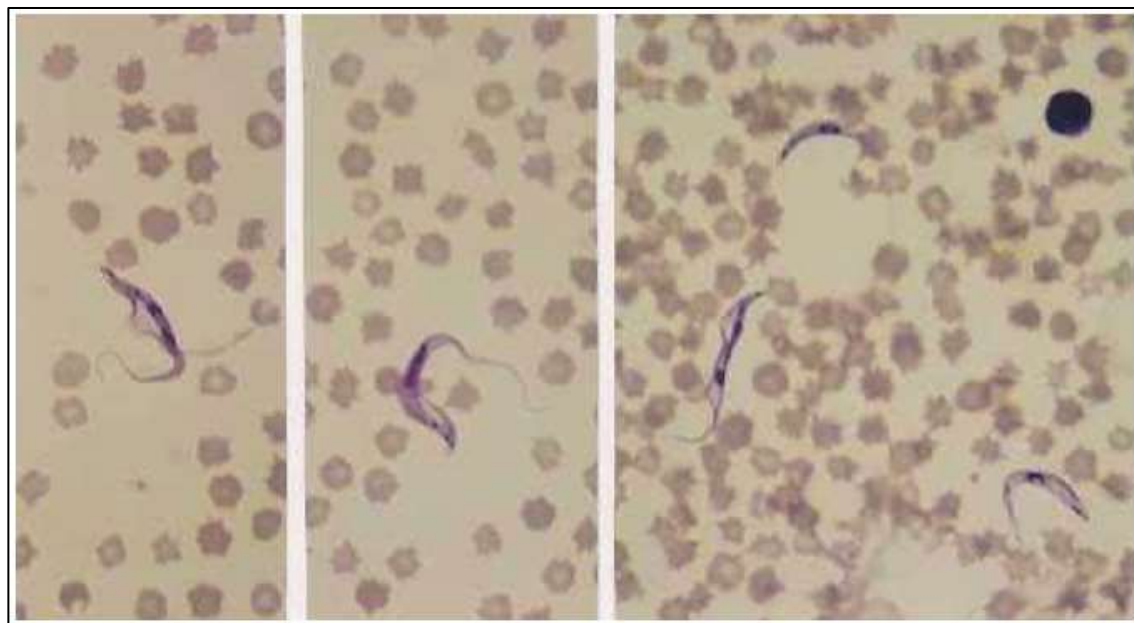
Especie: *Trypanosoma vivax*

Características y morfología de *T. vivax*

Este protozoo es considerado monomórfico y presenta dos características que se emplean para el diagnóstico mediante microscopio: la primera es que posee un kinetoplasto largo y la segunda es que se mueve de manera rápida cuando se observa una muestra de sangre fresca. Su flagelo se encuentra adherido mediante una membrana ondulante que se encuentra menos desarrollada en comparación con *T. brucei* y *T. evansi*. Su núcleo puede ser redondeado o elongado (dependiendo de la cepa), se encuentra localizado en la porción media del parásito (Gonzatti *et al.*, 2014). La longitud de protozoo varía de acuerdo al aislado, y esta se encuentra en un rango entre los 18 y 31 μm (Desquesnes M. , 2004).

Figura 4

Trypanosoma vivax de Guyana Francesa



Nota. Formas adultas delgadas de *Trypanosoma vivax* durante la división. Tomado de *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America* por Marc Desquesnes, 2004.

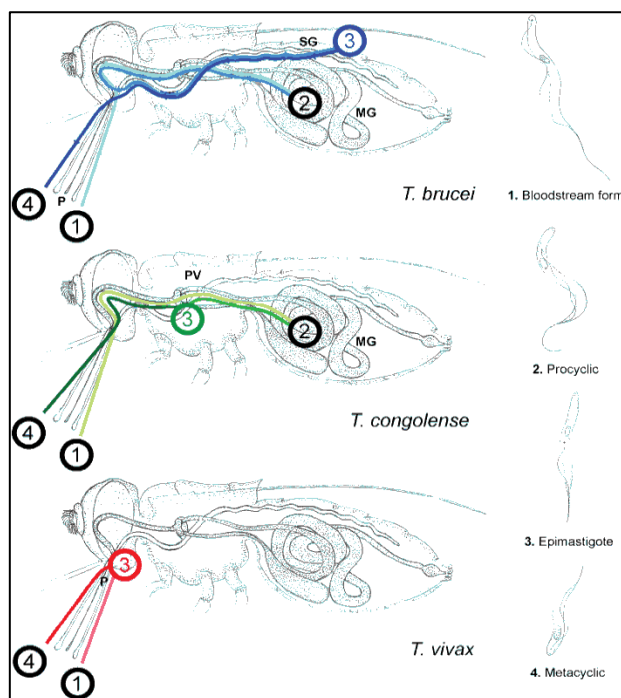
Ciclo biológico de *T. vivax*

Este protozoo carece de una fase procíclica en el intestino medio del insecto y no posee una migración compleja en el interior del mismo, sino que este se desarrolla directamente en la forma epimastigote dentro de la probóscide del insecto, lo que le permite a *T. vivax* ser transmitido por varios tipos de insectos hematófagos (Hoare, 1972).

Durante la alimentación, el insecto ingiere los parásitos a partir del torrente sanguíneo, posteriormente ocurre una diferenciación hacia la forma metacíclica para posteriormente ser inoculado en el huésped vertebrado al momento de la alimentación del insecto, esto en el caso de *T. vivax* Africano (Hoare, 1972).

Figura 5

Variación del ciclo de vida de los distintos tripanosomas Africanos



Nota. Tomado de The Trypanosomes of mammals: A Zoological Monograph por Hoare, 1972.

Transmisión

En Latinoamérica *Trypanosoma vivax* se transmite mediante la picadura de los insectos miembros de la familia Tabanidae y del género *Stomoxys* los cuales son considerados vectores potenciales (Chartier C., 2000). Sin embargo, no son los únicos capaces de transmitir el protozoario, las moscas del género *Haematobia*, y ciertos Culicidae también pueden transmitir el parásito (Ruiz-Martinez, 1971; Page, 1990). En varios estudios se ha considerado que los insectos involucrados en la transmisión de la enfermedad, son vectores mecánicos y no biológicos.

En los estudios realizados por Betancourt en Colombia y por Gonzalez y Espinoza y Melendez *et al*, en Venezuela, registraron que el parásito puede transmitirse de manera congénita en el ganado durante epizootias. Otra de las vías de transmisión, es la iatrogénica, que se produce debido a las malas prácticas de los cuidadores de las fincas en cuanto al manejo de las jeringuillas.

Diagnóstico

Reacción en Cadena de la Polimerasa. Existen varias técnicas de diagnóstico para la tripanosomosis, una de las más sensibles y específicas es la PCR. La Reacción en Cadena de la Polimerasa, es una técnica capaz de demostrar la existencia de fragmentos de ADN conocidos o parcialmente conocidos (Higuchi, 1989). Esta herramienta se hizo posible gracias al descubrimiento de la Taq polimerasa, la cual es una enzima termoestable obtenida a partir de *Thermophilus aquaticus* que se encarga de polimerizar ácidos nucleicos. Sin embargo, para lograr la polimerización se requiere de más componentes además de la Taq polimerasa, estos son: ADN templado, ácidos fosfatos desoxirribonucleicos, solución tampón, magnesio y un par de oligonucleótidos que flanqueen el fragmento de ADN de interés (Desquesnes M., 2004).

Esta prueba de diagnóstico está comprendida por tres fases, la primera se denomina fase de desnaturalización, en la cual se requieren temperaturas de alrededor de 94 °C y ocurre una apertura de la doble hélice del ADN; en la segunda fase se lleva a cabo la unión de los oligonucleótidos al ADN plantilla, esta adherencia por lo general requiere de una temperatura de aproximadamente 50 °C y finalmente una fase de extensión en la que se polimerizan los ácidos nucleicos a una temperatura promedio de 70 °C (Desquesnes M. , 2004). Al repetir estos ciclos de calor varias veces, se obtendrán porciones de ADN de secuencia y peso idénticas.

El producto amplificado se visualiza mediante electroforesis de gel de agarosa, aplicando un agente intercalante como el Bromuro de Etidio que permite que el ADN pueda ser visto mediante luz ultravioleta.

Catepsina L una cisteína proteasa empleada para la detección de T. vivax

El genoma de los tripanosomas contiene varias copias de genes de catL, que se diferencian de acuerdo a la especie. Las enzimas Catepsina L son cisteína proteasas que se encuentran involucradas con la patogenicidad, inmunidad, diferenciación celular, infectividad, y metabolismo de los tripanosomas. El empleo de estos genes para la identificación y diferenciación entre cepas ya ha sido empleado previamente por varios investigadores (Jesca Nakayima *et al.*, 2013) (Eyssen, 2018).

Capítulo III

Metodología

Sitios de estudio

Los insectos hematófagos fueron recolectados en fincas ubicadas en las provincias del Napo y Manabí entre junio y julio del año 2021 (ver figura 6).

Figura 6

Puntos de muestreo en las provincias de Manabí y Napo



Recolección de los insectos

Las moscas fueron recolectadas con la ayuda de la trampa Nzi ubicadas en lugares cercanos a los potreros del ganado bovino y se las mantuvo allí durante tres horas (de 8 am a 11 am). Una vez transcurrido este tiempo, se traspasaron las moscas recolectadas a tubos Falcon que contenían etanol al 70% para poder conservar las moscas.

Figura 7

Trampa Nzi



(A) Parte anterior de la trampa y (B) zona posterior de la trampa.

Figura 8

Colocación de la trampa Nzi para la recolección de las muestras en la provincia del Napo

**Figura 9**

Recolección de muestras en la provincia de Manabí



Determinación de la familia de la muestra empleando las características morfológicas

En el laboratorio las moscas fueron visualizadas mediante microscopio para determinar la especie a través sus características morfológicas, haciendo uso de la clave gráfica diseñada para ello por la Organización Panamericana de la Salud en 1962.

Extracción de ADN y amplificación PCR

Las muestras preservadas en etanol se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente su ADN genómico fue extraído de la mosca completa mediante el protocolo de precipitación con acetato de amonio tal y como lo describieron (García *et al.*, 2018) De manera breve, las muestras fueron digeridas en buffer Digsol (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 117 mM NaCl y 1% SDS) junto con 10 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) a 55 °C durante tres horas. El ADN se precipitó con acetato de amonio [4M], centrifugado por 15 minutos y posteriormente precipitado con etanol absoluto y lavado con etanol al 70%. Finalmente el pellet de ADN se dejó secar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ L de buffer TE (Tris-EDTA) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

Para corroborar la presencia de ADN genómico de la muestra, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) teñido con Bromuro de Etidio. En los pocillos se colocaron 3 μ L de ADN con 3 μ L de Buffer de carga Blue Juice 2x, y además se adicionaron 5 μ L de marcador de peso molecular de 100bp; la fuente se programó a 100 V y se dejó correr por 45 minutos. Finalizado este proceso se visualizó el gel en un transiluminador con ayuda de luz ultravioleta (UV). Una vez obtenido el ADN del insecto, se realizó una reacción de PCR para la amplificación del gen citocromo oxidasa I (COI), mediante el empleo de los primers LCO1490 y HCO 2198 (Folmer O. *et al.*, 1994) (Tabla 1). Las reacciones de amplificación se desarrollaron con un volumen total de 25 μ L (Tabla 2). En la tabla 3 se detallan los ciclos y las condiciones de la PCR convencional.

Para la determinación de prevalencia de *Trypanosoma vivax* en cada muestreo, se realizó la amplificación del gen que codifica la catepsina L

mediante la reacción de PCR empleando los cebadores TviCatL1 y DTO155 (Tabla 4) (Cortez A. P. *et al.*, 2009). En las tablas 5 y 6 se encuentran a detalle las concentraciones de los reactivos empleados y los ciclos y condiciones para llevar a cabo la PCR convencional para la amplificación de la región CatL-like.

Tabla 1

Cebadores para la amplificación del gen COI de los Dípteros

Cebador	Secuencia
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Tabla 2

Concentraciones y reactivos empleados para la amplificación del gen COI

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (uL)
Agua	μL			17,13
Buffer	X/m	10,00	1,00	2,50
	M			
Primer F	μM	10,00	0,40	1,00
Primer R	μM	10,00	0,40	1,00
MgCl₂	mM	50,00	1,50	0,75
dNTP	μM	10,00	0,20	0,50
taq	U/ μL	5,00	0,63	0,13
ADN	ng/ μL			2
Total				25

Nota. μL : microlitro; μM : micromolar; mM: milimolar; U/ μL : unidades por microlitro; ng/ μL : nanogramos por microlitro; dNTP: mix de desoxinucleótidos.

Tabla 3

Programa PCR para la amplificación del gen COI de los dípteros

Proceso	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	95° C	5 min	1
Desnaturalización	95° C	1 min	35
Hibridación	55° C	30 seg	35
Extensión	72° C	1 min	35
Extensión final	72° C	10 min	1
Mantenimiento	4° C	∞	

Tabla 4

Cebadores para la amplificación de la región CatL-like para Trypanosoma vivax.

Cebador	Secuencia
TviCatL1	5'-GCCATCGCCAAGTACCTCGCCGA - 3'
DT0155	5'- TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA- 3'

Nota. Fuente: (Cortez A. P. *et al.*, 2009)

Tabla 5

Concentraciones y reactivos empleados para la amplificación de la región CatL-like para Trypanosoma vivax.

Reactivos	Unidad	Stoc k	Concentració n final	Volume n (uL)
Agua	μL	N/A		14,75
Buffer	X/m M	10,00	1,00	2,50
Primer F	μM	10,00	1,00	2,50
Primer R	μM	10,00	1,00	2,50
MgSO4 2	mM	25,00	1,50	0,00
dNTP	μM	40,00	0,80	0,25
Taq	U/ μL	5,00	1,00	0,25
ADN	ngr			2
Total				25

Tabla 6

Programa PCR para la amplificación de la región CatL-like para Trypanosoma vivax.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	94° C	5 min	1
Desnaturalización	94° C	30 seg	35
Hibridación	65° C	30 seg	35
Extensión	72° C	1 min	35
Extensión final	72° C	10 min	1
Mantenimiento	20° C	∞	

Nota. Fuente: (Cortez A. P. *et al.*, 2009)

Secuenciación, alineamiento de secuencias, y análisis filogenético

La secuenciación fue realizada mediante la metodología de Sanger, en la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE matriz, para lo cual, fueron enviados 40 μ L de producto PCR, conjuntamente con los primers LCO1490 y HCO 2198 a una concentración de 5 mM.

Con la finalidad de identificar y comparar las secuencias obtenidas de las muestras de tábanos (gen COI), estas fueron sometidas a la herramienta BLASTn de la base de datos de NCBI. El porcentaje de identidad entre las secuencias obtenidas, se realizó mediante el software Geneious Prime.

Las secuencias COI de las moscas fueron corregidas y posteriormente alineadas empleando la herramienta MUSCLE del software MEGA-X; además, para la elaboración del árbol filogenético se empleó el método Neighbor-Joining (NJ) con un bootstrapping de 1000 réplicas y el modelo de distancia genética Tamura-Nei en el mismo software.

Tabla 7

Secuencias empleadas en el presente estudio y su origen

Nombre del organismo		Origen	Número de acceso de GenBank
<i>Atylotus agrestis</i>	África	Mozambique	MT231162.1
<i>Atylotus givellus</i>	Asia	Tailandia	MG426044.1
<i>Atylotus nigromaculatus</i>	África	Tanzania	KX946513.1
<i>Haematopota pluvialis</i>	Europa	Reino Unido	KC192969.1
<i>Hybomitra epistates</i>	Desconocido	Desconocido	KM243543.1
<i>Tabanus aurilineatus</i>	Asia	Tailandia	MG426056.1
<i>Tabanus birmanicus</i>	África	Desconocido	KM243514.1
<i>Tabanus similis</i>	América	Canadá	KR518893.1
<i>Tabanus thermanum</i>	Asia	Tailandia	MG426177.1
<i>Tabanus donaldsoni</i>	África	Kenya	KX946532.1
<i>Tabanus fraternus</i>	África	República Centroafricana	MK396303.1
<i>Tabanus secedens</i>	África	Liberia	MK396339.1
<i>Musca Domestica</i>	Desconocido	Desconocido	JX861433.1
M1Napo	América	Ecuador	N/A
M2Napo	América	Ecuador	N/A
MA1Manabí	América	Ecuador	N/A
ML2Manabí	América	Ecuador	N/A

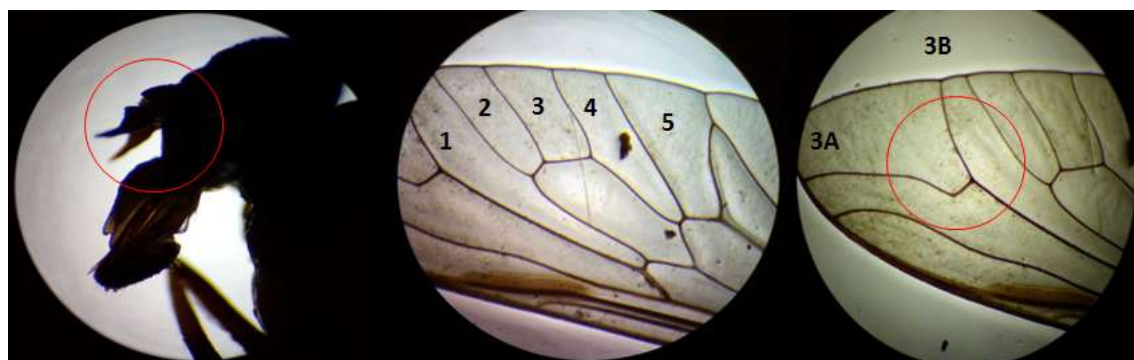
Capítulo IV

Resultados

Se recolectaron un total de siete moscas hematófagas en las provincias de Napo y Manabí, repartidos de la siguiente manera: cinco en la provincia del Napo y dos en la provincia de Manabí. Por su parte en el laboratorio mediante la visualización de las características morfológicas de las muestras recolectadas, tales como las nervaduras de las alas, probóscide, antena, forma del abdomen y ojos, se determinó que las muestras pertenecen a la familia Tabanidae.

Figura 10

Características morfológicas de las muestras



Nota. Visualización de las características morfológicas de las muestras mediante microscopio a 5X. Visualización de la antena, y nervadura de las alas. La antena posee 3 segmentos, las alas poseen 4 o 5 células posteriores y la tercera vena se divide en dos: 3A larga y 3B que termina detrás de la punta del ala (Organización Panamericana de la Salud, 1962).

Figura 11

Muestras recolectadas en la provincia del Napo



Nota. Los tamaños de las moscas varían entre unos y dos centímetros

Figura 12

Muestras recolectadas en la provincia de Manabí

**Amplificación del gen COI**

Para el análisis filogenético se amplificó el gen mitocondrial COI de las siete muestras, cuyo amplicón fue de ~700 pb (ver figuras 13 y 14). Sin embargo, de las siete muestras analizadas, solo se seleccionaron cuatro muestras (dos muestras de Manabí y dos de Napo), debido a la calidad del amplicón para su respectiva secuenciación.

Figura 13

PCR para la amplificación del gen COI de las muestras recolectadas en Napo

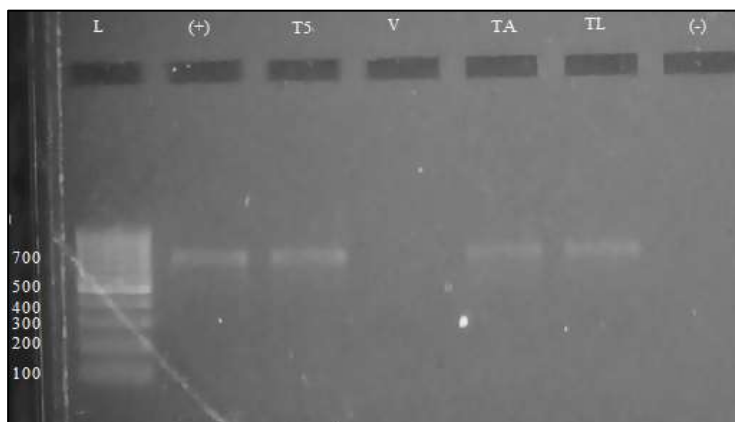


Nota. (L) pocillo con el marcador estándar de peso molecular (Ladder), (T1:T4) amplicones del gen COI de las muestras de tábanos recolectadas en el Tena; (-) negativo (agua).

!

Figura 14

Muestras recolectadas en la provincia de Manabí



Nota. (L) pocillo con el marcador estándar de peso molecular (Ladder), (+) muestra positiva (ADN de *Stomoxys calcitrans*); (T5) muestra recolectada en el Napo, (V) pocillo vacío; (TA Y TL) muestras recolectadas en Manabí, (-) negativo (agua).

Análisis filogenético

Una vez obtenidas las secuencias enviadas por la Universidad de las Fuerzas Armadas matriz (un total de cuatro), se analizaron mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para corroborar que las secuencias pertenecieran al organismo esperado. A continuación se muestran los resultados arrojados por la herramienta.

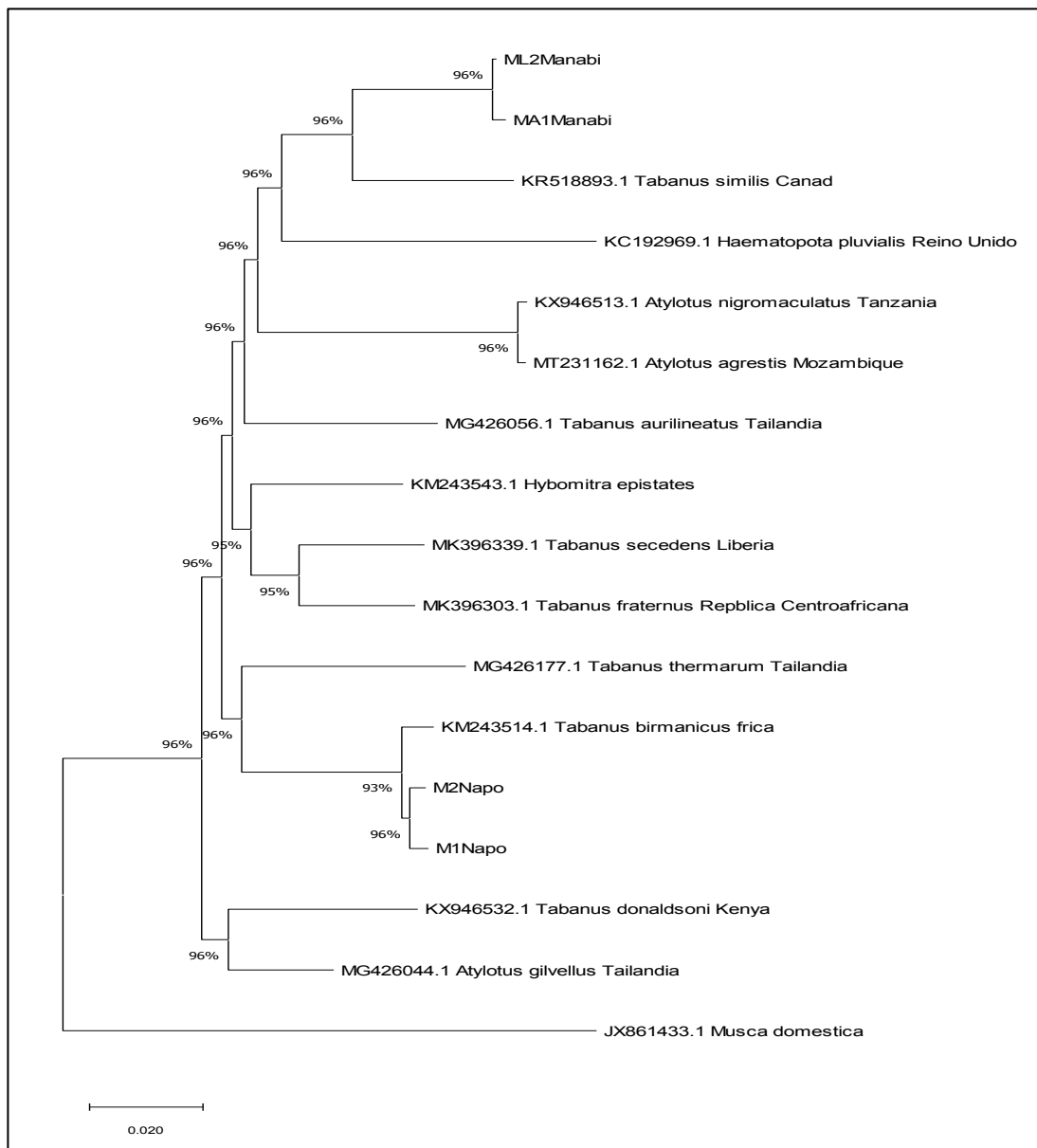
Tabla 8

Resumen de los resultados arrojados por el BLAST

Secuencia	Secuencia con mayor similitud (código de acceso)	Porcentaje de Identidad	E-value	Descripción de la secuencia con mayor similitud
M1Napo	MG426048.1	83,33	9e-163	<i>Tabanus admelanopygus</i> , gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), cds parcial; mitocondrial.
M2Napo	MG426047.1	82,87	9e-158	<i>Tabanus admelanopygus</i> , gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), cds parcial; mitocondrial.
MA1Manabí	KY777160.1	92,24	0,0	<i>Poeciloderas quadripunctatus</i> , gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa, cds parcial; mitocondrial.
ML2Manabí	KY777160.1	88,57	0,0	<i>Poeciloderas quadripunctatus</i> , gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa, cds parcial; mitocondrial.

Figura 15

Árbol filogenético de las moscas del Napo y Manabí



Nota. Árbol filogenético realizado mediante el método Neighbor-joining tree, empleando las secuencias del gen COI amplificados de muestras de tábanos del Napo (M1Napo y M2Napo) y Manabí (M1Manabi y M2Manabi). Las secuencias restantes fueron obtenidas de la base de datos de NCBI. La barra de escala representa una divergencia del 0.02%

Adicionalmente, las secuencias mostraron entre sí, un porcentaje de identidad del 71,9%, dicho valor se obtuvo mediante el software Geneious Prime.

Las relaciones filogenéticas entre las cuatro muestras morfológicamente distintas, fueron realizadas con el método Neighbor-joining (Figura 15). Las muestras que fueron recolectadas en la misma zona y que poseen las mismas características morfológicas (de ahora en adelante se les describirá como morfoespecies), formaron un mismo grupo, generándose dos grupos distintos, uno para las muestras de Manabí y otro para las muestras de Napo. Además, se pudo observar que las muestras recolectadas en Manabí, se encuentran relacionadas con la especie *Tabanus similis* de Canadá; y por su parte, las muestras recolectadas en el Napo se relacionan con la especie *Tabanus birmanicus* aislada de África. De acuerdo al árbol filogenético, las cuatro muestras analizadas muestran entre sí ciertas diferencias en sus secuencias, lo que nos indicaría que existen ciertas mutaciones intraespecie, esto se deduce ya que en los dos grupos, los dos miembros no se encuentran unidos por una línea vertical plana. El grupo externo que se empleó en este caso, es la *Musca domestica*. Este grupo externo nos permitió observar que nuestras muestras se encuentran estrechamente relacionadas con la familia *Tabanidae*, familia de suma importancia por su participación en la transmisión de enfermedades parasitológicas, al ver la distancia filogenética que mantiene con las muestras de interés.

Detección de *trypanosoma vivax* mediante TvCatL-PCR

Con la ayuda de la TvCatL-PCR, se encontró que dos de las cuatro muestras analizadas fueron positivas a *T. vivax*. El tamaño del fragmento amplificado fue de ~200 pb. De un total de siete muestras recolectadas, se obtuvo que el 28,57% fue positivo al hemotrópico de interés, estas muestras positivas corresponden a la provincia de Manabí.

Figura 16

TvCatL-PCR



Nota. (T1 y T2) muestras del Napo con ADN diluido 1/10, (TA' y TA'') muestras de Manabí con ADN diluido 1/10 y 1/100 respectivamente; (TL' y TL'') muestras de Manabí con ADN diluido 1/10 y 1/100 respectivamente, (V) vacío; (+) muestras positiva a *T. vivax*, ADN de bovino cedido por la Ing. Kelly Caiza, (-) negativo (agua).

Capítulo V

Discusión

En la presente investigación se comprobó la presencia de moscas hematófagas en las zonas que previamente fueron reportadas con presencia de hemotrópicos por parte de la institución pública AGROCALIDAD. Mediante el análisis morfológico, se pudo comprobar que las muestras recolectadas pertenecen a la familia Tabanidae, la cual es el grupo que posee a los insectos succionadores de sangre más grandes, hecho que se confirma con nuestros hallazgos, ya que las muestras tenían una longitud que oscilaba entre uno y dos centímetros. Las especies pertenecientes a la familia Tabanidae, tal y como lo expresan Chartier *et al.*, (2000), son vectores potenciales de enfermedades parasitológicas y virales, siendo una de ellas la tripanosomosis provocada por *Trypanosoma vivax*, lo que complica la contención de la enfermedad, ya que, como lo observaron Barros y Foil, en el 2007, estos insectos cuando son interrumpidos durante su alimentación, son capaces de volar hasta 25 metros para encontrar otra fuente de alimentación. Por esta razón es que la tripanosomosis puede diseminarse rápidamente por varias zonas, generando grandes pérdidas al sector ganadero.

Detección de *T. vivax* mediante TviCatL-PCR

El hecho de que los tabánidos son transmisores potenciales de la tripanosomosis, ya ha sido comprobado por varios autores. Por ejemplo, Jan Votýpka y colaboradores en el 2019, reportaron una prevalencia de *Trypanosoma theileri* en su muestreo de 24.6%, empleando nested PCR para la amplificación del 18S ARNr. En otro caso, en un estudio llevado a cabo en Colombia por Parra y Alarcón en el 2008, obtuvieron tres muestras infectadas con *T. vivax* de un total de 140 muestras obtenidas. En la presente investigación se encontró que de un total de siete muestras recolectadas, el 28,57%(lo que corresponde a dos muestras) fue positivo a *T. vivax*.

En el Ecuador no existen reportes sobre la prevalencia de *T. vivax* en los vectores mecánicos, por lo que este trabajo se convierte en el primer reporte de este parásito en moscas hematófagas. Estos resultados confirman que los insectos hematófagos son una pieza fundamental en la diseminación de la enfermedad, pero sobre todo, en las grandes pérdidas económicas del sector ganadero. Los efectos de la tripanosomosis sobre el ganado, ya han sido comprobados por Otte y colaboradores en 1994. Ellos analizaron los efectos de la tripanosomosis provocada por *Trypanosoma vivax* en varias fincas de Colombia, en las cuales, previamente se había registrado la actividad de moscas hematófagas, en especial de tabánidos. En este trabajo, en una de las fincas se detectó que la presencia de este parásito, provocó una reducción en la ganancia de peso, registrándose que antes de la detección de *Trypanosoma vivax* en el ganado, la ganancia de peso era de 390g/día, y después de la detección del parásito, esta bajó a 200g/día. El impacto de la tripanosomosis en la actividad ganadera, es considerable cuando analizamos las pérdidas en términos de dinero, por ejemplo, en un estudio realizado por Dawit Tesfaye y colaboradores en el 2012 en Etiopía, se estableció que solo en fármacos tripanocidas, los ganaderos invierten \$16 por año, y que la mortalidad a causa de tripanosomosis en la zona estudiada, fue del 4,4%, lo que en términos de dinero representó \$102 por año, por hogar.

Amplificación del gen COI

En la presente investigación, se realizó por primera vez en Ecuador la caracterización molecular de tábanos a través de la amplificación del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI), ya que los genes que codifican proteínas en el genoma mitocondrial, son muy conservados y permiten observar la diversidad de los organismos. En este estudio se obtuvieron secuencias que oscilaron entre los 670 y los 689 pb. Estos resultados son similares a los que obtuvieron Jan Votýpka y colaboradores en 2019, al amplificar a partir de muestras de tábanos, fragmentos del gen COI de alrededor de 700 pb.

De igual forma Mugasa y colaboradores en el 2018, en un trabajo de identificación molecular de especies de la familia Tabanidae en el Este de África, amplificaron fragmentos de aproximadamente 648 pb. Estos resultados corroboran que la amplificación del gen COI de las muestras recolectadas en las provincias de Napo y Manabí, se logró de manera exitosa.

Posteriormente las secuencias obtenidas por parte de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE matriz, fueron analizadas mediante la herramienta BLASTn para verificar la similitud con otras secuencias que forman parte de la base de datos de NCBI. Se obtuvo que las secuencias del Napo tienen un porcentaje de identidad de 83,33% y 82,87% con la secuencia del organismo *Tabanus admelanopygus*; mientras que por su parte, las muestras de Manabí obtuvieron porcentajes de identidad de 92,24% y 88,57% con la secuencia del organismo *Poeciloderas quadripunctatus*. Estos resultados confirman que las muestras capturadas mediante la trampa Nzi, pertenecen a la familia Tabanidae. Además, el porcentaje de identidad del 71,9% entre las secuencias analizadas en este estudio, indican una variabilidad entre los dos grupos de muestras (Manabí y Napo). Esto concuerda con las características morfológicas distintas que mostraron las muestras entre provincias. Además, en la figura 15 se puede observar que estas muestras formaron dos clados distintos, indicando la diferencia evolucionaria de ambos grupos y que corresponden a especies distintas.

La especie *Poeciloderas quadripunctatus*, ya ha sido previamente reportada y fue registrada en una lista actualizada, realizada por Jaime Buestán y colaboradores en el 2007 sobre tábanos en el Ecuador, específicamente en las provincias de Azuay, Chimborazo, Bolívar, Guayas, Loja, Morona Santiago, Napo, Orellana, Pastaza, Sucumbíos, Tungurahua, y Zamora Chinchipe. Por su parte *Tabanus admelanopygus*, ha sido reportado en Tailandia por Changbunjong y colaboradores en el 2018. Lastimosamente no se cuenta con mucha información sobre el registro de esta especie en América.

Análisis filogenético

Las muestras según el análisis filogenético, formaron dos grupos diferentes, resultado que concuerda con las características morfológicas distintas entre las muestras por provincia. En cuanto a la relación filogenética de las muestras, aquellas que fueron recolectadas en la provincia de Manabí, formaron un grupo monofilético con la especie *Tabanus similis* aislada de Canadá. Esto tiene sentido en cuanto a la distribución geográfica, ya que *Poeciloderas quadripunctatus*, es una especie que no ha sido únicamente avistada en Ecuador, además de este, se registran avistamientos en países como México, Nicaragua, Costa Rica, Estados Unidos y Brazil (Coscarón S & Papavero N, 2009). Esta especie pertenece a la tribu Tabanini, grupo que conjuntamente con el Haematopotini, contienen más de la mitad de la diversidad de la familia Tabanidae y se originaron relativamente recién en el Paleógeno (Shelah I *et al.*, 2015). Además los lugares en el que son registradas estas especies, concuerda con el hecho de que la diversificación de clados ocurrida en el Cretácico tardío y el Paleógeno se produjo principalmente en ambientes cálidos tropicales y subtropicales que florecieron en varias interacciones biológicas, incluidas aquellas generadas por la diversificación de angiospermas (polinización, recursos de néctar, hábitats larvarios semiacuáticos ricos en nutrientes) (Sheehan & Hansen, 1986; Ren & Lavandeira, 1998), además que en estas zonas se encontraban ampliamente distribuidos los grandes mamíferos y aves huéspedes que sobrevivieron después del Evento de Límite Cretácico-Paleógeno (Novacek, 1999). En cuanto a las muestras obtenidas en la provincia del Napo, formaron un grupo monofilético con la especie *Tabanus birmanicus* procedente de África. El género *Tabanus* a diferencia del *Peolocideras* que es endémico de Sudamérica, es un género que se encuentra ampliamente distribuido por el mundo, por tal razón es muy probable que se encuentren muestras de este género como la especie *Tabanus admenalopygus* en Sudamérica, además de que esta región posee los ambientes idóneos para el desarrollo de estos insectos.

Capítulo VI

Conclusiones

En el presente estudio se reportó la presencia de moscas hematófagas en las zonas en las que previamente se reportó la presencia de hemotrópicos por parte de la institución AGROCALIDAD, hecho que nos permite sugerir que estos insectos son los responsables de la diseminación de distintas enfermedades parasitológicas que afectan a la situación económica del sector ganadero.

La trampa Nzi, es una gran herramienta que permite la captura de estos insectos hematófagos, su efectividad dependerá del tiempo que se la deje en el campo, y del lugar en el que se la coloque.

Mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa, se pudo realizar el análisis filogenético de las muestras obtenidas en las provincias de Napo y Manabí, dando como resultado que las muestras se encuentran relacionadas con especies endémicas de América y cosmopolitas que se encuentran ampliamente distribuidas por el mundo; además, nos permitió conocer la homología de las muestras, siendo en el caso de las muestras del Napo, *Tabanus admenalopygus* al poseer porcentajes de identidad de 83,33% y 82,87%, y *Poeciloderas quadripunctatus* para las muestras de Manabí con porcentajes de identidad de 92,24% y 88,57%. Estos resultados son relativamente bajos, pero esto se puede deber a la calidad de las secuencias obtenidas. Debe destacarse que esta es la primera vez que se realiza este tipo de caracterización molecular en tábanos de Ecuador.

Con la ayuda de la TviCatL-PCR, se detectó que el 28,57% de las moscas fueron positivas a *T. vivax*. Este hecho corrobora el rol que cumplen los tábanos en la diseminación de enfermedades parasitológicas. Por tal razón, es importante establecer mecanismos de control de estos vectores.

Recomendaciones

La presencia de moscas hematófagas en zonas donde se ha reportado la presencia de hemotrópicos, es un motivo de real preocupación para el control de hemotrópicos, y adicional a esto, se cuenta con muy poca información sobre los vectores de estas enfermedades en el país, por dicha razón, se deben implementar programas de investigación que permitan estudiar de manera más profunda a estos vectores.

Los iniciadores LCO1490 y HCO2198, son idóneos para la amplificación del gen mitocondrial COI, por lo que en futuros proyectos de investigación sobre caracterización molecular en insectos hematófagos, es recomendable su uso, al ser un gen muy conservado.

Se recomienda de igual forma, plantear métodos que permitan controlar de manera efectiva la presencia de moscas hematófagas en las fincas ganaderas del Ecuador, para evitar la diseminación de enfermedades parasitológicas.

Capítulo VII

Bibliografía

- Adams, T. (1999). Hematophagy and hormone release. *Ann.Ent.Soc.Am*, 92, 1-13.
- Alarcón-Pineda, G. P.-H. (2008). Ecology and parasitological analysis of horse flies (Diptera: Tabanidae) in Antioquia Colombia. *Caldasia*, 30(1): 179-188.
- Baranov, N. (1935). New information on the Golubatz fly, *S. columbaczense*. *Rev. Appl. Ent. B*, 275-6.
- Barros, A. &. (2007). The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses. *Veterinary Parasitology*, 144, 380-384.
- Batista, J. R. (2011). Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitol. Res*, 110, 73-80.
- Betancourt, A. (1978). Transmisión prenatal del *Trypanosoma vivax* de bovinos en Colombia. *Revista ICA Bogotá (Colombia)*, 13, 127-129.
- Bezerra, F. S. (2008). Efeitos da infecção por *Trypanosoma vivax* sobre a reprodução: uma revisão. *Acta Vet. Bras*, 2, 61-66.
- Birhanu, H. F. (2015). Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions, Northern Ethiopia. *Parasites Vectors*, 8, 212.
- Boy V. & Duncan P. (1979). Time-budgets of Camargue horses. Developmental changes in the time-budgets of foals. *Behaviour*, 71, 187-202.
- Budd, L. T. (1999). DFID-Funded Tsetse and Trypanosomiasis Research and Development since 1980 (V. 2. Economic Analysis). *London: Department for international development*.
- Burton, R. (1860). The lake regions of Central Africa. *London: Longman*.
- Cadioli, F. B. (2012). First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in Sao Paulo state, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol Vet.*, 21, 118-124.
- Cassalett, E. J. (2011). Diagnóstico y caracterización molecular de infecciones naturales por *Trypanosoma* spp. en bovinos de la Orinoquía Colombiana. *Corpoica Cienc. Tecnol Agro*, 12, 86-91.

- Changbunjong T, B. B. (2018). Species identification of horse flies (Diptera: Tabanidae) in Thailand using DNA barcoding. *Vet Parasitol*, 259:35-43.
- Chartier C., I. J. (2000). Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. *Universités francophones, Aupelf Uref*, 774.
- Ciurea, I. and Dinulescu, G. (1924). Ravages causes por la mouchede Goloubatz en Roumanie; ses attaques contre les animaux et contre l'homme. *Ann. Trop. Med. Parasit*, 18, 323-42.
- Claire M. Mugasa, J. V. (2018). Morphological re-description and molecular identification of Tabanidae (Diptera) in East Africa. *ZooKeys*, 769:117-144.
- Cortez A. P., R. A. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23 (1), 44-51.
- Coscarón S, P. N. (2009). Catalogue of Neotropical Diptera. *Neotropical Diptera*, 16: 1-199.
- Dagnachew S., B. M. (2016). Review on *Trypanosoma vivax*. *Afr. J. Basic Appl, Sci*, 7, 41-64.
- Dawit Tesfaye, N. S. (2012). Economic burden of bovine trypanosomosis in three villages of Metekel zone, Northwest Ethiopia. *Trop Anim Helath Prod*, 44:873-879.
- Desquesnes, M. &. (1992). Les taons de Guyane biologie, importance vétérinaire et méthodes de lutte. *CIRAD-EMVT, Cayenne*, 29.
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock Trypanosomoses and their vectors in Latin America*. Paris: World Organisation for Animal Health.
- Dwinger, R. H. (2000). Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in ruminants in Latin America. *Animal Trypanosomosis: Diagnosis and Epidemiology*, 50-55.
- Eyssen, L. E. (2018). Recombinant and native TviCATL from *Trypanosoma vivax*: Enzymatic characterisation and evaluation as a diagnostic target for animal African trypanosomosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 223, 50-54.
- Fairchild, G. B. (1969a). Climate and the phylogeny and distribution of Tabanidae. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 15: 7-11.
- Fairchild, G. B. (1969b). Notes on Neotropical Tabanidae. Classification and distribution, with keys to genera and subgenera. *Arquivos de Zoologia de São Paulo*, 17: 199-255.

- Folmer O., B. M. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5), 294-299.
- Gonzalez, N. &. (1992). Experimental infection with, *Trypanosoma vivax* in Holstein cebu cows, during the last trimester of gestation and the post partum period. *In Premier séminaire international sur les Trypanosomes animaux non transmisés par les Glossines*, 208.
- Gonzatti, M. G.-B.-B. (2014). *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and trypanosomosis in Latin America: secadera/huequera/cacho hueco. Magez, S., Randwaska, M. (Eds), *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. Springer-Verlag, Wien, London, 261-285.
- Herakles A. García, C. M. (2018). Remarkable richness of trypanosomes in tsetse flies (*Glossina morsitans morsitans* and *Glossina pallidipes*) from the Gorongosa National Park and Niassa National Reserve of Mozambique revealed by fluorescent fragment length barcoding (FFLB). *Infection, Genetics and Evolution* 63, 370-379.
- Higuchi, R. (1989). PCR technology. *Principles and applications for DNA amplification (H. A. Erlich ed)*, 31-37.
- Hoare, C. (1972). The trypanosomes of mammals. *Blackwell, Oxford*, 749.
- J.S., B. F. (2008). Efeitos da infeccao por *Trypanosoma vivax* sobre a reproducao: uma revisao. *Acta Vet. Bras.*, 2, 61-66.
- Jaime Buestán, R. N. (2007). Lista actualizada de Tábanos (Díptera: Tabanidae) del Ecuador. *Rev Ecuat Hig Med Trop*, 44:23-78.
- Jan Votýpka, J. B. (2019). Horse flies (Diptera: Tabanidae) of three West African countries: A faunistic update, barcoding analysis and trypanosome occurrence. *Acta Tropica*, 1-8.
- Jesca Nakayima, R. N. (2013). Genetic diversity among *Trypanosoma (Duttonella) vivax* strains from Zmabia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. *Parasite*, 20-24.
- Lehane, M. J. (2005). *The biology of blood-sucking in insects*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Manson, P. (1878). On the development of *Filaria sanguinis hominis*. *J. Linn. Soc. Zool. London*, 14, 304-11.
- Melendez, R. F. (1993). Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. *J. Parasitol*, 293-294.

- Michael Barret, R. J. (2003, Noviembre 1). The trypanosomiases. *The trypanosomiases*. Lancet.
- Novacek, M. (1999). 100 million years of land vertebrate evolution: the Cretaceous-early Tertiary. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86: 230-258.
- Nuttall, G. H. (1899). On the role of insects, arachnids, and myriapods as carriers in the spread of bacterial and parasitic disease of man and animals. A critical and historical study. *Johns Hopkins Hospital Reports*, 8, 1-154.
- Organización Panamericana de la Salud. (1962). *Moscas de importancia para la salud pública*. Washintong: Organización Mundial de la Salud.
- Oscar Betancur, P. J.-R. (2016). Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Veterinary Parasitology*, 54-59.
- Otte MJ, A. J. (1994). *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. *Trop. Anim Health Prod*, 26(3): 146-56.
- Page, W. A. (1990). Feeding behaviour and trypanosomatid infection of some Tabanids and Culicidae in Colombia. *J Entomol*, 29, 1-13.
- Radwanska, S. M. (2014). *Trypanosomes and trypanosomiasis*. New York: Springer-Verlag Wien.
- Rafael E. Cárdenas, J. B. (2009). Diversity and distribution models of horse flies (Diptera:Tabanidae) from Ecuador. *Ann. soc. entomol. Fr.*, 45 (4): 511-528.
- Raymond, H. L. (1982). Insectes nuisibles au bétail et climat. *Influence du climat sur l'animal au pâturage*, 169-183.
- Ren, D. &. (1998). Flower-associated Brachycera flies as fossil evidence for Jurassic angiosperm origins. *Science*, 280: 85-88.
- Ruiz-Martinez. (1971). Les Trypanosomes au Venezuela. Progrès obtens dans la lutte et la prophylaxie de la maladie. *Bull. OIE*, 76, 275-289.
- Sheehan, P. &. (1986). Detritus feeding as a buffer to extinction at the end of the Cretaceous. *Geology*, 14: 868-870.
- Shelah I, M. K. (2015). Molecular phylogeny of the horse flies: a framework for renewing abanid taxonomy. *Systematic Entomology*, 41: 56-72.
- Smith, K. G. (1973). Insects and other arthropods of medical importance. *London: British Museum (Natural History)*.
- Strother, S. (1999). Tabanids. *Dermatology Online Journal*, 5(2).

Universo, E. (2017, Diciembre 23). Mosca tábano ha causado muerte de unas 600 reses en Chone. *El Universo*.

Zapata, R. M. (2009). Frecuencia de infección por Trypanosoma sp. en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en cuatro hatos bufaleros de Barrancabermeja Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu*, 22, 25-32.