



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**ANÁLISIS DE POSIBLES AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE *LUTZOMYIA*
LONGIPALPIS, VECTOR DE LEISHMANIASIS VISCERAL**

Tesista: Lorena Gisel Caligiuri

Directora: Christina Beryl M^cCarthy

Asesor Académico: Víctor Romanowski

2016

LUGAR DE TRABAJO



**LABORATORIO METAGENÓMICA DE MICROORGANISMOS
CENTRO REGIONAL DE ESTUDIOS GENÓMICOS**

INSTITUCIONES INTERVINIENTES



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NOROESTE DE LA
PROVINCIA DE BUENOS AIRES**



AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS**Estrategia para confirmar la presencia y asociación de microorganismos identificados en *Lutzomyia longipalpis*, vector de Leishmaniasis Visceral.**

Lorena G. Caligiuri y Christina B. McCarthy (*poster*) XIV Jornadas Argentinas de Microbiología y 3ra Jornada de Microbiología e Infectología del NEA; Asociación Argentina de Microbiología (AAM); Amerian Hotel Casino Gala, Resistencia, Chaco, Argentina; 2011.

Strategy for identifying *Psychodiella chagasi*, a putative control agent for *Lutzomyia longipalpis*, Visceral Leishmaniasis vector.

Lorena G. Caligiuri, Enrique A. Sandoval and Christina B. McCarthy (*poster*) 5th International Conference on Industrial Bioprocesses (IFIB-2012); National Taiwan University of Science and Technology, Taipei, Taiwan; 2012.

Testing the versatility of a *Psychodiella sp.* diagnostic assay in field surveys.

Lorena G. Caligiuri, Enrique A. Sandoval, María Soledad Santini, Soraya A. Acardi, Oscar D. Salomón, Lilian Tartaglino y Christina B. McCarthy (*poster*). VIII International Symposium on Phlebotomine Sandflies. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. 2014

Polymerase chain reaction-based assay for the detection and identification of sand fly gregarines in *Lutzomyia longipalpis*, a vector of visceral leishmaniasis.

Lorena G. Caligiuri, Soraya A. Acardi, María Soledad Santini, Oscar D. Salomón and Christina B. McCarthy. J Vector Ecol, 2014. 39(1): p. 83-93.

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento comienza a quien no solo condujo el desarrollo de esta Tesis sino quien también llenó de su personalidad y calidad humana esta formación, a la Dra. Christina McCarthy. Chris gracias por tu comprensión, apoyo profesional y sobre todo humano, en todo momento.

También quiero reconocer a una de las mejores compañeras que pude haber tenido, Natalia Cabrera, con quien compartimos todo tipo de momentos, y quien me acompañó en todo sentido con su calidez. Gracias Nali por estar siempre lista.

Quiero agradecer a mis compañeros del CREG, los viejos y los nuevos, con quienes frente a diversas situaciones mantuvimos una excelente relación y supimos acompañarnos.

A las generaciones que vienen detrás formando un hermoso grupo de Laboratorio, llegando en este tramo final pero en el momento justo.

Gracias a personas como Riccilo y Cocó que detuvieron su rutina para enseñarme y colaborar con gran entusiasmo y sin ningún tipo de especulación. A Carlita, Maga y Ceci por la mano dada en los momentos más necesarios. A investigadores como Marta Lizarralde y Jorge Ronderos, quienes prestaron sus equipos e instalaciones sin inconvenientes. Y a todos aquellos que, en un momento u otro, colaboraron con el desarrollo de esta tesis.

Gracias a la gran red de investigación REDILA por todos sus aportes, especialmente a los Dres Daniel Salomón, Ma. Soledad Santini y Soraya Acardi. Y a Kike (Enrique Sandoval) por todo el material otorgado y su predisposición.

Gracias a la Dra. Nagila Secundino por facilitar material invaluable sin mezquindad con el simple objetivo de colaborar.

Finalmente, mi agradecimiento más profundo a toda mi familia, sobre todo a mis viejos, quienes alentaron en todas las instancias incluyendo las más complicadas. Especialmente a Faby quien me apoyó en este desarrollo personal sin pertenecer a este mundo científico, intentando comprender algunas situaciones atípicas. Y dedicada especialmente a mi hijo Valentín, quien me empujó en el tramo final de esta Tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	12
OBJETIVOS	15
1. INTRODUCCIÓN	17
SECCIÓN 1 A	18
1. Panorama General	18
2. Flebótomos: Taxonomía, Distribución y Biología	21
Taxonomía	21
Distribución	22
Biología	22
Apareamiento: feromonas, <i>lovesongs</i> y <i>lekking</i>	24
<i>Lutzomyia longipalpis</i> es un complejo de especies	25
3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.	27
Desarrollo del parásito en el vector	28
Especies de flebótomos involucradas en la transmisión de <i>Leishmania</i> spp.	31
Rol de los flebótomos en la patogénesis de las leishmaniasis	34
4. Dispersión actual de las leishmaniasis	35
Leishmaniasis del Viejo Mundo	35
Leishmaniasis Zoonótica	36
Leishmaniasis Antroponótica	36
Leishmaniasis del Nuevo Mundo	37
Leishmaniasis Cutánea	37
Leishmaniasis Visceral	38
Situación de la LV en Argentina	39
SECCIÓN 1B	42
1. Control de las Leishmaniasis	42

Diagnóstico	42
Tratamiento y vacunas	42
Detección	43
Control de los reservorios hospedadores	43
Control de los vectores	44
Métodos	44
Control Químico	45
Gestión ambiental	47
Otras alternativas para el control de flebótomos	47
2. Microbiota asociada a los flebótomos	49
3. Importancia de los protistas apicomplejos identificados en <i>Lu. longipalpis</i> por homología de secuencia	51
4. Gregarinos: parásitos naturales de dípteros	52
<i>Psychodiella chagasi</i>	54
<i>Ascogregarina</i> spp.	56
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
PROTISTAS	
<i>Psychodiella chagasi</i>	61
CAPÍTULO 1. Diseño y análisis de cebadores diagnósticos a nivel género (<i>PsyF/PsyR</i>)	63
1.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a <i>Ps. chagasi</i>	65
Búsquedas por homología en bases de datos (BD:nt)	65
Alineamiento múltiple de secuencias correspondientes a <i>Ps. chagasi</i>	66
1.2 Diseño de cebadores diagnósticos para <i>Psychodiella</i> sp. (<i>PsyF/PsyR</i>)	71
1.3 Análisis <i>in silico</i> de los cebadores diagnósticos	72
Especificidad teórica a nivel género	72
Especificidad teórica a nivel filo	72
1.4 Validación <i>in vitro</i> de los cebadores diagnósticos	75

Amplificación por PCR de ADNc con los cebadores género específicos	75
Clonado del producto de amplificación	76
Secuenciamiento de los clones recombinantes	78
Control de especificidad de los cebadores <i>PsyF/PsyR</i>	79
CAPÍTULO 2. Validación a campo de los cebadores diagnósticos	81
2.1 Muestreo y recolección de <i>Lu. longipalpis</i> adultos	84
2.2 Análisis por microscopía de hembras infectadas	84
2.3 Extracción de ADN total de flebótomos	86
Control Interno de las extracciones de ADN total: gen <i>cacophony</i>	87
2.4 Amplificación por PCR y secuenciamiento	88
Límite de detección de los cebadores <i>PsyF/PsyR</i>	91
2.5 Análisis filogenético de las secuencias amplificadas por PCR	92
CAPÍTULO 3. Análisis de la versatilidad de los cebadores para ensayos a campo	95
3.1. Muestreo y recolección de diferentes especies de <i>Lutzomyia</i>	96
3.2 Análisis por microscopía de los ejemplares capturados	97
Infecciones con ooquistes y gamontes observados al microscopio	99
3.3 Extracción de ADN total; optimización de extracciones de 1 sólo adulto	105
3.4 Amplificación por PCR y secuenciamiento	112
Control interno: gen ribosomal 18S	114
3.5 Observación y análisis de glándulas secretoras de feromonas en machos con y sin infección gregarina	116
CAPÍTULO 4. Diseño y análisis de cebadores diagnósticos a nivel especie (<i>PsyF/20R</i>)	122
4.1 Diseño de cebadores diagnósticos para <i>Ps. chagasi</i> (<i>PsyF/20R</i>)	122
4.2 Análisis <i>in silico</i> de los cebadores diagnósticos	122
4.3 Validación a campo de los cebadores <i>PsyF/20R</i>	124
4.4 Flebótomos infectados experimentalmente con <i>Ps. chagasi</i> y <i>Ps. sergenti</i> ; análisis por microscopía	126

Análisis por microscopía	127
Mediciones de los parásitos	128
4.5 Extracción de ADN total, amplificación por PCR, secuenciamiento y análisis	131
Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de <i>Ps. sergenti</i>	134
<i>Ascogregarina taiwanensis</i>	135
CAPÍTULO 5. <i>A. taiwanensis</i>: Diseño y análisis de cebadores	137
5.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a <i>A. taiwanensis</i>	137
Búsquedas por homología en bases de datos nucleotídicas	137
Alineamiento múltiple de secuencias correspondientes a <i>A. taiwanensis</i>	138
5.2 Diseño de cebadores en base a las pirosecuencias de <i>A. taiwanensis</i> (5F/40R)	142
5.3 Análisis <i>in silico</i> de los cebadores diseñados	142
5.4 Evaluación <i>in vitro</i> de los cebadores diseñados para <i>A. taiwanensis</i>	146
Amplificación por PCR de ADNc con los cebadores 5F/40R	146
Clonado del producto de amplificación	147
Secuenciamiento de los clones recombinantes	150
CAPÍTULO 6. Evaluación a campo de los cebadores diseñados para <i>A. taiwanensis</i>	151
6.1 Muestreo y recolección de <i>Lu. longipalpis</i> ; extracción de ADN total	151
6.2 Amplificación por PCR y secuenciamiento	151
6.3 Análisis comparativo de los cebadores diseñados (5F/40R) con cebadores diagnósticos publicados para <i>A. taiwanensis</i>	153
6.4 Análisis filogenético de las secuencias amplificadas por PCR con los cebadores 5F/40R	159
<i>Plasmodium falciparum</i>	162
CAPÍTULO 7. <i>Plasmodium falciparum</i>: Diseño y análisis de cebadores	164
7.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a <i>P. falciparum</i>	164

Búsquedas por homología en bases de datos nucleotídicas	164
7.2 Diseño de cebadores en base a la pirosecuencia con homología a <i>P. falciparum</i> (41F/43R)	165
7.3 Análisis <i>in silico</i> de los cebadores diseñados	168
7.4 Evaluación <i>in vitro</i> de los cebadores diseñados para <i>P. falciparum</i>	169
Amplificación por PCR de ADNc con los cebadores 41F, 42R y 43R	169
Clonado del producto de amplificación con los cebadores 41F/43R	171
Secuenciamiento de los clones recombinantes	173
CAPÍTULO 8. Evaluación a campo de los cebadores diseñados para <i>P. falciparum</i>	174
8.1 Muestreo y recolección de <i>Lu. longipalpis</i> ; extracción de ADN total	174
8.2 Amplificación por PCR y secuenciamiento	174
Secuenciamiento y análisis de los productos de amplificación con los cebadores 41F/43R	175
8.3 Análisis comparativo de los cebadores diseñados (41F/43R) con cebadores diagnósticos publicados para <i>P. falciparum</i>	176
8.4 Evaluación de 41F/43R con ADN de <i>P. falciparum</i>	177
8.5 Análisis filogenético de las secuencias amplificadas por PCR con los cebadores 41F/43R	178
HONGOS	180
CAPÍTULO 9. FUNGI: Diseño y análisis de cebadores	181
9.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a hongos	181
Búsquedas por homología en bases de datos nucleotídicas	181
9.2 Diseño de cebadores en base a las pirosecuencias de Fungi	181
Control de especificidad teórica	183
9.3 Evaluación <i>in vitro</i> de los cebadores diseñados para <i>M. verticillata</i>	183
BACTERIAS	185
CAPÍTULO 10. BACTERIA: Diseño y análisis de cebadores	186
10.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a bacterias	186

Alineamiento múltiple de las pirosecuencias con homología a bacterias	187
10.2 Diseño de cebadores en base a las pirosecuencias de bacterias	188
3. RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	193
RESUMEN DE RESULTADOS	193
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	204
4. MATERIALES Y MÉTODOS	207
4.1 Análisis de las secuencias	207
4.2 Diseño de cebadores	207
4.3 Amplificaciones por PCR con los cebadores diseñados	207
4.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	208
4.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de los geles de agarosa	209
4.6 Digestión del ADN con Endonucleasas de Restricción	209
4.7 Tratamiento de clones recombinantes	210
Ligación de fragmentos	210
Cepas bacterianas	210
Cultivo de las cepas bacterianas	210
Condiciones de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	211
Selección de los clones transformantes de <i>E. coli</i>	211
Confirmación de clones recombinantes	212
4.8 Extracción de ADN plasmídico a partir de <i>E. coli</i>	212
4.9 Cuantificación de las muestras de ADN	213
4.10 Preparación de células <i>E. coli</i> competentes	213
4.11 Transformación de células bacterianas competentes	214
4.12 Secuenciamiento convencional	214
4.13 Muestras biológicas	214
4.14 Áreas de estudio	216
4.15 Microscopía óptica	218

4.16 Mediciones de los ooquistes y gamontes de <i>Ps. chagasi</i>	218
4.17 Mediciones de las glándulas secretoras de feromonas de <i>Lutzomyia</i> sp.	219
4.18 Extracción de ADN genómico de flebótomos	219
4.19 Control interno de las extracciones de ADN genómico (gen <i>cacophony</i> y gen <i>18S ribosomal</i>)	220
Gen <i>cacophony</i>	220
Gen <i>18S ribosomal</i>	221
4.20 Cebadores diagnósticos de bibliografía	221
4.21 Amplificación con los cebadores de bibliografía para <i>Plasmodium</i> sp.	222
4.22 Amplificación con los cebadores de bibliografía para <i>A. taiwanensis</i>	223
4.23 Análisis filogenético de secuencias	223
5. BIBLIOGRAFÍA	224
6. ABREVIATURAS Y GLOSARIO	238
7. ANEXO	240
Figuras	240
Tablas	245
MATERIAL COMPLEMENTARIO	253

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por vectores que tienen una ecología y epidemiología complejas. Se manifiesta clínicamente de cuatro maneras principales de las cuales la leishmaniasis visceral (LV) es la más severa, ya que es fatal si no es tratada (Desjeux, 1996). Esta "Enfermedad de la Pobreza" es un serio problema de salud pública a nivel mundial y, recientemente, a nivel nacional. Actualmente, no existe una vacuna para su prevención, y el tratamiento con drogas es un procedimiento caro que acarrea efectos secundarios indeseables. La leishmaniasis es causada por un protista parásito, *Leishmania* spp., y transmitida a los humanos por insectos flebótomos. En Latinoamérica, LV es causada por *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) y transmitida por *Lutzomyia longipalpis* (WHO, 2010). Este flebótomo solamente se encuentra en el Nuevo Mundo, con una amplia distribución desde México hasta Argentina. Entre 1925 y 1989, en Argentina se reportaron 14 casos humanos de leishmaniasis pero ninguno fue atribuido a *Le. infantum* y, adicionalmente, sólo hubo 2 registros aislados de *Lu. longipalpis* sin reporte de LV (en 1951 y 2000). Sin embargo, debido al avance indiscriminado de la urbanización, que acarrea pobreza y condiciones insalubres, recientemente se describió el primer foco de LV en Argentina (Salomón *et al.*, 2008).

La mejor manera de interrumpir cualquier enfermedad transmitida por vectores consiste en reducir el contacto humano-vector. Las estrategias dirigidas a los vectores son especialmente atractivas debido a que la capacidad vectorial para transmitir enfermedades infecciosas a los humanos es proporcional a la densidad del vector y es exponencial a la supervivencia del vector. El control biológico es una manera efectiva de reducir o mitigar plagas a través del uso de agentes naturales, y es más amigable para el ambiente que los tratamientos tradicionales con insecticidas químicos. Sin embargo, hay muy poca información sobre el control biológico de flebótomos y potenciales agentes de control. En el laboratorio donde se desarrolló esta tesis, recientemente se utilizó la pirosecuenciación para analizar los taxones asociados a *Lu. longipalpis* de zonas endémica (ZE) y no endémica (ZNE) de LV en Argentina y Brasil, respectivamente (McCarthy *et al.*, 2011), y para comparar los transcriptomas de estos especímenes (McCarthy *et al.*, 2013). Estos análisis permitieron ensamblar un inventario abarcativo de los taxones asociados a *Lu. longipalpis* adultos de ZE y ZNE de LV, y proveyó el fundamento para analizar la significancia de posibles candidatos para el control biológico de este vector (McCarthy *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 2013).

En este contexto, el objetivo general de la presente tesis consistió en establecer la significancia de los taxones previamente encontrados en *Lu. longipalpis* adultos (entre ellos, protistas, hongos y bacterias) (McCarthy *et al.*, 2011), con particular énfasis en los posibles agentes de control biológico y en los agentes etiológicos de importancia médica y veterinaria. Con este fin, se diseñaron y evaluaron cebadores diagnósticos para confirmar la presencia y asociación de los taxones identificados.

En el caso de los protistas, se diseñaron cebadores diagnósticos para dos especies de gregarinos, *Psychodiella chagasi* y *Ascogregarina taiwanensis*, y para un hemosporidio, *Plasmodium falciparum*. El interés particular en analizar la presencia y asociación de los gregarinos, se debe a que son parásitos naturales de flebótomos y de mosquitos. *Psychodiella chagasi* parasita a varias especies neotropicales del género *Lutzomyia* (Adler y Mayrink, 1961; Lewis *et al.*, 1970; Ayala, 1971; Brazil *et al.*, 1996), entre ellas *Lu. longipalpis*. En *Lu. longipalpis*, este parásito puede reducir la longevidad y la producción de huevos, y el nivel de parasitemia puede alcanzar más de un 80% en colonias de laboratorio (Dougherty y Ward, 1991). Por otro lado, como *Ascogregarina* spp. sólo se ha descrito en mosquitos (Votypka *et al.*, 2009), y se identificaron secuencias de *A. taiwanensis* en *Lu. longipalpis* (McCarthy *et al.*, 2011), esto podía indicar que el parásito también infecta a este flebótomo.

Por otro lado, la identificación de secuencias de hemosporidios en *Lu. longipalpis*, entre ellos *P. falciparum*, sugirió que estos vectores podían ser una fuente casual de dispersión de otras enfermedades infecciosas tales como la malaria. Por ello también se analizó la presencia y asociación del agente causal de la malaria en *Lu. longipalpis*.

Los hongos y bacterias encontrados en el estudio de referencia (McCarthy *et al.*, 2011) son ubicuos en los diversos ambientes frecuentados por los flebótomos. Por ello probablemente eran indicativos de sus patrones de comportamiento y hábitos de alimentación, y formaban parte de su microbiota transiente. Sin embargo, para poder analizar estas interacciones con más detalle, también se diseñaron cebadores diagnósticos para estos taxones.

A continuación se resumen los resultados más significativos de este trabajo de investigación. Se desarrolló el primer ensayo basado en PCR para la detección e identificación de infecciones gregarinas en flebótomos, mediante la amplificación selectiva de un fragmento de ADN del gen de la subunidad pequeña de ARNr (SSU ADNr) (Resultados: Capítulos 1 y 2; (Caligiuri *et al.*, 2014)). Este ensayo comprende: 1) la extracción de ADN total del hospedador; 2) la amplificación por PCR de un fragmento del gen SSU ADNr del parásito utilizando cebadores con homología a

regiones conservadas a nivel de género; y 3) la identificación del parásito a nivel de género por comparación del fragmento amplificado con un patrón de tamaños preestablecido, e identificación del parásito a nivel de especie mediante secuenciación del amplicón y posterior comparación de la secuencia resultante con secuencias de bases de datos informáticas.

Seguidamente se evaluó la aplicabilidad de este ensayo diagnóstico para estudios de campo (Resultados: Capítulo 3; (Caligiuri *et al.*, 2014)), demostrando que es muy versátil para este tipo de estudios, y que se puede adaptar a diferentes diseños de muestreo. Sumado a esto, el ensayo diagnóstico permitió detectar infecciones gregarinas en flebótomos en donde no se habían identificado infecciones aparentes previamente por microscopía.

También se diseñaron y evaluaron cebadores diagnósticos para identificar al parásito a nivel de especie (*Psychodiella chagasi*) (Resultados: Capítulo 4). Se utilizó el ensayo diagnóstico desarrollado con estos nuevos cebadores para analizar flebótomos infectados con dos especies diferentes de parásitos, *Ps. chagasi* y *Ps. sergenti*.

Por otro lado, el análisis de diferentes flebótomos con los cebadores diagnósticos diseñados para *A. taiwanensis* y *P. falciparum*, permitió descartar la asociación de estos apicomplejos con los ejemplares analizados (Resultados: Capítulos 5-8).

Por último, se diseñaron cebadores diagnósticos para varias de las especies de hongos y bacterias identificadas en ejemplares de *Lu. longipalpis* (Resultados: Capítulos 9 y 10). Estos cebadores servirán para analizar sus interacciones con los flebótomos en más detalle.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis han permitido cumplir con el objetivo principal de la misma (establecer la significancia de los taxones previamente encontrados en *Lu. longipalpis*, con particular énfasis en los posibles agentes de control biológico y en los agentes etiológicos de importancia médica y veterinaria). Consecuentemente, aportan información de suma relevancia sobre la biología de *Lu. longipalpis*, vector de LV, y de uno de sus parásitos naturales, *Ps. chagasi*, con potencial para ser usado como agente de control biológico de este vector.

OBJETIVOS

En esta tesis se profundizó el análisis de los taxones encontrados previamente en *Lu. longipalpis*, vector de LV, mediante secuenciamiento de siguiente generación (SSG) (McCarthy *et al.*, 2011). El análisis se enfocó en los agentes putativos de control biológico y en los agentes etiológicos de importancia médica y veterinaria.

Objetivo General

Establecer la significancia de los taxones previamente encontrados en *Lu. longipalpis* adultos machos y hembras de zonas endémica y no endémica de LV, con particular énfasis en los posibles agentes de control biológico y en los agentes etiológicos de importancia médica y veterinaria.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar un flujo de trabajo que permita analizar y determinar la presencia y asociación de los taxones identificados previamente por SSG en *Lu. longipalpis* adultos de zonas endémica y no endémica de LV.
2. Desarrollar ensayos diagnósticos para aquellos taxones cuya presencia y asociación se confirme.
3. Utilizar los ensayos diagnósticos desarrollados para analizar un mayor número de flebótomos capturados en diversas localidades.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La Introducción de esta tesis doctoral está dividida en dos partes. La primera (Sección 1A), brinda una descripción detallada de los flebótomos y de su involucramiento en la transmisión de la leishmaniasis. En particular, se profundiza en el estado actual de conocimiento sobre la biología de estos vectores, su dispersión y el rol que tienen en la patogénesis de esta enfermedad, haciendo hincapié en *Lutzomyia longipalpis* y su rol en la leishmaniasis visceral en Argentina.

Por otro lado, y en función de que el objetivo general de la presente tesis consiste en establecer la significancia de los taxones previamente encontrados en *Lu. longipalpis* (McCarthy et al., 2011), especialmente aquellos con potencial como agentes de control biológico, la segunda parte de esta Introducción (Sección 1B) tiene como propósito describir las estrategias de control existentes para combatir esta enfermedad, con particular énfasis en las medidas para controlar a los vectores. En este sentido, también se incluye una revisión de la información disponible sobre la microbiota asociada, especialmente en relación a *Lu. longipalpis*, y una descripción de los parásitos gregarinos identificados en el estudio de referencia (McCarthy *et al.*, 2011).

SECCIÓN 1A

1. Panorama general

Las leishmaniasis son enfermedades emergentes y resurgentes causadas por protistas parásitos y transmitidas por insectos vectores que, en términos del número de personas afectadas, sólo son sobrepasadas en importancia por la malaria [World Health Organization (WHO), 2010]. Con algunas pocas excepciones, los flebótomos son los únicos insectos hematófagos que transmiten leishmaniasis a través de la picadura de hembras infectadas, que previamente se alimentaron de un mamífero infectado. Los flebótomos también son vectores de otros patógenos humanos, entre ellos *Bartonella* spp. (enfermedad de Carrion) y varios agentes virales. Entre estos últimos, los más importantes se agrupan en los géneros *Phlebovirus* (Familia Bunyaviridae) y *Vesiculovirus* (Familia Rhabdoviridae), y causan fiebre Pappataci, meningitis de verano, estomatitis vesicular y encefalitis del virus Chandipura (Depaquit *et al.*, 2010).

Las leishmaniasis tienen manifestaciones clínicas multifacéticas, están ampliamente extendidas en el Viejo y Nuevo Mundo (son prevalentes en cuatro continentes), y tienen una diversidad epidemiológica muy grande. Son causadas por al menos 20 especies de protistas del género *Leishmania*, que son transmitidas por la picadura de las hembras de dos géneros de flebótomos, *Phlebotomus* y *Lutzomyia* en el Viejo y Nuevo Mundo, respectivamente. Hay cerca de 30 especies de flebótomos que han sido comprobados como vectores, y los hospedadores reservorios incluyen humanos y animales domésticos y/o salvajes. La mayoría de las leishmaniasis son zoonóticas, en donde los humanos son infectados secundariamente, pero en las formas antroponóticas los humanos serían el único reservorio (ver "Dispersión actual de las leishmaniasis"). Las hembras se infectan al alimentarse de un hospedador reservorio (Desjeux, 1996).

Las leishmaniasis son importantes en términos de morbilidad, y algunas son graves en términos de mortalidad. En la actualidad, la incidencia global anual de las leishmaniasis se estima en 1.5-2 millones de casos nuevos por año, con la siguiente distribución: 1-1.5 millones de casos de Leishmaniasis Cutánea (LC) y 500.000 casos de Leishmaniasis Visceral (LV), y más de 59.000 muertes por año causadas por LV (Desjeux, 2004). Por muchos años el impacto de las leishmaniasis en la salud pública fue significativamente subestimado, principalmente por una falta de conciencia a nivel global respecto de su grave impacto sobre la salud. Sin embargo, durante las últimas décadas se ha vuelto muy evidente que las leishmaniasis son mucho más prevalentes

de lo que se sospechaba previamente. Esto se debe en parte a que ha habido un incremento a nivel mundial en el número de casos, y a que estas enfermedades se han expandido geográficamente encontrándose en lugares que previamente no eran endémicos (ver “Dispersión actual de las leishmaniasis”).

En el humano las leishmaniasis tienen al menos cuatro formas clínicas principales (Figura 1): Cutánea, Cutánea Difusa, Mucocutánea y Visceral (Desjeux, 1996).

Leishmaniasis Cutánea (LC): En el Viejo Mundo es causada principalmente por *Leishmania major* que produce lesiones auto-curativas. Sin embargo, cuando estas lesiones son múltiples e incapacitantes y dejan cicatrices desfigurantes, esta enfermedad crea un estigma estético permanente. La LC causada por *Le. tropica* generalmente es más crónica y, en su forma más severa (leishmaniasis recidivans), es muy difícil de tratar y comúnmente se vuelve persistente, destructiva y desfigurante. En el Nuevo Mundo, *Le. mexicana* generalmente produce lesiones benignas, pero es muy difícil de tratar en algunos sitios, como el pabellón auricular.

Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD): No es muy común, es causada por *Le. aethiopica* y *Le. amazonensis*, y está asociada a una respuesta inmune celular deficiente contra el antígeno específico de *Leishmania*. Su gravedad se debe a que causa lesiones diseminadas similares a las de la lepra lepromatosa, que nunca sanan espontáneamente y muchas veces reinciden luego de su tratamiento con drogas. Se reconoce como un problema especial de salud pública debido a las consecuencias devastadoras para el paciente.

Leishmaniasis Mucocutánea (LMC o Espundia): Produce una extensa destrucción de las cavidades oronasal y faríngea, provocando horribles lesiones desfigurantes, mutilación de la cara y terrible sufrimiento de por vida. Está mayormente relacionada a especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, tales como *Le. braziliensis*, *Le. panamensis* y *Le. guyanensis*, aunque en el Viejo Mundo se han denunciado lesiones de la mucosa en pacientes inmunodeprimidos causadas por *Le. donovani*, *Le. major* y *Le. infantum*.

Leishmaniasis Visceral (LV): Es causada por el complejo de especies *Le. donovani*, compuesto por *Le. infantum* y *Le. donovani* en el Viejo Mundo, y por *Le. infantum* (sinonimia *chagasi*) en el Nuevo Mundo (WHO, 2010). Es la forma más grave (ya que es fatal si no es tratada) y se caracteriza por fiebre irregular, pérdida de peso, esplenomegalia, hepatomegalia y/o linfadenopatía y anemia. Causa epidemias a gran escala con altas tasas de mortalidad. Luego de su recuperación, los pacientes pueden

desarrollar una forma crónica de LC llamada “leishmaniasis dérmica post kala-azar” (LDPK), que generalmente requiere tratamientos prolongados y costosos.

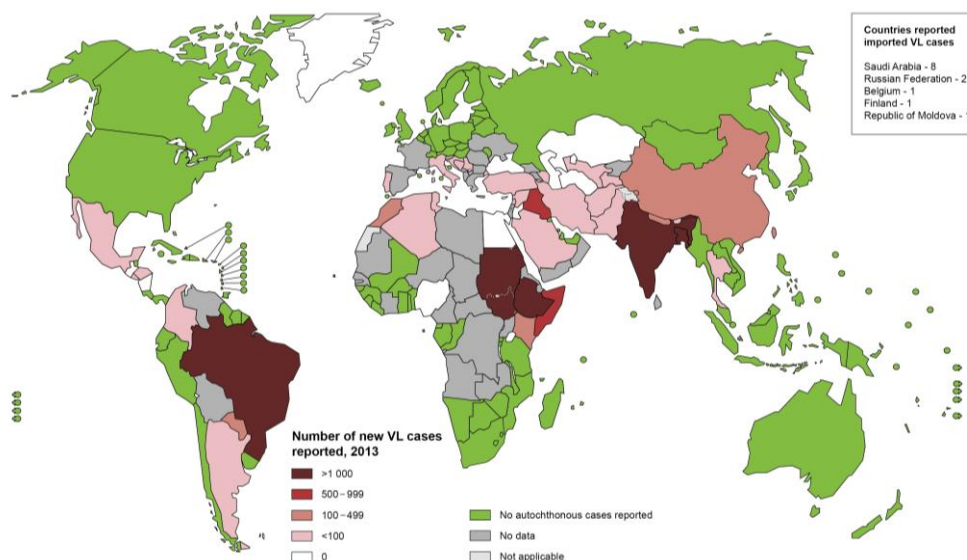
El desarrollo de la LV en los pacientes depende del estado de malnutrición, de factores genéticos y de otras enfermedades infecciosas, como casos de co-infección con HIV. La LV (Figuras 1 y 2) presenta la forma clínica más severa, como ya se ha mencionado, y se caracteriza por afectar varios órganos (bazo, hígado, mucosa del intestino delgado, médula ósea, ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides) debido a una excesiva multiplicación de células normales en órganos o tejidos (hiperplasia reticuloendotelial). Al mismo tiempo se generan alteraciones hematológicas (reducción de la vida de los leucocitos y los eritrocitos, con las consiguientes granulocitopenia¹ y anemia), provocando una predisposición del cuerpo humano a contraer infecciones.

Figura 1. Forma clínica de la LC, LCD, LMC y LV (Organización Mundial de la Salud, OMS).



¹ O neutropenia, es la disminución aguda o crónica de los granulocitos (neutrófilos) de la sangre.

Figura 2. Estado de la LV en el mundo. Mapa generado por la OMS correspondiente al año 2013. (http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png)



2. Flebótomos: Taxonomía, Distribución y Biología

Taxonomía

Se estima que existen más de 800 especies de flebótomos en diferentes regiones del mundo. Están agrupadas en el Suborden Nematocera del Orden Diptera, Familia Psychodidae, Subfamilia Phlebotominae. Los flebótomos comparten esta Familia (Psychodidae) con la mosca de la humedad o de los baños (Subfamilia Psychodinae), que no pica ni es vector.

La clasificación de los flebótomos es controvertida, complicada y lejos de ser definitiva. Basándose en la clasificación pionera de Theodor (Theodor, 1948), Lewis y colaboradores propusieron dos géneros para las especies del Viejo Mundo, *Phlebotomus* y *Sergentomyia*, y tres para el Nuevo Mundo, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* (Lewis *et al.*, 1977). El género *Chinius* corresponde a algunas especies chinas con caracteres primitivos (Leng, 1987). Los géneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Chinius*, son ampliamente aceptados por los taxónomos del Viejo Mundo. Dentro del género *Phlebotomus* se han reconocido 11 subgéneros, 96 especies y 17 subespecies (Lewis, 1982).

En el caso de los flebótomos neotropicales, la mayoría de los entomólogos siguen la clasificación de Lewis *et al.* (1977), posteriormente revisada por Young y Duncan, que reconoce los 3 géneros ya mencionados, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*, 15 subgéneros y 11 grupos de especies (Young y Duncan, 1994). Se han propuesto revisiones más recientes, pero ninguna es aceptada universalmente. Entre

éstas la más completa es la de Galati (Galati, 2003), que reconoce 464 especies de flebótomos neotropicales agrupados en 23 géneros, 20 subgéneros, 3 grupos de especies y 28 series (WHO, 2010).

Distribución

Los flebótomos se encuentran principalmente en las zonas cálidas de Asia, África, Australia, sur de Europa, y América (Killick-Kendrick, 1999). Hacia el norte, su distribución se extiende justo por encima de la latitud 50° N en el sudoeste de Canadá (Young y Perkins, 1984), y justo por debajo de esta latitud en el norte de Francia y Mongolia (Lewis, 1982). Su distribución más austral termina en la latitud 40° S, aunque están ausentes en Nueva Zelandia y las islas del Pacífico (Lane, 1993). Su distribución altitudinal se extiende desde debajo del nivel del mar (Mar Muerto) (Lane, 1993) hasta los 3300 m.s.n.m. en Afganistán (Artemiev, 1980).

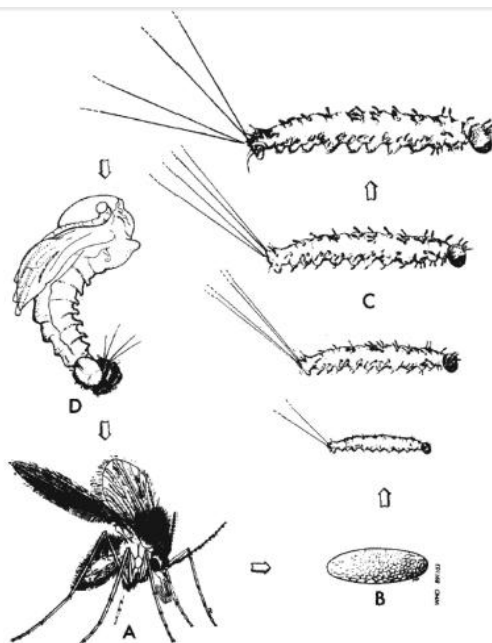
Biología

Los flebótomos sufren metamorfosis completa, es decir que presentan los cuatro estados del desarrollo: huevo, larva (cuatro estadios), pupa y adulto (Figura 3). A diferencia de los mosquitos, los estados inmaduros no requieren agua estancada para completar su desarrollo, aunque sí necesitan ambientes relativamente húmedos y cálidos. Las hembras adultas oviponen entre 15 y 80 huevos en hábitats ricos en materia orgánica (tales como excrementos de animales y humus), que proveen la protección, nutrición y humedad necesarias para las larvas emergentes. Los huevos (0,3-0,5 mm de largo) inicialmente son blancos o gris claro, pero con frecuencia se vuelven marrón oscuro o negros a pocas horas de ser ovipuestos. La eclosión es muy dependiente de la temperatura, y el desarrollo larval subsiguiente generalmente es lento. La duración de los estados del desarrollo recientemente fue determinada para 9 especies de flebótomos, pertenecientes a 6 géneros y subgéneros, mediante el análisis de 15 colonias de laboratorio a lo largo de un año. Después que la hembra ha ingerido sangre y completado la oviposición, las larvas de primer estadio emergen a los 12-19 días, las pupas a los 25-29 días, y los adultos a los 35-69 días (Volf y Volfova, 2011).

Las larvas tienen forma de oruga, tienen una cabeza que presenta una especie de cápsula, antenas pequeñas con forma de hoja, setas caudales largas (Figura 3), y se desplazan poco a partir del sitio de oviposición. Las pupas se asemejan a pequeñas crisálidas (Figura 3) en las que la muda del cuarto estadio larval está adherida a un sustrato sólido desde uno de los extremos. Los adultos son pequeños y rara vez

sobrepasan los 3,5 mm de longitud (Molyneux y Ashford, 1983). El cuerpo y las alas se encuentran cubiertas de pelos y, cuando se encuentran en reposo, mantienen sus alas característicamente en forma de “V” (Figura 3). Su color varía de casi blanco a casi negro, y sus patas son muy largas y delicadas.

Figura 3. Esquema del ciclo biológico de un flebótomo (WHO, 2010).



Tanto los machos como las hembras se alimentan del azúcar de las plantas, o de la mielaza producida por áfidos homópteros (Hemiptera: Aphidoidea). Las hembras presentan una estructura bucal que les permite alimentarse de sangre, y necesitan hacerlo al menos una vez para completar el desarrollo de los huevos (Sharma y Singh, 2008). Sólo unas pocas especies son capaces de producir huevos viables sin una ingesta previa de sangre. El macho no participa en la transmisión del parásito ya que su estructura bucal está poco desarrollada para perforar la piel. Además, no necesita alimentarse de sangre porque su fuente de energía proviene de los azúcares de las plantas (Cameron *et al.*, 1995). Las hembras pueden ingerir sangre tanto de animales domésticos y salvajes (gatos, perros, diversos roedores, ganado, aves y lagartos), como de humanos (Sharma y Singh, 2008). A diferencia de los mosquitos, atacan silenciosamente a sus hospedadores, y los adultos están activos principalmente al atardecer, a la noche y a la mañana temprano, aunque pueden picar durante el día si son molestados.

La velocidad de vuelo de los flebótomos es considerablemente más lenta que la de los mosquitos (<1 m/s) (Killick-Kendrick *et al.*, 1986). Son incapaces de volar

cuando hay viento de mayor velocidad (que su velocidad de vuelo), siendo ese el principal factor que limita su rango de dispersión. Típicamente su rango de vuelo es muy corto (alrededor de 300 m) y, por ende, las actividades del adulto generalmente están restringidas a la vecindad de los sitios de cría. Diversos estudios de marcado-liberación-captura han mostrado que las especies selváticas tienen distancias de dispersión más cortas que las peridomésticas. Por ejemplo, *Phlebotomus ariasi* se puede dispersar unos 2 km (Rioux *et al.*, 1979; Killick-Kendrick *et al.*, 1984). En contraste, las especies selváticas neotropicales rara vez se dispersan más de 1 km (WHO, 2010). Los sitios de descanso generalmente están cerca de los sitios de cría, y corresponden a micro-hábitats frescos, húmedos y oscuros (Killick-Kendrick, 1999). La actividad estacional de los adultos se ve afectada principalmente por las lluvias y la temperatura.

Apareamiento: feromonas, lovesongs y lekking

Algunos o todos los flebotomos neotropicales reconocen a sus parejas a través de feromonas y de “cantos” (*lovesongs*) producidos por la vibración de las alas del macho. En las especies de *Phlebotomus* no se ha demostrado la existencia de feromonas y de cantos similares, pero los machos de una especie de este género (*Ph. duboscqi*), monta a la hembra sin que ocurra copulación y luego la hembra acepta el apareamiento. Además de *lovesongs*, los machos de algunas especies (*Lu. longipalpis*, *Lu. migonei* y *Ph. argentipes*) esperan sobre o cerca del hospedador a las hembras que van a alimentarse y luego las cortejan, un comportamiento conocido como *lekking* (WHO, 2010).

Como se ha mencionado, *Lu. longipalpis* generalmente forma *leks* nocturnos sobre o cerca de los vertebrados hospedadores (Quinnell y Dye, 1994; Kelly y Dye, 1997). Allí los machos adultos producen una feromona terpenoide que tiene una función dual, como feromona sexual (Morton y Ward, 1990; Kelly y Dye, 1997) y para atraer otros machos a los sitios de agregación o *leks* (Quinnell y Dye, 1994; Kelly y Dye, 1997; Spiegel *et al.*, 2005; Bray *et al.*, 2010). La feromona sexual y de agregación es liberada al ambiente por los machos de *Lu. longipalpis* a partir de estructuras cuticulares papulares, localizadas en manchas abdominales pálidas (Figura 4). Estas estructuras corresponden a células glandulares agrupadas debajo de la cutícula, y cada célula glandular está conectada al exterior a través de un pequeño ducto cuticular (Lane y Bernardes Dde, 1990).

Hace ya casi 50 años se observó por primera vez una diferencia morfológica en el número de manchas abdominales en machos de *Lu. longipalpis* provenientes de

diferentes regiones de Brasil (Mangabeira, 1969). Los machos de *Lu. longipalpis* con un solo par de manchas abdominales en el cuarto terguito (1S), están distribuidos ampliamente y en forma discontinua en América Central y del Sur. Los machos que tienen dos pares de manchas abdominales en el tercer y cuarto terguitos abdominales (2S), están más concentrados en las regiones del Noreste de Brasil (Ward *et al.*, 1985) (Figura 4). También se han registrado otro tipo de variaciones en poblaciones de *Lu. longipalpis* de América Central y del Sur, de comportamiento, morfológicas y bioquímicas (Dias *et al.*, 1998; Lampo *et al.*, 1999; Araki *et al.*, 2009), así como la existencia de aislamiento reproductivo entre poblaciones de América Central y del Sur, probablemente mediada por la secreción de diferentes feromonas sexuales (Ward *et al.*, 1988).

Figura 4. Fotografía de las manchas abdominales pálidas ubicadas en tercer y cuarto terguitos de uno de los machos de *Lu. longipalpis* (Jacobina, Brasil) analizado en este tesis.



***Lutzomyia longipalpis* es un complejo de especies.**

La divergencia genética y la especiación no sólo son importantes desde una perspectiva evolutiva, sino que también puede llevar a variaciones en características que son de interés epidemiológico (Lanzaro *et al.*, 1993; Uribe, 1999), ya que pueden resultar en algunas poblaciones con mayor eficiencia vectorial que otras. *Lutzomyia longipalpis* es un complejo de especies (Ward *et al.*, 1988; Lanzaro *et al.*, 1993) que tiene una amplia distribución que se extiende desde México hasta Argentina. Sin embargo, dentro de este rango su distribución es fragmentaria, encontrándose primordialmente en hábitats secos en Centroamérica y el Norte de Sudamérica,

aunque también está asociada a hábitats selváticos en la cuenca del Amazonas (Lainson *et al.*, 1985; Lanzaro *et al.*, 1993; Dujardin *et al.*, 1997). Existe un grado considerable de aislamiento geográfico entre las diferentes poblaciones de *Lu. longipalpis*, que puede deberse a la combinación de su limitado rango de vuelo y a las barreras geográficas y climáticas (Lanzaro *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1998; Munsterman *et al.*, 1998). Pero, además de esos factores, también juegan un rol importante los cantos de apareamiento (de Souza *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2004) y la comunicación química (Hamilton *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 2005) en el aislamiento reproductivo entre las distintas especies hermanas (Bauzer *et al.*, 2007; Maingon *et al.*, 2008; Araki *et al.*, 2009). Debido a que los *lovesongs* son importantes para el comportamiento sexual y el aislamiento reproductivo en muchas especies, los genes que controlan las señales acústicas durante el cortejo son marcadores moleculares interesantes para estudiar el proceso de especiación. Se han identificado varios genes que controlan los cantos de cortejo en *Drosophila melanogaster* (Gleason, 2005) y tres de éstos, *period*, *cacophony* y *paralytic* (este último también asociado con la resistencia a insecticidas), se han usado para estudiar el complejo de especies de *Lu. longipalpis* en Brasil (Bauzer *et al.*, 2002; Bauzer *et al.*, 2002; Bottecchia *et al.*, 2004; Lins *et al.*, 2008) y en Argentina (Salomón *et al.*, 2010).

Los machos de *Lu. longipalpis* producen cuatro tipos de feromonas (Hamilton *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2004), que son liberadas por glándulas secretoras que se encuentran en las manchas abdominales (Lane y Ward, 1984; Spiegel *et al.*, 2002; Hamilton, 2008). No se ha encontrado una correlación entre la morfología de las manchas abdominales y el tipo de feromona producida (Hamilton *et al.*, 2005). Sin embargo, los datos moleculares asociados con el análisis de los cantos de apareamiento y de las feromonas de *Lu. longipalpis* de diferentes regiones de Brasil, sugieren la existencia de dos grupos principales de poblaciones (Araki *et al.*, 2009). El primer grupo representa una única especie, con machos que producen cantos de copulación *Burst-type* y la feromona cembreno-1 (Cemb), mientras que el segundo grupo es más heterogéneo y probablemente representa varias especies hermanas incipientes que producen diferentes combinaciones de cantos *Pulse-type* y de feromonas [9-metilgermacreno-B (Germ) e himacaleno (Hima)]. Esto demuestra un elevado nivel de divergencia y de complejidad en el flujo génico entre poblaciones de *Lu. longipalpis* en Brasil (Araki *et al.*, 2009). Por otro lado, en un estudio donde se analizaron las feromonas y el gen *period* (*per*) de *Lu. longipalpis* de Posadas (Argentina) (Salomón *et al.*, 2010), se vio que esta población producía la misma feromona (Germ) que *Lu. longipalpis* de Paraguay y de muchas poblaciones de Brasil,

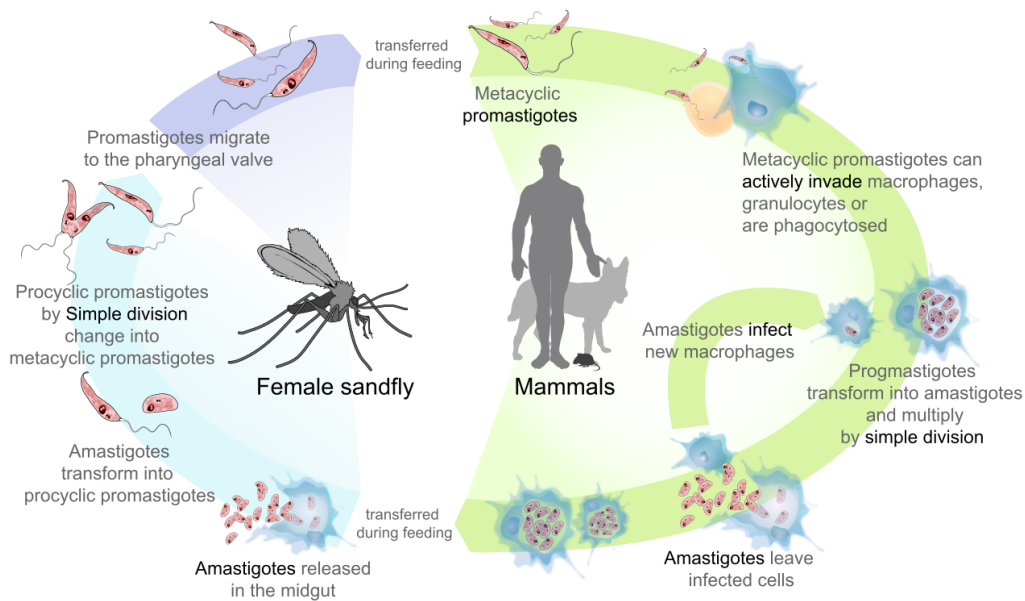
aunque el análisis del gen *per* mostró que la población de Argentina sería una especie hermana diferente de las que se encuentran en el Noreste y Sudeste de Brasil (Araki *et al.* 2009).

3. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

El parásito presenta un ciclo de vida heteroxeno, necesitando para su desarrollo un hospedador vertebrado además del insecto vector. La transmisión de esta enfermedad se produce cuando un flebótomo pica a un animal o humano afectado, el parásito infecta al flebótomo, multiplicándose en el intestino del insecto, y es transmitido a través de una nueva picadura del flebótomo. Por lo tanto, el ciclo biológico de *Leishmania* (Figura 5) podría dividirse en dos grandes etapas, una que se desarrolla en el insecto vector y otra que se desarrolla en los mamíferos. A su vez, el parásito presenta dos estadios principales, uno amastigote y otro promastigote. En el insecto vector el parásito adquiere la forma promastigote, caracterizada por ser alargada, móvil y de fase extracelular, mientras que en los vertebrados el parásito se encuentra en su forma amastigote, ovoide, sin movilidad y de fase intracelular. En los mamíferos se pueden identificar tres etapas:

1. El insecto vector inyecta la forma promastigote en la piel del hospedador, y poco después el parásito es fagocitado por los macrófagos de la piel donde evoluciona a la fase amastigote.
2. Luego los amastigotes se multiplican por fisión binaria hasta su liberación por ruptura de los macrófagos, quedando libres para infectar otros macrófagos. Esta etapa es crónica y puede continuar sin signos ni síntomas notorios durante meses o años, incluso durante todo el tiempo de vida del hospedador, dependiendo de la susceptibilidad del huésped y de su estado inmunológico. Los macrófagos infectados pueden permanecer localizados en la piel, como en el caso de la LC, dando lugar a la formación de úlceras, o puede difundir a otros órganos, como en la LV, o a las mucosas, como en la LMC.
3. Los amastigotes que adquieren los flebótomos a través de la ingesta de sangre, se transforman en promastigotes. Los flebótomos transmiten la infección durante la siguiente ingesta de sangre en la misma u otra especie.

Figura 5. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg: LadyofHats Mariana Ruiz Villarreal)



Desarrollo del parásito en el vector

Las especies de *Leishmania* se clasifican en tres subgéneros, *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) y *Leishmania* (*Sauroleishmania*), en base a qué partes del tracto digestivo del flebótomo colonizan. Los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* son los que se encuentran en humanos (Tabla 1) y, de los tres subgéneros, la biología del desarrollo de *Leishmania* (*Leishmania*) es la que se ha descrito con más detalle (Bates, 2007).

Tabla 1. Especies de *Leishmania* encontradas en humanos (WHO, 2010).

Subgenus	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Old World	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
New World	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifano</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naïffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic	Mucotropic

^a Species status is under discussion

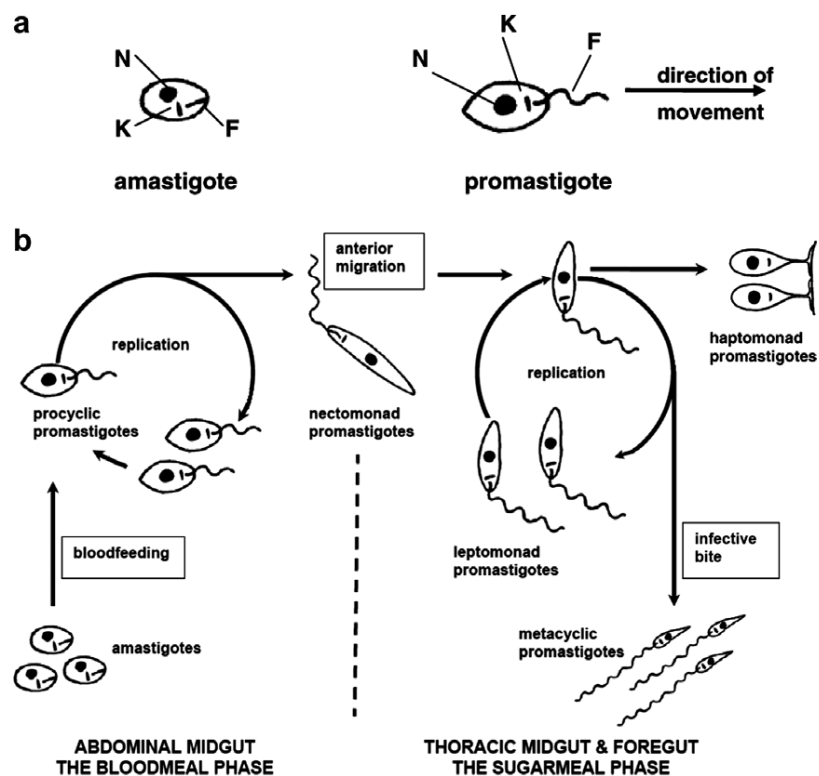
^b Taxonomic position is under discussion

Leishmania (Leishmania)

Como ya se ha mencionado, las hembras de los flebótomos (géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* en el Viejo y Nuevo Mundo, respectivamente) adquieren los parásitos de *Leishmania* cuando se alimentan de la sangre de un hospedador mamífero infectado. La forma amastigote que ingieren los flebótomos se encuentra en la piel, no en la circulación periférica, y los parásitos presentes en los órganos (como hígado y bazo) no están disponibles para el vector. Dado que los amastigotes son parásitos intracelulares que se encuentran en los fagolisosomas de los macrófagos y de otros fagocitos (Handman y Bullen, 2002), su captación por el flebótomo es asistida por la acción cortante de las piezas bucales de las hembras. Los flebótomos son *pool feeders*, es decir que insertan sus piezas bucales tipo sierra en la piel, y las agitan para producir una pequeña herida a la que fluye sangre desde los capilares superficiales (Lane, 1993). Este pequeño daño tisular asociado con la creación de una herida, es el que libera los macrófagos de la piel y/o los amastigotes libres al *pool* de sangre, y permite su posterior captación por el flebótomo. El desarrollo del parásito en el vector se dispara por el cambio en las condiciones en el hospedador mamífero a las del intestino medio del flebótomo (disminución de la temperatura, aumento del pH) (Bates y Rogers, 2004; Kamhawi, 2006). Los amastigotes se transforman en promastigotes móviles con flagelos en el extremo anterior (Figura 6). Esta primer etapa en el vector se denomina promastigote procíclico, una forma replicativa, poco móvil, que se multiplica dentro del bolo de sangre (Figura 6). La membrana peritrófica, una matriz proteica y de quitina secretada por el epitelio del intestino medio, restringe esta fase inicial ya que contiene al bolo de sangre que se está digiriendo (Secundino *et al.*, 2005). Luego de unos pocos días se enlentece la replicación de los parásitos, y éstos comienzan a diferenciarse a promastigotes nectomónados, elongados y fuertemente móviles. Éstas son formas migratorias que se acumulan en el extremo anterior de la membrana peritrófica y salen del bolo de sangre. Este escape se ve facilitado por la acción de una quitinasa secretada por el parásito (Schlein *et al.*, 1991; Shakarian y Dwyer, 2000), y probablemente por la acción de una quitinasa endógena del flebótomo (Ramalho-Ortigao *et al.*, 2005). Los parásitos se mueven hacia la parte anterior del intestino medio (algunos se adhieren a las microvellosidades del epitelio intestinal) hasta que alcanzan la válvula estomodeal (cardia), que se encuentra en la unión entre el intestino medio y el anterior. Estos promastigotes nectomónados marcan la fase de establecimiento de la infección que diferencia a un verdadero vector, ya que persisten luego de la digestión de la sangre y evitan ser expulsados durante la defecación. Una vez que llegan a la válvula estomodeal, los promastigotes nectomónados se

transforman en promastigotes leptomónados, que son formas más cortas que reanudan la replicación (Gossage *et al.*, 2003). Esta forma es la responsable de la secreción del gel secretor promastigote (GSP) (Rogers *et al.*, 2002), que juega un rol vital en la transmisión. Finalmente, algunos leptomónados se diferencian a promastigotas metacíclicos (Rogers *et al.*, 2002), el estado que infecta a los mamíferos. Éstos son depositados en la piel de un nuevo mamífero hospedador cuando el flebótomo toma una nueva ingesta de sangre, causando la transmisión de la enfermedad.

Figura 6. Desarrollo de las especies de *Leishmania* (*Leishmania*) en el flebótomo vector. (a) Morfología de los amastigotes y promastigotes. Cada forma tiene un núcleo (N), quinetooplasto (K) y flagelo (F). En los amastigotes el flagelo es interno y no es funcional; en los promastigotes el flagelo, que se extiende desde el cuerpo celular emergiendo de la porción anterior de la célula, tira al organismo en la dirección indicada. (b) Secuencia del desarrollo de las cinco formas principales de los promastigotes: procíclicos, nectomónados, leptomónados, haptomónados y metacíclicos. No se conoce la posición exacta de los promastigotes haptomónados en la secuencia del desarrollo (Bates, 2007).



Leishmania (*Viannia*)

Debido a que estos parásitos sólo se encuentran en el Nuevo Mundo, los vectores corresponden a especies del género *Lutzomyia*. Las primeras etapas en el

vector son similares a las descritas para el subgénero *Leishmania*, ya que los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos que replican en el bolo de sangre. Pero una característica distintiva de este subgénero es que, luego de esto, la mayoría de los parásitos migran a la región pilórica del intestino posterior (Walters *et al.*, 1989; Nieves y Pimenta, 2000).

Leishmania (Sauroleishmania)

Como el nombre lo sugiere, son las “leishmanias de las lagartijas” y no son patogénicas para los humanos. Mediante estudios filogenéticos basados en secuencias de ADN, se ha demostrado que este subgénero no es un grupo ancestral sino que se ha desarrollado secundariamente a partir de las especies que infectan a los mamíferos (Croan *et al.*, 1997; Noyes *et al.*, 1997; Orlando *et al.*, 2002). Debido a que su desarrollo es hipopilórico, está confinado al intestino posterior (Zhang y Leng, 1997). Los vectores pertenecen al género *Sergentomyia*, que se alimentan de reptiles además de otros vertebrados y que están ampliamente distribuidos en el Viejo Mundo. Dado que en los reptiles hospedadores los parásitos de *Sauroleishmania* se encuentran en la circulación como promastigotes extracelulares, o como amastigotes en eritrocitos o células tipo monocito (Wilson y Southgate, 1979; Paperna *et al.*, 2001), el daño tisular asociado a la ingesta de sangre es innecesario, a diferencia de lo que sucede para los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*.

Especies de flebótomos involucradas en la transmisión de *Leishmania* spp.

La incriminación de una especie como vector de leishmaniasis, se basa en una serie de criterios globalmente aceptados (Killick-Kendrick, 1990; WHO, 2010): (a) el vector se debe alimentar de humanos; (b) para las leishmaniasis zoonóticas, el vector también debe picar al/los hospedador/es reservorio/s; (c) en la naturaleza, el vector debe ser infectado naturalmente con las mismas especies de *Leishmania* que se encuentran en los humanos, y esto debe ser verificado por comparación de los aislados mediante isoenzimas o ADN; (d) el parásito debe poder desarrollarse completamente en el vector luego de que la sangre infectada ha sido digerida; y (e) el vector debe ser capaz de transmitir el parásito a un hospedador susceptible durante la ingesta de sangre.

De las >800 especies de flebótomos que existen, se ha comprobado o sospecha que 98 especies pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* son vectores de las leishmaniasis humanas (Tabla 2). Aún se debe dilucidar el rol de las especies del género *Sergentomyia* en la transmisión de *Leishmania* spp. entre mamíferos

hospedadores (Mukherjee *et al.*, 1997; Senghor *et al.*, 2011). En el Viejo Mundo, los vectores comprobados o probables suman un total de 42 especies, las cuales están implicadas en la transmisión de *Le. infantum* (20 especies), *Le. donovani* (6 especies), *Le. major* (7 especies), *Le. tropica* (7 especies) y *Le. aethiopica* (3 especies). Cada especie parece estar involucrada en la transmisión de un sólo agente de *Leishmania*, excepto *Ph. sergenti* (Gebre-Michael *et al.*, 2004) y probablemente *Ph. alexandri* (Maroli *et al.*, 2013).

Entre las especies de flebótomos del Nuevo Mundo, 56 especies del género *Lutzomyia* están involucradas en la transmisión de 15 especies de *Leishmania*: *Le. infantum* (= *Le. chagasi*), *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, *Le. mexicana*, *Le. amazonensis*, *Le. panamensis*, *Le. peruviana*, *Le. lainsoni*, *Le. shawi*, *Le. naiffi*, *Le. garnhami*, *Le. pifanoi*, *Le. lindenbergi*, *Le. venezuelensis* y *Le. colombiensis*. En contraste con *Phlebotomus* spp., es probable que algunas especies de *Lutzomyia* sean capaces de transmitir más de una especie de *Leishmania* (Maroli *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha encontrado a *Lu. migonei* infectada con cuatro especies diferentes de parásitos. Hay evidencia reciente que incrimina a *Lu. forattinii* y *Lu. migonei* como nuevos potenciales vectores de LV. En el estado de Mato Grosso (Brasil), se encontró a *Lu. forattinii* y a *Lu. cruzi* naturalmente infectadas con parásitos identificados como *Le. infantum* por métodos moleculares (de Pita-Pereira *et al.*, 2008). *Lutzomyia migonei*, recientemente incriminado como posible vector de LV en La Banda (Santiago del Estero) (Salomon *et al.*, 2010), también se ha sugerido como posible vector en Brasil (estado de Pernambuco), dado que *Le. infantum* se detectó en especímenes capturados a campo. Estos registros sugieren que *Lu. migonei* podría ser responsable de transmitir esta enfermedad en áreas donde *Lu. longipalpis*, el vector usual de LV, se encuentra ausente (Carvalho *et al.*, 2010).

Tabla 2. Especies de flebótomos de importancia médica y transmisión de las leishmaniasis (Bates, 2007). Varias especies de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* son responsables de la transmisión de leishmaniasis en el Viejo y Nuevo Mundo, respectivamente (la lista de esta tabla no es exhaustiva). En el Viejo Mundo, una especie de flebótomo generalmente transmite sólo una especie de parásito (ver texto), y cada parásito produce un tipo particular de enfermedad. Los reservorios animales son importantes para mantener el ciclo de vida de muchas especies de *Leishmania*, por lo que la transmisión frecuentemente es zoonótica y rural/selvática. Algunas excepciones importantes son *Le. tropica* y *Le. donovani*, que se transmiten entre seres humanos.

Medically important species of phlebotomine sand fly and transmission of leishmaniasis

Sand fly species	Geographical distribution	Species of <i>Leishmania</i>	Main disease(s) in humans	Transmission	Important mammalian hosts
<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus dubosqi</i> , <i>Phlebotomus salehi</i>	Central and West Asia, North Africa, Sahel of Africa, Central and West Africa	<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	Cutaneous (oriental sore)	Rural zoonotic	Great gerbil (<i>Rhombomys opimus</i>), fat sand rat (<i>Psammomys obesus</i>)
<i>Phlebotomus sergenti</i>	Central and West Asia, North Africa	<i>Leishmania (Leishmania) tropica</i>	Cutaneous (oriental sore)	Urban anthroponotic	Humans, rock hyraxes
<i>Phlebotomus longipex</i> , <i>Phlebotomus pedifer</i>	Ethiopia, Kenya	<i>Leishmania (Leishmania) aethiopia</i>	Cutaneous diffuse cutaneous	Rural zoonotic	Rock hyraxes (<i>Heterohyrax brucei</i> , <i>Procativa</i> spp.)
<i>Phlebotomus argenitipes</i> , <i>Phlebotomus orientalis</i> , <i>Phlebotomus martini</i>	Indian subcontinent, East Africa	<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	Visceral (kala azar)	Epidemic anthroponotic	Humans
<i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>Phlebotomus perniciosus</i>	Mediterranean basin, Central and West Asia	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	Infantile visceral	Zoonotic peridomestic	Domestic dog
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Central and South America	<i>L. (L.) infantum (syn. chugasi)</i>	Infantile visceral	Zoonotic peridomestic	Domestic dog, foxes (<i>Lycalopex vetulus</i> , <i>Cercopcyon thous</i>)
<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Central America	<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	Cutaneous (chiclero's ulcer)	Sylvatic zoonotic	Forest rodents (<i>Oryzomys phyllotis</i> + others)
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	South America	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	Cutaneous	Sylvatic zoonotic	Forest rodents (<i>Proechimys</i> spp. + others)
<i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia complexus</i> , <i>Lutzomyia carretii</i>	Central and South America	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Cutaneous mucocutaneous (espundia)	Sylvatic zoonotic	Forest rodents (<i>Akodon</i> spp., <i>Proechimys</i> spp. + others)
<i>Lutzomyia peruensis</i> , <i>Lutzomyia verrucarum</i>	Peru	<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	Cutaneous (uta)	Upland zoonotic	Reservoir unknown, dog?
<i>Lutzomyia umbratilis</i>	South America	<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	Cutaneous, often metastatic (pian-bois)	Sylvatic zoonotic	Sloth (<i>Choloepus didactylus</i>), anteater (<i>Tamandua tetradactyla</i>)
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	Central America	<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	Cutaneous	Sylvatic zoonotic	Sloth (<i>Choloepus hoffmanni</i>)

Rol de los flebótomos en la patogénesis de las leishmaniasis

Además de actuar como vectores en el ciclo de vida de *Leishmania* spp., los flebótomos también podrían estar directamente involucrados en la patogénesis de esta enfermedad. Cuando la hembra lacera la piel del hospedador para alimentarse, el contenido de sus glándulas salivales es inyectado al *pool* hemorrágico. La saliva del flebótomo contiene una variedad de agentes farmacológicos, incluyendo anticoagulantes, vasodilatadores, agentes anti-plaqueta, y moléculas inmunomodulatorias y antiinflamatorias (Andrade *et al.*, 2007). Por otro lado y probablemente como resultado de mecanismos coevolutivos, las modificaciones hemostáticas e inmunes en el sitio de alimentación juegan un rol en la transmisión de *Leishmania* spp., ya que afectan el establecimiento del parásito (Rohousova y Volf, 2006).

Cuando los hospedadores humanos y caninos son expuestos repetidamente a las picaduras de flebótomos no infectados, desarrollan anticuerpos específicos (IgG) contra las proteínas salivales (Gomes *et al.*, 2002; Rohousova *et al.*, 2005; Hostomska *et al.*, 2008). Los hospedadores picados también desarrollan respuestas celulares fuertes contra los componentes salivales. Las respuestas naturales del tipo DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*) en humanos son bien conocidas luego de ser picados en sucesivas ocasiones por *Ph. papatasi* (Maroli *et al.*, 2013).

Por otro lado, si la piel de un hospedador susceptible es inyectada con una cantidad relativamente pequeña de promastigotas cultivados, éste generalmente no desarrolla la enfermedad. Sin embargo, si el mismo número de parásitos es transmitido por un flebótomo, se establece una infección (Maroli *et al.*, 2013). Se han identificado diferentes componentes que promueven la infección, en el gel secretor del promastigote (matriz formada en el intestino anterior del insecto que contiene metacíclicos) (Rogers *et al.*, 2004) y en la saliva del vector. En varios modelos experimentales (murinos y caninos), la co-inyección de *Leishmania* spp. con saliva del vector incrementó la probabilidad de una infección exitosa, y resultó en lesiones de LC más grandes y en una mayor carga parásita en los tejidos relevantes en todos los modelos estudiados (Rohousova y Volf, 2006).

Sin embargo y aunque parece paradójico, en algunos modelos experimentales la inmunidad provocada por la saliva del flebótomo parece proteger contra la infección por *Leishmania* spp. (Kamhawi, 2000). Cuando se trataron ratones con lisados/sonicados de glándulas salivales, proteínas salivales purificadas, o picaduras de *Ph. papatasi* o *Lu. longipalpis* no infectados, y luego se los expuso a *Le. major* o *Le. amazonensis*, se redujo la severidad de la LC. De manera análoga, el ADN de

plásmidos que codificaban para proteínas salivales de *Lu. longipalpis* impidió que hamsters expuestos a *Le. infantum* desarrollaran LV (Gomes *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren que la vacunación contra antígenos del vector podría ser un método novedoso para controlar la leishmaniasis. Sin embargo, dadas la gran diversidad de las asociaciones naturales vector-parásito, y el hecho de que las diferentes especies de flebótomos difieren en los antígenos salivales [y que estas diferencias pueden estar presentes dentro de una misma especie, como se demostró recientemente en tres especies de *Phlebotomus* (Rohousova *et al.*, 2012)], los efectos de protección también podrían ser altamente específicos, reduciendo la probabilidad de desarrollar vacunas de aplicación mundial. Más aún, en un experimento donde se expuso a ratones a las picaduras de *Ph. duboscqi* por períodos de tiempo largos y cortos, y luego se los infectó con *Le. major* inmediatamente después de ser picados o luego de un período libre de picaduras, se demostró que la protección contra leishmaniasis estaba limitada a los ratones que habían sido expuestos por períodos cortos de tiempo a las picaduras de *Ph. duboscqi* y que habían sido infectados inmediatamente después con *Le. major* (Rohousova *et al.*, 2011). Esto explica la persistencia de las infecciones severas por *Leishmania* spp. en áreas endémicas, en donde los individuos son expuestos repetidamente a picaduras y/o la actividad de los flebótomos es estacional.

4. Dispersión actual de las leishmaniasis

Cada especie de parásito circula en un foco natural de infección en el que coexisten los vectores flebótomos y los mamíferos susceptibles. Las entidades nosogeográficas de las leishmaniasis se pueden clasificar en dos grupos epidemiológicos principales: las zoonóticas (que representan la gran mayoría de estas entidades) y las antroponóticas. Tradicionalmente, las entidades nosogeográficas del Viejo y Nuevo Mundo se han considerado separadamente porque los parásitos (con la excepción de *Le. infantum*), vectores y ecosistemas involucrados, son distintos. Sin embargo, los factores de riesgo para las leishmaniasis humanas son los mismos a nivel mundial, e incluyen a la pobreza, las viviendas insalubres y condiciones sanitarias deficientes, los conflictos, la migración humana, la deforestación y la urbanización.

Leishmaniasis del Viejo Mundo

Actualmente se reportan casos autóctonos de leishmaniasis humana en 80 países. Sin embargo, a pesar de la naturaleza endémica de la enfermedad en estos

países, las especies de *Leishmania* involucradas no se han determinado en 9 de estos países, y las especies vectores (comprobadas o sospechadas) no se han identificado en 16 países.

Leishmaniasis Zoonótica

Hay 3 especies reconocidas de *Leishmania* del Viejo Mundo que tienen un ciclo zoonótico: *Le. infantum*, *Le. major* y *Le. aethiopica* (Tabla 2). La LV zoonótica causada por *Le. infantum* se extiende en países de la cuenca mediterránea y de Asia central. La LC causada por este mismo parásito también se encuentra en este rango endémico donde generalmente es esporádica, aunque en algunos focos puede mostrar patrones hiperendémicos (Corradetti, 1952; Svobodova *et al.*, 2009). Hay varias especies de vectores involucradas, la mayoría de las cuales pertenecen al subgénero *Phlebotomus* (*Larrousius*). Los perros son los principales reservorios domésticos, y los zorros, chacales y lobos representan los reservorios selváticos (Maroli *et al.*, 2013).

La LC zoonótica clásica es causada por *Le. major*, un parásito ampliamente distribuido en zonas áridas y tipo savannah en las que los roedores actúan como reservorios. Los vectores comprobados pertenecen al subgénero *Phlebotomus* (*Phlebotomus*), y *Ph. papatasi* es el principal vector en un amplio rango geográfico, que se extiende desde el Norte de África hasta India (Tabla 2) (Maroli *et al.*, 2013).

El tercer agente zoonótico de LC, *Le. aethiopica*, está limitado a las zonas altas de Etiopía y Kenya. Los reservorios típicamente son los damanes (mamíferos como por ej. *Procavia capensis*), y es transmitido por las especies *Ph. (Larrousius) longipes* y *Ph. (Larrousius) pedifer* (Tabla 2) (Maroli *et al.*, 2013).

Leishmaniasis Antroponótica

Hay dos especies, *Le. donovani* y *Le. tropica*, que tienen patrones de transmisión exclusiva o predominantemente antroponóticos, y que resultan en varios miles de casos humanos.

En el continente asiático, la LV antroponótica causada por *Le. donovani* está restringida al noreste de India, Bangladesh y Nepal, donde *Ph. argentipes* es el único vector. En África oriental (Kenya, Etiopía, Somalia, Sudan y Uganda) y en la península arábiga, la distribución de *Le. donovani* está asociada a la de *Ph. orientalis* y/o *Ph. martini* (Tabla 2) (Maroli *et al.*, 2013).

La LC antroponótica causada por *Le. tropica* es altamente prevalente en regiones semi-áridas subtropicales, que se extienden desde el sureste de Turquía al noroeste de India. En los focos bien establecidos, la LC es transmitida de persona a

persona a través de *Ph. (Paraphlebotomus) sergenti* en los ámbitos urbanos (Tabla 2). Las migraciones urbanas a gran escala influyen los patrones de transmisión de *Le. tropica*, y las infecciones pueden ocurrir en brotes que pueden durar varios años. Adicionalmente, también se encuentran focos pequeños y discontinuos en el norte de África, Israel, Grecia, Arabia Saudita, Kenya y Etiopía (Hailu *et al.*, 2006), donde *Le. tropica* puede ser transmitida por otras especies de flebótomos (Maroli *et al.*, 2013).

Las causas de dispersión de las leishmaniasis del Viejo Mundo son diversas, aunque mayormente están asociadas con factores humanos sociales, de comportamiento e individuales, incluyendo migraciones masivas, conflictos, cambios ambientales antrópicos y condiciones inmunosupresivas. Por ello, la contribución de la dinámica de los flebótomos a la dispersión de la enfermedad puede variar grandemente. Por ejemplo, la epidemia de HIV y el uso incrementado de terapias inmunosupresivas, ha contribuido sustancialmente al aumento en los casos de LV desde el sur de Europa a India (Alvar *et al.*, 2008). En estos eventos, los cambios en las poblaciones de flebótomos no tendrían un rol específico. También es muy factible que los cambios climáticos afecten la densidad y dispersión de las especies de flebótomos del Viejo Mundo en forma directa (Fischer *et al.*, 2011) y, por ende, serían una causa principal en la dispersión de la leishmaniasis en determinados escenarios.

Leishmaniasis del Nuevo Mundo

Actualmente se reportan casos autóctonos de leishmaniasis humana en 21 países del continente Americano. República Dominicana, donde la LCD es endémica, es el único país donde no se han identificado de manera concluyente las especies de *Leishmania* y del/los vector/es flebótomo/s involucrados (WHO, 2010). Todas las formas clínicas de la leishmaniasis en el Nuevo Mundo, resultan de una transmisión zoonótica a partir de reservorios hospedadores domésticos o selváticos. La distribución geográfica de esta enfermedad abarca un área que se extiende desde los EEUU de Norteamérica (Texas) hasta Argentina.

Leishmaniasis Cutánea

Previo a 1960, la LC estaba restringida mayormente a áreas selváticas o boscosas, por lo que se conocía comúnmente como “úlceras de los chicleros” en Méjico y “úlceras de las guerrillas” en Venezuela y Colombia. De ahí que la caza, la tala y las actividades mineras han estado asociadas históricamente con esta enfermedad. A partir de 1960 la transmisión se extendió a áreas peridomésticas. La migración masiva desde los altiplanos a las áreas tropicales bajas de la región de los Andes, la

deforestación intensiva y el establecimiento de nuevos asentamientos, han contribuido grandemente al incremento en el número de casos (Desjeux, 2001; Aagaard-Hansen *et al.*, 2010). La deforestación y el reemplazo de los bosques primarios por monocultivos (por ej., plantaciones de café), han sido cruciales en el establecimiento de algunos vectores de *Lutzomyia* en Venezuela y Colombia (Scorza, 1985; Alexander, 1995). Se había predicho que la deforestación iba a reducir el contacto humano con los reservorios salvajes y los flebótomos, creyendo que esto llevaría a una erradicación local de especies importantes de *Leishmania*. Por el contrario, la invasión humana de hábitats salvajes resultó en la intromisión de especies de *Lutzomyia* en ambientes domésticos, cambiando radicalmente el perfil epidemiológico. Algunos ejemplos de esto incluyen a *Lu. nuneztovari anglesi* en Bolivia, *Lu. verrucarum* y *Lu. peruensis* en Perú, y *Lu. ovallesi* y *Lu. gomezi* en Venezuela (Gomez *et al.*, 1998; Campbell-Lendrum *et al.*, 2001). En Brasil, las modificaciones ambientales en el estado de São Paulo a principios del siglo XX, permitieron que *Lu. intermedia* jugara un rol preponderante en la transmisión de *Le. braziliensis* (Tolezano, 1994). De manera similar, en el estado de Tocantins, donde la leishmaniasis es endémica, *Lu. whitmani* se propagó a áreas muy degradadas por la deforestación, migración y asentamientos no planificados (Vilela *et al.*, 2011). En Argentina, se encontró que la abundancia de *Lu. whitmani* en el área de las Cataratas del Iguazú estaba asociada con las actividades económicas y de ocio que se desarrollan en los bosques primarios y secundarios, y que han causado marcados cambios ambientales (Salomon *et al.*, 2009). Por otro lado, se vió que las modificaciones ambientales moderadas impactan la distribución de *Lu. neivai* en Salta, donde la LC es hiperendémica (Quintana *et al.*, 2010).

Por último, la urbanización también ha contribuido grandemente a la emergencia e incremento de la LC en el Nuevo Mundo. Esta enfermedad se ha estado extendiendo a ciudades en Brasil (Carvalho *et al.*, 2010), México (Sanchez-Garcia *et al.*, 2010), Venezuela (Bonfante-Garrido *et al.*, 1984; Scorza y Rojas, 1990), Colombia (Sandoval *et al.*, 1998; Bejarano *et al.*, 2002; Cortes y Fernandez, 2008), Bolivia (Garcia *et al.*, 2009) y Argentina (Salomón *et al.*, 2008).

Leishmaniasis Visceral

La LV es endémica en 12 países del Nuevo Mundo. En EEUU de Norteamérica, *Le. infantum* se ha aislado de perros pero no se han confirmado casos humanos autóctonos (WHO, 2010). En el pasado, la LV se consideraba una enfermedad rural causada por *Le. chagasi* en áreas tropicales semi-áridas, en las que *Lu. longipalpis* se

reconocía como el único vector. Sin embargo, un análisis molecular reciente de poblaciones de parásitos que abarcó todo el continente, confirmó la hipótesis de que *Le. infantum* es el agente de LV en el Nuevo Mundo (Kuhls *et al.*, 2011). Este estudio le ha dado validez a la teoría de que el parásito fue importado a América a través de perros infectados traídos por colonizadores ibéricos.

Lutzomyia longipalpis fue descrita por primera vez en Brasil en 1912 por Lutz y Neiva (Lainson y Rangel, 2005). Como ya se ha mencionado, actualmente se acepta que *Lu. longipalpis* no es una única especie, sino un complejo de un número aún no definido de especies hermanas, tal como se ha evidenciado por diversos estudios, incluyendo experimentos de cría (Lanzaro *et al.*, 1993), análisis de alozimas (Lampo *et al.*, 1999), quimiotipos de feromonas sexuales masculinas (Hamilton *et al.*, 2005) y ADN mitocondrial (Arrivillaga *et al.*, 2002). Hasta ahora, *Lu. pseudolongipalpis* (de Venezuela) es la única nueva especie del complejo de especies de *Lu. longipalpis* que se ha descrito formalmente (Arrivillaga y Feliciangeli, 2001). Un clado hermano de *Lu. longipalpis*, bien diferenciado genéticamente, predomina en áreas hiperendémicas de LV en el norte y noreste de Brasil (Watts *et al.*, 2005).

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los casos de LV del Nuevo Mundo ocurren en Brasil. Durante las décadas de los 1990 y 2000 hubo una epidemia en la que se reportaban anualmente 3000-4000 casos. Esto se atribuyó a procesos de urbanización en los estados de Piauí, Maranhão, Bahia, Ceará, Pará, Rio Grande do Norte y Roraima, que causaron una proliferación desordenada de barrios pobres en los que había hacinamiento y condiciones sanitarias deficientes. La presencia de *Lu. longipalpis* en estas áreas llevó a la aparición y establecimiento de ciclos domésticos y peridomésticos de la enfermedad (Costa, 2008; Maia-Elkhoury *et al.*, 2008; Rangel y Vilela, 2008). Aunque de manera menos masiva, también se ha descrito LV urbana en otros países, incluyendo Venezuela (Aguilar *et al.*, 1998; Zerpa *et al.*, 2002), Paraguay (Canese, 2000) y Argentina (Salomón *et al.*, 2008).

Situación de la LV en Argentina

La reciente expansión geográfica de LV en Sudamérica se evidenció con la primera aparición de un foco de LV humano en Argentina en 2006, en la frontera con Brasil y Paraguay.

Entre 1925 y 1989, en Argentina se reportaron 14 casos humanos de leishmaniasis pero ninguno fue atribuido a *Le. infantum* y, adicionalmente, sólo hubo 2 registros aislados de *Lu. longipalpis* sin reporte de LV (en 1951 y 2000) (Salomón *et al.*, 2001). Sin embargo, el riesgo de transmisión cambió cuando Paraguay notificó un

caso humano autóctono durante el año 2000 en Asunción, ciudad fronteriza con Clorinda (Formosa). Desde el año 2000 al 2006, el Programa de Leishmaniasis de Paraguay registró 126 casos de LV humana, 90.1% provenientes de Asunción y del Departamento Central, aunque ninguno provino de la frontera oriental con Misiones. Paraguay también notificó una elevada proporción de LV canina en los mismos departamentos que registraban LV humana, y confirmó la presencia de *Le. infantum* y de su vector, *Lu. longipalpis* (Salomón *et al.*, 2008). Este vector se registró por primera vez en el año 2004 en la ciudad de Clorinda (Formosa), asociado al foco de Asunción (Salomón y Orellano, 2005). El primer caso autóctono de LV humana en Argentina se notificó en el año 2006 en la ciudad de Posadas (Misiones), con presencia de *Lu. longipalpis* y de LV canina (Salomón *et al.*, 2008).

Desde el 2006 hasta el 2012 se confirmaron 103 casos de LV (Figura 7) (Gould *et al.*, 2013), de los cuales 7 fallecieron (Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud de la Nación Argentina), y la mayor cantidad de casos del país (44 casos) se registró en la ciudad de Posadas (Misiones). A partir de diciembre del 2009, se registraron 6 casos en Santo Tomé (Corrientes), con dos fallecidos, lo que generó un estudio intensivo del vector en nuestro país (Salomón *et al.*, 2011). Por otro lado, un estudio de la casuística de LV en Argentina indicó que el grupo de mayor riesgo era el de niños de 0 a 15 años de edad (46%) (Figura 8) (Gould *et al.*, 2013).

Figura 7. Número de casos de LV humana en Argentina, notificados por año en el período mayo de 2006 a julio de 2012 (Gould *et al.*, 2013).

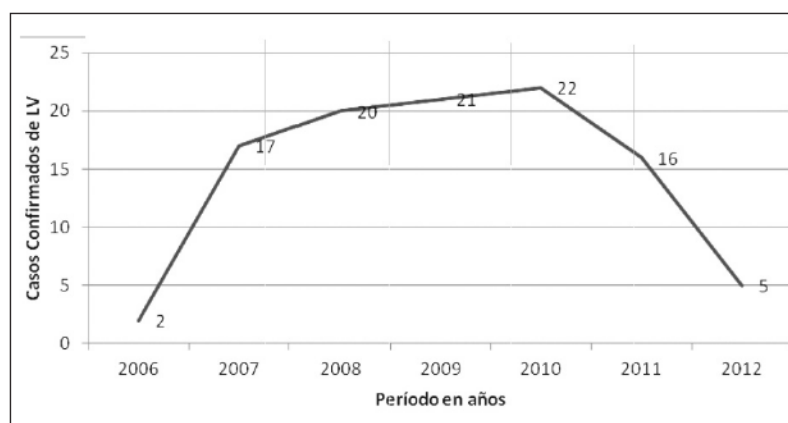
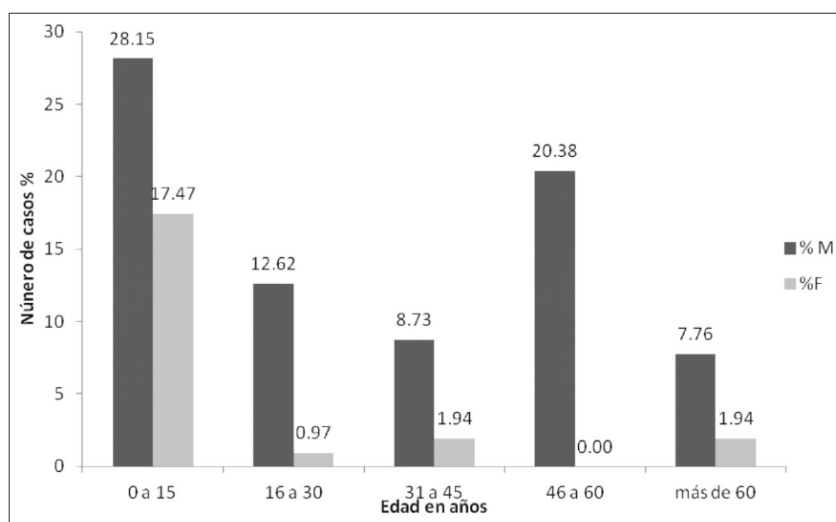


Figura 8. Número de casos acumulados de LV humana en Argentina, expresados en porcentajes (%), agrupados por edad y sexo. Masculinos (%M), Femeninos (%F). Mayo de 2006 a julio de 2012 (Gould *et al.*, 2013).



Actualmente se sabe que el insecto vector mantiene una distribución heterogénea, presentando zonas de alta y baja abundancia en áreas urbanas, que dependen de varios factores (Santini *et al.*, 2012). Se vió que los ambientes peridomésticos con baja abundancia de *Lu. longipalpis* están asociados a suelos y/o superficies expuestas a la luz solar y sin sombra y, por lo tanto, con baja humedad. Lo contrario ocurre en zonas con vegetación densa y diversa que provee sombra y, por ende, suelo húmedo y una fuente de hidratos de carbono para el vector (Santini *et al.*, 2012).

La transmisión de LV humana y canina hasta el momento se ha registrado en Misiones y Corrientes, mientras que en Santiago del Estero hubo casos de LV humana y en Formosa sólo LV canina. Sin embargo, el vector se encuentra en dispersión activa, actualmente comprobada hasta el sur de la provincia de Corrientes (Salomón *et al.*, 2009; Gould *et al.*, 2013).

SECCIÓN 1B

1. Control de las *Leishmaniasis*

La transmisión de las leishmaniasis ocurre en un sistema biológico complejo que involucra al hospedador humano, al parásito, al flebótomo vector y, en algunas situaciones, un reservorio animal. Por lo tanto, es poco probable que se logre controlar con una única intervención. Se deben combinar las estrategias para el manejo de casos (diagnóstico, tratamiento, vacunas y detección), para el control integrado del vector y, si es relevante, para el control del reservorio animal, y todo esto debe adaptarse a cada contexto (WHO, 2010).

Diagnóstico:

Debería desarrollarse una política de diagnóstico acorde con el servicio de salud existente, ya que las técnicas de laboratorio dependen en gran medida del nivel que presenta el Sistema de Salud (Tabla 3) (WHO, 2010).

Tabla 3. Plataforma mínima de técnicas diagnósticas para LV en áreas altamente endémicas en función del nivel del Sistema de Salud (WHO, 2010).

Nivel asistencial	Pruebas diagnósticas
Atención primaria	Inmunocromatografía basada en el antígeno rK39
Hospital distrital	Inmunocromatografía basada en el antígeno rK39, aglutinación directa ^a Microscopía del aspirado medular, esplénico o ganglionar ^b
Hospital terciario (de referencia)	Serología: inmunocromatografía basada en el antígeno rK39, aglutinación directa, otras pruebas serológicas (por ejemplo, IFI o ELISA) Microscopía de muestras de la capa leucocitaria, bazo, médula ósea o ganglios linfáticos Cultivo o PCR

^a La prueba de aglutinación directa solo debería utilizarse cuando se disponga de una supervisión y una garantía de la calidad adecuadas a nivel distrital.

^b El aspirado esplénico solo debería ser realizado por personal médico con experiencia, y en centros que dispongan de medios para hacer frente a las complicaciones hemorrágicas.

Tratamiento y vacunas:

Sólo se debe tratar al paciente luego de que se ha confirmado la enfermedad y, al mismo tiempo, se debe determinar la extensión de la infección, ya que esto puede influir en la elección de la terapia o del tratamiento de apoyo. En algunas regiones, el diagnóstico debe ser a nivel de especie (por ejemplo, para la LC en el Nuevo Mundo). En muchos casos el tratamiento de apoyo (por ejemplo, rehidratación o suplementos nutricionales) es necesario antes de iniciar la terapia (WHO, 2010).

Detección:

La detección de los casos puede ser pasiva o activa. La detección pasiva ocurre cuando los pacientes enfermos asisten a centros de salud primaria buscando atención debido a su enfermedad. La mayoría de los países endémicos para LV y LC se basan en la "vigilancia pasiva" para informar su carga de morbilidad. Sin embargo, estos informes sólo captan una fracción de la verdadera carga, debido a que es limitado el acceso a la atención de esta enfermedad desatendida, y porque los casos atendidos por el sector privado generalmente no se incluyen en los datos de vigilancia (WHO, 2010).

En la detección activa el personal de salud sale a la comunidad y realiza búsquedas sistemáticas para encontrar casos de leishmaniasis. Éste es un componente esencial en la estrategia utilizada en el subcontinente Indio para la eliminación de la LV. La detección activa debería reducir la transmisión de esta enfermedad ya que acorta el período de contagio de los pacientes. Además, el diagnóstico y tratamiento tempranos ofrecen un beneficio clínico (WHO, 2010).

Control de los reservorios hospedadores:

El control de los reservorios hospedadores se ha recomendado como un componente para las estrategias de control de LV y LC zoonóticas. Para el control de la leishmaniasis antroponótica, es fundamental que se desarrollen estrategias eficaces para la detección de casos, para el diagnóstico y para el tratamiento adecuado de los pacientes que presentan formas clínicas. En cada situación, las acciones a tomar van a depender de las condiciones locales y de los recursos y conocimientos disponibles (WHO, 2010).

En el caso de la LV los perros domésticos son los principales reservorios, y los programas de control en Brasil se centran en la eliminación masiva de los perros seropositivos y en la fumigación con insecticidas de acción residual (Courtenay *et al.*, 2002). Sin embargo, los registros nacionales de salud de Brasil mostraron que el sacrificio generalizado (la eliminación de 176.000 perros seropositivos durante 1990-1997) no se asoció con una reducción en el número de casos humanos (Vieira y Coelho, 1998). Por otro lado, la teoría muestra que el sacrificio de perros es relativamente ineficaz como método de control ya que, para lograr una marcada reducción en la transmisión de las enfermedades, se debe sacrificar una alta proporción de perros (Dye, 1996). En los programas actuales se sacrifican todos los perros infectados, en lugar de eliminar sólo a los que son contagiosos. En este sentido, si una proporción de los perros infectados nunca se vuelve contagioso su

eliminación podría ser contraproducente, ya que podrían ser sustituidos por perros susceptibles que sí se volverían contagiosos. Por último, aunque ni los humanos ni los zorros asintomáticos (*Cerdocyon thous*) parecen ser importantes para la transmisión, es posible que otros hospedadores como las zarigüeyas (*Didelphis spp.*) tengan un rol en la epidemiología (Travi *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2000; Courtenay *et al.*, 2002).

Control de los vectores:

Consideraciones generales

El objetivo de un programa de control de vectores consiste en reducir o interrumpir la transmisión de la enfermedad. En este sentido, el control de los flebótomos vectores es una estrategia eficaz para reducir las leishmaniasis humanas, especialmente en los hábitats domésticos y peridomésticos de transmisión. Hay varios métodos de control disponibles, incluyendo los productos químicos, la gestión ambiental y la protección personal. Aunque algunos métodos aplicados de manera individual pueden tener un fuerte impacto sobre las poblaciones de flebótomos, es recomendable utilizar un enfoque integrado que incluya más de un método. Asimismo, se debe tener una comprensión adecuada de la epidemiología local de la leishmaniasis (incluyendo si la transmisión es antroponótica o zoonótica), y un conocimiento detallado de los vectores involucrados, de sus hábitats (peridomésticos o silvestres), autonomía de vuelo, preferencias alimenticias en cuanto a hospedadores, sitios de descanso, ritmos circadianos y estacionalidad (WHO, 2010).

La planificación del manejo integrado de los vectores requiere una evaluación inicial de la ecología de la zona, la formulación de objetivos operativos, la elección de métodos adecuados, y un sistema de monitoreo y evaluación. Por otra parte, se deben tomar decisiones racionales para realizar un uso óptimo de los recursos, y para desarrollar planes institucionales adecuados que incluyan un marco regulatorio razonable. La aplicación de una gestión integrada requiere que la toma de decisiones y los procedimientos de garantía de calidad puedan ser aplicados al nivel administrativo más bajo del sistema de salud. Por otro lado, para que el manejo integrado sea exitoso, es fundamental que la comunidad acepte las medidas de control y que haya una adecuada relación costo-eficacia (WHO, 2010).

Métodos

El enfoque a utilizarse para el control de los flebótomos depende del comportamiento del vector, que puede ser fuertemente endofílico (preferencia por los hábitats humanos, especialmente adentro de las viviendas), peridoméstico o selvático.

Control Químico

Los principales métodos para el control de flebótomos con insecticidas incluyen la fumigación de interiores, de los sitios de reposo para las especies selváticas, el uso de materiales impregnados con insecticida (tales como mosquiteros y cortinas), y collares para perros impregnados con piretroides. Deben considerarse varios factores al seleccionar el insecticida para la fumigación de interiores o para la impregnación de mosquiteros: la seguridad para los seres humanos y el medio, su eficacia (incluida la duración), la relación costo-eficacia, su aceptación, la disponibilidad de productos de buena calidad, y la capacidad y recursos para una aplicación segura y efectiva, y para la eliminación de residuos.

La fumigación de interiores es uno de los principales métodos para controlar a los flebótomos endofílicos, y debería aplicarse en aquellas localidades que tienen una transmisión activa (fumigación focal). Su nivel de eficacia depende de la clase de insecticida utilizado, la susceptibilidad de los flebótomos al insecticida, el tipo de superficie que se va a tratar, la dosis, el método de aplicación, y el nivel de cobertura. Cuando las especies involucradas son exofílicas o peridomésticas, se deben fumigar las superficies exteriores de los refugios animales y las estructuras próximas (potenciales sitios de descanso de los flebótomos) (WHO, 2010).

La fumigación tipo barrera también es una alternativa, e involucra el tratamiento de los troncos de árboles y de la vegetación, dentro de un radio predeterminado de las viviendas humanas. Los problemas para su aplicación incluyen las dificultades para lograr una cobertura adecuada con los insecticidas, la persistencia reducida de los químicos, y el peligro para los organismos no blanco (Alexander y Maroli, 2003).

En aquellas áreas abiertas donde se conocen los sitios de reposo o apareamiento de los flebótomos, el tratamiento con insecticidas de estos microhábitats o su destrucción, representan alternativas más dirigidas de control (Alexander y Maroli, 2003). Sin embargo, se vio que la fumigación de los sitios de agregación cercanos a casos humanos notificados, no resultó eficiente para reducir la prevalencia de la enfermedad (Amora *et al.*, 2009) (ver más adelante, “Otras alternativas para el control de flebótomos”).

Se han usado muchas clases de insecticidas para la fumigación de interiores, incluyendo los organoclorados (por ej., DDT), organofosforados (por ej., malatión), carbamatos (por ej., propoxur) y piretroides sintéticos (por ej., deltametrina y λ -cihalotrina). Sin embargo, no se conoce bien la susceptibilidad de los flebótomos a los insecticidas que se han utilizado en los programas de control. Se ha identificado resistencia a los insecticidas organoclorados (por ejemplo, la resistencia de *Ph.*

papatasi y *Ph. argentipes* al DDT en India), y pueden haber desarrollado resistencia al malatión y a los piretroides en las zonas donde se han utilizado durante mucho tiempo (WHO, 2010). Para evitar la aparición de resistencia, los insecticidas deben ser rotados a intervalos apropiados. Todos los programas de control deben incluir estudios de susceptibilidad previo a la selección de insecticidas, y la resistencia debería ser monitoreada en sitios centinela durante el desarrollo del programa (WHO, 2010).

Los mosquiteros tratados con insecticida son un método de control eficaz, relativamente barato y sostenible en el tiempo. Este método incluye mosquiteros que son impregnados regularmente, y mosquiteros de larga duración, en los que el insecticida se incorpora a la fibra o se aplica como revestimiento y cuya eficacia dura 2-3 años. En Afganistán y Siria se realizaron ensayos con mosquiteros tratados con insecticida, y se vio que protegían eficazmente contra la LC. Otros estudios sugirieron que tenían un efecto protector contra la LV (en Bangladesh, Nepal y Sudán), y que reducían la densidad del vector en zonas endémicas de LV. Por otro lado, la eficacia de los mosquiteros de larga duración para reducir los efectos clínicos de la LV (infección, enfermedad) está siendo evaluada en varios países (WHO, 2010).

La aceptación y el comportamiento humano durante las horas de descanso son fundamentales para la eficacia de este método. A menudo se argumenta que los mosquiteros son incómodos cuando hace calor porque impiden una buena ventilación. Pero esta idea se deriva de la falsa concepción de que las redes deben ser de malla pequeña para lograr una protección contra los flebótomos. En este sentido, hay estudios de campo que muestran que los mosquiteros con una malla de tamaño normal tratados con insecticida son eficaces, y varios estudios han demostrado una buena aceptación en zonas endémicas, dado que las redes confieren privacidad y también protegen contra otros insectos. En estudios realizados en Burkina Faso, Italia, Sudán y América Latina, se vio que al tapar las ventanas con materiales tratados con insecticida o con cortinas impregnadas, se redujo significativamente el número de flebótomos que ingresaban a las casas. Otro método para el control de la LV y LC zoonóticas, es el uso de collares impregnados con piretroides para perros. En un ensayo en Irán, se vio que este método redujo la incidencia de LV en niños. En los perros los insecticidas piretroides también pueden aplicarse a través de shampoos, *spot ons*² y lociones, y estos métodos están siendo evaluados (WHO, 2010).

² Vía tópica a través de pipetas caninas.

Gestión ambiental

El principio de la gestión ambiental consiste en generar condiciones desfavorables para el ciclo de vida del vector (Kishore *et al.*, 2006). Por ello, la gestión ambiental debería apuntar a los refugios de los animales domésticos cercanos a las viviendas humanas, y a condiciones sanitarias deficientes en el peridomicilio y en las zonas boscosas aledañas (Teodoro *et al.*, 2001). Estas áreas están asociadas a suelos húmedos y materia orgánica acumulada, que favorecen los sitios de cría y, por ende, la concentración de vectores en los entornos peridomiciliarios (Casanova, 2001). Algunos ejemplos de gestión ambiental incluyen la reubicación de asentamientos humanos a sitios alejados de los hábitats de los flebotomos, o una modificación física de los hábitats. Las medidas deben ir precedidas por estudios cuidadosos de la ecología local y del impacto ambiental. También se recomienda que las personas que visitan o viven en focos altamente endémicos utilicen medidas de protección personal para evitar las picaduras de los flebotomos, incluyendo el uso de repelentes y evitar los momentos y lugares de mayor actividad de los flebotomos (WHO, 2010). Sin embargo, pocos estudios han analizado el efecto de la gestión ambiental sobre los flebotomos, especialmente en relación a la salud pública (Amora *et al.*, 2009).

Otras alternativas para el control de flebotomos

El uso indiscriminado de insecticidas no sólo genera resistencia en los insectos, sino que también altera las cadenas alimentarias afectando a especies no blanco. Estos factores, asociados con las muchas enfermedades que son transmitidas por dípteros, impulsan el desarrollo de nuevas estrategias de control. Los bioinsecticidas generalmente son más específicos, su toxicidad para animales no blanco es baja o inexistente, y son ambientalmente más amigables (Hynes y Boyetchko, 2006). A continuación se mencionan algunas alternativas que se han estudiado en flebotomos.

Las larvas de flebotomos en el laboratorio son susceptibles a *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Bti) (De Barjac *et al.*, 1981). Sin embargo, los sitios de cría se descartan como blanco para el control de estos vectores, debido a la dificultad para encontrar el estado larval en la naturaleza (Deane, 1956; Kishore *et al.*, 2006). Se ha sugerido que Bti podría utilizarse contra el estado adulto, incorporándolo en cebos de azúcar que luego sean pulverizados sobre diferentes sustratos en ambientes abiertos (Yuval y Warburg, 1989). *Bacillus sphaericus* también causó mortalidad en larvas de *Ph. papatasi*, y una reducción en la fecundidad de las hembras emergidas a partir de las pupas sobrevivientes (Wahba, 2000).

Los flebótomos del Viejo y Nuevo Mundo son parasitados naturalmente por gregarinos (Lewis *et al.*, 1970). *Psychodiella chagasi* reduce la longevidad y fecundidad de *Lu. longipalpis*, y destruye las colonias de laboratorio (Dougherty y Ward, 1991). Sin embargo, todavía se desconoce hasta qué punto puede utilizarse este parásito para su control biológico (Lainson y Rangel, 2005) (ver más adelante, “Gregarinos: parásitos naturales de dípteros”).

Los hongos entomopatógenos en general son más eficientes y tienen una mayor especificidad para el insecto blanco que los insecticidas químicos. En Colombia, se demostró que el papel de filtro impregnado con conidios de *Beauveria bassiana* aumentó la mortalidad de adultos *Ph. papatasi* y *Lu. longipalpis* (Warburg, 1991). Sin embargo, esta eficiencia no pudo reproducirse para *Lutzomyia* en ensayos de laboratorio (Reithinger *et al.*, 1997).

También se ha descrito un nematodo intestinal parásito (Rhabditida, Steinernematidae) en *Lu. longipalpis* de Minas Gerais (Brasil). Su ciclo de vida es concomitante con el del flebótomo y su transmisión es directa. Se cree que las condiciones de estrés podrían aumentar sus niveles de colonización, lo cual interferiría con el desarrollo normal del flebótomo. La capacidad infecciosa de este nematodo, su efecto letal sobre el flebótomo, y el hecho de que no presenta riesgo para los vertebrados, lo convierten en un buen candidato para el control biológico de *Lu. longipalpis* (Secundino *et al.*, 2002).

Tras el descubrimiento de que ciertas plantas (*Capparis spinosa*, *Ricinus communis*, *Solanum luteum*) utilizadas como fuentes de azúcar por los flebótomos, eran tóxicas para *Le. major* (Schlein y Jacobson, 1994; Jacobson y Schlein, 1999), se encontró que ciertas especies exóticas también eran capaces de matar a los vectores (Schlein *et al.*, 2001). Por lo tanto, otra alternativa sostenible y de bajo costo al uso de insecticidas, podría ser plantar estas especies (*Bougainvillea glabra*, *Ricinus communis*, *Solanum jasminoides*) en las zonas de barrera. En otro estudio se evaluó el efecto insecticida de dos extractos de plantas ictiotóxicas utilizados por indios del Amazonas. Los extractos de las hojas secas de ambas especies, *Antonia ovate* y *Derris amazonica*, disueltos en agua, fueron altamente tóxicos para *Lu. longipalpis*, matando al 80% y 100% de las hembras, respectivamente (Luitgards-Moura *et al.*, 2002). Por lo tanto, estas plantas podrían representar una alternativa de fácil acceso a los insecticidas comerciales para el control de flebótomos en Brasil.

Por último, las campañas de fumigación podrían ser significativamente más eficientes si se explotara la ecología química de *Lu. longipalpis* (Kelly y Dye, 1997). Las feromonas sexuales terpenoides de los machos de *Lu. longipalpis*, producidas por

las glándulas abdominales (Lane y Ward, 1984; Lane *et al.*, 1985; Hamilton *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 2005; Hamilton, 2008), en combinación con el olor del hospedador, atraen a ambos sexos a las agregaciones o *leks* sobre los animales hospedadores, donde las hembras se alimentan de sangre y se aparean (Quinnell y Dye, 1994; Morrison *et al.*, 1995; Kelly y Dye, 1997). Tradicionalmente se ha fumigado los sitios de *lekking* (comúnmente galpones de gallinas) con insecticidas, pero esto mata al pequeño número de machos que llegan primero para establecer la agregación, e interrumpe la producción de feromonas. Debido a esto se impide el posterior reclutamiento (y muerte) de un número significativo de flebótomos de ambos sexos (Kelly *et al.*, 1997). Como consecuencia, los vectores buscan sitios de agregación alternativos más cercanos a las viviendas humanas, con un aumento asociado en el riesgo de picaduras y transmisión de LV (Kelly *et al.*, 1997). Sin embargo, si la fumigación con insecticidas se combinase con la liberación de feromonas desde una fuente artificial, para atraer a los flebótomos a los galpones tratados, esto potencialmente produciría una gran mortalidad y eliminaría el riesgo de que se formen agregaciones en otros sitios (Kelly y Dye, 1997). En un estudio reciente se vio que la utilización de feromonas sintéticas es más eficaz cuando se la combina con regímenes existentes de fumigación con insecticidas (Bray *et al.*, 2010).

En estudios de campo se vió que las trampas adhesivas de feromonas pueden usarse para capturar a ambos sexos de *Lu. longipalpis*, pero la feromona debe ser utilizada en conjunción con el olor del hospedador para atraer a las hembras (Bray *et al.*, 2009). Más allá de que el atractivo de las feromonas no depende de la presencia del hospedador (Morton y Ward, 1990), esto ocurre porque su rango está limitado a unos pocos metros, considerablemente menor que el del CO₂ o que el olor del hospedador (Alexander, 2000).

2. Microbiota asociada a los flebótomos

Para comprender la biología de los insectos de manera integral, los microorganismos asociados deben considerarse como un componente muy importante del sistema ecológico (Steinhaus, 1960). Por otro lado, hay amplio consenso en que la microbiota de muchos insectos proviene del ambiente circundante, como el filoplano de las plantas consumidas o la piel del animal hospedador y, aunque se desconoce el grado de persistencia de las especies ingeridas, estos microorganismos pueden influenciar el ciclo de vida del insecto (Dillon y Dillon, 2004).

Hay poca información sobre la colonización microbiana de *Lu. longipalpis* y aún no está claro si presentan una comunidad autóctona. En estudios previos donde se analizaron las bacterias del intestino medio de poblaciones salvajes y de laboratorio de *Lu. longipalpis* (Oliveira *et al.*, 2000; Perira de Oliveira *et al.*, 2001; Gouveia *et al.*, 2008), se mostró una dominancia de bacterias Gram negativas. Se encontraron varios géneros que se encuentran en forma ubicua en el ambiente (agua, suelo y *debris*), incluyendo *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Flavimonas* y *Enterobacter*. Estas bacterias también se han encontrado asociadas con el intestino de varios otros insectos (La Scola y Raoult, 2004; Zayed y Bream, 2004; Lindh *et al.*, 2005; Rani *et al.*, 2009), sugiriendo que son parte de la microbiota natural o transitoria. Por otro lado, el análisis de los intestinos y túbulos de Malpighi de *Ph. papatasi* y *Ph. tobbi* capturados en el campo, mostraron una alta incidencia de micosis similares a *Aspergillus sclerotiorum* y *Saccharomyces cerevisiae* (Schlein *et al.*, 1985). También se han encontrado varios tipos de virus infectando flebótomos (Young y Duncan, 1994), incluyendo *Vesiculovirus* (Travassos da Rosa *et al.*, 1984; Tesh *et al.*, 1987) y el Virus de la Poliedrosis Citoplasmática (Warburg y Pimenta, 1995). Más aún, además de *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum* y posiblemente otros tripanosomátidos (Lainson y Rangel, 2005), los flebótomos neotropicales podrían albergar otros parásitos incluyendo microsporidios (Lainson *et al.*, 1977; Matos *et al.*, 2006), algunas especies de *Plasmodium* que parasitan lagartijas (Klein *et al.*, 1987) y nematodos (Killick-Kendrick *et al.*, 1989; Warburg, 1991; Poinar *et al.*, 1993; Secundino *et al.*, 2002). Sin embargo, hay poca información sobre los efectos patológicos que estos parásitos podrían producir en los flebótomos hospedadores.

Recientemente se hizo un análisis metagenómico de los taxones asociados a *Lu. longipalpis*, en ejemplares adultos capturados en una zona endémica (ZE) (Posadas, Misiones, Argentina) y una zona no endémica (ZNE) (Cueva de Lapinha, Minas Gerais, Brasil) de LV (McCarthy *et al.*, 2011). Este fue el primer estudio en analizar los taxones asociados al vector de una enfermedad infecciosa utilizando un enfoque no sesgado y exhaustivo. Se encontraron secuencias de bacterias en todas las muestras analizadas, excepto machos de ZE (Posadas, Misiones). La mayoría correspondieron a bacterias Gram negativas (53.8%), y las especies identificadas fueron *Acinetobacter baumannii*, *Ralstonia pickettii*, *Veillonella sp.* y bacterias no cultivables provenientes de muestras ambientales (heces de vaca, humus y agua). Las bacterias Gram positivas (38.5%), identificadas en los ejemplares de ZNE, correspondieron a *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus kaustophilus*,

Streptomyces coelicolor y *Propionibacterium acnes*. Los hongos sólo se identificaron en los ejemplares de ZNE, y correspondieron a *Peronospora conglomerata*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Mortierella verticillata* y *Toxicocladosporium irritans*. Los protistas se identificaron únicamente en las muestras de ZE, y el 99,8% se encontró en los machos. Se identificaron diez especies y un género de apicomplejos parásitos de dípteros (*Ascogregarina taiwanensis*, *Psychodiella chagasi*), aves (*Eimeria tenella*, *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis cornixi*), mamíferos (*Cryptosporidium muris*, *Sarcocystis arieticanis*, *Besnoitia besnoiti*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei*), y reptiles, aves y mamíferos (*Sarcocystis sp.*). En todas las muestras se hallaron secuencias de metazoos (*Homo sapiens*, *Gallus gallus* y *Anolis carolinensis*), y diez especies de plantas.

La diversidad de secuencias de bacterias, hongos, protistas, plantas y metazoos encontradas en este estudio, confirmó sus hábitos alimenticios y patrones de comportamiento. Sin embargo, también sugirió que estos vectores podrían ser una fuente de dispersión casual de diversas enfermedades de importancia médica y veterinaria, tales como malaria y coccidiosis (McCarthy *et al.*, 2011). Esto es particularmente significativo dada la franca expansión geográfica de este vector (WHO, 2002), sumado a que se aisló ARN de estos patógenos lo cual indicaría que eran biológicamente activos. Por otro lado, la identificación de protistas gregarinos sugirió que estos parásitos podrían ser un método de control más eficiente en condiciones naturales que lo sugerido previamente (Soares y Turco, 2003; McCarthy *et al.*, 2011). Esto es de especial relevancia dado que, como ya se ha mencionado, aún son escasos los estudios de control biológico de flebótomos y que los biolarvicidas no son una opción viable para el control de este vector (Deane, 1956).

3. Importancia de los protistas apicomplejos identificados en *Lu. longipalpis* por homología de secuencia

Los protistas del Phylum Apicomplexa son organismos eucariotas unicelulares, fundamentalmente endoparásitos, y en algunos casos patógenos de humanos, como por ejemplo *Cryptosporidium*, *Toxoplasma* y *Plasmodium*. En el estudio metagenómico mencionado (McCarthy *et al.*, 2011) se identificaron 10 especies de este Phylum, y tres de ellas llamaron particularmente la atención por su importancia médica o por su posible utilización como agentes de control biológico: *Plasmodium falciparum* (hemosporidio causal de la malaria), y gregarinos parásitos de dípteros (*Ascogregarina taiwanensis* y *Psychodiella chagasi*).

En el año 2013 la malaria causó cerca de 584.000 muertes (con un margen de incertidumbre que oscila entre 367,000 y 755,000), sobre todo en niños africanos (OMS). *Anopheles gambiae* (Orden: Diptera; Familia: Culicidae) es el principal vector que transmite este parásito al ser humano a través de las picaduras (Molina-Cruz *et al.*, 2012). La identificación de este agente etiológico en flebótomos machos, un vector no natural (*Lu. longipalpis*), se relacionó con una posible dispersión casual (McCarthy *et al.*, 2011).

Por otro lado, *A. taiwanensis* parasita mosquitos de la especie *Aedes albopictus*, y *Ps. chagasi* parasita flebótomos de la especie *Lu. longipalpis*. La importancia de estos parásitos radica principalmente en su potencial uso como posibles agentes de control biológico.

4. Gregarinos: parásitos naturales de dípteros

Los gregarinos son un grupo basal de protistas apicomplejos ampliamente distribuidos entre invertebrados marinos y terrestres (Carreno *et al.*, 1999; Perkins *et al.*, 2000). Se conocen como parásitos exclusivamente en invertebrados, por lo que se desestima su importancia sanitaria para los seres humanos. Sin embargo, debido a que los gregarinos parasitan dípteros, su importancia radica en que afectan a importantes vectores de enfermedades humanas (Lantova y Volf, 2014). Este grupo incluye a los géneros *Ascogregarina* y *Psychodiella* (Eugregarinorida: Aseptatorina), que pertenecen a la familia Ascogregarinidae (Lantova y Volf, 2014). Ambos géneros tienen diferentes hospedadores (*Culicidae versus Psychodidae*) y sus ciclos se diferencian considerablemente. Pero, debido a que la morfología y el tamaño de ambos géneros son similares, *Psychodiella* previamente fue incluido en el género *Ascogregarina* (Clopton, 2000). Sin embargo, varias características únicas justificaron su reciente separación para formar el género *Psychodiella* (Votykka *et al.*, 2009): sólo parasitan flebótomos, en las hembras los ooquistes tienen una localización única y característica en las glándulas accesorias, poseen secuencias ribosomales de la subunidad pequeña distintivas y, en los adultos, los gregarinos se localizan en la cavidad corporal y glándulas accesorias (no en los túbulos de Malpighi como ocurre con los ascogregarinos).

El género *Psychodiella* se ha encontrado en más de 20 especies de flebótomos (Young y Lewis, 1977), pero sólo incluye cinco especies descritas que parasitan dos especies de flebótomos del Nuevo Mundo, *Ps. chagasi* (Adler y Mayrink, 1961) y *Ps. saraviae* (Ostrowska *et al.*, 1990), y tres especies del Viejo Mundo, *Ps. mackiei* (Shortt y Swaminath, 1927), *Ps. sergenti* y *Ps. tobbi* (Lantova *et al.*, 2010) (Tabla 4).

Por otro lado, el género *Ascogregarina* (Ward *et al.*, 1982) mayormente parasita dípteros, en particular nueve especies de mosquitos (Lantova y Volf, 2014), e incluye a las siguientes especies: *A. culicis*, *A. tripteroidesi*, *A. barretti*, *A. clarki*, *A. armigerei*, *A. lanyuensis*, *A. taiwanensis* y *A. geniculati* (Tabla 4).

Tabla 4. Especies de gregarinos y sus respectivos hospedadores naturales (Lantova y Volf, 2014).

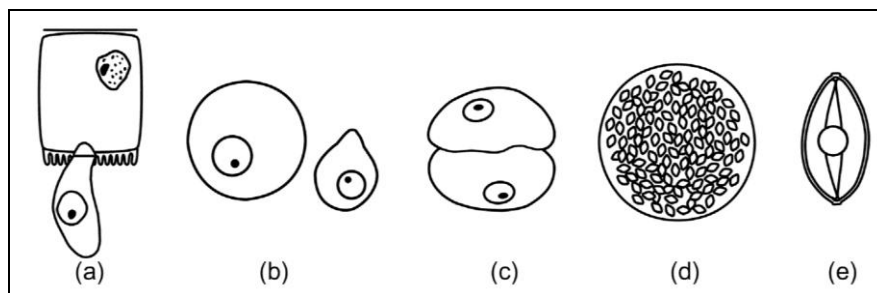
Género	Especie	Hospedador natural
Ascogregarina (parásito de mosquitos)	<i>A. culicis</i>	<i>Aedes aegypti</i>
	<i>A. tripteroidesi</i>	<i>Tripteroides dofleini</i>
	<i>A. barretti</i>	<i>Ae. triseriatus</i>
	<i>A. clarki</i>	<i>Ae. sierrensis</i>
	<i>A. armigerei</i>	<i>Armigeres subalbatus</i>
	<i>A. lanyuensis</i>	<i>Ae. alcalasidi</i>
	<i>A. taiwanensis</i>	<i>Ae. albopictus</i>
	<i>A. geniculati</i>	<i>Ae. geniculatus</i>
	<i>A. polynesiensis</i>	<i>Ae. polynesiensis</i>
Psychodiella (parásito de flebotomos)	<i>Ps. chagasi</i>	<i>Lu. longipalpis</i>
	<i>Ps. saraviae</i>	<i>Lu. lichyi</i>
	<i>Ps. mackiei</i>	<i>Ph. argentipes</i>
	<i>Ps. sergenti</i>	<i>Ph. sergenti</i>
	<i>Ps. tobbi</i>	<i>Ph. tobbi</i>

Aunque afecten a importantes vectores de enfermedades humanas, estos dos géneros de gregarinos (*Ascogregarina* y *Psychodiella*) no han sido estudiados en profundidad. Tal es así que falta información sobre ambos grupos, especialmente del género *Psychodiella* (Lantova y Volf, 2014). En el caso de *Ascogregarina*, se ha secuenciado completamente el genoma de *A. taiwanensis* (Templeton *et al.*, 2010), y parcial o completamente el ADN ribosomal (SSU ADNr, 28 ADNr y secuencias de ITS1, 5.8S ADNr e ITS2) de *A. armigerei*, *Ascogregarina sp.* de *Ochelorotatus japonicus*, *A. culicis*, *A. taiwanensis* y *A. barretti* (Morales *et al.*, 2005; Lantova y Volf, 2014). Hay mucha menos información sobre el género *Psychodiella*, ya que existen pocos estudios y no se ha secuenciado ningún genoma. Solamente se encuentran disponibles las secuencias del gen SSU ADNr de *Ps. sergenti* (Lantova *et al.*, 2010), *Ps. chagasi* (Adler y Mayrink, 1961) y *Ps. tobbi* (Votypka *et al.*, 2009; Lantova *et al.*, 2010; Lantova *et al.*, 2011).

Psychodiella chagasi

La especie tipo del género *Psychodiella*, *Ps. chagasi*, fue descrita por primera vez en el hemocel y glándulas accesorias de *Lu. longipalpis* de Brasil (Adler y Mayrink, 1961), y su ciclo de vida ha sido estudiado en detalle (Adler y Mayrink, 1961; Coelho y Falcao, 1964; Wu y Tesh, 1989; Warburg y Ostrovska, 1991). Esta especie presenta particular interés por parasitar al vector de LV (Adler y Mayrink, 1961). Todos los estados del ciclo biológico (Figura 9), incluyendo los gametocitos y ooquistes, ocurren en larvas y adultos de ambos sexos. Brevemente, larvas de primer estadio son infectadas cuando ingieren ooquistes (estado infectivo de los gregarinos). Los esporozoítos liberados a partir de los ooquistes residen en el intestino medio de la larva y allí se desarrollan a trofozoítos. Los gamontes (estado maduro de los gregarinos) se encuentran mayormente en el lumen del intestino larval, donde ocurre su diferenciación sexual: dos gamontes se asocian en sизigia y después son envueltos por una pared quística para formar un gametocito. Dentro del gametocito cada gamonte se desarrolla por gamogonia a gameta y, luego de la fertilización y durante la esporogonia, los cigotes se diferencian a ooquistes con ocho esporozoítos cada uno. En los adultos, los gregarinos se localizan en el hemocel y allí ocurre la diferenciación sexual. En hembras, los gametocitos se adhieren a las glándulas accesorias y los ooquistes son inyectados al lumen. Durante la oviposición, el fluido de la glándula accesoria que contiene los ooquistes, se adhiere al corion de los huevos y sirve como fuente de infección para las larvas recién eclosionadas. Este ciclo de vida general se modifica en otras especies de *Psychodiella*.

Figura 9. Ciclo biológico de *Ps. chagasi*. a) Trofozoito extracelular adherido a la célula epitelial del intestino de la larva. b) Gamontes, usualmente localizados en el intestino de la larva y pupa, o en la cavidad corporal de adultos y pupas. c) Sizigia, generalmente localizado en el intestino larval o la cavidad corporal en adultos. d) Gametocitos con ooquistes, usualmente localizados en el intestino larval y cavidad de los adultos; en las hembras se adhieren a las glándulas accesorias. e) Ooquiste esporulado, localizados en el intestino y heces de la larva, en la cavidad corporal de los adultos, en el lumen de las glándulas accesorias de las hembras y sobre el corion de los huevos (Lantova y Volf, 2014).



Considerando que las estrategias de biocontrol buscan reducir el tamaño de las poblaciones blanco a niveles en los que ya no representen un problema de salud (Service, 1985), hay varias características que hacen que *Ps. chagasi* sea un candidato interesante para el control biológico de *Lu. longipalpis*. En primer lugar, su ciclo de vida bimodal constituye un mecanismo eficiente para su perpetuación en tiempo y espacio (Adler y Mayrink, 1961): las larvas infectadas contribuyen a la transmisión horizontal y vertical a otras larvas (larva a larva), mientras que las infecciones en adultos facilitan la dispersión geográfica del parásito y, debido a la contaminación con ooquistes de los huevos durante la oviposición, aseguran una transmisión vertical eficiente (adulto a larva). En segundo lugar, *Ps. chagasi* tendría un rango de hospedadores muy estrecho (Adler y Mayrink, 1961; Wu y Tesh, 1989), otra característica deseable en un agente de biocontrol. En tercer y último lugar, aunque no se ha observado que *Ps. chagasi* cause daño visible, se demostró que afecta negativamente la longevidad de los adultos (Wu y Tesh, 1989) y la producción de huevos, y el nivel de parasitemia puede llegar al 80% en colonias de laboratorio (Dougherty y Ward, 1991).

En cuanto a la especificidad de hospedador de *Ps. chagasi*, se han encontrado resultados contradictorios. Por un lado, se sugirió que *Ps. chagasi* tiene un amplio rango de hospedadores entre las especies de flebótomos del Nuevo Mundo (Levine, 1977). Sin embargo, en estudios de infección cruzada, se encontró que *Ps. chagasi* sólo puede completar su ciclo de vida en *Lu. longipalpis* adultos, ya

que no desarrolló ooquistes en las seis otras especies estudiadas, tres del Viejo Mundo (*Ph. papatasi*, *Ph. argentipes* y *Ph. perniciosus*) y tres del Nuevo Mundo (*Lu. abonnenci*, *Lu. serrana* y *Lu. columbiana*) (Wu y Tesh, 1989). Sumado a esto, se han encontrado infecciones naturales de esta especie en cuatro otras especies de flebótomos neotropicales: *Lu. sallesi* (Coelho y Falcao, 1964), *Lu. flaviscutellata* (Lewis *et al.*, 1970), *Lu. townsendi* (Scorza y Carnevali, 1981), *Lu. evandroi* (Brazil y Ryan, 1984) y, muy recientemente, *Evandromyia lenti* (de Souza Rocha *et al.*, 2015).

***Ascogregarina* spp.**

Muchos de los estudios sobre el ciclo de vida gregarino se han enfocado en *Ascogregarina taiwanensis* (Chen y Yang, 1996; Chen *et al.*, 1997; Chen, 1999; Chen y Fan-Chiang, 2001), el gregarino comúnmente encontrado en *Ae. albopictus*. Su ciclo de vida es similar al de otras especies del mismo género y se describe aquí brevemente. Los ooquistes ingeridos por larvas de mosquitos de estadios tempranos liberan esporozoítos, que luego ingresan a las células intestinales epiteliales del hospedador y allí se desarrollan a trofozoítos. Previo a que el mosquito empupe, los trofozoítos migran del intestino medio a los túbulos de Malpighi, donde se transforman en macro- o microgametas. Durante el estado pupal, dos gametas se fusionan para formar un gametocito dentro del cual se forman cientos de ooquistes (Chen, 1999). Los ooquistes son liberados a los sitios de cría a través de los adultos que allí mueren y por los adultos en metamorfosis (Chen *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Chen y Fan-Chiang, 2001).

En cuanto a la especificidad de hospedador de *Ascogregarina*, los resultados también son contradictorios. En un estudio se demostró que no es un parásito hospedador-específico, ya que los ooquistes encontrados en *Ae. albopictus* infectaron larvas de *Ae. aegypti* y *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Garcia *et al.*, 1994). Sin embargo, en otros estudios de infección cruzada, se demostró que estos gregarinos tienen un alto grado de especificidad (Reyes-Villanueva *et al.*, 2003).

En cuanto a la patogenicidad de los ascogregarinos, algunas especies son claramente patogénicas para el hospedador (Sulaiman, 1992; Comiskey *et al.*, 1999) y podrían potencialmente utilizarse como agentes de control biológico (Perkins *et al.*, 2000). Cuando se estudió la patogenicidad de *A. taiwanensis* en varias especies de mosquitos (Garcia *et al.*, 1994), se encontró que *Culex quinquefasciatus*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. territans* y *Anopheles quadramaculatus* no eran susceptibles. *Aedes aegypti* y *O. triseratus* eran susceptibles, pero en estas

especies no se produjeron ooquistes de *A. taiwanensis*. Estos resultados concuerdan con estudios previos que demostraron un incremento en la severidad de la infección en algunas combinaciones gregarino / hospedador no natural (Walsh y Olson, 1976; Spencer y Olson, 1982). Se ha observado que *A. culicis* puede causar daño severo a los túbulos de Malpighi de *Ae. aegypti* y más del 80% de mortalidad en larvas de especies no naturales (Walsh y Olson, 1976). Por otro lado, se han realizado varios estudios para determinar los efectos de las infecciones de *A. taiwanensis* sobre la adaptabilidad de *Ae. albopictus* y otras especies de mosquitos (García *et al.*, 1994; Comiskey *et al.*, 1999; Comiskey *et al.*, 1999; Tseng, 2004). En tres de estos estudios se encontró que la severidad de la infección de *A. taiwanensis* en *Ae. albopictus* dependía de las condiciones del ambiente. Estos estudios también sugirieron que los niveles de nutrientes y de hacinamiento pueden influenciar la infección gregarina en forma dependiente del sexo del hospedador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo de esta tesis se utilizó el flujo de trabajo general indicado en la Figura 10 y, para facilitar la interpretación de los resultados, esta sección se organizó de acuerdo a lo indicado en este esquema general (Figura 10).

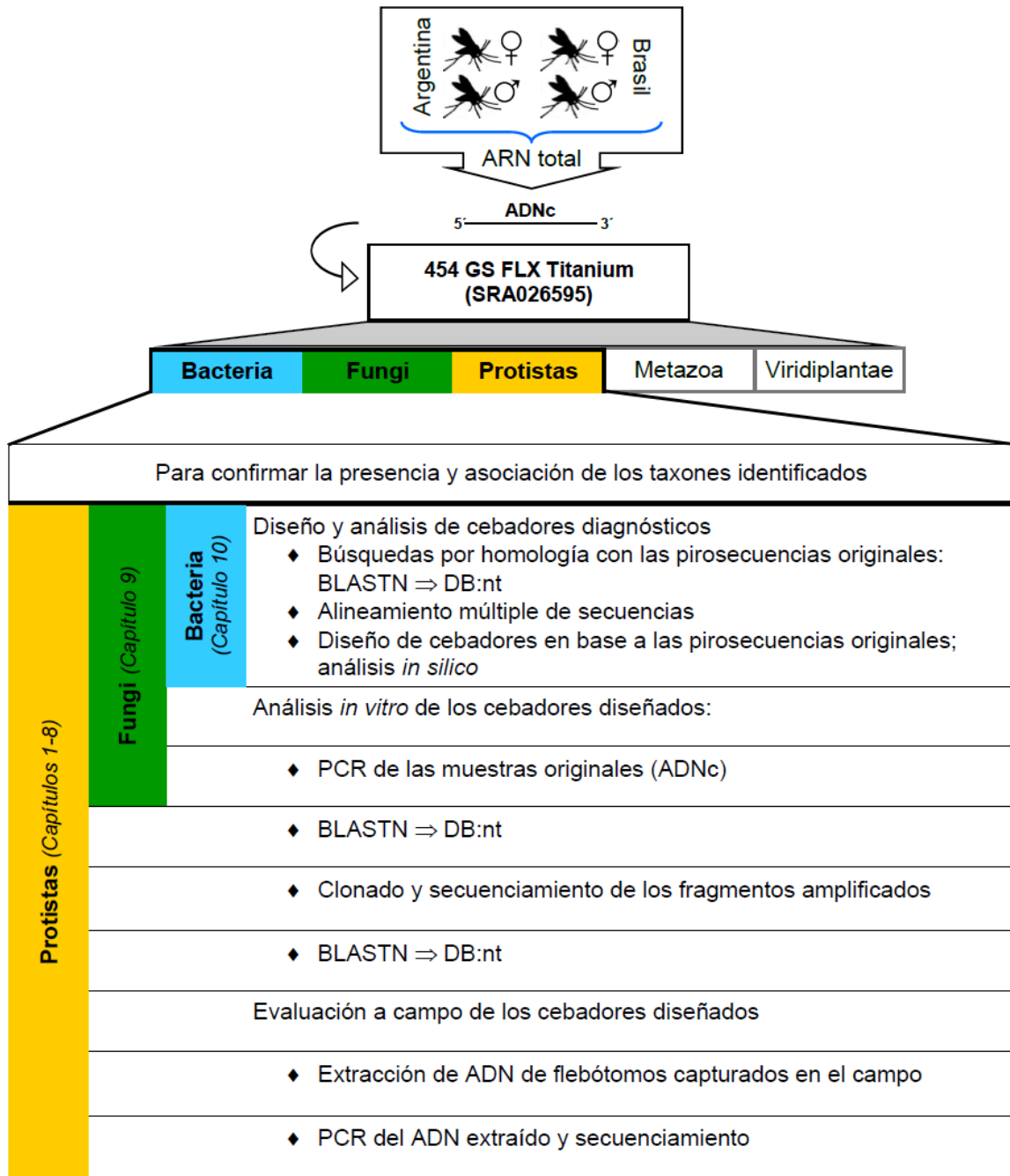
Como ya se ha mencionado, de todos los taxones que fueron identificados en las muestras originales de *Lu. longipalpis* (McCarthy *et al.*, 2011), en esta tesis se profundizó el análisis de los posibles agentes de control biológico y los agentes etiológicos de importancia sanitaria. En función de esto, los Capítulos 1 a 8 describen el análisis de tres de los protistas de mayor interés identificados en *Lu. longipalpis* (dos de ellos parásitos naturales de dípteros, *Psychodiella chagasi* y *Ascogregarina taiwanensis*, y uno de ellos de importancia sanitaria, *Plasmodium falciparum*), y los Capítulos 9 y 10 describen el desarrollo de cebadores para analizar la presencia y asociación de las especies de hongos y bacterias identificadas en este vector.

También cabe aclarar que los resultados obtenidos para cada taxón analizado se organizaron por separado:

- ✓ Protistas: *Ps. chagasi* (Capítulos 1 al 4), *A. taiwanensis* (Capítulos 5 y 6) y *P. falciparum* (Capítulos 7 y 8)
- ✓ Fungi (Capítulo 9)
- ✓ Bacteria (Capítulo 10)

Por último, con el objetivo de facilitar la interpretación de los capítulos que describen los resultados para cada taxón, al inicio de los mismos se incluyó una figura que sintetiza el análisis realizado para ese taxón en particular.

Figura 10. Esquema general del flujo de trabajo utilizado durante el desarrollo de esta tesis.

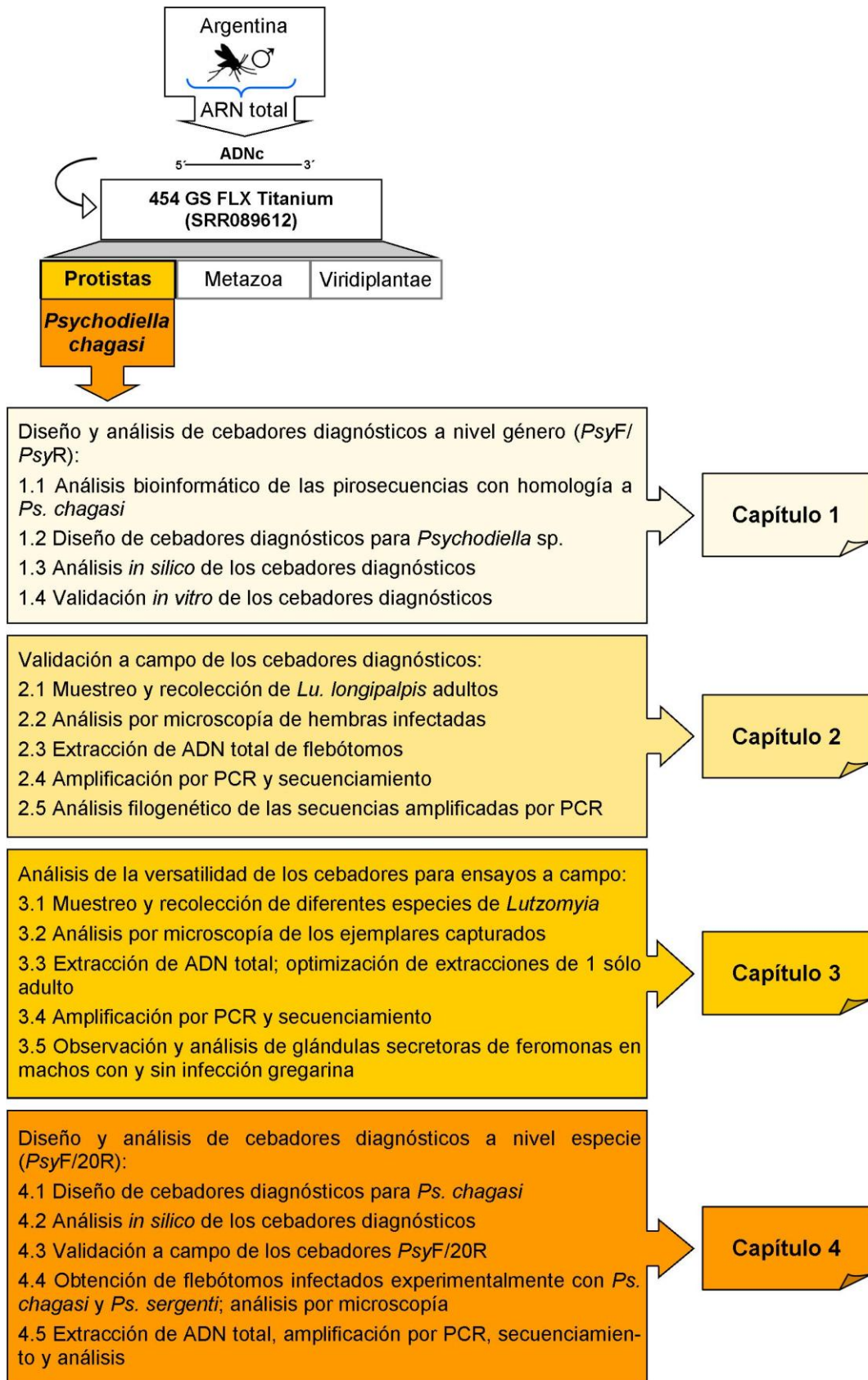


Psychodiella chagasi

En esta primera parte de Resultados y Discusión (Capítulos 1 a 4) se analiza *Psychodiella chagasi*, uno de los taxones identificados en *Lu. longipalpis* machos de una zona endémica de LV (Posadas, Argentina) (McCarthy *et al.*, 2011). El interés que presenta *Ps. chagasi* radica en su potencial utilización como agente de control biológico de este insecto-vector.

El punto de partida de este análisis fueron las cuatro pirosecuencias originales que mostraron homología con *Ps. chagasi*. Estas secuencias nucleotídicas fueron sometidas a diferentes análisis *in silico* para el diseño de cebadores específicos. Posteriormente, se realizó una validación *in vitro* y a campo de los cebadores diseñados.

A continuación se muestra un esquema que sintetiza el contenido de los Capítulos que describen los Resultados para *Ps. chagasi*.



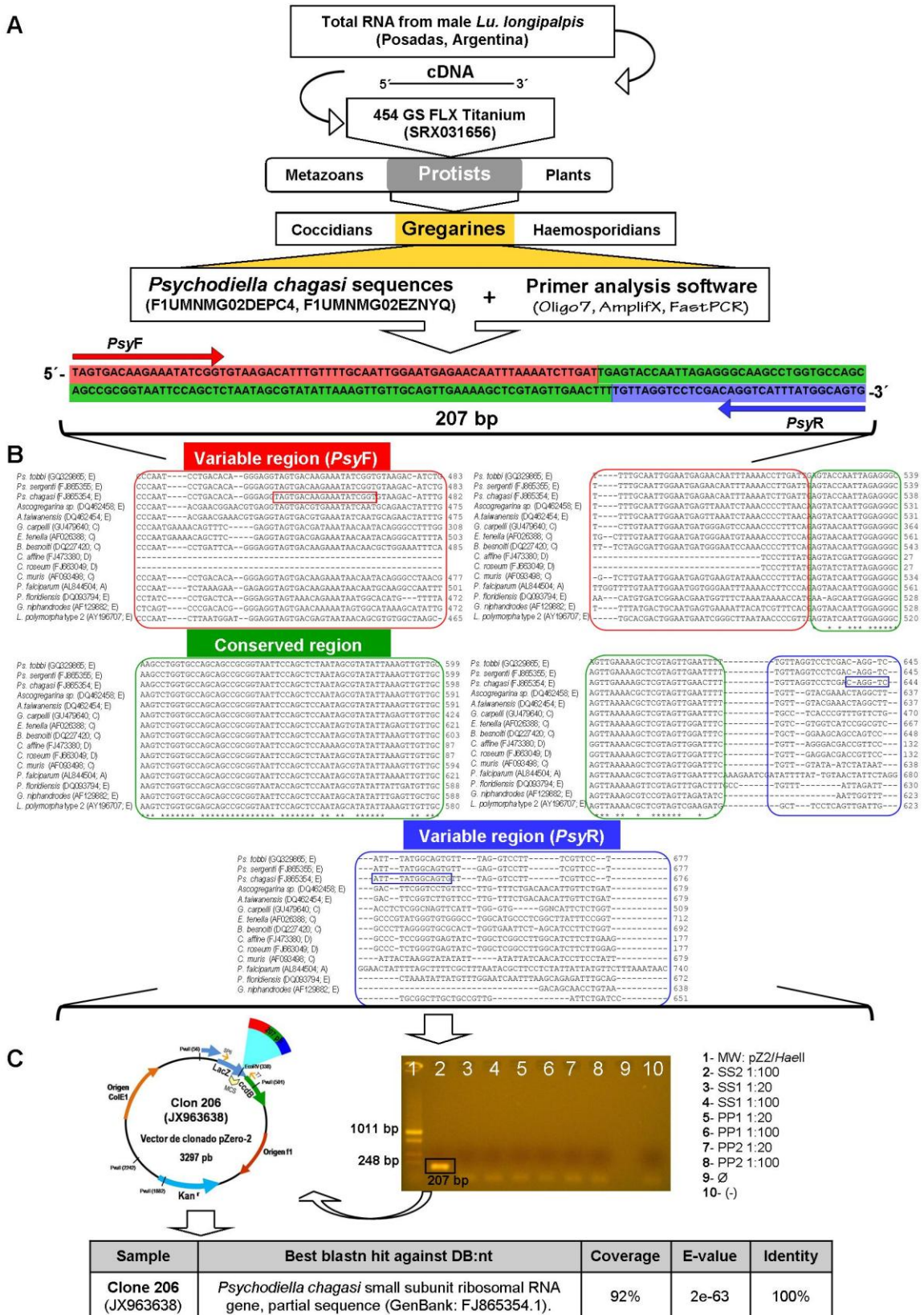
CAPÍTULO 1. Diseño y análisis de cebadores diagnósticos a nivel género (PsyF/PsyR)

Los resultados presentados en este capítulo forman parte de dos presentaciones a congreso (Caligiuri y McCarthy, 2011; Caligiuri et al., 2012) y una publicación científica (Caligiuri et al., 2014).

Resumen del Capítulo 1:

La siguiente figura sintetiza la estrategia descrita en este capítulo para el diseño y análisis de cebadores diagnósticos para *Psychodiella* sp. (PsyF/PsyR) (Caligiuri et al., 2014).

Figura 11. Estrategia usada en el diseño de los cebadores género específicos (A), análisis *in silico* (B), y validación *in vitro* (C) de los cebadores PsyF/PsyR. Los cebadores PsyF/PsyR fueron diseñados en base a las pirosecuencias con homología a *Ps. chagasi* identificadas previamente en *Lu. longipalpis* machos de Posadas (Argentina) (Figura 11, parte A). En el amplicón teórico de 207 pb se muestran los cebadores PsyF/PsyR en la parte superior de la secuencia, con flechas roja y azul respectivamente. En la parte B de la Figura 11, se muestra un resumen del análisis *in silico* basado en el AM correspondiente a 13 secuencias de apicomplejos y 2 de dinoflagelados, todas correspondientes a la subunidad pequeña del ADN ribosomal. El AM abarca la región amplificada por PsyF/PsyR, y se identifican tres regiones: una región conservada, señalada con recuadro verde, y dos regiones variables señaladas con recuadro rojo y azul. En la secuencia de *Ps. chagasi* se señalan las secuencias diana de los cebadores PsyF/PsyR mediante rectángulos rojo y azul, respectivamente. En la parte C de la figura, se representa la etapa de validación *in vitro* de PsyF-PsyR mediante la amplificación por PCR con dichos cebadores de las muestras originales de ADNc. La fotografía muestra el resultado de la amplificación visualizada en un gel de agarosa 1%, en la cual se observa una banda del tamaño esperado (207 pb) únicamente en machos de Posadas. El fragmento de ADN amplificado fue purificado, clonado (clon 206 = clon 50) y secuenciado. Por último, se muestra el resultado de la búsqueda por homología usando BLASTN (BD: nt) con la secuencia clonada.



1.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a *Ps. chagasi*

Como se mencionó anteriormente, las pirosecuencias originalmente identificadas como *Ps. chagasi* (McCarthy *et al.*, 2011) fueron sometidas a un extenso análisis bioinformático, incluyendo búsquedas por homología en bases de datos, alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas y posterior diseño de cebadores específicos.

Búsquedas por homología en bases de datos (BD:nt)

En primer lugar, las cuatro pirosecuencias fueron sometidas a una nueva búsqueda por homología utilizando BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) contra la base de datos nucleotídica no redundante (nr). El resultado de este análisis indicó que todas las pirosecuencias nuevamente dieron *hit*³ con *Psychodiella chagasi*, específicamente con la subunidad pequeña del gen ribosomal, con valores de E-value entre 0 y 2 e-57, y una identidad entre 96 y 100%. En la tabla 5 se presentan las características más importantes de este análisis, como largo final de las pirosecuencias luego de su edición, y los resultados más significativos de la búsqueda por homología (E-value y porcentaje de identidad).

Tabla 5. Resultados y características de las pirosecuencias luego de una nueva búsqueda por homología.

Pirosecuencias	Muestra y procedencia	Largo ⁴	BLASTN (BD:nt)		
			Hit	E-value ⁵	Identidad
F1UMNMG02EZNYQ	SS2: machos de Posadas (zona endémica de LV)	342 nt	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (NA: FJ865354)	4e-114	100%
F1UMNMG02DEPC4		343 nt		4e-114	100%
F1UMNMG02ECVO9		383 nt		0	98%
F1UMNMG02EKVDC		187 nt		2e-57	96%

³ Ver definición en Glosario.

⁴ El largo corresponde a la edición final de la pirosecuencia: eliminación del cebador #1 (CGCCGTTTCCCAGTAGGTCTC) usado para la amplificación independiente de secuencia, y de nucleótidos N.

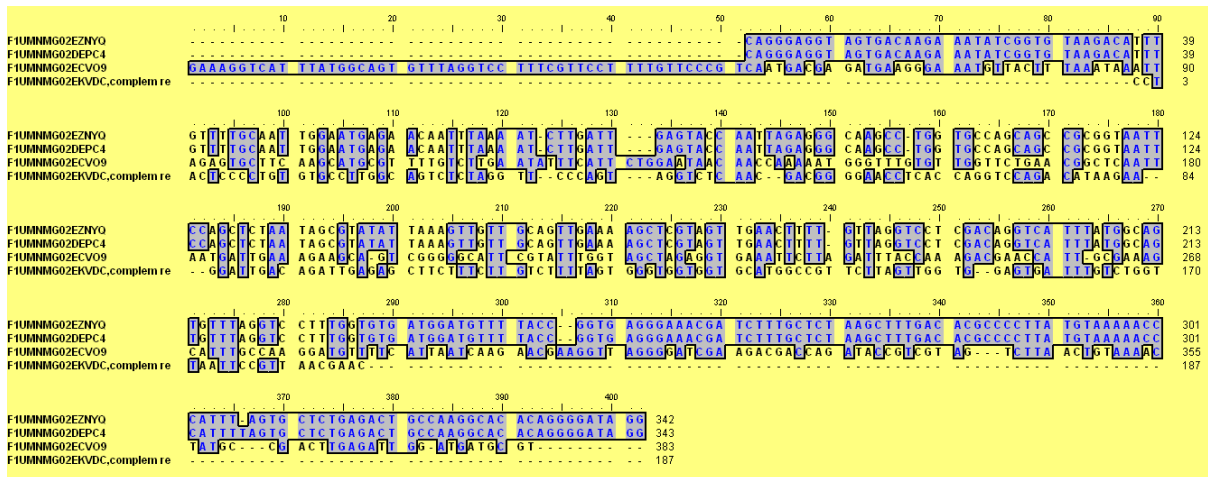
⁵ Ver definición en Glosario.

Alineamiento múltiple de secuencias correspondientes a *Ps. chagasi*

Con el objetivo de conocer el grado de similitud de las pirosecuencias entre sí y de compararlas con la secuencia de referencia del GenBank (NA FJ865354), se realizaron varios alineamientos múltiples (AM) con ClustalW (Thompson *et al.*, 1994; Hall, 1999).

Inicialmente se realizó un AM con las cuatro pirosecuencias correspondientes a *Ps. chagasi* (F1UMNMG02EZNYQ, F1UMNMG02DEPC4, F1UMNMG02ECVO9 y F1UMNMG02EKVDC). En la Figura 12, donde se muestra todo el alineamiento, se puede observar que las secuencias F1UMNMG02EZNYQ y F1UMNMG02DEPC4 (NYQ y PC4, respectivamente) son las más similares.

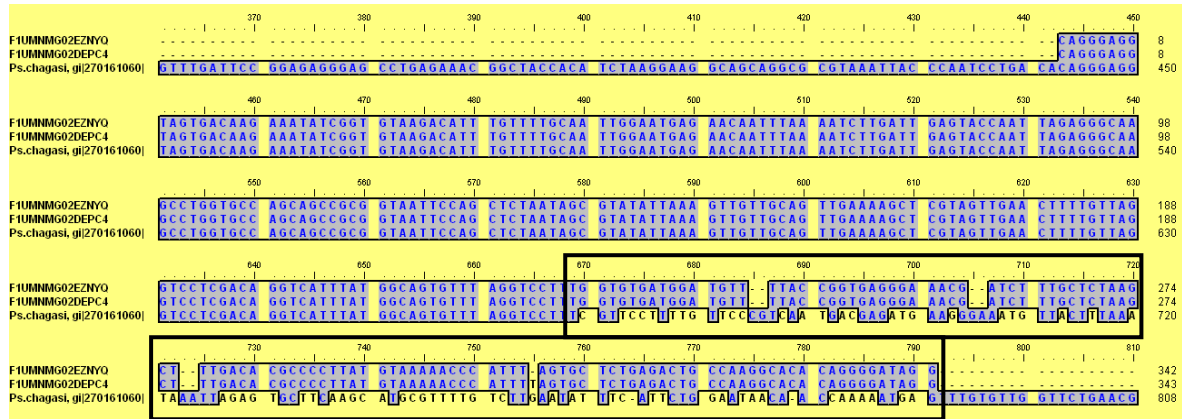
Figura 12. Alineamiento múltiple de las pirosecuencias con homología a *Ps. chagasi*. Las coincidencias (identidades) entre las secuencias se indican con recuadro negro y fondo gris. Nota: La pirosecuencia F1UMNMG02EKVDC se analizó mediante su hebra reversa complementaria (ver más adelante).



Luego se realizaron alineamientos de cada pirosecuencia con la secuencia de referencia del GenBank (NA: FJ865354), con el objetivo de identificar las regiones involucradas. En el caso de las secuencias NYQ y PC4 se alinearon juntas con FJ865354, ya que son prácticamente idénticas (Figuras 13 y 14).

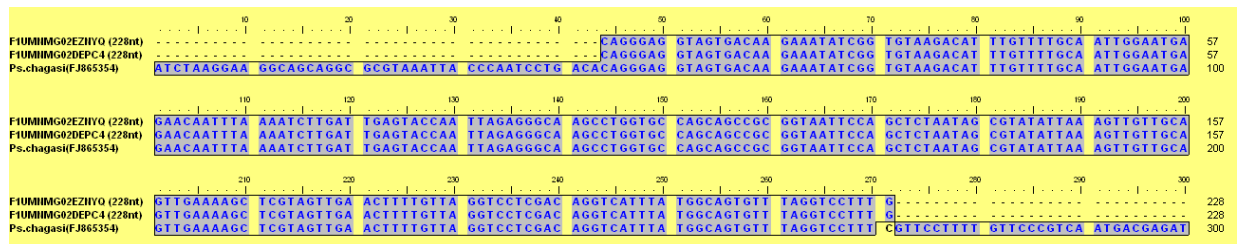
Este análisis permitió confirmar 100% de identidad entre los nucleótidos (nt) 443 a 669 (numeración correspondiente a la secuencia de referencia) y, a partir del nucleótido 670 en adelante, se observó una región que no alineaba con FJ865354 (recuadro negro en la Figura 13).

Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias F1UMNMG02EZNYQ y F1UMNMG02DEPC4 con la secuencia de referencia del GenBank (NA: FJ865354).



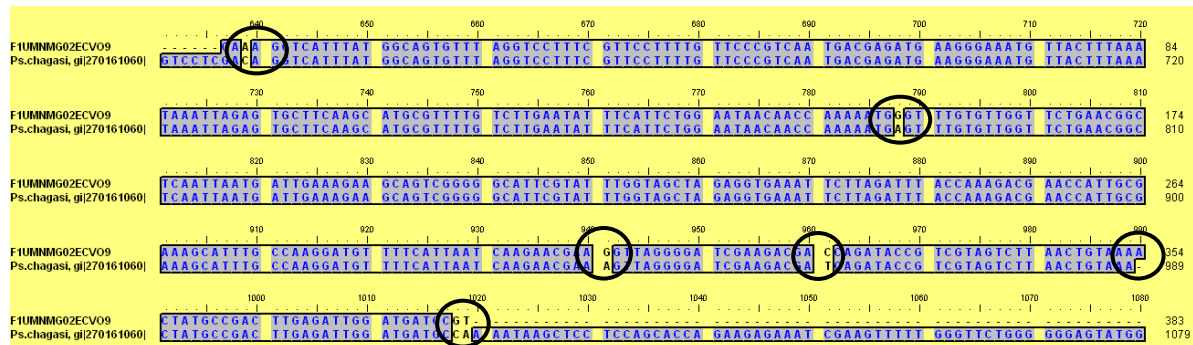
La Figura 13 muestra que había 115 nt en ambas pirosecuencias (NYQ y PC4) que no alineaban con la secuencia de referencia (señalado con recuadro negro). Esta anomalía se debió a la presencia de una secuencia quimérica en ambas pirosecuencias, artefacto de la pirosecuenciación, y estos 115 nt correspondían a *Lutzomyia longipalpis* (AJ244429: 18S rRNA gene, clone LONG2). En función de este resultado, luego de eliminar los 115 nt de ambas pirosecuencias, se volvió a realizar un AM con FJ865354 (Figura 14). El resultado de este AM confirmó que había identidad total entre NYQ y PC4 con la secuencia de referencia.

Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias F1UMNMG02EZNYQ y F1UMNMG02DEPC4 con la secuencia de referencia del GenBank (NA: FJ865354) luego de eliminar la porción quimérica.



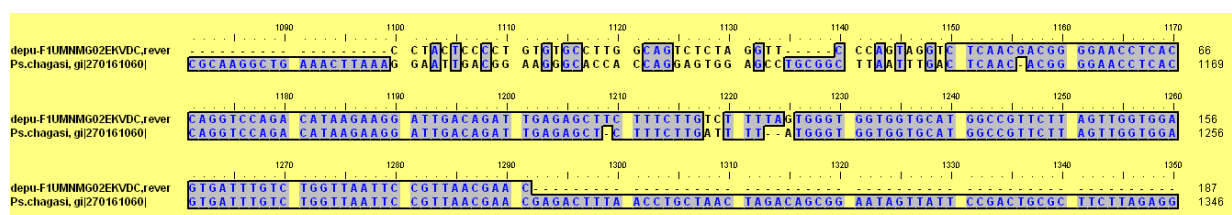
Se realizó el mismo análisis para las otras dos pirosecuencias (F1UMNMG02ECVO9 y F1UMNMG02EKVDC). En el caso de la secuencia F1UMNMG02ECVO9 (VO9) se obtuvo un alineamiento casi perfecto con la secuencia de referencia en toda su longitud (nt 637 a 1017), observándose 6 *mismatches* y 1 *gap* a lo largo de toda la pirosecuencia (Figura 15). En la Figura 15 se muestra la región involucrada, el resultado del alineamiento, señalando con círculos los *mismatches* y el *gap*.

Figura 15. Alineamiento de la secuencia F1UMNMG02ECVO9 con la secuencia de referencia del GenBank (NA: FJ865354). Los círculos negros indican los *mismatches* y el *gap*.



Por último, el análisis de la pirosecuencia F1UMNMG02EKVDC (VDC) se realizó de manera levemente diferente. Debido a que la pirosecuencia corresponde a la hebra (-), según los datos obtenidos del alineamiento del BLASTN, previamente se generó la hebra reversa complementaria para poder alinearla a la hebra (+) de la secuencia de referencia. El alineamiento resultante mostró discrepancias en aproximadamente 40 nt del extremo 5' de la pirosecuencia, seguido de un buen alineamiento de aproximadamente 140 nt (Figura 16). Este resultado fue concordante con el resultado de la búsqueda por homología, ya que sus valores de E-value e identidad fueron los más bajos (2e-57 y 96%, respectivamente). Sumado a esto, como el largo de la pirosecuencia era demasiado corto para la búsqueda de cebadores, fue descartada de los análisis subsiguientes.

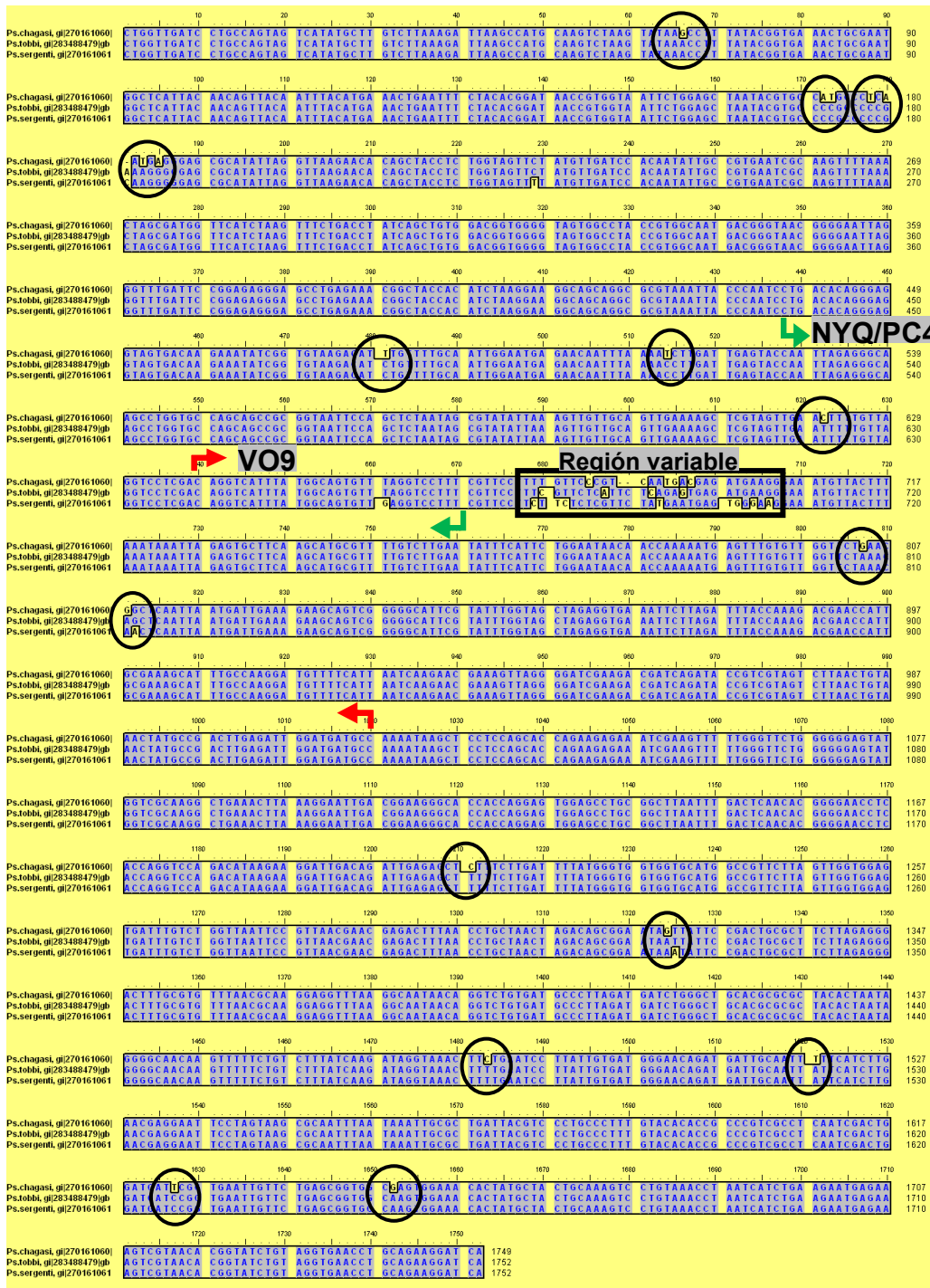
Figura 16. Alineamiento de la secuencia F1UMNMG02EKVDC (hebra +) con la secuencia de referencia del GenBank (NA: FJ865354).



Por otro lado, se realizó un AM con las secuencias nucleotídicas del género *Psychodiella* depositadas en el GenBank: *Ps. tobbi* (NA: GQ329865), *Ps. sergenti* (NA: FJ865355) y *Ps. chagasi* (NA: FJ865354). Se han descrito dos especies más del género *Psychodiella* (*Ps. mackiei* y *Ps. saraviae*), pero no hay secuencias disponibles de las mismas en GenBank, y por lo tanto no se pudieron incluir en los análisis bioinformáticos.

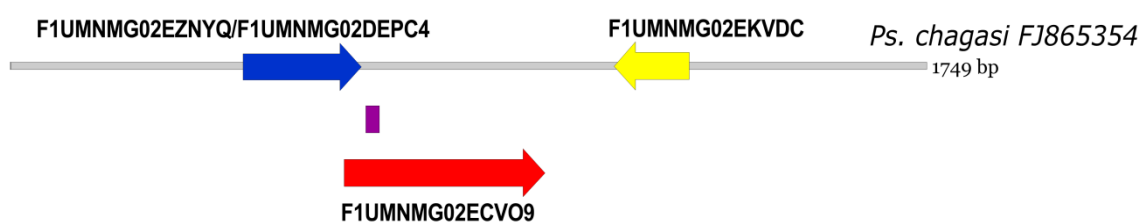
Para obtener un mapa genético global que ubicara las regiones abarcadas por las pirosecuencias (NYQ, PC4 y VO9), se hizo un AM usando las secuencias publicadas de *Psychodiella* sp. (*Ps. tobbi*, *Ps. sergenti* y *Ps. chagasi*). Este análisis reveló regiones conservadas y variables entre las secuencias de las tres especies de *Psychodiella*. En la Figura 17 se indican los *mismatches* con círculos, y las regiones abarcadas por las pirosecuencias NYQ/PC4 y VO9 se muestran entre flechas. En esta figura se observó que la mayor parte de los ~1700 nt se encuentran conservados en las tres especies de *Psychodiella*, las cuales sólo se diferencian en algunos *mismatches* (Figura 17). Sin embargo, también se observó que *Ps. chagasi* difiere de las otras dos especies en una región variable (indicada con un recuadro) donde la secuencia de *Ps. chagasi* presenta 5 nt que tienen *mismatches* con los de las otras dos especies. El resto de los nt tienen al menos alguna coincidencia con las secuencias de *Ps. sergenti* o *Ps. tobbi*, o con ambas. Todos los círculos señalan *mismatches* en la secuencia de *Ps. chagasi* con respecto a las otras dos especies.

Figura 17. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas depositadas en GenBank del género *Psychodiella* spp. Referencias: círculos: *mismatches*; flechas verdes: pirosecuencias NYQ y PC4; recuadro: región variable entre las tres secuencias de *Psychodiella* spp.; flechas rojas: pirosecuencia VO9.



Para tener una visión aún más general de las pirosecuencias estudiadas, se construyó un esquema (Figura 18) donde se comparan las regiones involucradas, entre sí y con la secuencia de referencia de *Ps. chagasi*, así como sus largos y orientaciones.

Figura 18. Esquema de todas las pirosecuencias analizadas junto con la secuencia de referencia de *Ps. chagasi*. Referencias: rectángulo violeta: región variable; flecha roja: VO9; flecha amarilla: VDC (hebra -); flecha azul: NYQ y PC4.



De todos estos análisis se concluyó que las secuencias NYQ y PC4 eran las óptimas para el diseño de cebadores del género *Psychodiella*, debido a que incluían una región conservada suficientemente larga entre las tres especies analizadas (Figuras 14, 17 y 18). Por otro lado, presentaban valores de E-value excelentes y una identidad del 100 % (Tabla 5).

Asimismo, se identificó una región variable entre las tres secuencias de referencia (recuadro Figura 17, y rectángulo violeta Figura 18). Esta región comprende los nucleótidos 678 a 703 de la secuencia FJ865354 y fue considerada ideal para el diseño de cebadores para la identificación de *Ps. chagasi* (especie específicos).

1.2 Diseño de cebadores diagnósticos para *Psychodiella* sp. (PsyF/PsyR)

Una vez determinadas las pirosecuencias óptimas (NYQ y PC4) para el diseño de cebadores diagnósticos a nivel género (*Psychodiella*), se procedió a su diseño. El programa utilizado (Oligo 7) generó varios cebadores que fueron seleccionados de acuerdo a las siguientes características:

- Longitud mayor o igual a 18 nt;
- Probabilidad reducida o nula de formación de *hairpin* o dímeros;
- Producto de amplificación mayor a 200 pb.

Respetando dichas características se eligieron los cebadores 11F y 12R, con un amplicon teórico de 207 pb. En la Figura A (Anexo I) y en Materiales y Métodos (M y M) se muestran las características de cada cebador (secuencia nucleotídica, longitud de cada uno, ausencia de formación de estructuras secundarias y temperatura de *melting*). En el caso de los cebadores elegidos, el producto teórico fue de 207 pb usando como molde las secuencias NYQ y PC4. La temperatura de hibridación óptima de 51,3 °C (máxima 62,1 °C), y la ausencia de estructura secundaria, se indican en la Figura B (Anexo I). Además de estos datos el programa brindó la posición del amplicón, esquema de amplificación, porcentaje GC, etc.

1.3 Análisis *in silico* de los cebadores diagnósticos

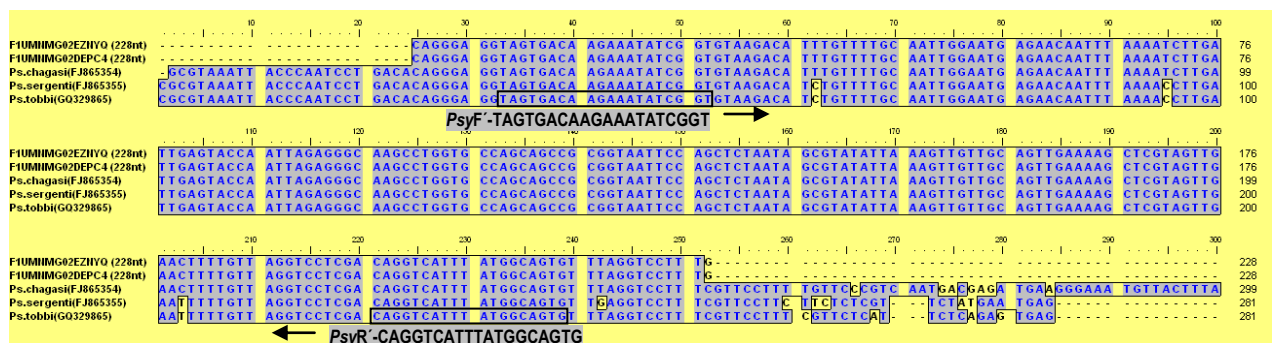
Continuando con el análisis *in silico* de los cebadores diseñados 11F y 12R, se evaluó su especificidad teórica, primero a nivel género y luego a nivel filo, a través del análisis comparativo de varias secuencias.

Especificidad teórica a nivel género

Se realizó un AM de las secuencias publicadas (*Ps. sergenti*, *Ps. tobbi* y *Ps. chagasi*) con las dos pirosecuencias ambientales (NYQ y PC4) (Figura 19). Se observó que ambos cebadores 11F y 12R hibridarían con todas las secuencias de *Psychodiella*, tanto las del NCBI como las ambientales.

Los cebadores 11F y 12R fueron renombrados *PsyF* y *PsyR*, respectivamente.

Figura 19. Alineamiento múltiple de las pirosecuencias NYQ y PC4 con las secuencias de referencia del GenBank. También se indican los cebadores *PsyF* y *PsyR*. Nota: Para poder visualizar el cebador reverse en el alineamiento se usó la secuencia reversa complementaria.



Especificidad teórica a nivel filo

La especificidad *in silico* a nivel filo se analizó a través de un AM donde se compararon las secuencias de gregarinos y otros apicomplejos. El AM se realizó con las secuencias de referencia de varios de los taxones encontrados previamente (McCarthy *et al.*, 2011), así como de otros apicomplejos más distantes evolutivamente y dinoflagelados. Los taxones incluidos en este análisis se muestran en la Tabla 6, especificando su clasificación taxonómica, número de acceso del GenBank y el organismo hospedador.

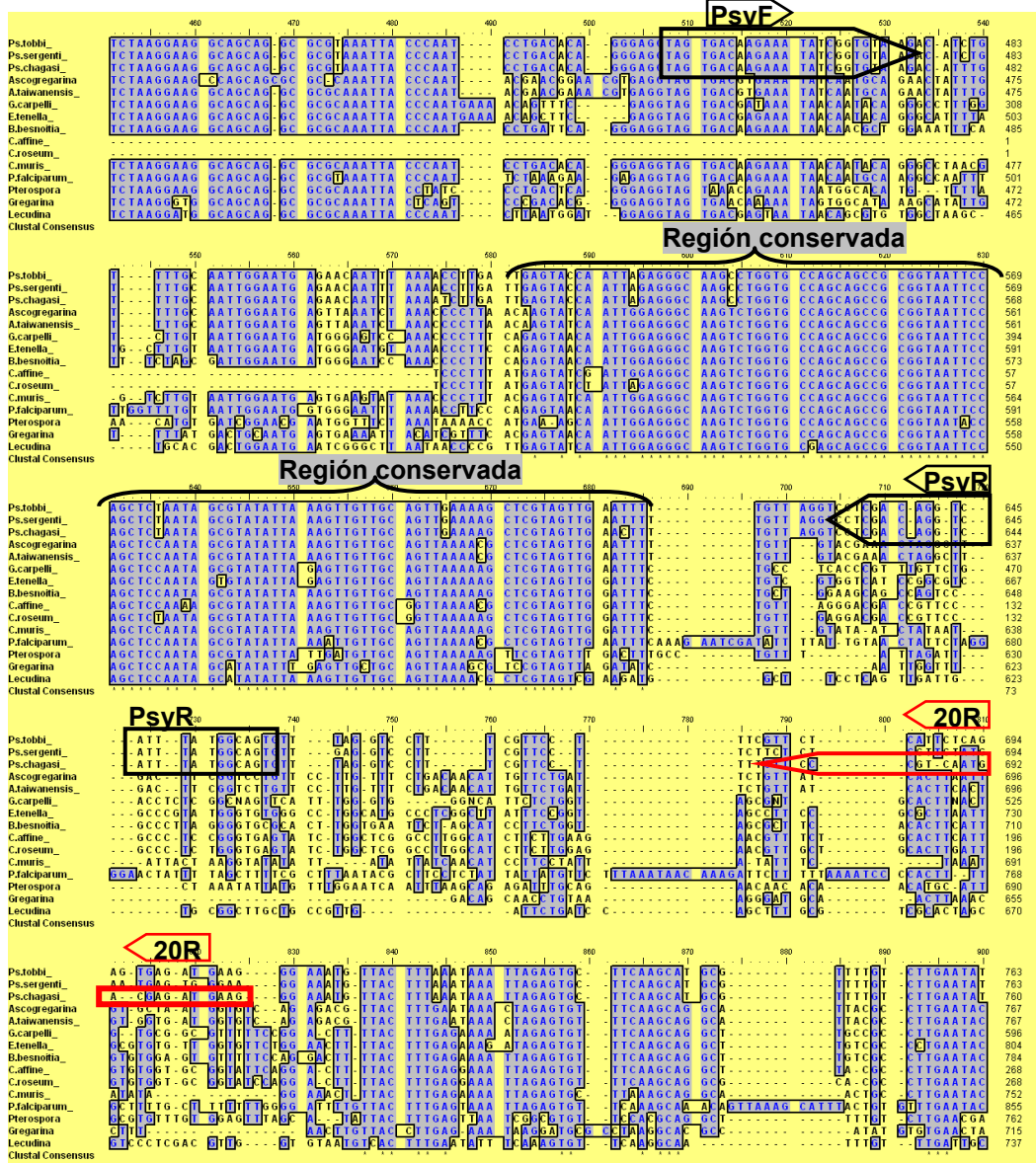
Tabla 6. Taxones usados para analizar la especificidad teórica de los cebadores *PsyF/PsyR*.

Especies (Clase y Orden ^a , número de acceso)	Organismo hospedador
<i>Ascogregarina sp.</i> (E, DQ462458)	<i>Ochlerotatus japonicus</i>
<i>Ascogregarina taiwanensis</i> (Japan) (E, DQ462454)	<i>Aedes albopictus</i>
<i>Ps. chagasi</i> (E, FJ865354)	<i>Lu. longipalpis</i>
<i>Ps. sergenti</i> (Lantova et al., 2010) (E, FJ865355)	<i>Phlebotomus sergenti</i>
<i>Ps. tobbi</i> (Lantova et al., 2010) (E, GQ329865)	<i>Phlebotomus tobbi</i>
<i>Lecudina polymorpha</i> type 2 (E, AY196707)	<i>Lumbrineris sp.</i>
<i>Pterospora floridiensis</i> (E, DQ093794)	<i>Axiiothella mucosa</i>
<i>Gregarina niphandrodes</i> (E, AF129882)	<i>Tenebrio molitor</i>
<i>Besnoitia besnoiti</i> (Spain) (C, DQ227420)	Desconocido
<i>Eimeria tenella</i> (Houghton strain) (C, AF026388)	<i>Gallus gallus</i>
<i>Goussia carpelli</i> (C, GU479640)	<i>Cyprinus carpio</i>
<i>Chytridium affine</i> (D, FJ473380)	Huevos de Copépodos
<i>Chytridium roseum</i> (D, FJ663049)	Huevos de Copépodos
<i>Cryptosporidium muris</i> (C, AF093498)	mamíferos
<i>Plasmodium falciparum</i> (A, AL844504)	<i>Anopheles sp.</i>

^a E: Clase Gregarina, Orden Eugregarinida; N: Clase Gregarina, Orden Neogregarinorida; C: Clase Coccidia, Orden Eucoccidiorida; A: Clase Aconoidasida, Orden Haemosporida; D: Clase Dinophyceae, Orden Coccidiales; P: Clase Dinophyceae, Orden Prorocentrales y G: Clase Dinophyceae, Orden Gymnodiniales.

Este análisis (Figura 20) indicó que los cebadores *PsyF/PsyR* sólo amplificarían las tres secuencias pertenecientes a *Ps. chagasi*, *Ps. sergenti* y *Ps. tobbi*. Esto se debe a que el amplicón teórico comprende una región central conservada, flanqueada por dos regiones variables en las cuales intervienen los dos cebadores diseñados. El cebador *reverse PsyR* involucra una región totalmente variable y el cebador *forward PsyF* en cambio presenta algunos nucleótidos conservados.

Figura 20. Alineamiento múltiple de las secuencias de referencia de diversos apicomplejos. Las secuencias de los cebadores género-específicos se recuadran en negro; con línea roja se señala el cebador especie-específico descrito más adelante (Capítulo 4).



De este análisis se concluye que las tres especies del género *Psychodiella* secuenciadas hasta la fecha, presentan regiones idénticas entre sí donde se ubican los cebadores *PsyF/PsyR*. El AM de las secuencias de *Psychodiella* sp. con algunos de los otros apicomplejos identificados previamente en *Lu. longipalpis* (McCarthy *et al.*, 2011), y con otros protistas evolutivamente distantes, mostró que esta región del gen ARNr SSU de *Psychodiella* tiene diferencias significativas con las secuencias de los otros protistas (Figura 20).

Conjuntamente se analizó la posible hibridación teórica de los cebadores *PsyF/PsyR* con cada uno de los taxones estudiados en el AM de la Figura 20. Para

ello, se usó el programa Oligo 7 con cada una de las secuencias nucleotídicas provenientes del GenBank. Los taxones analizados fueron *Ascogregarina* sp. (DQ462458), *A. taiwanensis* (DQ462454), *G. carpelli* (GU479640), *E. tenella* (AF026388), *B. besnoiti* (DQ227420), *C. affine* (FJ473380), *C. roseum* (FJ663049), *C. muris* (AF093498), *P. falciparum* (AL844504), *P. floridensis* (DQ093794), *G. niphandrodes* (AF129882) y *L. polymorpha* (AY196707). No se generó un amplicón teórico en ninguno de estos taxones, confirmando la especificidad teórica de los cebadores diseñados (resultados no mostrados).

1.4 Validación *in vitro* de los cebadores diagnósticos

La siguiente sección muestra los resultados de la validación *in vitro* de los cebadores *PsyF/PsyR*: los productos de PCR resultantes de las amplificaciones usando dichos cebadores con las muestras de ADNc originales, fueron clonados para posteriormente ser secuenciados, y así poder confirmar la detección de *Psychodiella* sp.

Amplificación por PCR de ADNc con los cebadores género específicos

Se comenzó con el análisis por PCR de los cebadores diseñados, buscando optimizar la amplificación y obtener el producto de PCR esperado. Se realizaron amplificaciones usando la temperatura de hibridación óptima de los cebadores *PsyF/PsyR*. Cada una de las amplificaciones fue visualizada en gel de agarosa 1%.

En una primera instancia, se sometieron a una amplificación por PCR las muestras de ADNc obtenidas a partir de la extracción de ARN total de hembras y machos de *Lu. longipalpis* provenientes de Posadas (SS1 y SS2, respectivamente). La muestra de ADNc de machos de Posadas (SS2) fue la única donde se generó un producto de PCR nítido y bien definido, de aproximadamente 200 pb. Conjuntamente se verificó la especificidad de los cebadores usando como molde el ADNc de las hembras y machos de Cueva de Lapinha, Brasil (PP1 y PP2, respectivamente). Se utilizaron dos diluciones de las diferentes muestras (1:20 y 1:100), y sólo se obtuvo amplificación en la muestra SS2 (Figura 21). No se observó amplificación en el resto de las muestras donde previamente no fue identificada *Ps. chagasi*. El análisis que incluye a la muestra SS1 se observa en Figura 26 (más adelante).

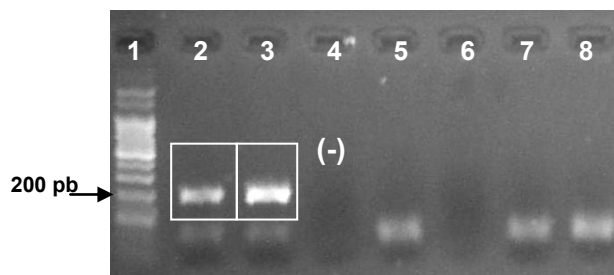


Figura 21. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores *PsyF* y *PsyR*. Orden de siembra: 1. marcador de peso molecular (PM) de 100pb. La banda más intensa del marcador corresponde a 500 pb. 2. SS2 dilución 1:100; 3. SS2 dilución 1:20; 4. Control negativo (agua); 5. PP2 dilución 1:100; 6. PP2 dilución 1:20; 7. PP1 dilución 1:100; 8. PP1 dilución 1:20.

Debido a la intensidad del producto de PCR y ausencia de bandas inespecíficas, se continuó con el clonado del amplicón para su posterior secuenciación.

Clonado del producto de amplificación

El producto de amplificación obtenido usando la muestra SS2 con los cebadores *PsyF/PsyR* fue utilizado para ser clonado. Previamente se purificó a partir de un gel de agarosa usando el protocolo detallado en M y M. El producto purificado se clonó en el vector pZERO™-2 (Invitrogen), previamente digerido con la enzima de restricción *EcoRV* (ver M y M). La ligación se realizó utilizando relaciones molares vector:inserto de 5:1, y el constructo fue transformado en células *E. coli* Top 10 siguiendo las indicaciones descritas en M y M. Las colonias transformadas se analizaron extrayendo el ADN plasmídico y digiriéndolo con la enzima *PvuII*. En la Figura 22 se esquematiza la estrategia de clonado llevada a cabo utilizando los cebadores *PsyF/PsyR*. El amplicón de 207 pb generó un clon recombinante de 3504 pb.

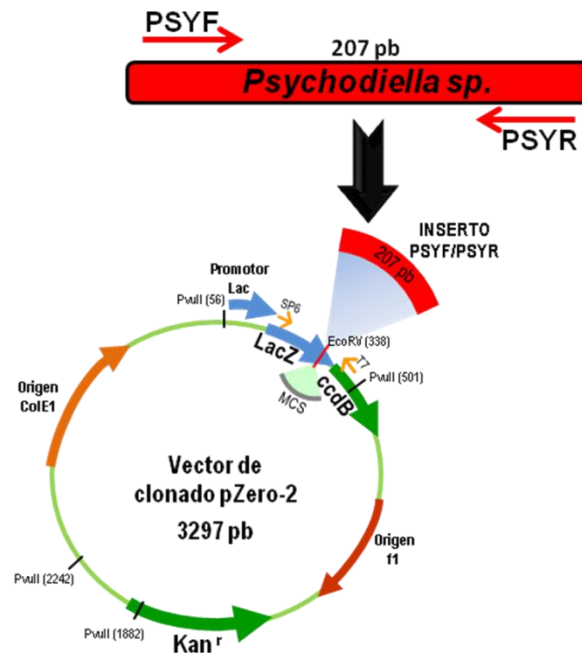


Figura 22. Estrategia de clonado del producto de PCR generado por los cebadores *PsyF/PsyR*, de 207 pb (rectángulo rojo). El fragmento de interés se ligó al plásmido pZERO™-2 de 3297 pb, generando un clon recombinante de 3504 pb. La enzima de restricción usada para la confirmación de los clones recombinantes fue *PvuII*. LacZ: ORF perteneciente al gen lacZ; ccdB: ORF perteneciente al gen letal ccdB; MCS: sitio de clonado múltiple, permite la inserción del inserto deseado interrumpiendo la expresión del gen lacZ-ccdB; SP6: sitio de hibridación del cebador universal SP6 para secuenciamiento; T7: sitio de hibridación del cebador universal T7 para secuenciamiento; Kan^r: resistencia a Kanamicina; Promotor Lac: permite inducir la expresión del gen fusión LacZ-ccdB.

Los posibles clones que contenían el plásmido recombinante fueron enumerados desde 50 hasta 93, y de estas 40 colonias crecidas en placa, 21 correspondieron a verdaderos clones recombinantes. En la figura 23 se observan algunas de las extracciones de ADN plasmídico obtenidas de las colonias.

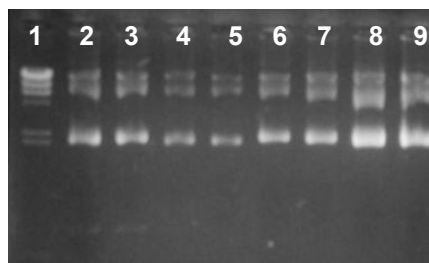


Figura 23. Extracción de ADN plasmídico de posibles clones recombinantes. Orden de siembra: 1. PM: Lambda/*HindIII*; 2 y 3. colonia 90; 4 y 5. colonia 91; 6 y 7. colonia 92; 8 y 9. colonia 93.

Como ya se mencionó, los clones recombinantes fueron analizados mediante digestión enzimática simple del ADN plasmídico con *PvuII*. Las digestiones se incubaron durante 16 horas a 37 °C y los fragmentos generados se separaron en un gel de agarosa 1 %. De estos resultados se obtuvieron 21 clones con el patrón de restricción deseado: 1381, 814, 652 y 360 pb. En la Figura 24 se observa el resultado de la digestión con el constructo correspondiente al clon recombinante. Particularmente en las calles 5, 7, 10 y 11 se observan los fragmentos generados por los clones 64, 69, 82 y 86 debido al clonado de los 207 pb (Figura 24 A y B), mostrando el patrón de bandas esperado.

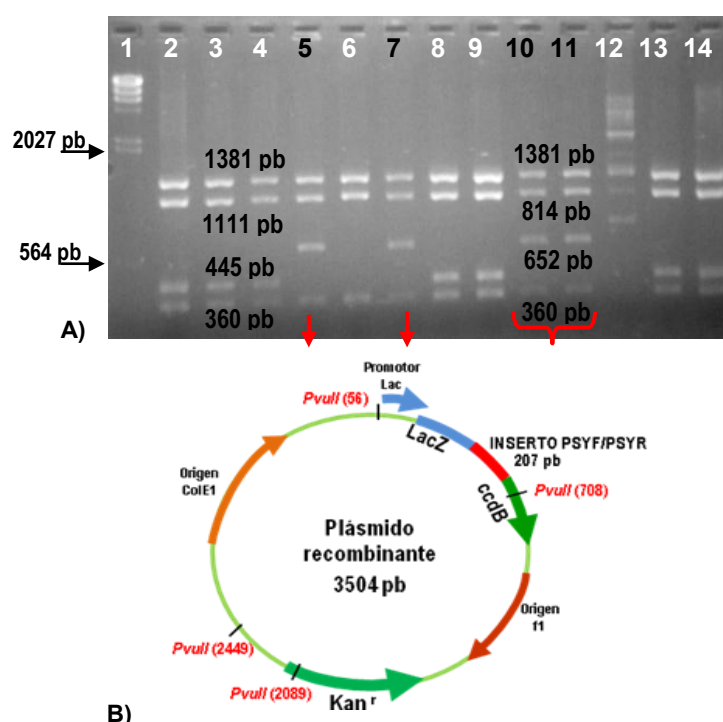


Figura 24. A) Digestión enzimática de los clones recombinantes. Orden de siembra: 1. PM: Lambda/*HindIII*; 2. vector plasmídico, pZERO-2; 3. colonia 62; 4. colonia 63; 5. clon 64; 6. colonia 65; 7. clon 69; 8. colonia 76; 9. colonia 77; 10. clon 82; 11. clon 86; 12. colonia 87; 13. colonia 88; 14. Vector plasmídico, pZERO-2. **B) Esquema del Plásmido recombinante.**

Secuenciamiento de los clones recombinantes

Seguidamente se secuenciaron 8 de los clones recombinantes, obteniéndose cromatogramas de muy buena calidad (Tabla E, Anexo I). A partir de estas secuencias se realizaron búsquedas por homología con BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) contra la base de datos nucleotídica no redundante del NCBI (BD:nt).

Las búsquedas por homología dieron *hit* con *Psychodiella chagasi* (small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; FJ865354) con muy buenos valores de E-

value e identidad del 100 %. En la Figura 25 se muestra el resultado del clon 50, cuya secuencia fue depositada en GenBank (JX963638).

Figura 25. Resultado de la búsqueda por homología de la secuencia del clon 50.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ865354.1	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	250	250	92%	2e-63	100%
GQ329865.1	<i>Psychodiella</i> sp. JIV-2009b small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	239	239	92%	4e-60	98%
FJ865355.1	<i>Psychodiella</i> sp. JIV-2009a small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	239	239	92%	4e-60	98%
HQ219436.1	Uncultured Chytridiomycota clone AY2009D13 18S ribosomal RNA gene, internal tr	176	176	71%	3e-41	97%

Tres de las muestras de ADNc (SS1, PP1 y PP2) se sometieron nuevamente a una amplificación por PCR con *PsyF/PsyR*, bajo las condiciones de reacción óptimas y utilizando uno de los clones recombinantes como control positivo (Figura 26). Sólo se observó producto de amplificación a la altura esperada en el clon recombinante (~207 pb). En el resto de las muestras no se observó amplificación, confirmando lo previsto según los resultados de las pirosecuencias.

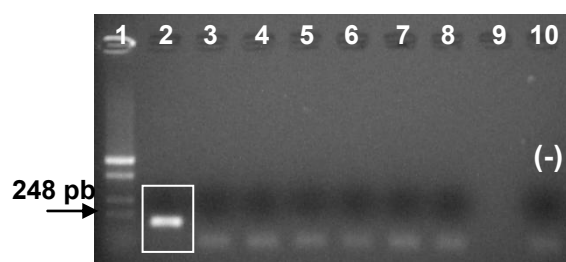


Figura 26. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores *PsyF-PsyR*. Orden de siembra: **1.** PM: pZ2-*Haell*; **2.** control positivo, clon 50 dilución 1:100; **3.** SS1 dilución 1:20; **4.** SS1 dilución 1:100; **5.** PP1 dilución 1:20; **6.** PP1 dilución 1:100; **7.** PP2 dilución 1:20; **8.** PP2 dilución 1:100; **9.** vacía; **10.** Control negativo (agua).

Por consiguiente, los resultados obtenidos mediante la estrategia hasta aquí descrita, confirmaron la especificidad de los cebadores *PsyF-PsyR* para identificar *Psychodiella* sp. Sin embargo, hasta aquí habían sido probados únicamente en las muestras originales de ADNc.

Control de especificidad de los cebadores *PsyF/PsyR*

Se continuó con los ensayos de especificidad, bajo las mismas condiciones de reacción, usando ADN de otro apicomplejo (*P. falciparum*). El laboratorio de Entomología del Centro de Investigación René Rachou (Fundación Oswaldo Cruz, Brasil) proporcionó ADN de diferentes cepas de *P. falciparum* (NF 54, 134, 44, S20 y 99). Cada una fue probada usando la muestra concentrada y varias diluciones de las

mismas. Estos resultados se resumen en la Figura 27, en donde no se observó amplificación con *PsyF/PsyR* en todas las cepas (en esta figura sólo se muestra la dilución 1:100 de las cepas de *P. falciparum*).

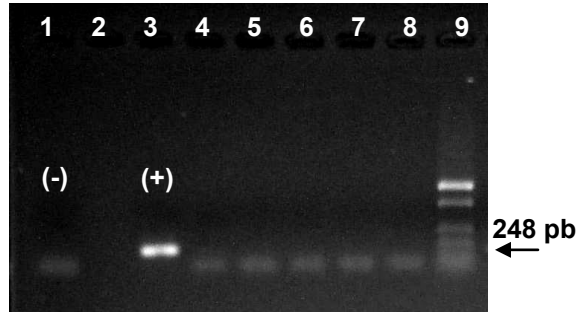


Figura 27. Amplificación con los cebadores *PsyF/PsyR*. Orden de siembra: **1.** Control negativo; **2.** Vacía; **3.** Control positivo, Clon 64 dilución 1:100; **4.** Pf NF54 dilución 1:100; **5.** Pf S20 dilución 1:100; **6.** Pf 44 dilución 1:100; **7.** Pf 99 dilución 1:100; **8.** Pf 134 dilución 1:100; **9.** PM: pZ2-*Haell*.

De esta manera, este ensayo *in vitro* confirmó la especificidad teórica a nivel género de *PsyF/PsyR*, observada previamente en el análisis *in silico*, ya que no hubo amplificación con ADN de otro apicomplejo (*P. falciparum*).

CAPÍTULO 2. Validación a campo de los cebadores diagnósticos.

Los resultados presentados en este capítulo forman parte de una presentación a Congreso (Caligiuri et al., 2012) y de una publicación científica (Caligiuri et al., 2014).

Para continuar con la validación de los cebadores diseñados (*PsyF/PsyR*), se los evaluó de la siguiente manera:

- Con muestras compuestas por una menor cantidad de flebótomos (10, 5 y 1 ejemplares por muestra, en contraposición a los 100 ejemplares analizados originalmente);
- Con ADN total extraído de flebótomos capturados (en lugar de ADNc);
- En muestras de flebótomos donde la infección gregarina se había confirmado por microscopía.

El laboratorio donde se desarrolló esta tesis (Laboratorio de Metagenómica de Microorganismos, Centro Regional de Estudios Genómicos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP) forma parte de la Red de Investigación de la Leishmaniasis en Argentina (REDILA). La REDILA nuclea varios grupos de investigación en el país que estudian esta enfermedad infecciosa desde enfoques diversos. Dos de los grupos de investigación que forman parte de esta Red (Instituto Municipal de Vigilancia y Control de Vectores, Municipalidad de Posadas, Misiones; y Laboratorio de Biología Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones), proveyeron las muestras que fueron analizadas en este Capítulo.

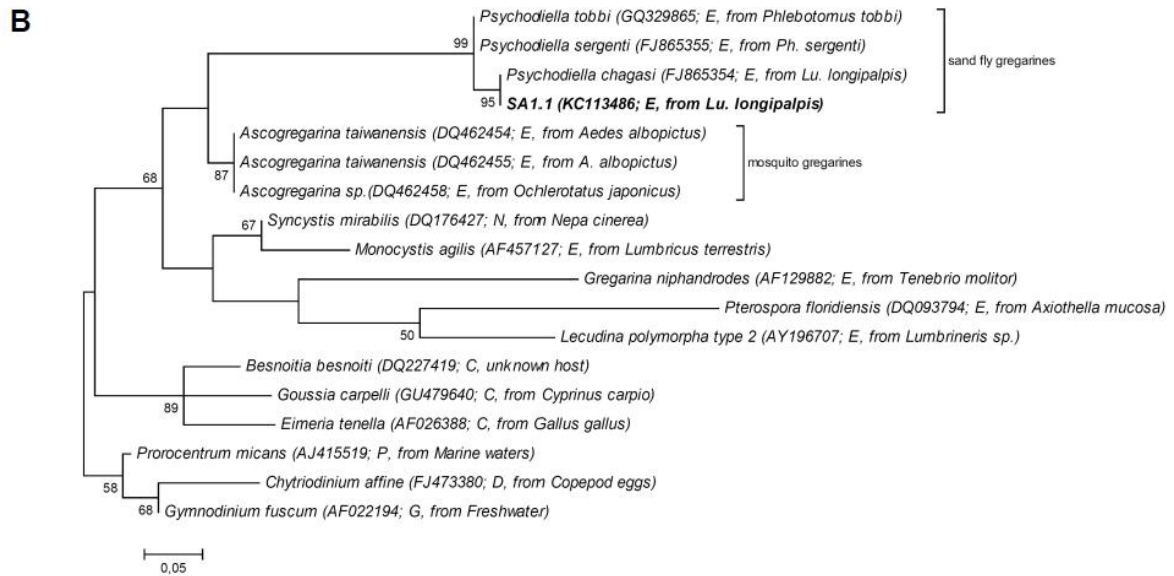
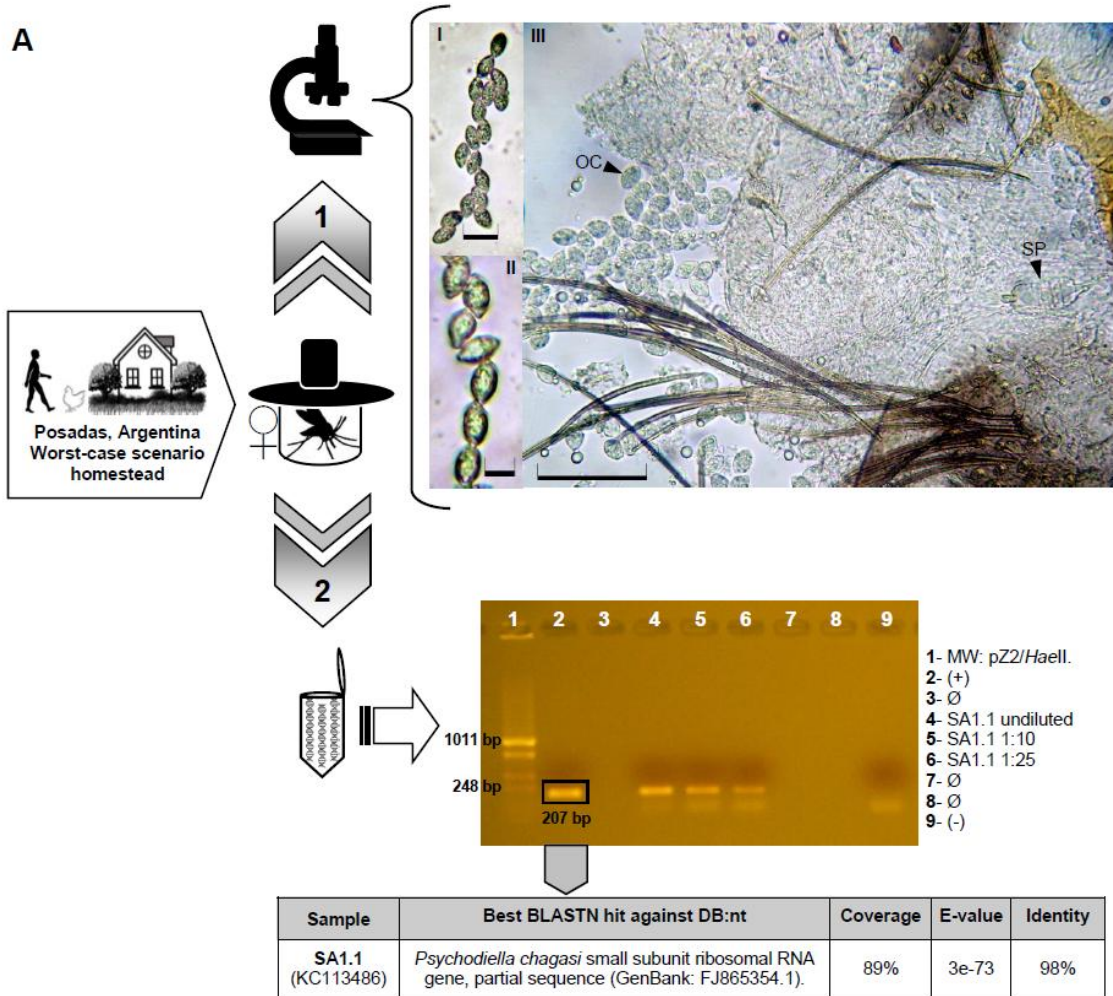
Resumen del Capítulo 2: La siguiente figura sintetiza la estrategia descrita en este capítulo para la validación a campo de los cebadores diagnósticos *Psyf/PsyR* (Caligiuri et al., 2014).

Figura 28. Validación a campo del ensayo diagnóstico basado en PCR para la identificación de gregarinos en *Lu. longipalpis*.

A) *Muestreo de flebótomos, extracción de ADN total, amplificación por PCR y secuenciamiento.* Captura de hembras de *Lu. longipalpis* en peridomicilios en situación de “peor escenario” (ver M y M) en la ciudad de Posadas. (1) Las disecciones de rutina y el análisis por microscopía de las hembras capturadas mostraron que 6 de ellas estaban parasitadas por gregarinos. Las fotografías muestran los ooquistes de *Ps. chagasi* encontrados en una de las hembras. Barras de escala: 20 μm (I), 10 μm (II) y 50 μm (III). OC: ooquistes; SP: espermateca. (2) Se extrajo ADN total de las hembras infectadas y se sometió a amplificación por PCR con los cebadores

PsyF/PsyR. Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa 1%, donde se observó una única banda del tamaño esperado (207 pb) en las diferentes diluciones. El producto de PCR fue secuenciado y analizado con BLASTN contra DB:nt (Altschul *et al.*, 1990). Se muestra el mejor *hit* de las búsquedas por homología. PM: Marcador de peso molecular, pZErO™-2 digerido con *Hae*II; (+): control positivo, clon 206 (= clon 50; JX963638) dilución 1:100; SA1.1 (sin diluir, diluciones 1:10 y 1:25): ADN total extraído de 5 hembras infectadas de Posadas; Ø: calle vacía; (-): control negativo.

B) *Análisis filogenético utilizando el método de Máxima Similitud (ML)*. La historia evolutiva se infirió usando el método de ML basado en el modelo de sustitución nucleotídica Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985). La secuencia utilizada para realizar este análisis evolutivo está resaltada en negrita (SA1.1). Los gregarinos que parasitan flebótomos y mosquitos se indican con corchetes.



2.1 Muestreo y recolección de *Lu. longipalpis* adultos

En esta etapa de validación se usaron un total de 6 lotes conteniendo 10 flebótomos cada uno, y un lote con 6 ejemplares.

Cuatro de estos lotes (KS), provistos por el Instituto Municipal de Vigilancia y Control de Vectores (Municipalidad de Posadas, Misiones), fueron capturados en la ciudad de Posadas en 5 peridomicilios diferentes, durante Noviembre de 2011. Dos lotes de 10 ejemplares correspondían a una captura realizada en Posadas en Mayo de 2009 (CM) (ver detalles en M y M).

El séptimo lote estaba compuesto por 6 hembras infectadas con gregarinos, capturadas en Posadas durante Diciembre de 2010, que fueron provistas por el Laboratorio de Biología Molecular Aplicada (Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones).

2.2 Análisis por microscopía de hembras infectadas

Durante la identificación taxonómica por microscopía óptica de 59 hembras de *Lu. longipalpis*, capturadas durante un muestreo realizado para otros estudios en Posadas durante Diciembre de 2010, se encontraron 6 hembras parasitadas por *Ps. chagasi* (hasta 100 ooquistes por hembra). Las 6 hembras infectadas fueron separadas en 2 muestras, SA1 (5 hembras) y 1SA (1 hembra).

Los ooquistes se analizaron por microscopía óptica a través del registro fotográfico de estas muestras. La Figura 29 muestra algunas de las imágenes de los ooquistes hallados, señalando con una flecha negra uno de los ooquistes (OC), como también la espermateca de la hembra (SP). A partir de las fotografías tomadas, se pudieron analizar los ooquistes de estas hembras infectadas, comparando su tamaño y morfología con los datos publicados para tres especies del género *Psychodiella* (Lantova *et al.*, 2010). El análisis comprendió un recuento de los ooquistes y la medición de cada uno de ellos (ver M y M). Para cada ooquiste se midió el largo, el ancho, y se calculó la relación Largo / Ancho, alcanzando 50 mediciones. En la Tabla 7 se muestran los valores medidos y su comparación con los valores publicados para *Ps. chagasi*. Los valores obtenidos se resumen en la siguiente fórmula:

$$(11.01 - 13.69) \mu\text{m} \times (7.3 - 8.84) \mu\text{m}$$

$$Q = (1.35 - 1.76); N = 50$$

$$\mathbf{Me = 12.57 \times 8.14 \mu\text{m}; Qe = 1.55}$$

Valores mínimo y máximo de largo y ancho entre paréntesis, respectivamente, en negrita se señala el tamaño promedio (Me) de los ooquistes. Q es la relación

Largo / Ancho, parámetro medido por los autores de referencia (Lantova *et al.*, 2010), y Q_e corresponde al valor promedio de Q .

Se realizó un test-T para diferentes tamaños muestrales y diferentes varianzas, para comparar las medias (L, A y L/A) entre ooquistes de *Lu. longipalpis* de Posadas (ooquistes de Posadas) y los ooquistes de *Ps. chagasi*, *Ps. tobbi*, y *Ps. sergenti* (Lantova *et al.*, 2010). Los ooquistes de Posadas eran significativamente diferentes de los ooquistes de *Ps. tobbi* y *Ps. sergenti* (L, A y L/A; no se muestran los resultados), indicando que los ooquistes de Posadas no correspondían a los ooquistes de ninguna de esas dos especies. Por otro lado, la diferencia entre los ooquistes de Posadas y los de *Ps. chagasi* no fue significativa ($p > 0.01$; Tabla 7), indicando que los ooquistes encontrados en las hembras de *Lu. longipalpis* de Posadas eran ooquistes de *Ps. chagasi* (Tabla 7). Por lo tanto, se pudo determinar que la infección observada en las hembras de *Lu. Longipalpis* de Posadas correspondía a *Ps. chagasi* en su estado ooquiste.



Figura 29. La disección de rutina y el análisis por microscopía óptica de 6 hembras de *Lu. longipalpis* mostró que estaban infectadas con gregarinos. Las fotografías muestran los ooquistes de *Ps. chagasi* en las hembras analizadas. Barras de escala: 20 µm (I), 10 µm (II) y 50 µm (III). OC: ooquistes; SP: espermateca.

Tabla 7. Comparación de los tamaños entre los ooquistes encontrados en *Lu. longipalpis* de Posadas y los ooquistes de *Ps. chagasi* (Lantova *et al.*, 2010).

Valores	Ooquistes	Media	Min.	Max	SD	t	df	p
L/A	Posadas	1.55	1.35	1.76	0.09	2.155	68.99	0.035
	<i>Ps. chagasi</i> (Lantova <i>et al.</i> , 2010)	1.52	1.41	1.68	0.06			
L	Posadas	12.57	11.01	13.69	0.59	1.476	60.51	0.145
	<i>Ps. chagasi</i> (Lantova <i>et al.</i> , 2010)	12.7	12.0	13.3	0.3			
A	Posadas	8.14	7.30	8.84	0.43	2.387	70.94	0.020
	<i>Ps. chagasi</i> (Lantova <i>et al.</i> , 2010)	8.3	7.3	8.9	0.3			

$N=50$ y $N=113$ corresponde al tamaño de muestra para los ooquistes de Posadas y *Ps. chagasi* (Lantova *et al.*, 2010), respectivamente. Las medidas se encuentran expresadas en μm . Largo (L); ancho (A) y relación largo/ancho (L/A); Min.: valor mínimo; Max.: valor máximo; SD: desviación estándar; t: valor t; df: grados de libertad; p: probabilidad bilateral.

2.3 Extracción de ADN total de flebotomos

En esta etapa de validación se usaron 6 lotes de 10 flebotomos cada uno (CM y KS), 1 lote de 5 flebotomos (SA1), y 1 lote de 1 sólo ejemplar (1SA). El análisis de los especímenes comenzó con la extracción del ADN total. Los lotes analizados fueron sometidos a diferentes protocolos de extracción de ADN total, según Acardi (A) (Acardi *et al.*, 2010) y según Golczer (G) (Golczer y Arrivillaga, 2008) (ver M y M).

También se evaluó un tercer protocolo, utilizando como base el protocolo de Golczer con una leve modificación (GM) (ver M y M). A continuación se detalla con qué protocolo fue procesado cada lote:

CM1: protocolos (A) y (G).

KS1: protocolo (A).

KS2: protocolos (A), (G) y (GM).

SA1: protocolo (A).

1SA: protocolo (A).

Para confirmar que las extracciones de ADN habían sido exitosas, se utilizó un control interno de amplificación usando cebadores específicos de bibliografía (ver abajo).

Control Interno de las extracciones de ADN total: gen *cacophony*

Se utilizaron cebadores dirigidos al gen *cacophony* de *Lutzomyia* spp. (Peixoto *et al.*, 2001; Lins *et al.*, 2002) para realizar un control interno de las extracciones de ADN y de las amplificaciones realizadas. Se usaron los cebadores específicos 5Llcac y 3Llcac (Peixoto *et al.*, 2001; Lins *et al.*, 2002) (renombrados 44F y 45R, respectivamente), que amplifican una porción de la región IVS6 del gen *cacophony* en flebótomos del género *Lutzomyia* spp., y cuyo producto de amplificación es de 225 pb.

Los 8 lotes procesados (1SA-A, SA1-A, KS1-A, KS2-A, KS2-G, KS2-GM, CM1-G y CM1-A) fueron sometidos a una amplificación con los cebadores 44F/45R, y en todos los casos se obtuvo un fragmento del tamaño esperado (225 pb), con buena intensidad y nitidez. Para optimizar las reacciones de amplificación con estos cebadores, se ensayaron diferentes condiciones: amplificaciones sin BSA y con 2 mM de MgCl₂, con 3 mg/ml de BSA y 2,5 mM de MgCl₂, y distintas diluciones de las muestras (1:10, 1:25 y 1:50) con 0,1 mg/ml de BSA y 2,5 mM de MgCl₂. Con estas últimas condiciones se alcanzó una amplificación óptima para cada muestra analizada (Figuras 30 y 31).

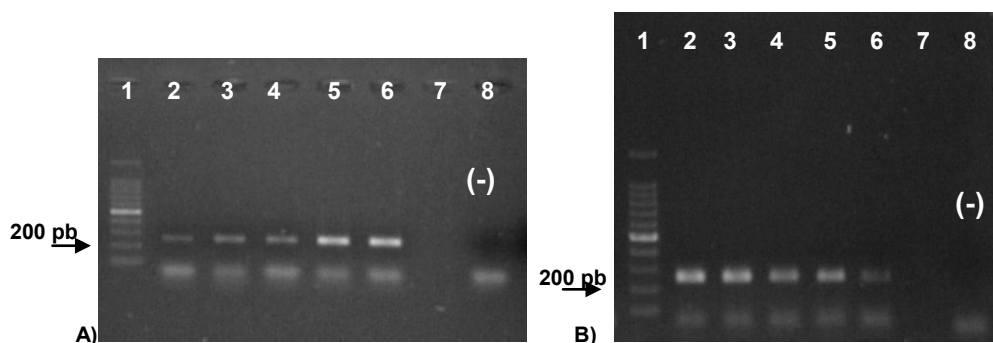


Figura 30. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 44F/45R. **A)** Orden de siembra: 1. PM de 100 pb; 2. CM1-G dilución 1:50; 3. CM1-A dilución 1:10; 4. CM1-A dilución 1:25; 5. CM1-G dilución 1:10; 6. CM1-G dilución 1:25; 7. vacía; 8. control negativo. **B)** Orden de siembra: 1. PM de 100 pb; 2. control positivo, CM1-G dilución 1:50; 3. KS2-A dilución 1:10; 4. KS2-A dilución 1:25; 5. KS2-G dilución 1:10; 6. KS2-G dilución 1:25; 7. vacía; 8. control negativo (agua).

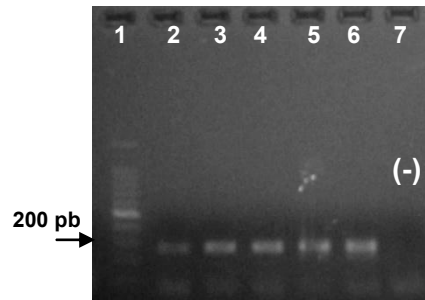


Figura 31. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 44F/45R. Orden de siembra: **1.** PM de 100 pb; **2.** control positivo, CM1-G dilución 1:50; **3.** KS1-A, dilución 1:10; **4.** KS1-A, dilución 1:25; **5.** KS2-GM dilución 1:10; **6.** KS2-GM dilución 1:25; **7.** control negativo (agua).

Se realizaron los mismos controles internos para las muestras de hembras infectadas con ooquistes (SA1 y 1SA) (Figura 32 A y B). Se obtuvo una buena amplificación en la muestra de 5 ejemplares (SA1), y una amplificación mucho más tenue en la muestra de un sólo ejemplar (1SA).

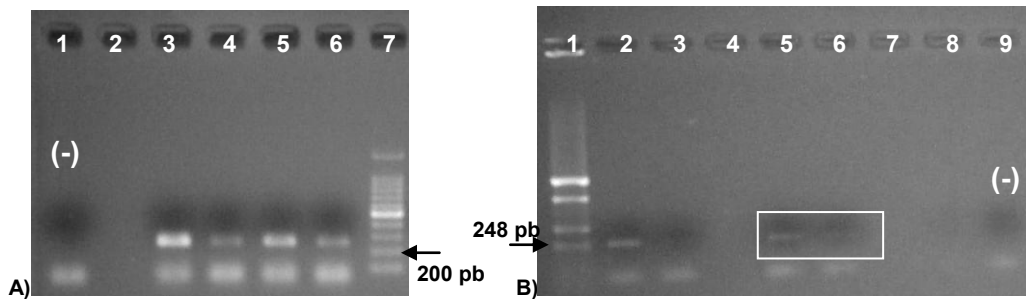


Figura 32. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 44F/45R. A) Orden de siembra: **1.** Control negativo (agua); **2.** Vacía; **3.** CM1-G dilución 1:25; **4.** CM1-G dilución 1:50; **5.** SA1-A dilución 1:10; **6.** SA1-A dilución 1:25; **7.** PM de 100 pb. B) Orden de siembra: **1.** PM: pZ2-Haell; **2.** control positivo, CM1-G dilución 1:25; **3.** CM1-G dilución 1:50; **4.** vacía; **5.** 1SA dilución 1:10; **6.** 1SA dilución 1:25; **7 y 8.** vacía; **9.** Control negativo.

2.4 Amplificación por PCR y secuenciamiento

Luego de optimizar las reacciones de amplificación para el control interno, se continuó con las amplificaciones por PCR usando los cebadores diagnósticos (*PsyF/PsyR*). Como control positivo de todas las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR*, se utilizó el clon 50 ya secuenciado y confirmado por BLASTN (JX963638) (Capítulo 1).

Las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR* de las hembras infectadas con *Ps. chagasi* (SA1 y 1SA), mostraron el producto de PCR esperado (Figura 33).

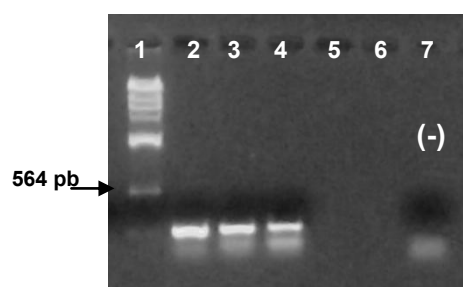


Figura 33. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR*. Orden de siembra: 1. PM: λ -*HindIII*; 2. control positivo, clon 50 dilución 1:100; 3. SA1 dilución 1:10; 4. 1SA dilución 1:10; 5 y 6. Vacías; 7. Control negativo (agua).

También se obtuvo amplificación con los lotes KS1 y KS2 (de 10 flebótomos cada uno), y los productos de PCR presentaron buena intensidad y nitidez en las condiciones óptimas de reacción (2,5 mM de $MgCl_2$ y 0,1mg/ml de BSA). Las muestras CM1-A y CM1-G (de 10 flebótomos cada una) también presentaron amplificación, aunque el producto de PCR fue de menor intensidad (Figura 34). Esto se puede haber debido a que, a diferencia de los ejemplares KS, que estaban almacenados a $-20^\circ C$ en etanol 70% desde el año 2012, los adultos CM habían sido directamente congelados a $-20^\circ C$ en el año 2009.

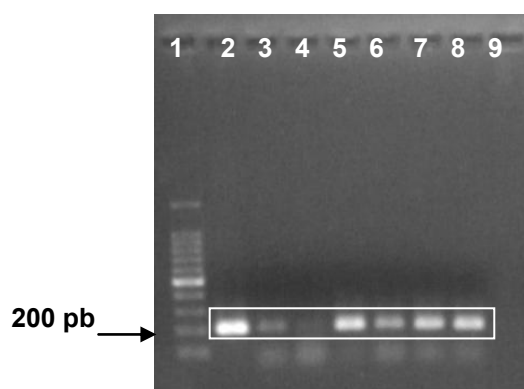


Figura 34. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR*. Orden de siembra: 1. PM de 100pb; 2. control positivo, clon 50 dilución 1:100; 3. CM1-A dilución 1:5; 4. CM1-G dilución 1:5; 5. KS1-A dilución 1:25; 6. KS2-A dilución 1:25; 7. KS2-G dilución 1:25; 8. KS2-GM dilución 1:25; 9. vacía.

Estos productos de amplificación obtenidos a partir de hembras y machos de *Lu. longipalpis*, fueron secuenciados (Macrogen) usando un único cebador para todas las muestras, excepto para KS1 donde se usaron ambos cebadores (*PsyF* y *PsyR*). Las secuencias obtenidas se analizaron con BLASTN (BD:nt) y mostraron homología con *Ps. chagasi* (Tablas 8 y F (Anexo I)).

Tabla 8. Resultados de la búsqueda por homología mediante BLASTN contra la base de datos nucleotídica no redundante del NCBI (BD: nt).

Muestra	Hit	Score	E-value	Identidad
CM1-A	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (GenBank: FJ865354).	291	2e-75	99%
CM1-G		152	7e-34	95%
KS1-A		408	9e-76	97%
KS2-A		292	4e-76	97%
KS2-G		298	9e-78	97%
KS2-GM		285	7e-74	97%
SA1-A		283	3e-73	98%

Las secuencias de los siete lotes de flebótomos mostraron homología con *Psychodiella* sp. En particular, para la muestra SA1 se obtuvo un cromatograma de excelente calidad (Figura C, Anexo I), confirmándose la presencia de *Ps. chagasi*, que había sido validada también mediante el análisis por microscopía. Por consiguiente, se confirmó la detección del gregarino en la muestra 1SA.

En el caso de las muestras CM1-G y KS2-GM los cromatogramas fueron de muy baja calidad, lo cual repercutió en el resultado de la búsqueda por homología. Aunque se obtuvo el *hit* esperado, los valores de E-value y % de cobertura fueron relativamente pobres. Para el resto de las muestras los cromatogramas fueron de muy buena calidad y los resultados de la búsqueda por homología también fueron óptimos (Tabla 8).

Debido a la baja calidad del cromatograma de la muestra KS2-GM, se realizó un nuevo secuenciamiento a partir de una nueva amplificación. También se volvió a amplificar la muestra CM1-G, pero como no se logró una buena amplificación, no se volvió a secuenciar. El cromatograma resultante del nuevo secuenciamiento de la muestra KS2-GM se presenta en la Figura D (Anexo I). La secuencia se sometió a una búsqueda por homología que dió *hit* con *Psychodiella chagasi* (FJ865354), con un E-value de 7e-74 y un 97% de identidad.

Se continuaron analizando ejemplares de *Lu. longipalpis* de Posadas, con el objetivo de determinar el nivel de parasitemia en los especímenes capturados. Estas extracciones se realizaron según el protocolo de Acardi a partir de lotes de 5 y 10 flebótomos. Las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR* indicaron que todos los lotes procesados (CM1.5, CM1.10, KS1.5, KS1.10 y KS2.5) estaban infectados

con *Psychodiella* sp., excepto la muestra KS2.10 que no presentó amplificación por PCR (Figura 35).

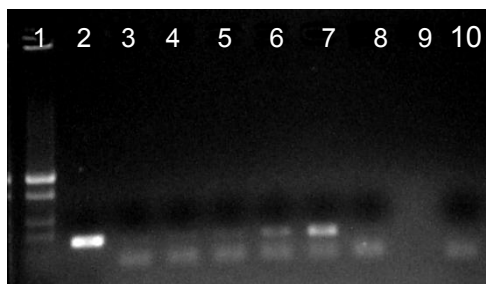


Figura 35. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR*. Orden de siembra: **1.** PM: pZ2-*Haell*; **2.** Control positivo, clon 50 dilución 1:100; **3.** CM1.5 dilución 1:25; **4.** CM1.10 dilución 1:25; **5.** KS1.5 dilución 1:25; **6.** KS1.10 dilución 1:25; **7.** KS2.5 dilución 1:25; **8.** KS2.10 dilución 1:25; **9.** Vacía; **10.** Control negativo (agua).

Límite de detección de los cebadores *PsyF/PsyR*

A partir del ADN extraído de la muestra 1SA (1 hembra infectada con *Ps. chagasi*), se realizó el análisis del límite de detección de los cebadores *PsyF/PsyR* mediante diluciones seriadas de la muestra (10^{-1} hasta 10^{-4}), como se ha descrito previamente (Acardi *et al.*, 2010). En la Figura 36 se pueden observar los productos de amplificación obtenidos, llegando el límite de detección a la dilución 10^{-3} (calle 4), el cual se estimó en 0,1 femtogramos. Siguiendo el razonamiento de Acardi *et al.* (2010), considerando que el contenido total de ADN de *Ps. chagasi* es similar al de *A. taiwanensis* dada su cercanía filogenética (aproximadamente 22 femtogramos por genoma, (Templeton *et al.*, 2010)), y teniendo en cuenta que el límite de detección del ensayo se calculó en 0,1 femtogramos, se estima que este ensayo puede fácilmente detectar el genoma de un gregarino por flebótomo, haciéndolo un método diagnóstico mucho más sensible que la microscopía convencional (Caligiuri *et al.*, 2014).

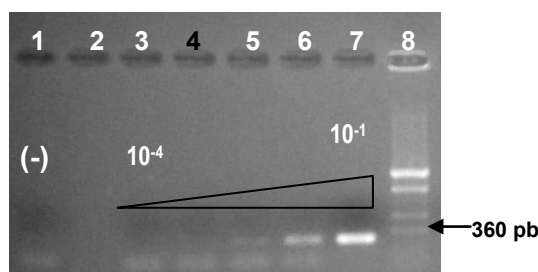


Figura 36. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR*. Orden de siembra: **1.** control negativo (agua); **2.** Vacía; **3.** 1SA dilución 1:10.000; **4.** 1SA dilución

1:1.000; 5. 1SA dilución 1:100; 6. 1SA dilución 1:10; 7. Control positivo, clon 50 dilución 1:100; 8. PM: pZ2-Pvull.

2.5 Análisis filogenético de las secuencias amplificadas por PCR

Se realizó un análisis filogenético de todas las secuencias de *Ps. chagasi* obtenidas a partir de *Lu. longipalpis* de Posadas (SA1-A; KS1-A; KS2-A; KS2-G; KS2-GM; CM1-A y CM1-G), para determinar su posición filogenética.

Para la construcción de los árboles filogenéticos (Figuras 37 y 38) se empleó el método de *Maximum Likelihood* mediante el modelo de evolución HKY (Hasegawa *et al.*, 1985). Este análisis fue acompañado de secuencias obtenidas del NCBI utilizadas en un AF de referencia publicado previamente (Votypka *et al.*, 2009), además de otras secuencias elegidas para este análisis. El conjunto de secuencias incluyó, además de las secuencias correspondientes a las muestras procesadas (SA1-A; KS1-A; KS2-A; KS2-G; KS2-GM; CM1-A y CM1-G), 14 secuencias de apicomplejos (*Ps. tobbi* NA Q329865, *Ps. sergenti* NA FJ865355, *Ps. chagasi* NA FJ865354, *Ascogregarina taiwanensis* NA DQ462454, *A. taiwanensis* NA DQ462455, *Ascogregarina* sp. NA DQ462458, *Syncystis mirabilis* NA DQ176427, *Monocystis agilis* NA AF457127, *Gregarina niphandrodes* NA AF129882, *Pterospira floridiensis* NA DQ093794, *Lecudina polymorpha* type 2 NA AY196707, *Besnoitia besnoiti* NA DQ227419, *Goussia carpelli* NA GU479640 y *Eimeria tenella* NA AF026388) y 3 secuencias de dinoflagelados usadas como *outgroups* (*Prorocentrum micans* NA AJ415519, *Chytriodinium affine* NA FJ473380 y *Gymnodinium fuscum* NA AF022194). En las figuras 37 y 38, junto a cada uno de los taxones utilizados se detalla el NA, el organismo hospedador y su clasificación taxonómica (manteniendo las abreviaturas de la tabla 6, Capítulo 1).

Las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético (AF) fueron sometidas a varias ediciones mediante el programa BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y alineadas usando ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). El modelo de sustitución óptimo para cada conjunto de secuencias fue seleccionado por el programa JModelTest versión 0.1.1 (Posada y Buckley, 2004; Posada, 2008). Finalmente, los AF fueron construidos y editados mediante el programa Mega 5 versión 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) lográndose la topología filogenética obtenida en las Figuras 37 y 38. Sobre las ramas se indican los valores de *bootstrap* mayores a 50.

Este análisis demostró que las secuencias de *Ps. chagasi* obtenidas a partir de *Lu. longipalpis* de Posadas, analizadas individualmente (sólo SA1; Figura 37) o en conjunto (SA1-A, KS1-A, KS2-A, KS2-G, KS2-GM y CM1-A; Figura 38), forman un

clado bien soportado con la secuencia publicada de *Ps. chagasi*. Por ende, este análisis confirmó su relación cercana con esta especie del Nuevo Mundo detectada previamente en *Lu. longipalpis* de Brasil. Inicialmente, se generó un AF con los mismos taxones especificados anteriormente, pero únicamente con la secuencia obtenida de SA1 (Figura 37), el cual mostró robustez en el nodo de *Ps. chagasi* con valores de *bootstrap* mayores a 90%. Cuando se incluyeron todas las muestras secuenciadas, se obtuvo la misma topología pero con valores de *bootstrap* levemente menores (73%, Figura 38). En las figuras, la nomenclatura .1 corresponde a la muestra procesada con el protocolo de Acardi (por ejemplo, SA1.1), .2 a la muestra procesada con el protocolo de Golczer, y .3 al protocolo de Golczer Modificado.

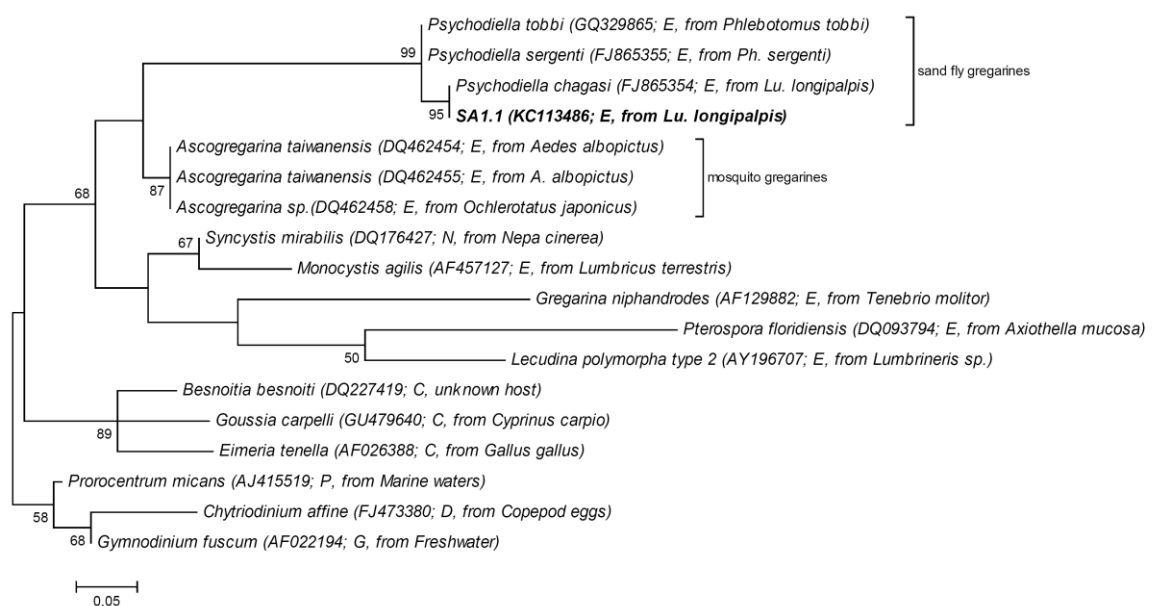


Figura 37. Análisis filogenético de una sola muestra (SA1) mediante el método de *Maximum Likelihood*. La historia evolutiva se infirió usando el método *Maximum Likelihood* con el modelo de sustitución nucleotídica Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985). El árbol consenso fue inferido a partir de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). El porcentaje de *bootstrap* se muestra sobre las ramas. El árbol está dibujado a escala y el largo de las ramas corresponde al número de sustituciones por sitio. El análisis involucró a 18 secuencias nucleotídicas. Hubo un total de 138 posiciones en el conjunto final de datos, eliminando los *gaps*. El análisis evolutivo se realizó en MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

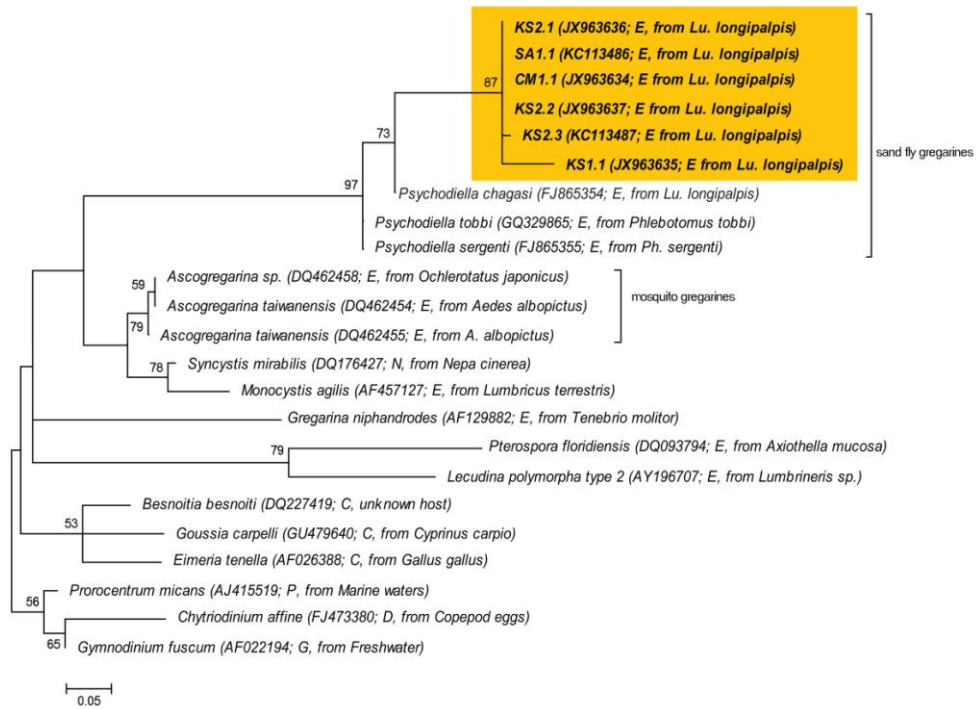


Figura 38. Análisis filogenético de todas las muestras mediante el método de *Maximum Likelihood*. La historia evolutiva se infirió usando el método *Maximum Likelihood* con el modelo de sustitución nucleotídica Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985). El árbol está dibujado a escala y el largo de las ramas corresponde al número de sustituciones por sitio. El análisis involucró a 23 secuencias nucleotídicas. Hubo un total de 136 posiciones en el conjunto final de datos, eliminando los *gaps*. El análisis evolutivo se realizó en MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

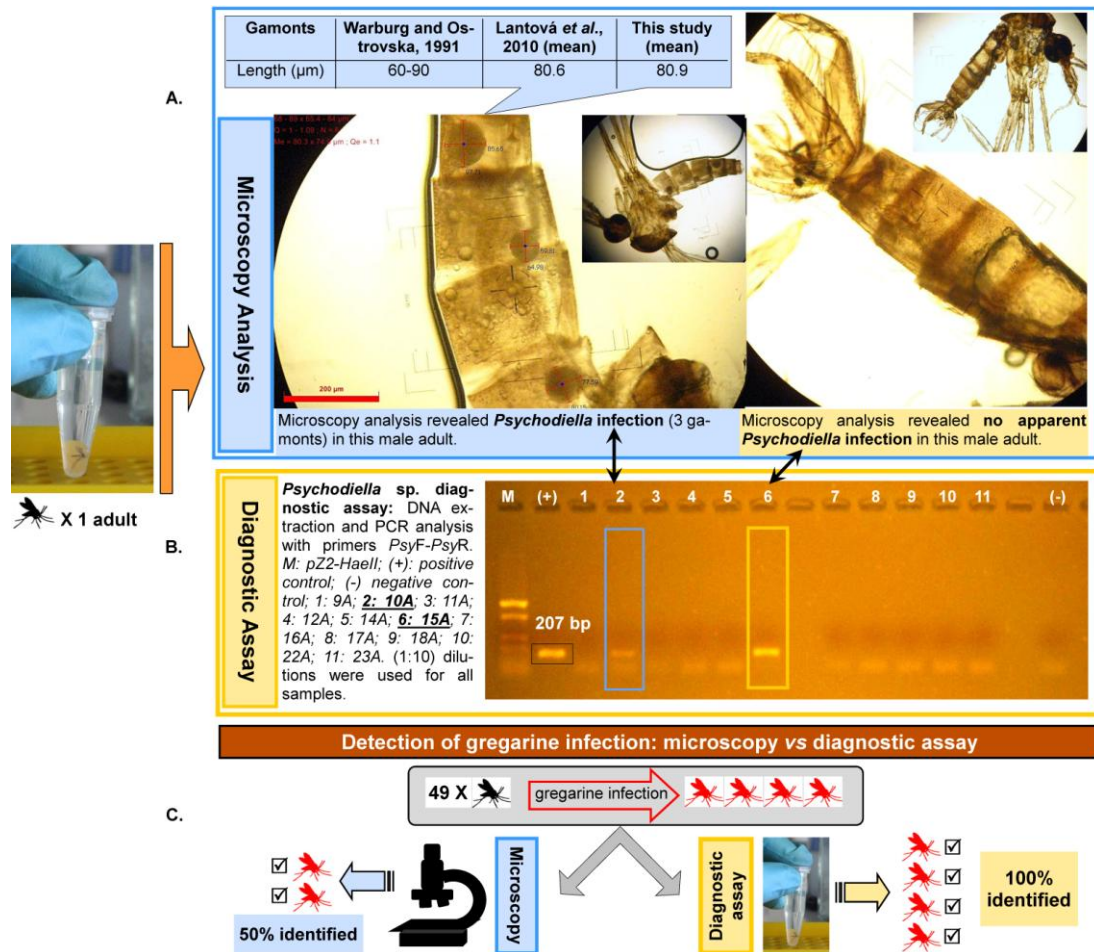
CAPÍTULO 3. Análisis de la versatilidad de los cebadores para ensayos a campo

Los resultados presentados en este capítulo forman parte de una presentación científica (Caligiuri et al., 2014).

En los Capítulos 1 y 2 se describe el desarrollo de un ensayo diagnóstico basado en PCR para la detección de *Psychodiella* sp. en flebótomos adultos de la especie *Lu. longipalpis* (Caligiuri et al., 2014). En este Capítulo se describen los resultados del análisis de la versatilidad de este ensayo en una extensa cantidad de flebótomos capturados a campo en Argentina (Posadas) y en Brasil (diversas localidades). Asimismo, se comprobó la eficacia del ensayo para el diagnóstico de infecciones en muestras compuestas por 1 sólo ejemplar, realizándose un análisis comparativo con las observaciones al microscopio de cada uno de los ejemplares analizados.

Resumen del Capítulo 3: La siguiente figura sintetiza parte de los resultados descritos en este capítulo (Caligiuri et al., 2014):

Figura 39. Análisis de la versatilidad para estudios de campo del ensayo diagnóstico desarrollado. (A) Análisis por microscopía óptica de cada flebótomo adulto para determinar presencia o ausencia de infección gregarina: la imagen de la izquierda (en celeste) muestra un adulto de *Lu. longipalpis* de Posadas donde se visualizaron gamontes de *Ps. chagasi*. La imagen de la derecha (en naranja) muestra otro macho de Posadas donde no se observó infección con gregarinos. (B) Análisis molecular de las muestras observadas al microscopio óptico (MO): se analizó por PCR el ADN total extraído en forma individual de cada adulto observado. Los recuadros celeste y naranja en la fotografía muestran los resultados de las amplificaciones con *PsyF/PsyR* para los machos de la izquierda y derecha en A), respectivamente. (C) Comparación de la eficiencia del análisis por MO y del ensayo diagnóstico desarrollado, para identificar infecciones gregarinas: de un total de 49 adultos de *Lu. longipalpis* de Posadas analizados individualmente por ambos métodos, 4 mostraron infección con *Psychodiella*. De éstos, sólo 2 (50%) fueron identificados por MO, mientras que el 100% fue identificado por nuestro ensayo diagnóstico.



3.1. Muestreo y recolección de diferentes especies de *Lutzomyia*

En esta etapa se analizaron al microscopio un total de 554 flebótomos capturados en el campo, 390 provenientes de Argentina y 164 provenientes de Brasil (Tabla 9). Los 390 ejemplares de Argentina correspondían a *Lu. longipalpis* y fueron capturados en Posadas (Tabla 9). Del total de 164 ejemplares de Brasil, 64 correspondían a *Lu. longipalpis*, y los 100 restantes a las especies *Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, *Lu. umbratilis* y *Lu. renei*, todas correspondientes a vectores de LC, excepto *Lu. renei* que no corresponde a un insecto-vector. Estos flebótomos fueron capturados en diferentes localidades de Brasil. En la Tabla 9 se detallan las cantidades de cada especie estudiada, diferenciando machos y hembras, y su procedencia.

Tabla 9. Listado de los ejemplares analizados bajo microscopio diferenciados por especie, sexo y procedencia.

Especie	Sexo	Ejemplares	Procedencia
<i>Lu. Intermedia</i> ^a	♂	19	Corte de Pedra, Bahía, Brasil
	♀	10	
<i>Lu. migonei</i> ^a	♂	14	Ceará, Brasil
	♀	10	
<i>Lu. umbratilis</i> ^a	♂	13	Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil
	♀	10	
<i>Lu. renei</i> ^b	♂	10	Lapinha, Minas Gerais, Brasil
	♀	14	
<i>Lu. longipalpis</i>	♂	12	Cavunge, Bahía, Brasil
	♀	11	
	♂	13	Jacobina, Bahía, Brasil
	♀	8	
	♂	10	Lapinha, Minas Gerais, Brasil
	♀	10	
<i>Lu. longipalpis</i>	♂	336	Posadas, Misiones, Argentina
	♀	54	

^a insecto-vector de LC; ^b No es vector.

3.2 Análisis por microscopía de los ejemplares capturados

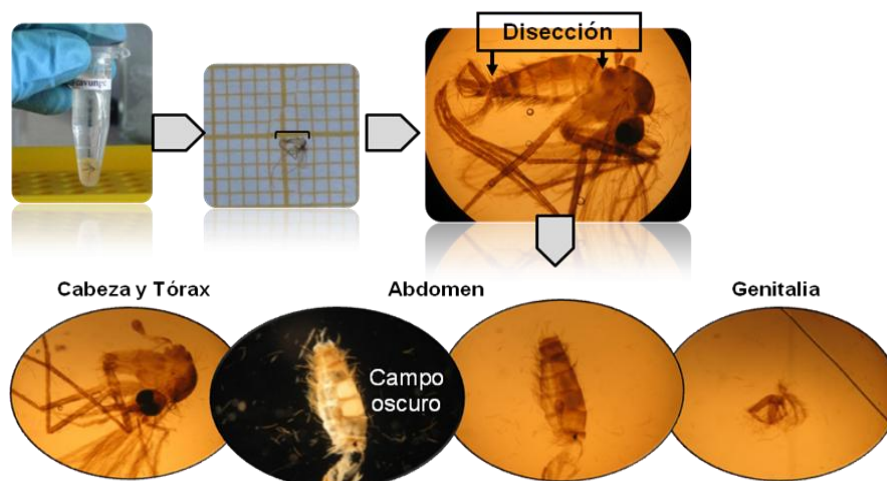
Si bien el análisis bajo microscopio de flebótomos adultos inicialmente no se iba a realizar, se consideró necesario llevar a cabo este estudio en paralelo con los ensayos de PCR, para validar de manera fehaciente los resultados moleculares. De esta manera, las observaciones bajo microscopio fueron cotejadas con los resultados de las amplificaciones por PCR, comprobando así la efectividad de los cebadores diseñados.

El análisis bajo microscopía óptica se llevó a cabo utilizando objetivos 10X, 20X y en algunos casos 40X. Todos los ejemplares fueron analizados bajo el mismo procedimiento, y se guardó un registro fotográfico de cada uno.

Como primera medida, se fotografió el flebótomo entero, sin disección, y en algunos casos se aplicó un corte sobre la parte anterior y posterior del abdomen (Figura 40). Específicamente en el caso de los machos, se los sometió a disección de la genitalia, pretendiendo de esta manera mejorar la visualización interna de los ejemplares. Cabe destacar que a las muestras no se les realizó ninguna tinción, sino que se usó el material directo, para no interferir con el análisis molecular posterior al que fue sometido cada ejemplar luego de ser observado al microscopio. Para optimizar la observación de cada flebótomo se utilizó un campo visual oscuro que evidenciaba más claramente la presencia o ausencia de parásitos. En la Figura 40 se

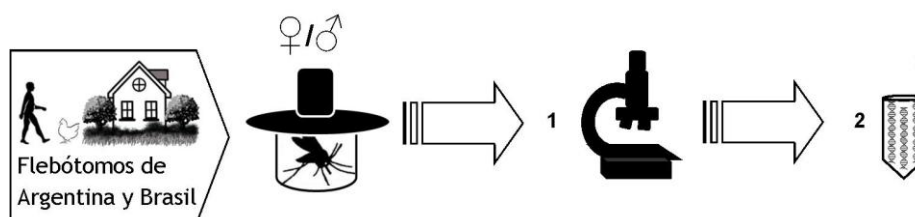
esquematiza el análisis por microscopía óptica que se realizó para la mayoría de los flebótomos.

Figura 40. Esquema del análisis realizado por microscopía óptica para la mayoría de los flebótomos. Aquí se muestra la disección de un macho adulto de *Lu. longipalpis* de Cavunge (Brasil). Todas las fotografías mostradas corresponden a un aumento 10X.



Luego de las disecciones y observaciones al microscopio, cada uno de los ejemplares se sometió a la extracción de ADN total desarrollada, para luego ser analizado por PCR. Este procedimiento se esquematiza en la Figura 41.

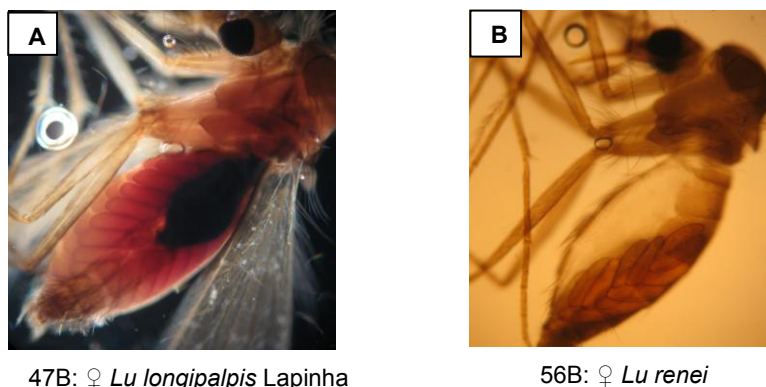
Figura 41. Esquema de la estrategia desarrollada para el análisis individual de flebótomos salvajes de Argentina y Brasil. 1: análisis por microscopía óptica, y 2: análisis molecular de los ejemplares.



Del total de 554 flebótomos observados al microscopio, algunos fueron analizados con mayor detalle por presentar características distintivas, y 149 fueron sometidos a extracción individual de ADN total para su posterior análisis por PCR. Utilizando el campo oscuro del microscopio, se encontró infección gregarina en algunos de los flebótomos salvajes. Los ejemplares con presencia de alguna estructura peculiar fueron clasificados de acuerdo a lo observado y analizados de manera particular. Por ejemplo, las hembras conteniendo huevos y/o sangre en el abdomen fueron fotografiadas y clasificadas, pero no fueron procesadas para el

análisis molecular. Algunos de estos ejemplares se muestran en la Figura 42. Por otro lado, aquellos machos donde se observaron glándulas secretoras de feromonas, fueron analizados por separado y los resultados de este análisis se describen en el apartado 3.5. Por último, los ejemplares con aparente infección del parásito se describen en la Tabla 11.

Figura 42. Fotografías de dos hembras del género *Lutzomyia*, con el abdomen lleno de sangre y huevos (A), y conteniendo sólo huevos (B). Las fotografías corresponden a un aumento 10X.



Infecciones con ooquistes y gamontes observados al microscopio

Como ya se ha mencionado, se analizó un total de 554 flebótomos adultos por microscopía óptica. De este total, 390 correspondían a *Lu. longipalpis* de Posadas (Misiones), y 164 a diferentes especies del género *Lutzomyia* de Brasil, de los cuales 64 eran *Lu. longipalpis* (Tabla 9).

De los 390 *Lu. longipalpis* de Posadas (336 machos y 54 hembras), se observó un total de 20 adultos parasitados con *Ps. chagasi*, 14 machos y 6 hembras. De estos 20 adultos, 13 presentaron el estado gamonte (todos machos), 1 presentó los estados gamonte y ooquiste (1 macho), y 6 presentaron el estado ooquiste (todas hembras; correspondientes a las muestras SA1 y 1SA analizadas en el Capítulo 2) (Tabla 10).

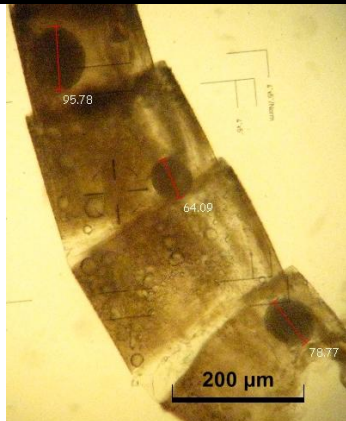
Tabla 10. Detalles de las infecciones con ooquistes y gamontes observadas al microscopio.

<i>Lu. longipalpis</i> de Posadas	Estado del parásito	Total adultos parasitados	Detalle de las muestras	Total adultos observados al MO
Machos	Gamonte	14	10 A, 13 A, 59 A, 208 A, 213 A, 241 A, 251 A, 253 A, 273 A, 279 A, 291 A, 314 A, 350 A, 386 A	336
	Ooquiste	1	13 A	
Hembras	Ooquiste	6	SA1 (5 hembras), 1SA	54
Total Adultos Infectados		20		390

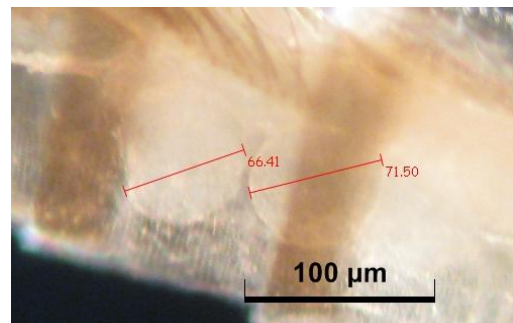
El análisis por microscopía de cada uno de los ejemplares infectados permitió medir la mayoría de los parásitos en cada estado observado del ciclo biológico. Todos los ejemplares con gamontes se incluyeron en la Tabla 11, donde se muestra el registro fotográfico de cada uno y las mediciones realizadas.

Tabla 11. Machos de *Lu. longipalpis* de Posadas infectados con el gregarino en estado gamonte.

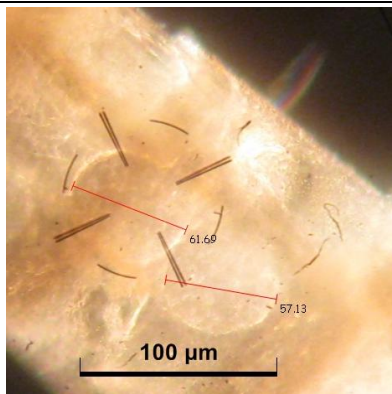
Mediciones de los gamontes



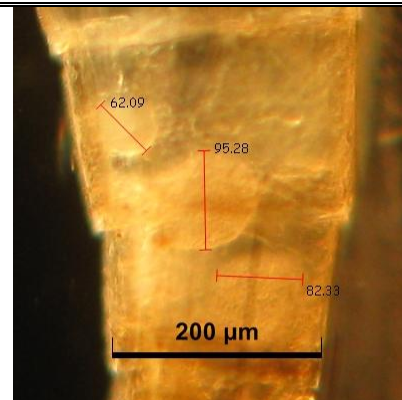
10 A: 95,78 µm, 64,09 µm y 78,77 µm.



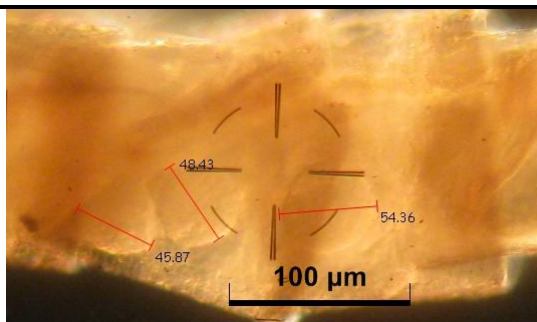
13 A: 66,41 µm y 71,50 µm.



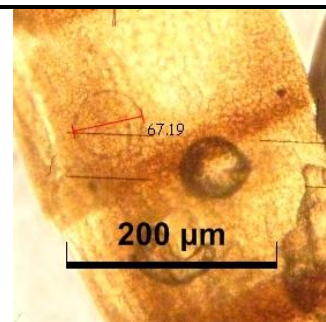
59 A: 61,69 µm y 57,13 µm.



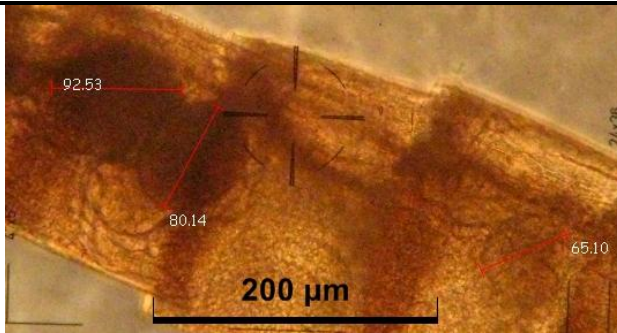
208 A: 62,09 µm; 95,28 µm y 82,33 µm.



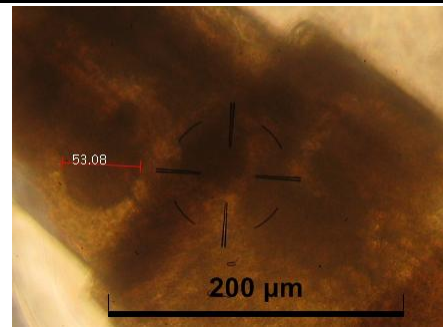
213 A: 45,87 µm; 48,43 µm y 54,36 µm.



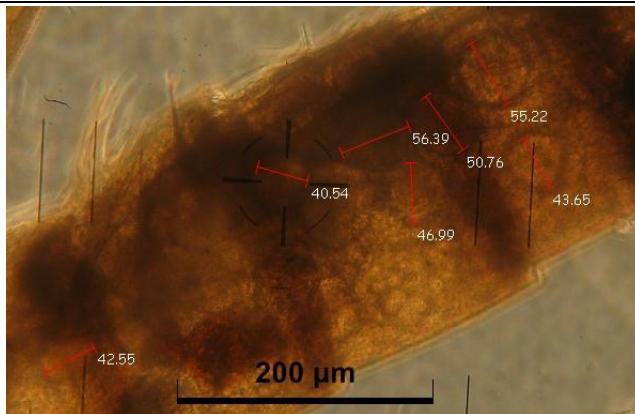
241 A: 67,19 µm.



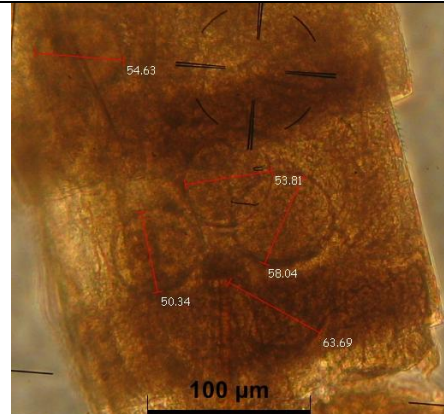
251 A: 92,53 µm; 80,14 µm y 65,10 µm.



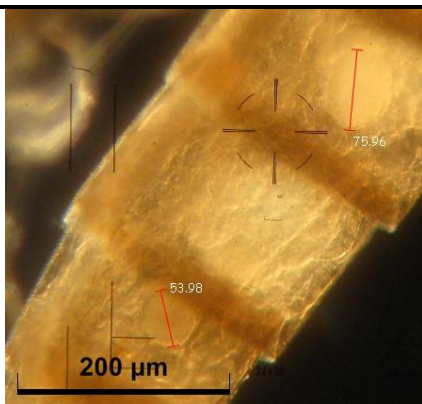
253 A: 53,08 µm.



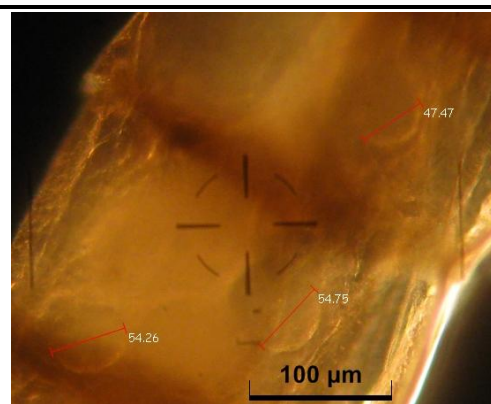
273 A: 42,55 µm; 40,54 µm; 46,99 µm; 56,39 µm; 50,76 µm; 55,22 µm y 43,65 µm.



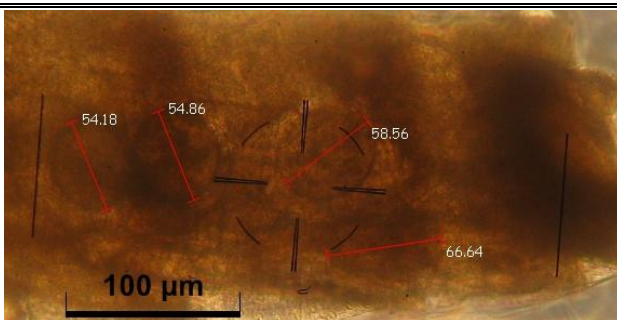
278 A: 54,63 µm; 53,81 µm; 50,34 µm; 58,04 µm y 63,69 µm.



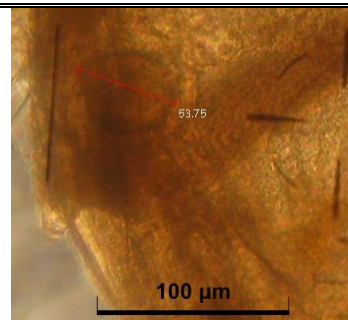
291 A: 75,96 µm y 53,98 µm.



314 A: 54,26 µm; 54,75 µm y 47,47 µm.



350 A: 54,18 µm; 54,86 µm; 58,56 µm y 66,64 µm.



386 A: 53,75 µm.

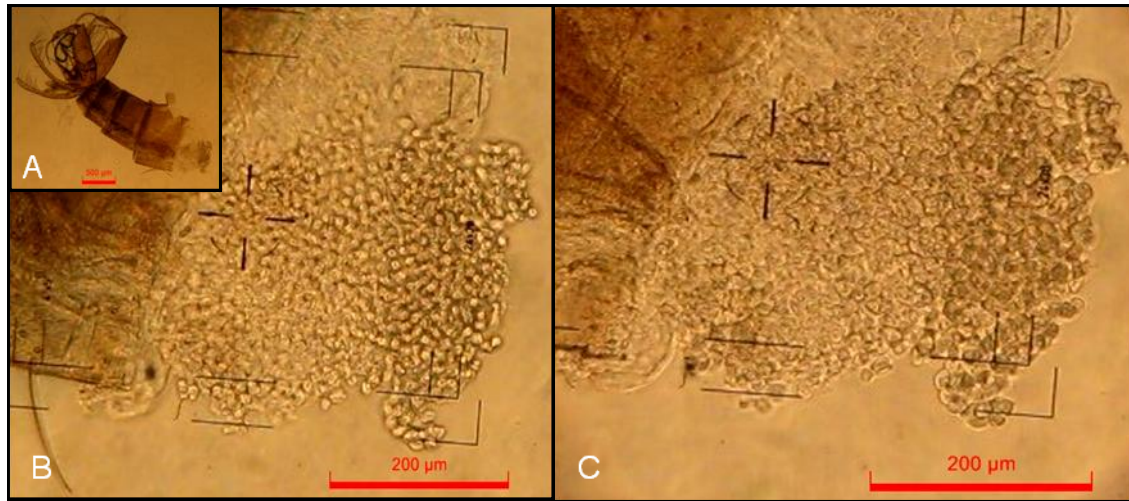
La especie se determinó por comparación con las medidas de referencia (Lantova *et al.*, 2010), al igual que se hizo anteriormente para los ooquistes (Capítulo 2). Las medidas publicadas (Lantova *et al.*, 2010) se compararon con las mediciones de los 14 ejemplares analizados (Tabla 11). Se logró medir un total de 40 parásitos, obteniéndose un valor promedio de 60,8 μm , con un valor mínimo de 40,54 μm y un valor máximo de 95,78 μm . En la Tabla 12 se comparan las mediciones de nuestro estudio con las establecidas por Lantova *et al.* (2010). Debido a que los valores mínimo y máximo se ajustan a los establecidos para el estado gamonte de *Ps. chagasi* (Lantova *et al.*, 2010), se pudo determinar que los parásitos hallados correspondían a este estado de *Ps. chagasi*.

Tabla 12. Cuadro comparativo entre las medidas de referencia de los gamontes y la medición realizada en nuestras muestras. N = cantidad de mediciones realizadas de los gregarinos. Min.= valor mínimo medido. Máx.= valor máximo medido.

Dimensiones	Gamontes	Promedio (μm)	Min. (μm)	Máx. (μm)	N
	<i>Ps. chagasi</i> en nuestro análisis	60,8	40,5	95,8	40
	<i>Ps. chagasi</i> (Lantova <i>et al.</i> , 2010)	80,6	25,5	168	133
	<i>Ps. sergenti</i> (Lantova <i>et al.</i> , 2010)	114,6	59	188	408
	<i>Ps. tobbi</i> (Lantova <i>et al.</i> , 2010)	123,6	54,5	204,1	188

En la muestra 13 A, además de los gamontes, se observaron ooquistes luego de realizar un corte transversal en el abdomen del flebótomo (Figura 43). Debido a la cercanía entre los ooquistes y su abundancia no se logró realizar la medición de los mismos.

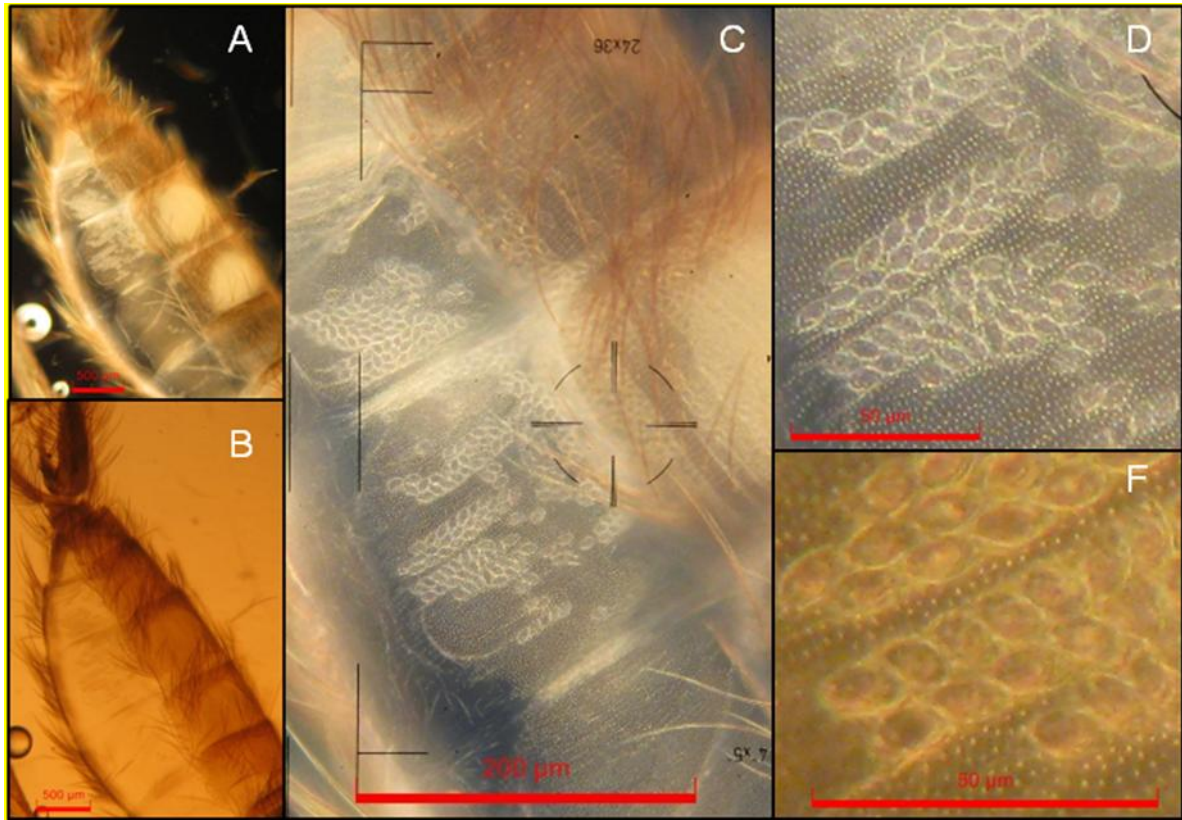
Figura 43. Macho adulto de *Lu. longipalpis* de Posadas (13 A) con infección de ooquistes en el abdomen. En A) se observa la imagen de la genitalia del macho y algunos segmentos abdominales (aumento 10 X). B) y C) muestran los ooquistes (aumento 40 X).



De los 164 adultos del género *Lutzomyia* capturados en diferentes localidades de Brasil, se observó infección con ooquistes de *Ps. chagasi* en un sólo macho de *Lu. longipalpis* (80B) capturado en Jacobina (Estado de Bahía). Sin embargo, cabe resaltar que no se han registrado previamente infecciones con *Ps. chagasi*, ni con otro gregarino, en las demás especies capturadas (*Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, *Lu. umbratilis* y *Lu. renei*).

Las imágenes del ejemplar registradas bajo campo oscuro se muestran en la Figura 44, en donde se observan las hileras de ooquistes en el IV y V segmento del abdomen (A). Además, en los segmentos abdominales III y IV, se observaron estructuras redondas de coloración blanca bajo contraste oscuro (desarrollado en el apartado 3.5), con una pronunciada hinchazón en el abdomen a la altura de dichos segmentos. En la Figura 44 se observa el flebótomo bajo campo oscuro (A) y campo claro (B), demostrando la importancia de la herramienta campo oscuro para distinguir la infección. En este ejemplar los ooquistes se observaron en hileras continuas (Figura 44 C-F).

Figura 44. *Lu .longipalpis* de Jacobina, Brasil (ejemplar 80B), con infección de ooquistes de *Ps. chagasi*. Flebótomo observado con aumentos 10 X, bajo campo oscuro (A) y campo claro (B), 20 X (C y D) y 40 X (F).



Este ejemplar infectado fue analizado en detalle, siendo sometido a un recuento de los ooquistes y a una medición de cada uno de ellos. Debido a la forma ahusada de los ooquistes se midió el largo y ancho de cada uno, alcanzando 80 mediciones. A continuación se muestra la formula obtenida de la misma manera que se hizo anteriormente con las muestras SA1 y 1SA de Posadas. Los valores mínimo y máximo del largo y ancho, respectivamente, se muestran entre paréntesis, y en negrita se resalta el tamaño promedio (Me) de los ooquistes. Q es la relación Largo / Ancho, cuyo parámetro es medido por los autores de referencia, y Qe corresponde al valor promedio de Q.

$$(9 - 13.2) \mu\text{m} \times (6.1 - 9.1) \mu\text{m}$$

$$Q = (1.3 - 1.9); N = 80$$

$$\text{Me} = \mathbf{11.7 \times 7.3 \mu\text{m}}; Q_e = 1.6$$

Según las mediciones realizadas con aumento 40X, la medida promedio del largo y ancho de los ooquistes fue de **11.7** μm X **7.3** μm (N= 80), ajustándose a las medidas publicadas para *Ps. chagasi* (Lantova *et al.*, 2010).

3.3 Extracción de ADN total; optimización de extracciones de 1 sólo adulto

Para realizar el análisis molecular de los ejemplares observados por microscopía óptica (*Lu. longipalpis*, *Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, *Lu. umbratilis* y *Lu. renei*), se realizó la extracción de ADN de los flebotomos usando el protocolo de Acardi (A) (Acardi *et al.*, 2010), de la misma manera que para la validación de los cebadores *PsyF/PsyR*. Sin embargo, como ya se ha mencionado, esas extracciones fueron realizadas usando lotes de flebotomos de 10 y 5 ejemplares, pero en esta etapa se procedió a la extracción de ADN de un sólo individuo por lote, procesando un total de 149 ejemplares (= 149 lotes). Debido a esto, las amplificaciones de control interno (con los cebadores 44F/45R) en general eran muy pobres, y por ello se debieron ensayar diferentes alternativas en base al protocolo de Acardi para optimizar el rendimiento de la extracción de ADN.

En una primera instancia se probaron diferentes períodos de incubación con la enzima Proteinasa K, variando el tiempo en 30 minutos, 2, 3, 4 y 8 horas; y simultáneamente se probó la incubación con etanol absoluto a -20°C durante toda la noche (O.N), y sin esta incubación a -20°C durante toda la noche (S/O.N). Para esta optimización se procesaron machos adultos de *Lu. longipalpis* de Posadas (KS2), usando un buffer de lisis similar al planteado por Acardi (Acardi *et al.*, 2010): 10 mM Tris-HCl, pH 8; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.2 % SDS y 0,42 µg/µl de Proteinasa K. Para determinar el rendimiento, cada muestra procesada fue sometida a una amplificación con los cebadores 44F/45R (Peixoto *et al.*, 2001; Lins *et al.*, 2002).

El resultado de todas las extracciones realizadas con las modificaciones antes mencionadas se observa en la Figura 45, en donde se observa amplificación en las muestras O.N 2, O.N 3 y O.N 4 (calles 4, 5 y 6), correspondientes al tiempo de incubación con Proteinasa K de 2, 3 y 4 horas y precipitación con etanol absoluto durante toda la noche a -20 ° C. La ausencia de amplicón en la muestra O.N 8 (calle 7) fue un resultado inesperado. Por el contrario, la ausencia de amplificación en la muestra O.N 30 (30 minutos de incubación, calle 3) fue esperable debido al corto tiempo de incubación con Proteinasa K. Las muestras donde no se precipitó con etanol absoluto a -20°C (S/O.N), mostraron producto de amplificación con un leve aumento de intensidad con los períodos más prolongados de incubación con Proteinasa K (muestras S/O.N 3, 4 y 8, calles 10, 11 y 12, respectivamente). Sorprendentemente, se observó amplificación en la muestra S/O.N 30 (calle 8), aunque de menor intensidad, y ausencia total de amplificación en la muestra S/O.N 2 (calle 9).

Si bien no se pudo realizar un análisis comparativo con todas las estrategias usadas debido a la ausencia de amplificación en tres muestras, sí se pudo observar que la ausencia de incubación a -20°C denotaba una leve mejoría en el rendimiento de ADN, y además que los períodos de incubación más prolongados con Proteinasa K (4 y 8 horas) también mejoraban el rendimiento.



Figura 45. Amplificación con los cebadores 44F/45R y las muestras KS2 ON y S/ON.

Orden de siembra: 1.PM: pZ2-*HaeII*; 2. Control positivo, CM1-G dilución 1:25; 3. KS2 ON 30; 4. KS2 ON 2; 5. KS2 ON 3; 6. KS2 ON 4; 7. KS2 ON 8; 8. KS2 S/ON 30; 9. KS2 S/ON 2; 10. KS2 S/ON 3; 11. KS2 S/ON 4; 12. KS2 S/ON 8; 13. Vacía, 14. Control negativo (agua).

Para continuar con la optimización del protocolo de extracción de ADN a partir de un solo adulto, se aumentó al doble la concentración de Proteinasa K (de $0,42 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a $0,84 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y, en los pasos de extracción con solventes (cloroformo:alcohol isoamílico), la mezcla por inversión se realizó de manera suave (Acardi *et al.*, 2010) y vigorosa (nuestra modificación).

En la Figura 46 se puede observar que el aumento en la concentración de la Proteinasa K no parecía mejorar el rendimiento de la extracción, pero sí se observó una diferencia en el rendimiento en función del modo de mezclar las soluciones de extracción. La mezcla por inversión vigorosa parecía mejorar el rendimiento de la extracción (calle 5), ya que se observó una banda a la altura esperada con mayor nitidez que con la mezcla por inversión suave (calle 3). A partir de estos resultados también se observó que solamente se obtuvo amplificación con las extracciones directas resuspendidas en $20 \mu\text{l}$ de agua miliQ, ya que en ambos casos la muestra diluida (1:10) no presentó producto de amplificación. El control positivo usado fue la muestra CM1-G correspondiente a la extracción de ADN de 10 flebotomos usando el protocolo estándar.

En función de estos resultados, en los pasos de extracción con solventes la manera de mezclar por inversión se modificó a vigorosa, y se mantuvo la concentración de Proteinasa K en su valor original.

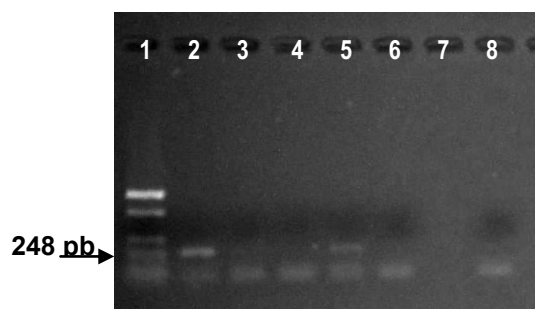


Figura 46. Amplificación con cebadores 44F/45R de las muestras 7 A y 8 A. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-Haell; 2. Control positivo, CM1-G dilución 1:25; 3. 7 A, concentrado mezclado suave; 4. 7 A dilución 1:10 mezclado suave; 5. 8 A, concentrado mezclado vigoroso; 6. 8 A dilución 1:10 mezclado vigoroso; 7. Vacía; 8. Control negativo (agua).

Otra de las modificaciones que se evaluó para optimizar el protocolo, fue variar la cantidad de pasos realizados en la extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), de tres (Acardi *et al.*, 2010) a un sólo paso de extracción. También se probó nuevamente el aumento de la concentración de Proteinasa K. Todas las muestras fueron mezcladas por inversión en forma vigorosa y se incubaron con etanol absoluto a -20°C durante toda la noche.

Sin embargo, sólo se observó amplificación con los cebadores 44F/45R (control interno) en algunas de las muestras, y con demasiada variación entre ellas, a tal punto que no se pudo determinar qué estrategia mejoraba el rendimiento y cuál no (no se muestran los resultados).

Debido a que las modificaciones realizadas anteriormente no determinaron una mejoría contundente en el rendimiento, se continuó con la optimización. Para ello se probaron dos buffers de lisis optimizados para las extracciones de ADN. Los buffers utilizados fueron el buffer Ca compuesto por 30 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA, 1% de SDS (Hilz *et al.*, 1975) y 5 mM de CaCl_2 (Bajorath *et al.*, 1988); y el buffer S compuesto por 30 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA y 1% de SDS. Además, se probó la incubación de la enzima a 50° y no 58°C , debido a que su mayor actividad se encuentra entre $50-55^{\circ}\text{C}$, y también para alejarse de la temperatura de inhibición de la enzima (65°C), según recomendaciones del fabricante.

Para poder determinar el óptimo rendimiento de los buffers de lisis se realizaron extracciones de ADN de *Lu. longipalpis* de Posadas: los ejemplares 22 A, 23 A, 25 A y 26 A procesados con el buffer S; y los ejemplares 27 A, 28 A, 30 A y 32 A con el buffer Ca. Todas las extracciones fueron resuspendidas en 10 μl de agua miliQ. Las amplificaciones con los cebadores 44F/45R mostraron variabilidad en el rendimiento de las extracciones con el buffer S, debido a la ausencia de producto de PCR en las

muestras 22 A y 25 A (Figura 47; calles 3 y 5), y además una menor intensidad en las amplificaciones de las muestras 23 A y 26 A (Figura 47; calles 4 y 6). En cambio las amplificaciones obtenidas con las extracciones de ADN procesadas con el buffer Ca presentan mayor nitidez en el producto de PCR en todas las muestras (Figura 47; calles 7 a 10). De esta manera, con el buffer Ca se logró la extracción de ADN en todas las muestras procesadas y una mejoría en el rendimiento de ADN.

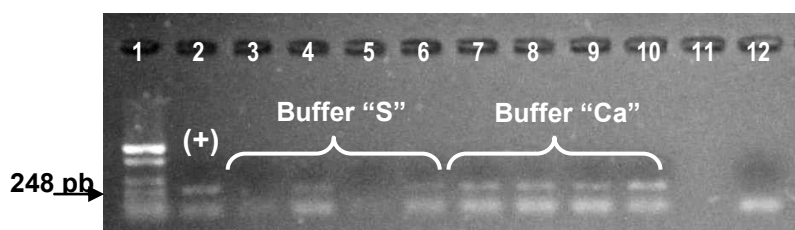


Figura 47. Amplificación con los cebadores 44F/45R de las muestras 22 A, 23 A, 25 A, 26 A, 27 A, 28 A, 30 A y 32 A. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-Haell; 2. Control positivo, CM1-G dilución 1:25; 3. 22 A dilución 1:5; 4. 23 A dilución 1:5; 5. 25 A dilución 1:5; 6. 26 A dilución 1:5; 7. 27 A dilución 1:5; 8. 28 A dilución 1:5; 9. 30 A dilución 1:5; 10. 32 A dilución 1:5; 11. Vacía; 12. Control negativo (agua).

A partir de la mejora en el rendimiento en las extracciones de ADN con las últimas modificaciones (concentración estándar de Proteinasa K, mezcla por inversión vigorosa, resuspensión en 10 µl de agua miliQ) y el uso del buffer Ca, se volvió a intentar optimizar los tiempos del protocolo, buscando disminuir el período de incubación sin disminuir el rendimiento, y además incluir o no la precipitación del ADN con la incubación a -20°C durante toda la noche.

Se continuaron usando ejemplares de *Lu. longipalpis* (machos) de Posadas, cada uno con un tiempo de incubación diferente: 5 A y 42 A con 1 hora de incubación; 6 A y 36 A con 2 horas de incubación; 21 A y 35 A con 3 horas de incubación; 24 A y 34 A con 4 horas; y 29 A y 33 A con 8 horas de incubación. Las primeras muestras mencionadas para cada período de incubación (5 A, 6 A, 21 A, 24 A y 29 A) fueron procesadas incluyendo el paso de precipitación a -20°C durante toda la noche, las segundas muestras mencionadas (42 A, 36 A, 35 A, 34 A y 33 A) fueron procesadas sin incluir la incubación a -20°C. Los resultados del control interno (amplificación con 44F/45R) mostraron que las intensidades de las bandas varían con el período de incubación con el buffer de lisis en ambos tratamientos (con y sin incubación a -20°C): a menor tiempo de incubación con Proteinasa K, menor intensidad (Figura 48; calles 3, 4, 5, 11 y 12).

En el caso del protocolo con incubación a -20°C , el mejor rendimiento se logró con 8 horas de incubación (Figura 48; calle 7), disminuyendo el rendimiento a menor período de incubación (Figura 48; calles 3 a 6). Las muestras tratadas sin incubación a -20°C manifestaron un leve aumento del rendimiento respecto de las que sí se incubaron a -20°C . Esto se pudo observar en la muestra 33 A (Figura 48; calle 8), ya que presenta un mejor rendimiento que la muestra 29 A (Figura 48; calle 7) con el mismo período de incubación con Proteinasa K (8 horas). En el caso de la muestra con 4 horas de incubación (Figura 48; calle 9), la intensidad es más débil comparada con la de 3 horas (calle 10) bajo la misma estrategia de extracción. Pero esto puede deberse a la manipulación de la muestra, y no que corresponda al tratamiento en sí. Otro de los resultados que mostró un mejor rendimiento de ADN fue la muestra 35 A (calle 10) con respecto a la muestra 21 A (calle 5).

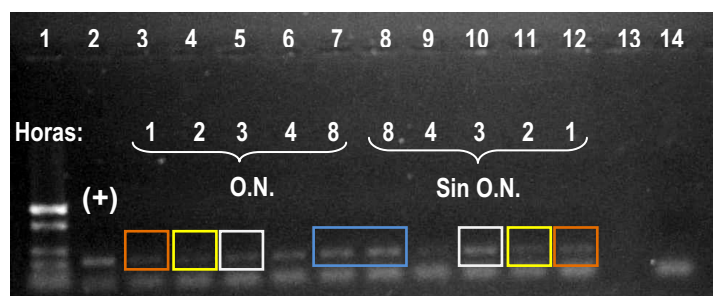


Figura 48. Amplificación de las muestras CM1-A, 5 A, 6 A, 21 A, 24 A, 29 A, 33 A, 34 A, 35 A, 36 A y 42 A con los cebadores 44F/45R. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-HaeII; 2. Control positivo, CM1-G dilución 1:25; 3. 5 A dilución 1:5, 1 hora incubación, O.N.; 4. 6 A dilución 1:5, 2 horas incubación, O.N.; 5. 21 A dilución 1:5, 3 horas incubación, O.N.; 6. 24 A dilución 1:5, 4 horas incubación, O.N.; 7. 29 A dilución 1:5, 8 horas incubación, O.N.; 8. 33 A dilución 1:5, 8 horas incubación, s/O.N.; 9. 34 A dilución 1:5, 4 horas incubación, s/O.N.; 10. 35 A dilución 1:5, 3 horas incubación, s/O.N.; 11. 36 A dilución 1:5, 2 horas incubación, s/O.N.; 12. 42 A dilución 1:5, 1 hora incubación, s/O.N.; 13. Vacía; 14. Control negativo (agua).

Para poder determinar el período óptimo de incubación con Proteinasa K en el protocolo de extracción, se volvieron a repetir tres estrategias (Figura 49). Para esto se usaron las muestras 45 A con incubación de 8 horas (protocolo control), 46 A con 4 horas y 47 A con 3 horas de incubación, todas sin incubación a -20°C para el paso de precipitación. Los resultados de estas nuevas extracciones mostraron que, a medida que disminuye el tiempo de incubación con la enzima, también disminuye el rendimiento de ADN (calles 4 a 6), siendo el mejor rendimiento el de 8 horas de incubación correspondiente a la muestra 45 A (Figura 49; calle 4).

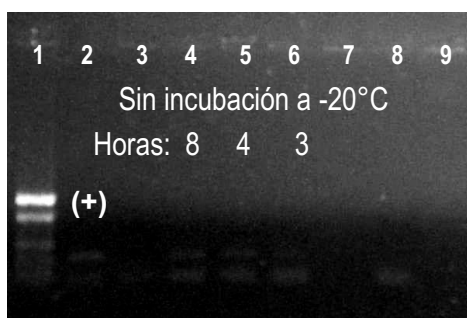
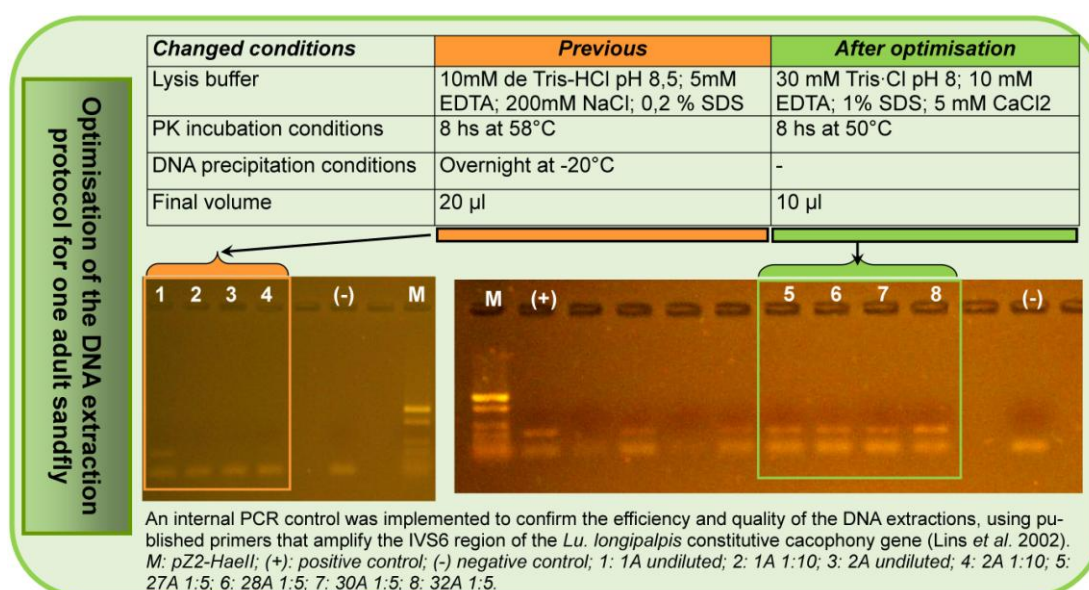


Figura 49. Amplificación de las muestras CM1-G, 34 A, 45 A, 46 A y 47 A con los cebadores 44F/45R. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-HaeIII; 2. control positivo, CM1-G dilución 1:25; 3. 34 A dilución 1:5, 4 horas incubación, s/O.N.; 4. 45 A dilución 1:5, 8 horas incubación, s/O.N.; 5. 46 A dilución 1:5, 4 horas incubación, s/O.N.; 6. 47 A dilución 1:5, 3 horas incubación, s/O.N.; 7. Vacía; 8. Control negativo (agua).

De esta manera, quedó determinado el protocolo de extracción con el mejor rendimiento de ADN, en 8 horas de incubación con Proteinasa K a 50°C con el buffer de lisis Ca, mezcla por inversión vigorosa, sin incubación a -20°C y resuspendiendo el material en 10 µl de agua miliQ .

La siguiente Figura resume los resultados del proceso de optimización:



Una vez optimizado el protocolo, se procesaron un total de 55 ejemplares de *Lu. longipalpis* de Posadas (Tabla A, Material Complementario), obteniéndose un buen rendimiento de ADN en 46 muestras y en 9 no se logró una extracción exitosa.

Lo mismo se hizo con los ejemplares de Brasil, a partir de los cuales se procesaron un total de 104 flebotomos del género *Lutzomyia*, incluyendo 37 adultos de

Lu longipalpis, 24 de *Lu. intermedia*, 6 de *Lu. migonei*, 22 de *Lu. umbratilis* y 15 de *Lu. renei* (Tabla B, Material Complementario).

Este análisis se pudo realizar debido a que los cebadores usados para el control interno de extracción de ADN (gen *cacophony*; cebadores 44F/45R) también fueron usados para las otras especies de *Lutzomyia* (Lins *et al.*, 2002), excepto *Lu. renei* que no presentaba registro de análisis con estos cebadores. Algunos de los resultados obtenidos de las extracciones realizadas se muestran en las Figuras 50 y 51.

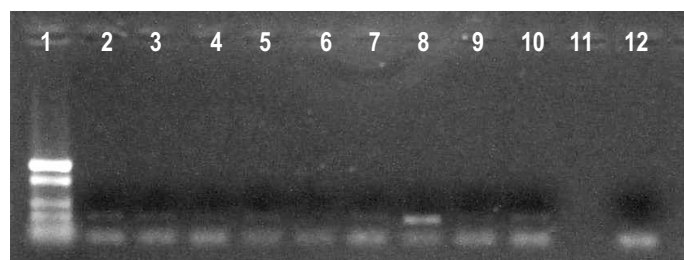


Figura 50. Amplificación con los cebadores 44F/45R y las muestras 30B, 31B, 41B, 42B, 53B, 54B, 55B y 57B. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-Haell; 2. CM1-G dilución 1:25; 3. 30B dilución 1:5 (*Lu longipalpis* Cavunge hembra); 4. 31B dilución 1:5 (*Lu longipalpis* Cavunge macho); 5. 41B dilución 1:5 (*Lu. longipalpis* Lapinha hembra); 6. 42B dilución 1:5 (*Lu. longipalpis* Lapinha hembra); 7. 53B dilución 1:5 (*Lu. renei* hembra); 8. 54B dilución 1:5 (*Lu. renei* hembra); 9. 55B dilución 1:5 (*Lu. renei* hembra); 10. 57B dilución 1:5 (*Lu. renei* macho); 11. Vacía; 12. Control negativo.



Figura 51. Amplificación con los cebadores 44F/45R y las muestras 5B, 91B, 92B, 93B, 94B, 95B, 96B, 103B, 104B, 105B, 106B y 107B. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-Haell; 2. CM1-G dilución 1:25; 3. 5B dilución 1:5 (*Lu intermedia* macho); 4. 91B dilución 1:5 (*Lu longipalpis* Cavunge hembra); 5. 92B dilución 1:5 (*Lu longipalpis* Cavunge hembra); 6. 93B dilución 1:5 (*Lu longipalpis* Cavunge hembra); 7. 94B dilución 1:5 (*Lu. umbratilis* hembra); 8. 95B dilución 1:5 (*Lu. umbratilis* hembra); 9. 96B dilución 1:5 (*Lu. umbratilis* hembra); 10. 103B dilución 1:5 (*Lu. umbratilis* macho); 11. 104B dilución 1:5 (*Lu. renei* hembra); 12. 105B dilución 1:5 (*Lu. renei* hembra); 13. 106B dilución 1:5 (*Lu. renei* hembra); 14. 107B dilución 1:5 (*Lu. renei* hembra); 15. Vacía; 16. Control negativo.

3.4 Amplificación por PCR y secuenciamiento

El objetivo en esta etapa de la tesis fue analizar varias muestras de flebótomos salvajes, de diferentes especies y lugares, sometiendo cada una a una amplificación por PCR con los cebadores diseñados (*PsyF/PsyR*) para determinar si estaban parasitadas con gregarinos. Las muestras procesadas correspondientes a *Lu. longipalpis* de Posadas (captura noviembre de 2011) fueron 54 en total. La amplificación por PCR con *PsyF/PsyR* de estos ejemplares, diagnosticó infección con *Psychodiella* sp. en seis machos adultos: 2 A, 10 A, 13 A, 15 A, 59 A y 213 A. Cada una de las muestras fue analizada previamente por microscopía óptica, observándose el parásito en cuatro de ellas (10 A, 13 A, 59 A y 213 A). En la Tabla 11 se detalla el registro fotográfico de estas muestras, cuyas mediciones señalan que la forma del parásito se encuentra en fase “gamonte”, y la mayor infección visible es de 3 gamontes por flebótomo. La muestra 13 A fue la única que presentó ooquistes, además de dos gamontes, que se observaron luego de realizar la disección del flebótomo (Figura 43).

Los resultados de las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR* de las muestras 2 A, 10 A y 15 A se observan en la Figuras 52 A y B. Los productos presentan muy buena intensidad y sólo en el caso de la muestra 10 A los resultados se corresponden con las observaciones al microscopio, ya que en las otras dos (2 A y 15 A) no se observó infección al microscopio.

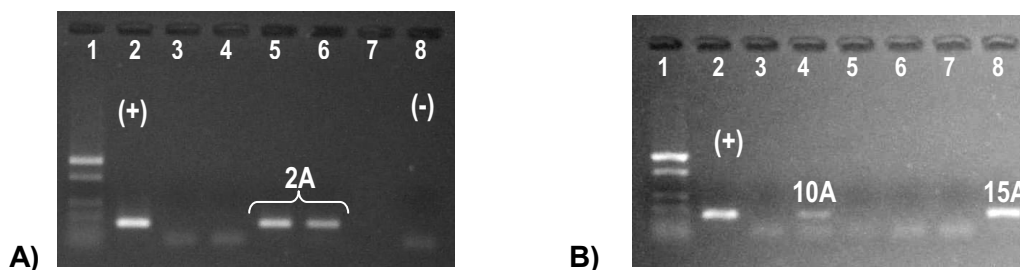


Figura 52. Amplificación de las muestras 1 A, 2 A, 9 A, 10 A, 11 A, 12 A, 14 A y 15 A con los cebadores *PsyF/PsyR*. **A)** Orden de siembra: 1. PM: pZ2-Haell; 2. Control positivo, Clon 64 dilución 1:100; 3. 1 A (macho) concentrada; 4. 1 A dilución 1:10; 5. 2 A (macho) concentrada; 6. 2 A dilución 1:10; 7. Vacía; 8. Control negativo. **B)** Orden de siembra: 1. PM: pZ2-Haell; 2. Control positivo, Clon 64 dilución 1:100; 3. 9 A dilución 1:10; 4. 10 A dilución 1:10; 5. 11 A dilución 1:10; 6. 12 A dilución 1:10; 7. 14 A dilución 1:10; 8. 15 A dilución 1:10.

Las muestras 10 A y 15 A que mostraron amplificación exitosa en los resultados anteriores (Figura 52 B), se volvieron a someter a PCR con los cebadores *PsyF/PsyR*, pero en esta ocasión usando las muestras concentradas y diluidas (1:10). El objetivo

era determinar si la baja intensidad del producto de PCR de la muestra 10 A (Figura 52 B) se debía al bajo rendimiento de ADN del gregarino o a inconvenientes en la reacción de PCR. Para esto, también se realizó un ensayo control de doble ADN, usando como segundo molde al clon 64 (dilución 1:100). Los resultados de estos ensayos confirmaron la diferencia de intensidades, mostrando que las bandas obtenidas para 15 A, pura y diluida, poseen mayor nitidez (Figura 53; calles 5 y 6). Por otro lado, la muestra 10 A pura no presentó producto de PCR (Figura 53; calle 3), pero sí la diluida (calle 4), aunque mucho más tenue en comparación con el producto de la muestra 15 A diluida (calle 6). El ensayo de doble ADN confirmó la presencia de inhibidores en la muestra concentrada 10 A, ya que no hubo amplificación en la muestra control (estos resultados no se muestran).

En función de estos resultados se pudo confirmar que la diferencia de intensidades en los amplicones se debió a la presencia de inhibidores en la muestra 10 A, los cuales interferían con la amplificación en la muestra pura y causaban un menor rendimiento de la reacción de PCR en la muestra diluida.

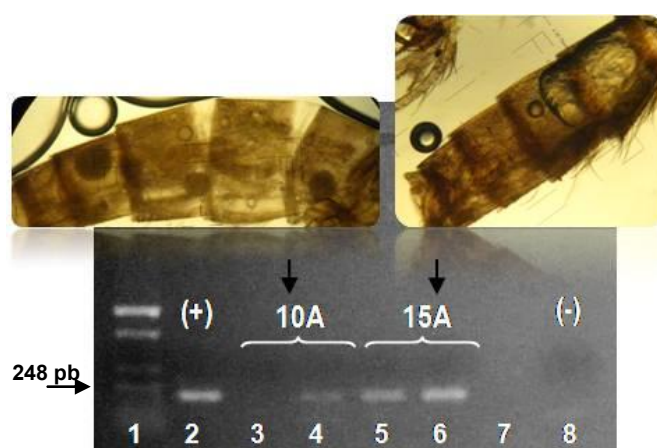


Figura 53. Amplificación de las muestras 10 A y 15 A con los cebadores *PsyF/PsyR*. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-*Haell*; 2. Control positivo, Clon 64 dilución 1:100; 3. 10 A, pura; 4. 10 A dilución 1:10; 5. 15 A pura; 6. 15 A dilución 1:10; 7. Vacía; 8. Control negativo. En la parte superior del gel se observa el registro fotográfico de ambas muestras.

El siguiente objetivo fue analizar el grado de infección en flebotomos de otra procedencia, y para ello se analizaron ejemplares de Brasil capturados en diferentes regiones (Cavunge, Jacobina y Lapinha). Se analizaron un total de 37 muestras correspondientes a la especie *Lu. longipalpis*. Cada una de las muestras fue sometida a la extracción de ADN utilizando el protocolo optimizado. Posteriormente, el rendimiento de las extracciones fue analizado a través de amplificaciones con los

cebadores para el gen *cacophony*, y luego se prosiguió al análisis por PCR con *PsyF/PsyR*.

De todo este análisis se detectó infección gregarina en una sola muestra correspondiente a un macho adulto (44B), diagnosticándose exclusivamente por PCR ya que su presencia no era visible con el microscopio. Debido a que se diseccionó el abdomen de este flebótomo, esta muestra fue analizada en dos partes: una parte incluyó la genitalia y algunos segmentos del abdomen incluyendo la glándula secretora de feromonas ("G"), y la otra parte incluyó el resto del flebótomo con cabeza, tórax y segmentos del abdomen ("F") (Tabla 15 A, muestra el resultado de la disección).

Conjuntamente se examinaron diferentes especies del género *Lutzomyia*, las cuales previamente se analizaron bajo microscopía óptica (Tabla 9). Este análisis fue realizado en las mismas condiciones que para las muestras procesadas de *Lu. longipalpis* de Posadas y Brasil. Se analizaron 68 ejemplares correspondientes a las especies *Lu. intermedia* (24), *Lu. migonei* (6), *Lu. umbratilis* (22) y *Lu. renei* (15) (Tabla B, Material Complementario). Los ejemplares analizados no mostraron infección gregarina, tanto por microscopía como por PCR.

Control interno: gen ribosomal 18S

Como ya se detalló en el capítulo 2, se utilizó un par de cebadores (44F/45R) para verificar la eficiencia y la calidad de la extracción de ADN de los flebótomos. Este control interno fue utilizado en todas las especies de flebótomos analizadas en este trabajo, resultando útil para la mayoría de las muestras procesadas. Únicamente para dos de las cinco especies analizadas (*Lu. migonei* y *Lu. umbratilis*) no se pudo implementar este control correctamente, debido a la nula o escasa amplificación con los cebadores correspondientes al gen *cacophony*. Por consiguiente, se buscó un segundo control interno para poder verificar las extracciones de ADN de 6 muestras de *Lu. migonei* y 14 muestras de *Lu. umbratilis*.

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica de cebadores universales para eucariotas y, en función de sus características, se eligieron los cebadores F-566 y R-1200, renombrados según nuestra lista de cebadores 54F y 55R, respectivamente. Según bibliografía, estos cebadores amplifican en promedio un fragmento de 650 pb de las regiones V4 y V5 del gen ribosomal 18S. Seguidamente se realizó un análisis *in silico* de los cebadores utilizando secuencias nucleotídicas obtenidas de la base de datos del NCBI. Las secuencias usadas para este análisis correspondieron a *Lu. longipalpis* (AJ244429), *Lu. geniculata* (AJ391734), *Lu. intermedia* (DQ868357), *Lu. neivai* (DQ868362), *Ps. chagasi* (FJ865354), *Ps. sergenti* (FJ865355) y *Ps. tobbi*

(GQ329865). El objetivo de este análisis fue verificar la amplificación teórica de las secuencias, analizando cada una de ellas con el programa Oligo 7. El amplicón teórico resultante fue sometido a una búsqueda por homología con BLASTN (DB:nt). Cada uno de estos amplicones arrojó como *hit* más relevante su correspondiente taxón, con E-value 0 y un porcentaje de identidad del 100 % (resultados no mostrados).

Tras confirmar las correctas amplificaciones teóricas con estos cebadores universales, se realizaron amplificaciones por PCR utilizando dichos cebadores (54F/55R) con algunas de las muestras ya verificadas anteriormente con el primer control interno (*cacophony*). Los resultados de estas primeras pruebas se observan en la Figura 54, en donde las muestras 15 A, KS1.10 y KS2.10 presentan una excelente amplificación. Es preciso mencionar que la muestra 15 A presentaba infección con *Ps. chagasi* (Figura 52 B).

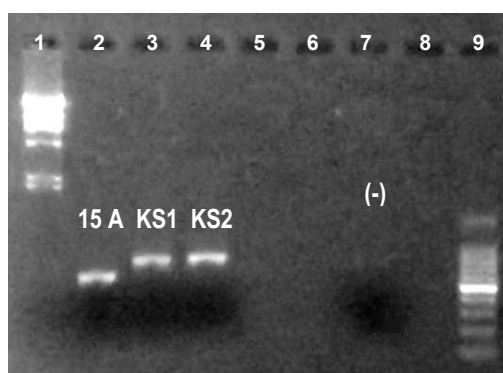


Figura 54. Amplificación de las muestras 15 A, KS1.10 y KS2.10 con los cebadores 54F y 55R. Orden de siembra: 1. PM: λ -HindIII; 2. 15 A dilución 1:25; 3. KS1.10 dilución 1:10; 4. KS2.10 dilución 1:10; 5. vacía; 6. vacía; 7. Control negativo (agua); 8. Vacía; 9. PM de 100 pb.

El resultado de la amplificación anterior muestra una diferencia de tamaño del amplicón entre la muestra 15 A con las otras dos. Esto se debe a que los cebadores 54F/55R son universales para la subunidad 18S eucariota y, como ya se había observado en el análisis *in silico* de estos cebadores, existe una diferencia en el producto de amplificación de *Lu. longipalpis* y *Ps. chagasi* con estos cebadores. Para *Lu. longipalpis* (según el programa Oligo 7) el producto teórico es de 752 pb, y para *Ps. chagasi* el producto teórico es de 611 pb. Entre las dos especies hay una diferencia mayor a 100 nucleótidos aproximadamente, diferencia similar a la que se observa en el gel. Por otro lado, se debe tener en cuenta que las muestras KS1.10 y KS2.10 corresponden a extracciones de ADN de 10 flebótomos y, en el caso de 15 A, corresponde a la extracción de 1 sólo flebótomo infectado.

Una vez determinadas las condiciones de reacción y la correcta amplificación con este segundo control interno, se prosiguió con las muestras de interés. Como control positivo de las amplificaciones se usó la muestra KS1.10. Las 6 muestras correspondientes a *Lu. migonei* y las 14 correspondientes a *Lu. umbratilis* fueron analizadas con estos cebadores universales 54F y 55R, pero sólo se obtuvo amplificación en la muestra 68B (Figura 55).

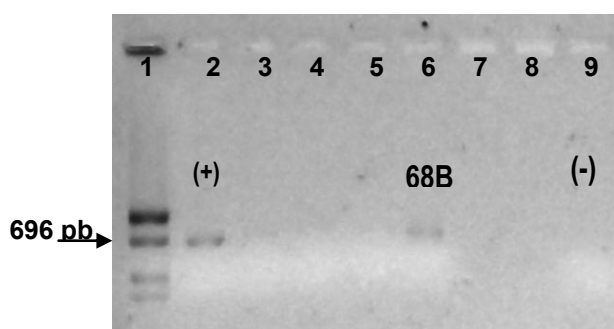


Figura 55. Amplificación de las muestras KS1.10, 8B, 69B y 68B con los cebadores 54F y 55R. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-HaeII; 2. Control positivo, KS1.10 dilución 1:10; 3. 69 B (*Lu. umbratilis*) concentrada; 4. 69B dilución 1:10; 5. 8B (*Lu. migonei*) dilución 1:10; 6. 68 B (*Lu. umbratilis*) dilución 1:10; 7. Vacía; 8. Vacía; 9. Control negativo (agua).

Con los resultados anteriores sólo se pudo confirmar que la extracción de ADN de la muestra 68B fue exitosa.

Por otro lado, el ADN de estas muestras fue medido con un microespectrofotómetro (AQ-07). Las concentraciones de ADN de las muestras de *Lu. migonei* variaron entre 13,3 y 79,6 µg/ml y, en el caso de *Lu. umbratilis*, entre 9,1 y 46,4 µg/ml. En particular, para la muestra 69B correspondiente a *Lu. umbratilis*, cuya amplificación con los cebadores 54F y 55R fue negativa (Figura 55; calles 3 y 4), se obtuvo una concentración de ADN de 107,9 µg/ml. Esto indicaría que la falta de amplificación de las muestras analizadas se debió a la presencia de inhibidores.

3.5 Observación y análisis de glándulas secretoras de feromonas en machos con y sin infección gregarina

A partir de las observaciones al microscopio realizadas para todos los ejemplares de Argentina y Brasil, se observó la presencia de glándulas secretoras de feromonas en *Lu. longipalpis* y *Lu. renei*, por comparación de nuestras imágenes con registros previos (Spiegel *et al.*, 2002; Spiegel *et al.*, 2011). De esta manera se pudo clasificar a los machos en flebótomos con un par de “manchas” sobre el IV terguito abdominal (1GF: un par de glándulas secretoras de feromonas), y machos con un par

adicional de “manchas” sobre el III terguito abdominal (2GF: dos pares de glándulas secretoras de feromonas). En nuestro registro de ejemplares se observaron los dos patrones morfológicos de “manchas” en los segmentos abdominales, según su lugar de procedencia. En la Tabla 13 se detalla la clasificación realizada para *Lu. longipalpis*, donde también se incluyó a *Lu. renei*. Con el objetivo de comparar la distancia entre los sitios de captura y los patrones morfológicos hallados, esta información se sintetizó en un mapa (Figura 56): círculos verde y negro para Jacobina y Cavunge, respectivamente (ambas ciudades del Estado de Bahía), un círculo azul para Lapinha (Estado de Minas Gerais) y, por último, una estrella roja para Misiones (Argentina).

Tabla 13. Registro del patrón morfológico de las glándulas secretoras de feromonas observadas en flebotomos capturados en Argentina y Brasil.

<u>Especie</u>	<u>Ubicación de las glándulas secretoras</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Ejemplares</u>	<u>Cantidad de ejemplares</u>
<i>Lu. longipalpis</i>	III y IV tergito abdominal	● Cavunge, Bahía -Brasil	133B/ 134B/ 135B/ 136B/ 137B/ 138B	6
	III y IV tergito abdominal	● Jacobina, Bahía -Brasil	35B/ 36B/ 38B/ 51B/ 79B/ 80B/ 82B/ 83B/ 84B	9
	IV tergito abdominal	● Lapinha, Minas Gerais-Brasil	43B/ 44B/ 45B/ 46B/ 125B/ 127B/ 128B	7
	III y IV tergito abdominal	★ Posadas, Misiones-Argentina	40A/ 113A/ 119A/ 125A/ 130A/ 131A/ 142A/ 143A/ 146A/ 154A/ 155A/ 164A/ 169A/ 171A/ 175 A/ 206A/ 220A/ 222A/ 230A/ 255A/ 266A/ 267 A/ 268A/ 282 A/ 301A/ 303A/ 323A/ 324A/ 331A/ 346A/ 364A/ 368A/ 371A	33
	IV tergito abdominal		59A/298A/ 380A	3
<i>Lu. Renei</i>	IV tergito abdominal	● Lapinha, Minas Gerais-Brasil	145B/ 146B/ 147B/ 148B	4

Figura 56. Mapa de los sitios de captura de la especie *Lu. longipalpis* y *Lu. renei*, señalando el lugar con su respectivo patrón morfológico.



En la Figura 57 se muestran ejemplares de *Lu. longipalpis* de diferente procedencia con 1 y 2 pares de glándulas secretoras de feromonas: Jacobina (Estado de Bahía) y Lapinha (Estado de Minas Gerais) en Brasil. En la Figura 58 se muestran dos ejemplares de *Lu. longipalpis* de la misma ciudad Posadas (Misiones), que presentaron diferente patrón morfológico: el ejemplar 380A presenta 1GF y el ejemplar 301A presenta 2GF.

Figura 57. Flebótomos de la misma especie (*Lu. longipalpis*) y de diferentes regiones: el ejemplar 35B de Jacobina (Bahía) presenta 2GF y el ejemplar 43B de Lapinha (Minas Gerais) presenta 1GF. Fotografías con aumento 10 X.

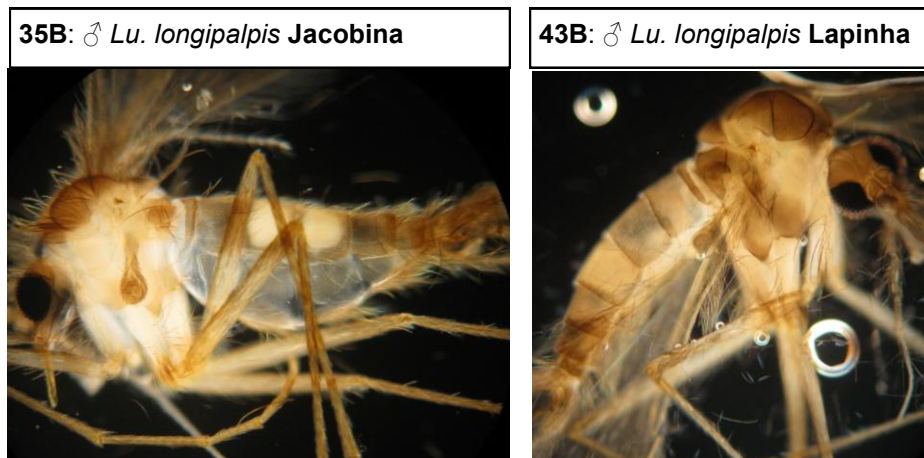
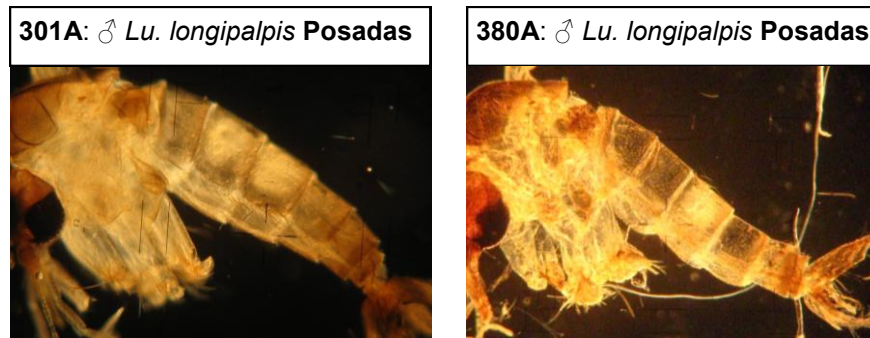


Figura 58. Flebótomos de la misma especie (*Lu. longipalpis*) provenientes de la misma ciudad (Posadas, Misiones): el ejemplar 301A presenta 2GF y el ejemplar 380A presenta 1GF. Fotografías con aumento 10X.



El análisis de las glándulas secretoras de feromonas, por un lado, manifestó la presencia de dos patrones morfológicos conviviendo en Brasil, en concordancia con lo que se ha descrito previamente (Araki *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011), particularmente en los Estados de Bahía y Minas Gerais. Por otra parte, en un mismo Estado (Bahía) registramos el mismo patrón morfológico (2 GF) en dos ciudades diferentes, como ocurrió en Cavunge y Jacobina, a diferencia del patrón 1 GF que se ha encontrado previamente en *Lu. longipalpis* de esta región (Araki *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). Lo contrario se observó en la ciudad de Posadas (Misiones), en donde se registraron los dos patrones morfológicos (Tabla 13 y Figura 58). Previamente se hizo un análisis de las feromonas sexuales y del gen *per* en *Lu. longipalpis* de Posadas (Salomón *et al.*, 2010) pero, a nuestro saber, es la primera vez que se describen los dos patrones morfológicos en *Lu. longipalpis* de Posadas.

Por otro lado, mediante este estudio pudimos observar que los límites de las estructuras observadas en el abdomen en los flebótomos con 2 GF están bien definidos, en comparación con los ejemplares 1 GF, y que esta diferencia es mucho más notable en los ejemplares de Brasil, cualquiera sea la región. En la mayoría de los casos se pudieron realizar las mediciones de las glándulas observadas, del mismo modo que para los gamontes y ooquistes. Sin embargo, en algunos casos no se podía observar el límite de la glándula, y por ende no se realizó la medición de la misma, quedando fuera de los cálculos mostrados en la Tabla 14. En dicha tabla se muestran los valores mínimo y máximo, junto con el promedio y la cantidad de mediciones realizadas (N) de todas las glándulas medidas, clasificando las mediciones según procedencia y grupo (1 GF o 2 GF). Por lo mencionado anteriormente, la cantidad de glándulas secretoras visualizadas en los flebótomos fue mayor que las que se pudieron medir. Es así que se observaron 7 flebótomos con glándulas secretoras de



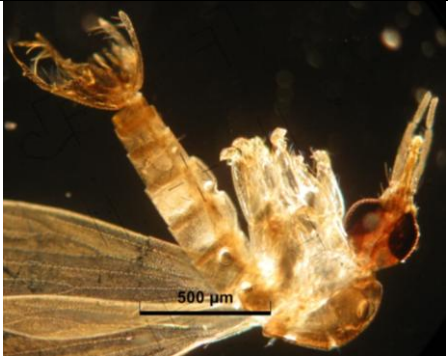
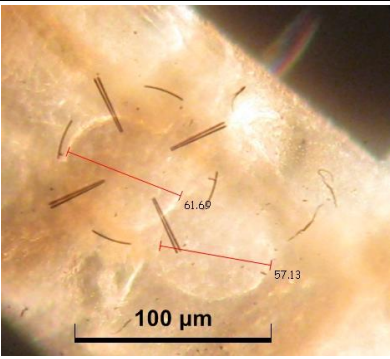
feromonas procedentes de Lapinha, 6 en Cavunge, 9 en Jacobina y, en Posadas, se observaron 33 flebótomos con 2 GF y sólo 3 con 1 GF. Los datos detallados en la Tabla 14 muestran una diferencia de tamaño importante entre los grupos 1 GF y 2 GF, siendo de mayor tamaño las glándulas del grupo 1 GF.

Tabla 14. Resultados de las mediciones realizadas de las glándulas secretoras de feromonas. N = cantidad de mediciones realizadas de las glándulas. Min.= valor mínimo medido. Máx.= valor máximo medido.

Dimensiones	Glándulas secretoras de feromonas	Promedio (μm)	Min. (μm)	Máx. (μm)	N
	<i>Lu. longipalpis</i> , Lapinha- Brasil = 1 GF	215,45	186,34	224,65	5
	<i>Lu. longipalpis</i> , Cavunge y Jacobina- Brasil = 2 GF	168,62	137,06	194,97	29
	<i>Lu. longipalpis</i> , Posadas = 1 GF	290,8	288,19	293,35	2
	<i>Lu. longipalpis</i> , Posadas = 2 GF	144,9	111,06	190,49	24
	<i>Lu. renei</i> , Brasil = 1 GF	204,5	199,46	208,95	4

Como ya se ha mencionado, se diagnosticó infección con *Ps. chagasi* en varias muestras, y en algunas se pudo relacionar el patrón morfológico observado con la presencia del parásito. En el caso de la muestra 80B de *Lu. longipalpis* procedente de Jacobina (Bahía), se observaron las glándulas de feromonas en III y IV terguitos abdominales y también se identificaron ooquistes de *Ps. chagasi* (Figura 44). Por otro lado, también se identificaron flebótomos con 1 GF infectados con el gregarino. En un caso (muestra 44B), la infección se diagnosticó mediante amplificación con los cebadores *PsyF/20R* (ver más adelante, Figura 61), y se visualizó una mancha clara sobre el abdomen en el IV segmento correspondiente a la glándula secretora, aunque los límites de las glándulas eran difusos (Tabla 15 A). En otra de las muestras (59A, de Posadas), se visualizó el mismo patrón que la muestra anterior (1 GF) pero, en este caso, la infección gregarina se reconoció por microscopía (dos gamontes) y posteriormente por PCR con los cebadores *PsyF/20R* (ver más adelante, Figura 61). Al igual que para la muestra 44B, en la muestra 59A los límites de las glándulas no se observan definidos. En la Tabla 15 se describen las muestras 44B y 59A.

Tabla 15. Cuadro descriptivo de las muestras con 1 GF infectadas con *Ps. chagasi*.

<p>A. 44B: ♂ <i>Lu longipalpis</i>, Lapinha, Mina Gerais, Brasil</p>		<p>Disección: </p> <p>En el IV terguito abdominal se encuentran las glándulas secretoras de feromona, aproximadamente del tamaño del segmento.</p>
<p>B. 59A: ♂ <i>Lu longipalpis</i>, Posadas, Misiones, Argentina</p>		 <p>En el IV terguito abdominal se encuentran las glándulas secretoras de feromona. En el V terguito abdominal se observan estructuras redondas correspondientes al parásito.</p>

CAPÍTULO 4. Diseño y análisis de cebadores diagnósticos a nivel especie (PsyF/20R)

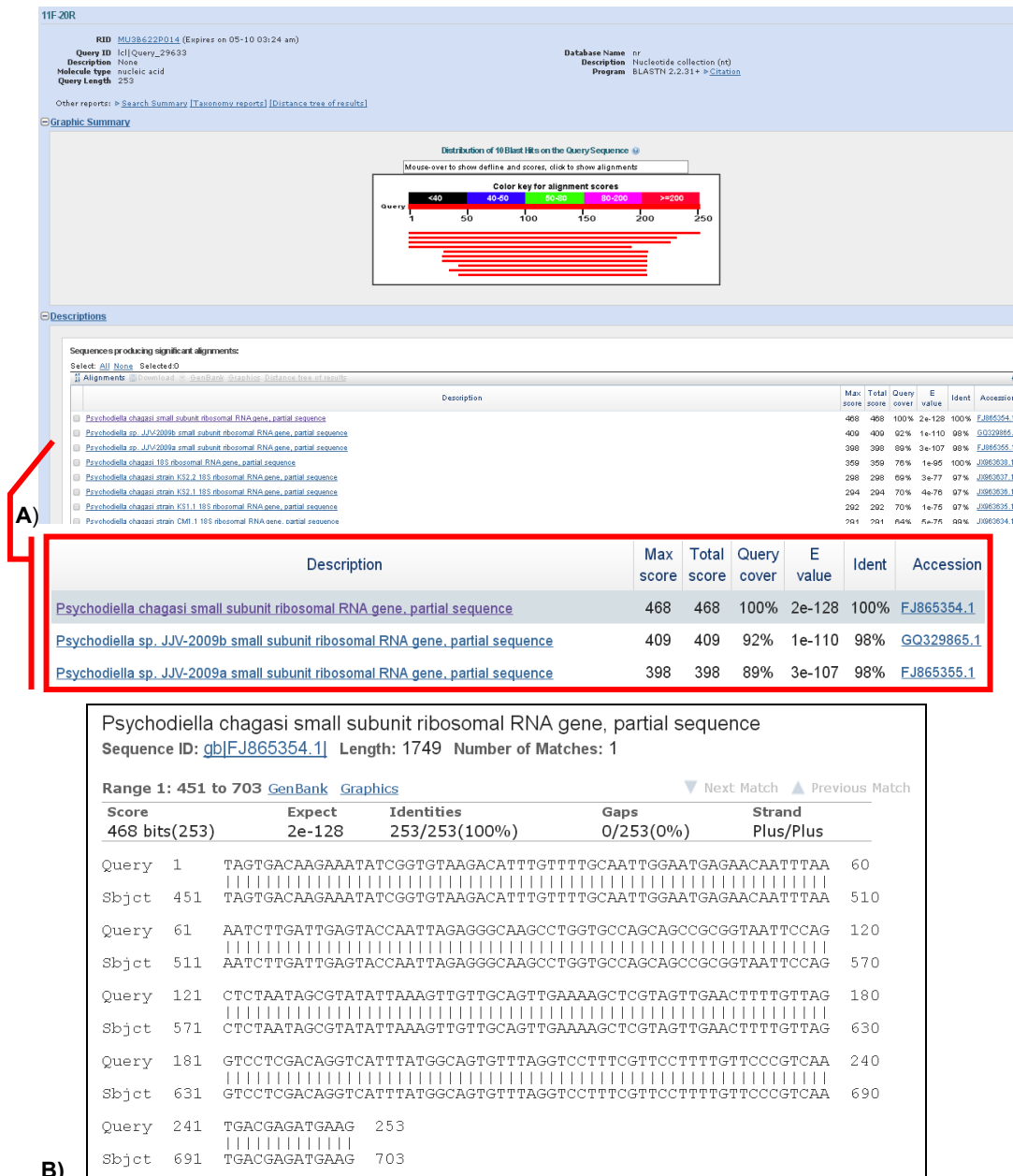
4.1 Diseño de cebadores diagnósticos para *Ps. chagasi* (PsyF/20R)

Luego de diseñar y validar los cebadores género-específicos para *Psychodiella* sp. (PsyF/PsyR), se decidió diseñar cebadores especie-específicos para *Ps. chagasi*, usando como molde la secuencia FJ865354 del GenBank. La región usada para el diseño fue la comprendida entre la secuencia del cebador forward PsyF (nucleótido 450) y la región variable encontrada entre las secuencias de las tres especies de *Psychodiella* sp. (recuadro en la Figura 17, Capítulo 1), que comprende los nucleótidos 678 a 703 (Figura 17). Debido a que el programa utilizado para el diseño de los otros cebadores (Oligo 7) no generó ninguno para esta región, éste fue diseñado manualmente y se denominó 20R. Su longitud es de 20 nucleótidos, su temperatura de melting de 55,2 °C, y se muestra una posible formación de estructura secundaria (*hairpin*), la cual no pudo ser excluida con la eliminación de algún nt (Figura E, ANEXO I). Aún con la posible formación de *hairpin* se continuó con el análisis de este cebador, ya que en esta ocasión se buscaba específicamente un cebador que hibridara con la región variable.

4.2 Análisis *in silico* de los cebadores diagnósticos

Una vez obtenido el cebador deseado, se hizo un análisis *in silico* del par PsyF/20R (Amplif X y Oligo 7) con el objetivo de verificar la amplificación teórica y el producto de PCR deseado. Este análisis mostró que generaban un producto teórico de 253 pb, el cual incluye los nucleótidos 451 a 703 (Figura F, Anexo I), y que presentaban una temperatura de hibridación óptima de 52°C, entre otros (Figura G, Anexo I). Seguidamente el amplicón teórico generado por los cebadores PsyF/20R, se verificó con BLASTN. Los resultados mostraron homología con la secuencia FJ865354 con un E-value de 2e-128 y 100 % de identidad (Figura 59).

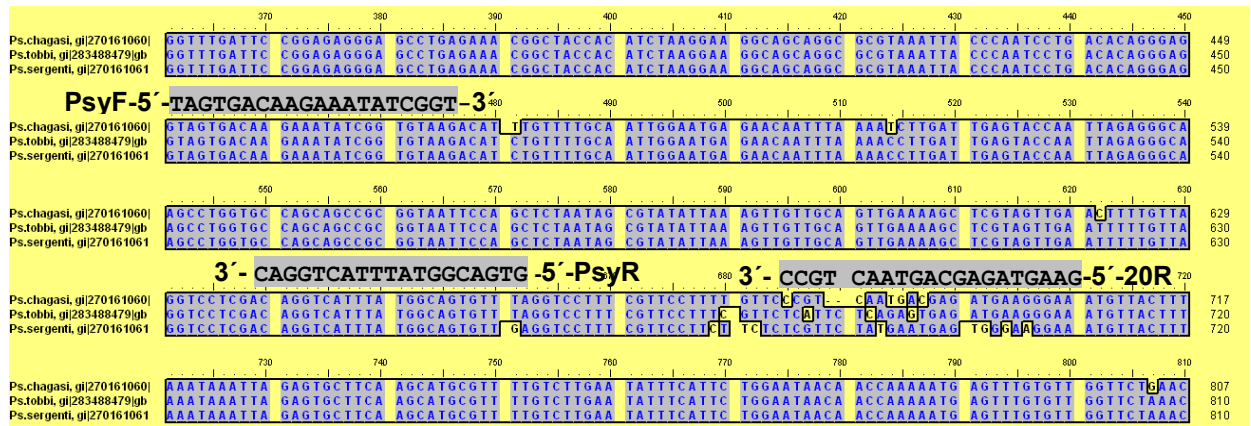
Figura 59. Resultado del BLASTN del amplicon teórico de los cebadores *PsyF/20R* (A) y su alineamiento (B).



Como ya se ha mencionado, la región usada para el diseño fue la comprendida entre la secuencia del cebador *PsyF* (nucleótido 450) y la región variable entre las secuencias de las tres especies de *Psychodiella sp.* (Figura 17, Capítulo 1). Además, el extremo 5' del cebador *reverse* (20R) fue diseñado en base a nucleótidos variables entre las tres especies, especialmente con respecto a la secuencia de *Ps. sergenti*, ya que el extremo 5' del cebador difiere en 4 nt de 6 nt con respecto a la secuencia de *Ps. sergenti*. Por otra parte, el extremo 3' presenta menos nt diferentes entre las secuencias, debido a la necesidad de respetar el “cepo GC” para estabilizar al

cebador. Este análisis se puede observar en la Figura 60, en donde se señalan los cebadores género-específicos (*PsyF/PsyR*) y especie-específicos (*PsyF/20R*), y en donde se observa que el cebador 20R, que involucra la región variable, sólo hibridaría con la secuencia de *Ps. chagasi* por lo que, junto con el cebador *PsyF*, generaría un amplicon únicamente en *Ps. chagasi* (Figura 20).

Figura 60. Alineamiento múltiple de las secuencias de referencia de GenBank de tres especies de *Psychodiella*. En la parte superior del AM se muestran los cebadores *PsyF*, *PsyR* y 20R resaltados. Para poder visualizar los cebadores *reverse* en el AM, se usaron las secuencias reversa complementaria.



4.3 Validación a campo de los cebadores *PsyF/20R*

En base a las muestras donde se identificó infección gregarina utilizando los cebadores ya validados *PsyF/PsyR*, se continuó con el análisis de dichas muestras con los cebadores *PsyF/20R*. De acuerdo a lo esperado, las muestras amplificadas con *PsyF/PsyR*, también mostraron producto de amplificación usando el cebador especie-específico 20R. Los resultados de estas amplificaciones se pueden observar en la Figura 61, junto con el registro fotográfico de los gamontes contenidos en cada una de las muestras de *Lu. longipalpis* de Posadas.

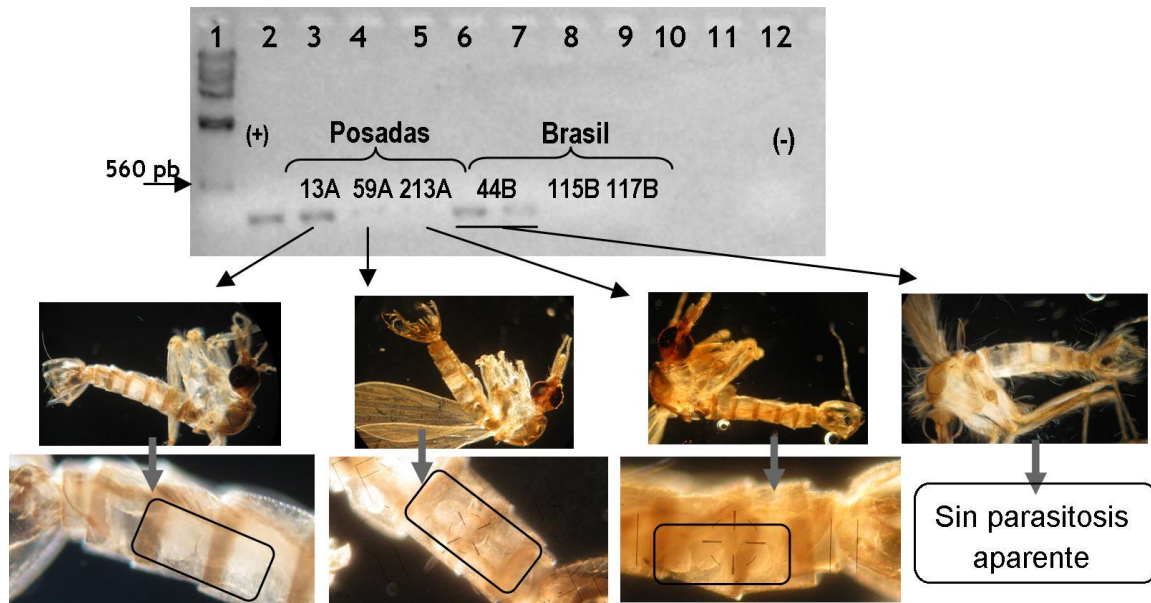


Figura 61. Amplificación de las muestras 13 A, 59 A, 213 A, 44 B, 115 B y 117 B con los cebadores *PsyF/20R*. Orden de siembra: 1. PM: λ -HindIII; 2. Control positivo, KS2-A dilución 1:10; 3. 13 A dilución 1:10; 4. 59 A dilución 1:10; 5. 213 A dilución 1:10; 6. 44B “F” (*Lu longipalpis* Lapinha) dilución 1:10; 7. 44B “G” (*Lu longipalpis* Lapinha) dilución 1:10; 8. 115B (*Lu. intermedia*) dilución 1:10; 9. 117B (*Lu. intermedia*) dilución 1:10; 10. Vacía; 11. Vacía, 12. Control negativo.

Algunas de las muestras amplificadas con *PsyF/20R* fueron sometidas a secuenciamiento para confirmar la identificación de *Ps. chagasi*, y así culminar con la validación del nuevo cebador (20R). Para ello cuatro de las muestras amplificadas se secuenciaron con ambos cebadores (*PsyF* y *20R*): SA1, KS2, 13A y 44B. Dos de esas muestras (SA1 y KS2) fueron previamente usadas para la validación de los cebadores *PsyF/PsyR* (Capítulos 1 y 2). La muestra 13A corresponde a una de las muestras donde se observaron gamontes en el abdomen (2 visibles; Tabla 11) y también se registraron ooquistes post-disección (Figura 43). La muestra 44B fue la única de Brasil en la que la presencia del gregarino se identificó únicamente por PCR, ya que con el microscopio no se observó infección.

El secuenciamiento de cada una de las muestras generó un cromatograma de excelente calidad. Las búsquedas por homología de las secuencias obtenidas con *PsyF/20R*, confirmaron su identidad con *Ps. chagasi*. En la Tabla 16 se detallan los resultados de estas búsquedas por homología, mostrando el *hit* más relevante, E-value y porcentaje de identidad. Cada una de las secuencias fue analizada tanto por separado como luego de ser ensambladas. En ambos análisis los resultados del *hit* fueron los mismos.

Tabla 16. Resultados de la búsqueda por homología con BLASTN (DB:nt) de las secuencias amplificadas por *PsyF* y 20R de cada una de las muestras; también se muestra el resultado de esta búsqueda (E-value y porcentaje de identidad) a partir del contig resultante del ensamblado de las secuencias (última columna).

Cebador	Muestra	Hit	E-value	Identidad	Contig
<i>PsyF</i>	SA1, <i>Lu. longipalpis</i> (hembra)	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA	2,00E-98	99%	2e-108; 95%
20R			2,00E-98	99%	
<i>PsyF</i>	KS2, <i>Lu. longipalpis</i> (macho)	gene, partial sequence (FJ865354)	2,00E-98	98%	2e-109; 95%
20R			2,00E-103	99%	
<i>PsyF</i>	13A, <i>Lu. longipalpis</i> (macho)		7,00E-103	99%	6e-124; 99%
20R			7,00E-100	98%	
<i>PsyF</i>	44B, <i>Lu. longipalpis</i> (macho)		9,00E-102	99%	1e-106; 93%
20R			1,00E-100	99%	

4.4 Flebótomos infectados experimentalmente con *Ps. chagasi* y *Ps. sergenti*; análisis por microscopía

En el momento en el que se realizaron las validaciones de los cebadores diseñados se disponía en el laboratorio solamente de muestras ambientales, es decir, flebótomos capturados en el campo (también llamados salvajes). Debido a esto, para las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR* inicialmente se usaron como control (positivo y negativo) las muestras de ADNc originales usadas para la pirosecuenciación y, luego del clonado del amplicón resultante con ese molde, se utilizó como control positivo el clon secuenciado. En el caso de *PsyF/20R*, se utilizó como control positivo el ADN extraído de las muestras ambientales (flebótomos infectados capturados) ya secuenciados. Finalizando la etapa de ensayos de esta tesis, se recibieron muestras de flebótomos de colonias mantenidas en laboratorio e infectadas experimentalmente con gregarinos, provistas por el Dr. Jan Votýpka (Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencia, Universidad de Charles, Praga, República Checa). Las muestras incluyeron un total de 56 flebótomos separados en dos lotes correspondientes a *Phlebotomus sergenti* y *Lu. longipalpis*, que habían sido infectados experimentalmente con *Ps. sergenti* y *Ps. chagasi*, respectivamente (Tabla 17). Estas muestras fueron utilizadas para analizar la especificidad de los cebadores *PsyF/20R* para *Ps. chagasi*, y para confirmar la especificidad de *PsyF/PsyR* a nivel género *Psychodiella*.

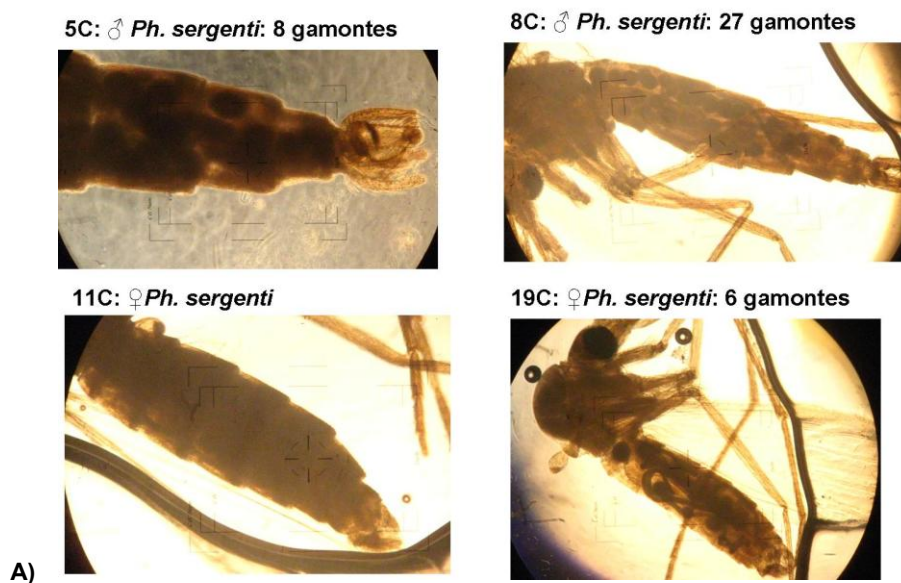
Tabla 17. Listado de los ejemplares analizados bajo microscopio diferenciados por especie, sexo y procedencia.

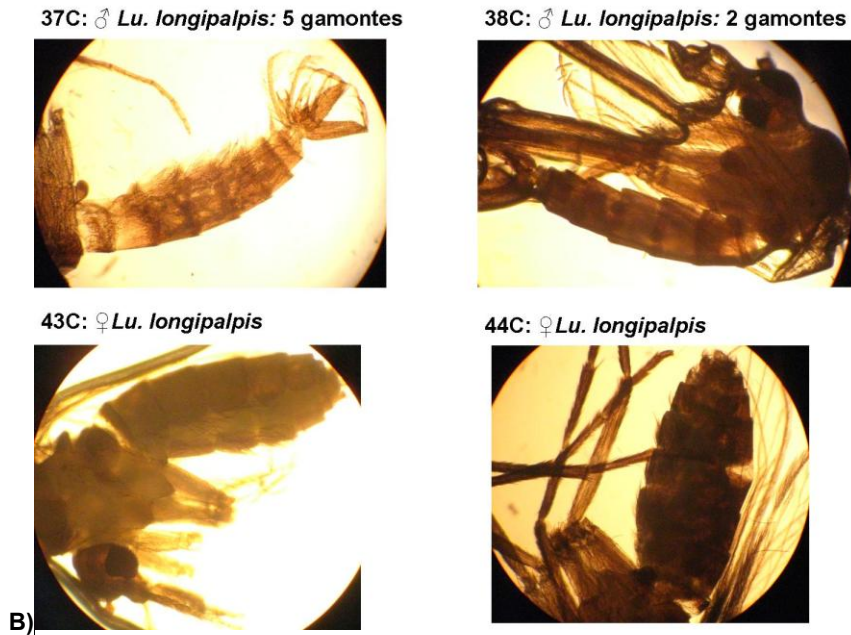
Especie	Sexo	Ejemplares	Procedencia
<i>Lu. longipalpis</i>	♂	15	Colonia de laboratorio (República Checa)
	♀	15	
<i>Ph. sergenti</i>	♂	14	Colonia de laboratorio (República Checa)
	♀	12	

Análisis por microscopía

Con el fin de verificar los resultados obtenidos en las validaciones de los cebadores diseñados, estos ejemplares de laboratorio se analizaron de la misma manera que las muestras ambientales. En primer lugar se observaron los 56 flebótomos infectados por microscopía óptica (Tabla 18).

Tabla 18. Observación al microscopio óptico de los flebótomos provenientes de colonias de laboratorio infectados experimentalmente con gregarinos. En **A)** se observan flebótomos de la especie *Ph. sergenti* y en **B)** de *Lu. longipalpis*.





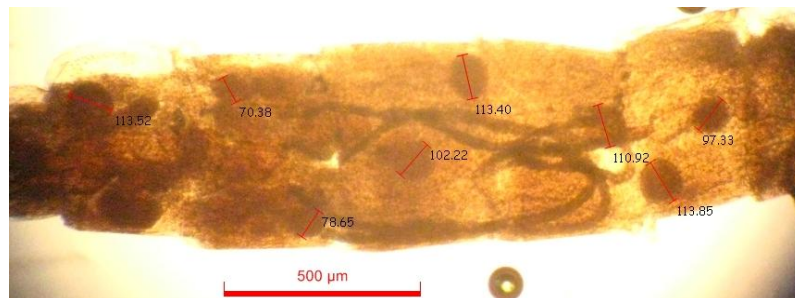
Mediciones de los parásitos

Las mediciones de los parásitos (*Ps. sergenti* y *Ps. chagasi*) en ambas especies de flebótomos, se hizo de la misma manera que para las muestras ambientales de Posadas y Brasil. En función del nivel de infección, en algunos casos se pudo medir la totalidad de los parásitos observados, en otros casos sólo los más visibles, y en otros casos no se pudieron visualizar individualmente (11C, 43C y 44C). En la Tabla 19 se detallan las mediciones junto con las fotografías de las muestras analizadas.

Tabla 19. Mediciones de *Ps. sergenti* y *Ps. chagasi* en flebótomos infectados experimentalmente.

Muestra Foto / Mediciones

5C: ♂
Ph. sergenti:
8 gamontes

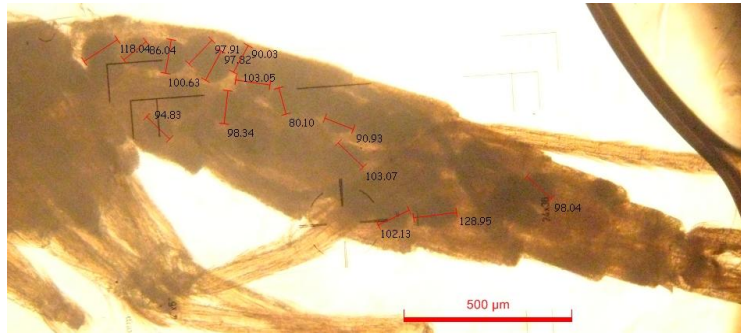


113,52 µm; 70,38 µm; 78,65 µm; 102,22 µm; 113,4 µm; 110,92 µm; 97,33 µm y 113,85 µm.

8C: ♂

Ph. sergenti:

15 de 27
gamontes



118,04 µm; 86,04 µm; 100,63 µm; 97,91 µm; 97,82 µm; 90,03 µm; 103,05 µm; 94,83 µm; 98,34 µm; 80,10 µm; 90,93 µm; 103,07 µm; 102,13 µm; 128,95 µm y 98,04 µm.

19C: ♀

Ph. sergenti:

4 de 6
gamontes

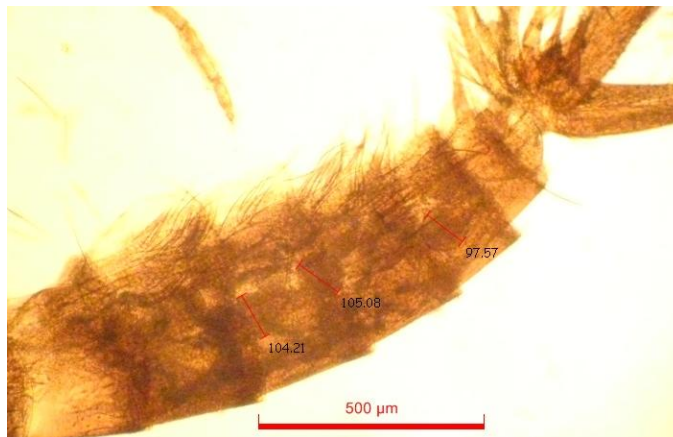


145,23 µm; 102,85 µm; 93,51 µm y 129,93 µm.

37C: ♂

Lu. longipalpis:

3 de 5
gamontes

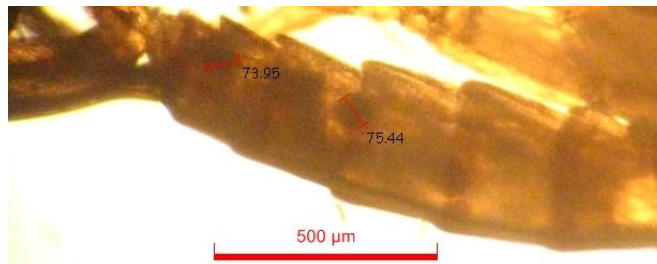


104,21 µm; 105,08 µm y 97,57 µm

38C: ♂

Lu. longipalpis:

2 gamontes



73,95 µm y 75,44 µm

En el caso de *Ph. sergenti* se pudieron medir 27 parásitos (*Ps. sergenti*), y en el caso de *Lu. longipalpis* 5 parásitos (*Ps. chagasi*). Para *Ps. sergenti* los valores mínimo y máximo correspondieron a 70,38 μm y 145,23 μm , respectivamente. Para *Ps. chagasi*, los valores mínimo y máximo fueron 73,95 μm y 104,21 μm , respectivamente.

En el caso de *Ps. chagasi*, los valores se ajustaron a las medidas publicadas para esta especie (Warburg y Ostrovska, 1991; Lantova *et al.*, 2010) (Tablas 19 y 20), determinándose que los parásitos se hallaban en estado gamonte, al igual que los descritos en la Tabla 12.

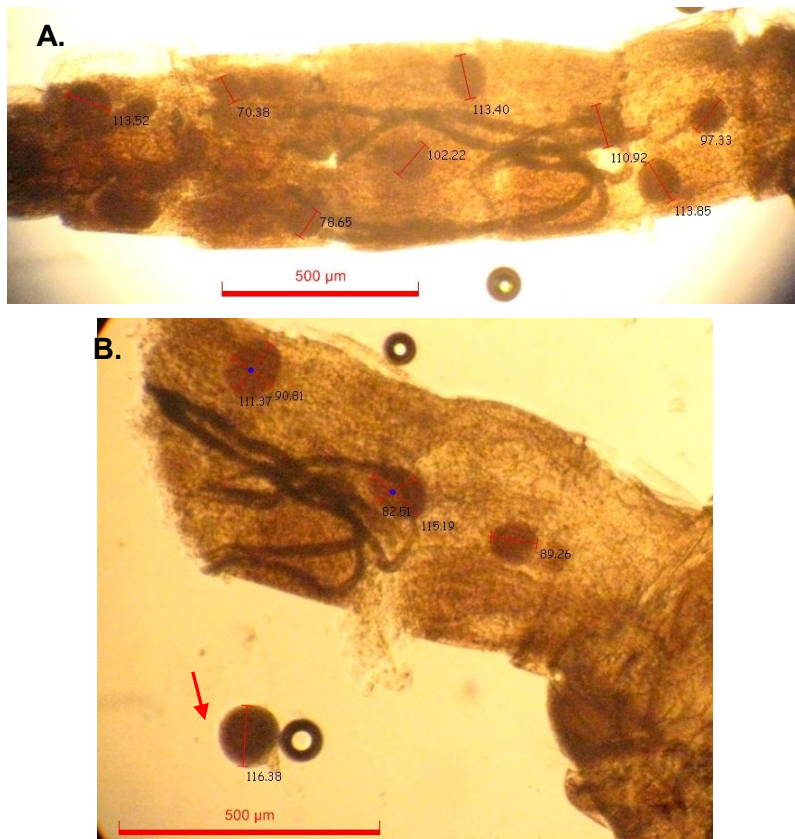
Tabla 20. Comparación de los tamaños de gregarinos en flebótomos infectados experimentalmente, con los valores publicados para *Ps. chagasi* y *Ps. sergenti*. Mediciones realizadas de *Ps. chagasi* y *Ps. sergenti* en las ejemplares de laboratorio *Ph. sergenti* y *Lu. longipalpis*, respectivamente. N = cantidad de mediciones realizadas de los gregarinos. Min.= valor mínimo medido. Máx.= valor máximo medido.

Dimensiones	Gamontes	Promedio (μm)	Min. (μm)	Máx. (μm)	N
	<i>Ps. chagasi</i> (infección experimental)	91,3	73,95	104,21	5
	<i>Ps. chagasi</i> (Lantova <i>et al.</i> , 2010)	80,6	25,5	168	133
	<i>Ps. sergenti</i> (infección experimental)	102,3	70,38	145,23	27
	<i>Ps. Sergenti</i> (Lantova <i>et al.</i> , 2010)	114,6	59	188	408

Del mismo modo, las mediciones realizadas para *Ps. sergenti* indicaron que el parásito también se encontraba en el estado gamonte, teniendo en cuenta los valores mínimo (59 μm) y máximo (188 μm) publicados (Lantova *et al.*, 2010) (Tabla 20). Aunque el promedio (102,3 μm) de las mediciones de *Ps. sergenti* corresponde a un valor menor que el establecido por Lantova (114,6 μm ; Tabla 20), supera el valor promedio de *Ps. chagasi*. Por otro lado, al igual que para las otras mediciones, los parásitos fueron medidos dentro del flebótomo, lo cual puede afectar la precisión de las mediciones. Para analizar este aspecto, se realizó una disección de la muestra 5C (*Ph. sergenti*) realizando un corte transversal en el abdomen, para poder observar gamontes libres. Este procedimiento permitió dejar fuera del abdomen uno de los gamontes, logrando de esta manera una medición más precisa del parásito (señalado con una flecha roja en la Figura 62 B). Nuevamente se midieron los gamontes de este ejemplar: el gamonte libre extraído por disección midió 116,38 μm , y el resto de los

parásitos visibles en el interior de este mismo flebótomo alcanzaron 111,37 μm , 115,19 μm y 89,26 μm . Al comparar estas nuevas mediciones con que se habían hecho previo a la disección, se encontró una diferencia, siendo de mayor tamaño los gamontes medidos post-disección.

Figura 62. Medición del gregarino *Ps. sergenti* libre. Disección de un macho adulto de *Ph. sergenti* (muestra 5C) con posterior medición de uno de los gamontes libres de *Ps. sergenti*. **A.** flebótomo antes de la disección. **B.** flebótomo después de la disección. Ambas fotos corresponden a un aumento 10X del microscopio óptico.



4.5 Extracción de ADN total, amplificación por PCR, secuenciamiento y análisis

En esta etapa se utilizaron los cebadores diagnósticos *PsyF/PsyR* y *PsyF-20R* para analizar el ADN extraído de los flebótomos infectados experimentalmente.

Las amplificaciones con los cebadores *PsyF/PsyR* generaron el resultado esperado, ya que se detectaron *Ps. sergenti* y *Ps. chagasi* en todas las muestras, aunque con variaciones en las intensidades de los amplicones. En la Figura 63 se observan los resultados obtenidos con algunas de las muestras procesadas utilizando

dos diluciones (1:10 y 1:20). En la muestra 44C (dilución 1:10, calle 9) no se observó amplificación en esta ocasión, pero sí en otras repeticiones que no se muestran aquí.

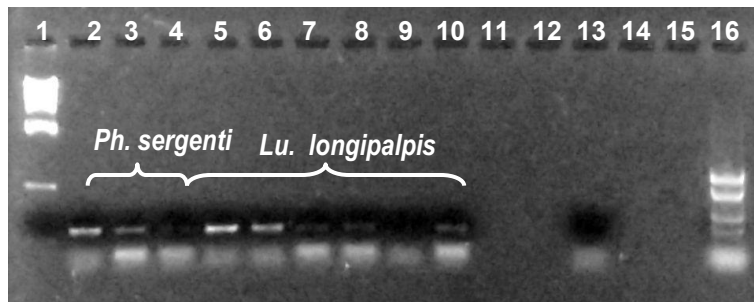


Figura 63. Amplificación de las muestras 1SA, 5C, 37C, 43C y 44C con los cebadores *PsyF/PsyR*. Orden de siembra: 1. PM: λ -*HindIII*; 2. 1SA dilución 1:10, control positivo; 3. 5C dilución 1:10; 4. 5C dilución 1:20; 5. 37C dilución 1:10; 6. 37C dilución 1:20; 7. 43C dilución 1:10; 8. 43C dilución 1:20; 9. 44C dilución 1:10; 10. 44C dilución 1:20; 11 y 12. Vacía; 13. Control negativo (agua); 14 y 15. Vacía; 16. PM: pZ2-*HaeII*

También se realizaron amplificaciones con los cebadores *PsyF/20R* utilizando las mismas muestras. Aunque únicamente se esperaba obtener amplificación en las muestras de *Lu. longipalpis* infectadas con *Ps. chagasi*, también se obtuvo amplificación en dos de las muestras de *Ph. sergenti* infectadas con *Ps. sergenti* (11C y 19C). En la Figura 64 se muestran las amplificaciones pertinentes, donde los amplicones de las muestras 43C, 44C y 19C se observan muy tenues.

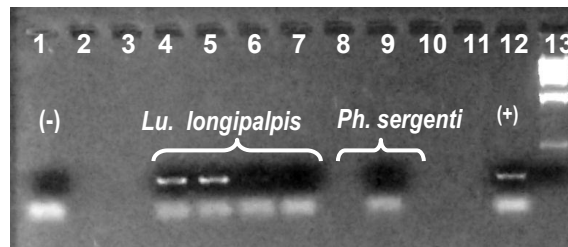


Figura 64. Amplificación de las muestras 37C, 38C, 43C, 44C, 19C y SA1 con los cebadores *PsyF* y *20R*. Orden de siembra: 1. Control negativo (agua); 2. Vacía; 3. Vacía; 4. 37C dilución 1:10; 5. 38C dilución 1:10; 6. 43C dilución 1:10; 7. 44C dilución 1:10; 8. Vacía; 9. 19C dilución 1:10; 10. Vacía; 11. Vacía; 12. Control positivo, SA1 dilución 1:10; 13. PM: λ -*HindIII*.

Para analizar estos resultados con más detalle, se secuenciaron los productos de amplificación con ambos cebadores (*PsyF/PsyR* o *PsyF/20R*, según el caso) (Macrogen). En la Tabla 21 se muestran los resultados de las búsquedas por homología de cada una de estas secuencias, mostrando el *hit* más relevante, E-value

y porcentaje de identidad. Cada una de las secuencias fue analizada por separado y también luego de ser ensambladas (Tabla 21). Todos los cromatogramas obtenidos del secuenciamiento fueron de muy buena calidad, excepto por la muestra 43C (*Lu. longipalpis* hembra, amplicón *PsyF*-20R) que no pudo ser ensamblada debido a la baja calidad de la secuencia con *PsyF*.

Tabla 21. Resultados de la búsqueda por homología mediante BLASTN (DB:nt) de cada una de las muestras con ambos cebadores; también se muestra el resultado de la búsqueda por homología de las secuencias ensambladas (contig), con su E-value y porcentaje de identidad.

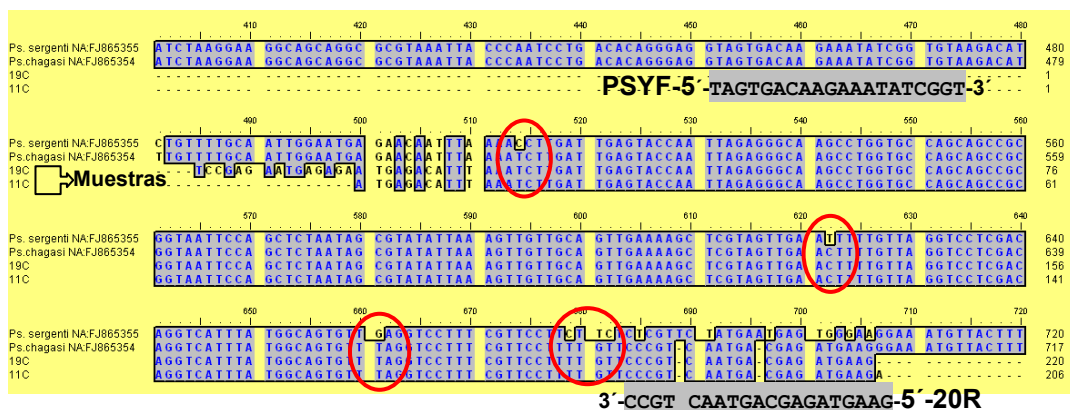
Cebador	Muestra	Hit	E-value	% identidad	Contig
<i>PsyF</i>	11C, <i>Ph sergenti</i> (hembra)	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (FJ865354)	5,00E-97	99	3E-75; 99%
20R			2,00E-98	99	
<i>PsyF</i>	19C, <i>Ph sergenti</i> (hembra)	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (FJ865354)	3,00E-98	99	6E-83; 100%
20R			7,00E-101	100	
<i>PsyF</i>	37C, <i>Lu. longipalpis</i> (macho)	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (FJ865354)	5,00E-102	99	5E-79; 98%
20R			8,00E-96	98	
<i>PsyF</i>	38C, <i>Lu. longipalpis</i> (macho)	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (FJ865354)	2,00E-99	99	2E-83; 100%
20R			3,00E-100	99	
<i>PsyF</i>	43C, <i>Lu. longipalpis</i> (hembra)	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (FJ865354)	2,00E-97	99	no
20R			5,00E-54	87	no
<i>PsyF</i>	37C, <i>Lu. longipalpis</i> (macho)	<i>Psychodiella chagasi</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (FJ865354)	1,00E-77	100	JX963638: 3E-60; 99%
<i>PsyR</i>			9,00E-78	99	
<i>PsyF</i>	38C, <i>Lu. longipalpis</i> (macho)	<i>Psychodiella chagasi</i> strain KS2.1 18S ribosomal RNA gene (JX963636)	2,00E-80	99	9E-55; 98%
<i>PsyR</i>			9,00E-77	98	
<i>PsyF</i>	43C, <i>Lu. longipalpis</i> (hembra)	<i>Psychodiella chagasi</i> strain SA1.1 18S ribosomal RNA gene (KC113486)	1,00E-73	99	JX963638: 1E-59; 99%
<i>PsyR</i>			5,00E-72	99	
<i>PsyF</i>	44C, <i>Lu. longipalpis</i> (hembra)	<i>Psychodiella chagasi</i> strain SA1.1 18S ribosomal RNA gene (KC113486)	1,00E-74	99	JX963638: 7E-56; 98%
<i>PsyR</i>			6,00E-71	99	
<i>PsyF</i>	5C, <i>Ph sergenti</i> (macho)	<i>Psychodiella chagasi</i> strain SA1.1 18S ribosomal RNA gene (KC113486)	4,00E-73	100	JX963638: 2E-46; 99%
<i>PsyR</i>			5,00E-73	99	
<i>PsyF</i>	8C, <i>Ph sergenti</i> (macho)	<i>Psychodiella chagasi</i> strain SA1.1 18S ribosomal RNA gene (KC113486)	7,00E-74	99	JX963638: 2E-46; 98%
<i>PsyR</i>			6,00E-71	99	

Análisis *in silico* de las secuencias de *Ps. sergenti*

Luego de los resultados inesperados que se obtuvieron a partir del secuenciamiento de las muestras de *Ph. sergenti* y amplificadas con los cebadores *PsyF-20R*, se analizaron en detalle las secuencias resultantes. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas a partir de las muestras 11C y 19C con *PsyF/20R*, indicó que ambas presentaban homología con *Ps. chagasi* (NA: FJ865354), no con *Ps. sergenti* como era de esperarse. Como ya se ha mencionado, el cebador 20R fue diseñado a partir de una región variable entre las tres especies de *Psychodiella* (Figura 60).

Por ello se analizaron las secuencias de las muestras 11C y 19C junto con las secuencias de referencia de *Ps. chagasi* (NA: FJ865354) y de *Ps. sergenti* (NA: FJ865355), ubicando la secuencia de los cebadores *PsyF/20R*. El objetivo de este análisis fue comparar las secuencias obtenidas con *PsyF/20R* (dirigidos a la detección específica de *Ps. chagasi*) con las secuencias de referencia para ambas especies. En la Figura 65 se muestra el alineamiento de las secuencias de referencia con las secuencias de las muestras 11C y 19C, donde se puede observar que ambas muestras secuenciadas presentan identidad del 100% con la secuencia de *Ps. chagasi*. Más allá de los nt diferenciales presentes en la región variable (región utilizada para diseñar el cebador 20R), hay otros 6 nt diferentes entre *Ps. chagasi* y *Ps. sergenti* a lo largo de la región del amplicón, que también coinciden entre las secuencias de 11C y 19C con *Ps. chagasi* (señalados con círculo en la Figura 65).

Figura 65. Alineamiento múltiple de las secuencias de referencia del GenBank de *Ps. chagasi* y *Ps. sergenti*, junto con las muestras 11C y 19C. Los cebadores *PsyF/20R* se indican en la parte inferior del AM resaltados en gris. Para poder visualizar el cebador *reverse* en el alineamiento se usó la secuencia reversa complementaria.

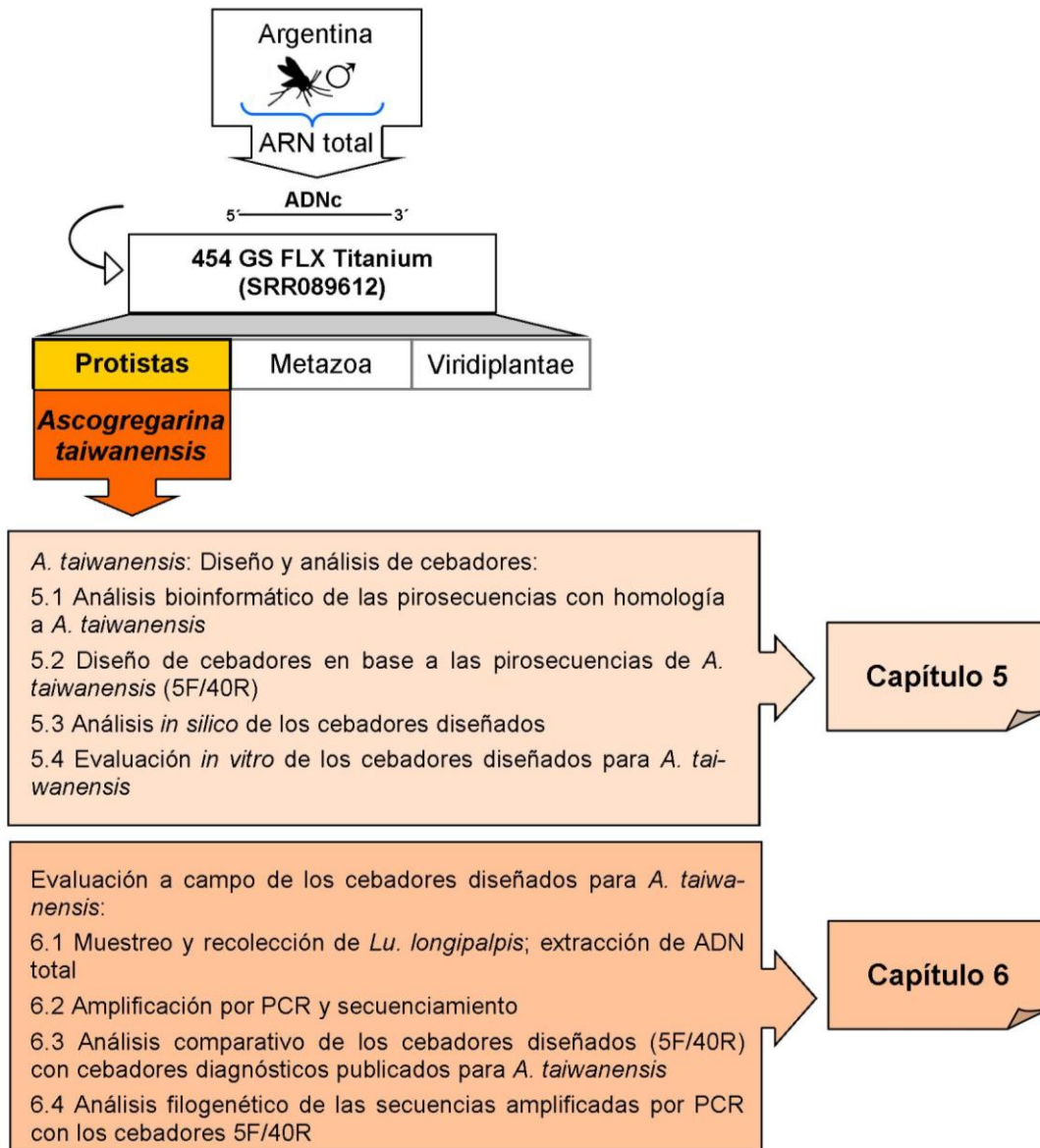


Ascogregarina taiwanensis

En esta segunda parte de Resultados y Discusión (Capítulos 5 y 6) se analiza *Ascogregarina taiwanensis*, otro de los taxones de interés identificados en *Lu. longipalpis* machos de una zona endémica de LV (Posadas, Argentina) (McCarthy *et al.*, 2011). El interés que presenta este protista gregarino es que, aunque sólo ha sido descrito como parásito de mosquitos (Lantova y Volf, 2014), varias secuencias presentes en *Lu. longipalpis* machos de Posadas mostraron homología con *A. taiwanensis* (McCarthy *et al.*, 2011).

El punto de partida de este análisis fueron las 37 pirosecuencias originales que mostraron homología con *A. taiwanensis*. Estas secuencias nucleotídicas fueron sometidas a diferentes análisis *in silico* para el diseño de cebadores específicos. Posteriormente, se realizó una validación *in vitro* y a campo de los cebadores diseñados.

A continuación se muestra un esquema que sintetiza el contenido de los Capítulos que describen los Resultados para *A. taiwanensis*.



CAPÍTULO 5. *A. taiwanensis*: Diseño y análisis de cebadores

5.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a *A. taiwanensis*.

Como ya se ha mencionado, *Ascogregarina taiwanensis* fue identificado en 37 pirosecuencias presentes en *Lu. longipalpis* machos de Posadas (Misiones, Argentina). Los resultados originales de las búsquedas por homología de estas pirosecuencias arrojaron valores de E-value entre -117 y -52 (McCarthy *et al.*, 2011). Las pirosecuencias tienen un largo entre 173 y 607 nt y, a partir de las mismas, se inició la estrategia de búsqueda de cebadores para determinar la asociación y significancia de este taxón en *Lu. longipalpis*.

Búsquedas por homología en bases de datos nucleotídicas

Para comenzar con el análisis bioinformático de estas pirosecuencias se realizó una nueva búsqueda por homología con BLASTN contra la base de datos nucleotídica no redundante (DB:nt). Todas las pirosecuencias analizadas volvieron a mostrar homología con *A. taiwanensis* con valores de E-value cercanos a los originales (McCarthy *et al.*, 2011), excepto por dos secuencias. La pirosecuencia F1UMNMG02DORVU presentó como *hit* más relevante a *Goussia carpelli* (parásito de peces; *Goussia carpelli* strain 23 28S ribosomal RNA gene, partial sequence, NA: GU593716), y la pirosecuencia F1UMNMG02DLGWU presentó como *hit* más relevante a *Cyprinus carpio* (*Cyprinus carpio* genome assembly common carp genome scaffold LG24, NA: LN590679). Por ello estas pirosecuencias fueron excluidas del análisis subsiguiente.

En la Figura 66 se muestra uno de los resultados de la búsqueda por homología de las pirosecuencias. En A) se observan los *hits* obtenidos con el *hit* más relevante resaltado con un recuadro, y en B) se muestra el alineamiento entre las secuencias homólogas. Estos resultados confirmaron que el *hit* más importante era *A. taiwanensis*, y el alineamiento obtenido del BLAST mostraba dos porciones. Una región de menor longitud de 95 nt, que abarcaba los nt 3962 a 4057 del *hit*, y una segunda región de mayor longitud de 338 nt, que abarcaba los nt 4179 a 4517 del *hit* (señalados en la figura con llaves y nombrados “Alineamiento menor” y “Alineamiento mayor”, respectivamente).

Figura 66. Resultado de la búsqueda por homología correspondiente a la pirosecuencia F1UMNMG02DPREJ. A) Algunos de los *hits* resultantes; el más relevante se indica con un recuadro. B) Alineamiento del BLAST del primer *hit*.



Alineamiento múltiple de secuencias correspondientes a *A. taiwanensis*

Para determinar el grado de similitud entre las pirosecuencias y continuar con el diseño de los cebadores, se realizó un AM con las pirosecuencias correspondientes a *A. taiwanensis*. Previamente, las pirosecuencias se seleccionaron eligiendo las más largas y las que tenían mejores valores de E-value.

Teniendo en cuenta que las longitudes de las 35 pirosecuencias oscilan entre 173 y 607 nt, se buscó seleccionar secuencias con longitudes similares y mayores a los 500 nt, para poder conseguir cebadores con un producto de PCR de un tamaño similar. De este análisis se desprendieron nueve secuencias con longitudes entre 500 y 607 nt. Las pirosecuencias seleccionadas se detallan en la Tabla 22, junto con el largo y dos de los valores de la búsqueda por homología (E-value e identidad).

Tabla 22. Secuencias seleccionadas por su longitud y valores de E-value.

Secuencia	Largo (nt)	BLASTN (BD:nt)		
		Hit	E-value	Identidad
F1UMNMG02EIPL4	500	<i>Ascogregarina taiwanensis</i> 18S	e-101	71 %
F1UMNMG02DLTBT	556	ribosomal RNA gene, partial	e-114	78 %
F1UMNMG02DWG6S	542	sequence; and internal	e-119	77 %
F1UMNMG02E5ND6	607	transcribed spacer 1, 5.8S	e-85	60 %
F1UMNMG02D3TBF	538	ribosomal RNA gene, internal	e-129	77 %
F1UMNMG02DP7AP	541	transcribed spacer 2, 26S	e-122	77 %
F1UMNMG02EZ5KT	545	ribosomal RNA and 5S	e-126	78 %
F1UMNMG02DPREJ	541	ribosomal RNA genes,	e-131	77 %
F1UMNMG02E25YO	567	complete sequence (EF666482)	e-118	75 %

Se realizó un AM con las nueve pirosecuencias seleccionadas, en donde se observó que presentaban una elevada similitud entre sí en la mayor parte de su largo. Esto se observa en la Figura 68, cuyo recuadro negro con fondo gris muestra las identidades entre ellas. Además, en la Figura se señalan con un recuadro los cebadores diseñados 5F-40R descritos más adelante (apartado 5.2).

Figura 68. Alineamiento múltiple de las nueve pirosecuencias seleccionadas con homología a *A. taiwanensis*. Se señalan con un recuadro los cebadores diseñados 5F-40R (ver más adelante). Se muestra la secuencia reversa complementaria del cebador *reverse* para poder visualizarlo en las secuencias de hebra (+).



De estas nueve pirosecuencias se eligió la de mejor E-value, F1UMNMG02DPREJ (SRR089612), para el diseño de los cebadores.

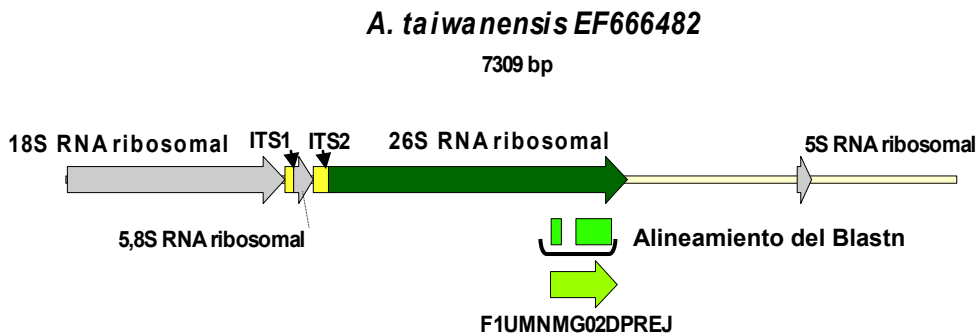
Conjuntamente, se confirmó que las nueve pirosecuencias seleccionadas (Tabla 22) corresponden a la misma región de la secuencia de referencia del GenBank (EF666482). Esto se logró analizando los alineamientos resultantes del BLASTN. A continuación se detalla cada una de las pirosecuencias y las regiones involucradas (Tabla 23), nombradas Alineamiento menor (1) y Alineamiento mayor (2).

Tabla 23. Pirosecuencias seleccionadas y regiones involucradas en el alineamiento del BLASTN; en cada columna se indican el inicio y fin de los nt del *hit* involucrados en el alineamiento. 1: corresponde al Alineamiento menor, región de menor longitud y 2: al Alineamiento mayor, región de mayor longitud.

Pirosecuencia	Región nucleotídica	
	1	2
F1UMNMG02EIPL4	3971 al 4057	4179 al 4517
F1UMNMG02DLTBT	3971 al 4057	4179 al 4479
F1UMNMG02DWG6S	3971 al 4057	4179 al 4517
F1UMNMG02E5ND6	3971 al 4057	4179 al 4456
F1UMNMG02D3TBF	3971 al 4057	4179 al 4518
F1UMNMG02DP7AP	3971 al 4057	4179 al 4517
F1UMNMG02EZ5KT	3971 al 4057	4179 al 4517
F1UMNMG02DPREJ	3971 al 4057	4179 al 4517
F1UMNMG02E25YO	3962 al 4057	4179 al 4513

Si bien el *hit* resultante del BLASTN corresponde a los genes ribosomales 18S, 5,8S, 26S y 5S de *A. taiwanensis*, la pirosecuencia seleccionada abarca 371 nt de la región correspondiente al gen 26S ribosomal. Para poder determinar las regiones involucradas en este análisis, se obtuvo la secuencia EF666482 del NCBI y, en base a la misma, se hizo un mapa genético para ubicar la pirosecuencia (programa NTI Vector; Figura 69). A partir de este análisis se pudo observar que el gen 26S ribosomal comprende los nt 2147 a 4602, y la pirosecuencia elegida desde el nt 3971 al 4057 (región de menor longitud), y del nt 4179 al 4517 (la de mayor longitud).

Figura 69. Esquema de la secuencia de referencia de *A. taiwanensis* (EF666482) del NCBI, junto con la pirosecuencia F1UMNMG02DPREJ (flecha verde claro) y los dos alineamientos obtenidos del alineamiento con el *hit* en BLASTN (rectángulos verdes).



5.2 Diseño de cebadores en base a las pirosecuencias de *A. taiwanensis* (5F/40R).

Seguidamente se procedió a diseñar los cebadores para *A. taiwanensis* en base a la pirosecuencia seleccionada (F1UMNMG02DPREJ) con el programa Oligo 7. Al igual que para el diseño de los cebadores para *Ps. chagasi*, se eligió el juego de cebadores con mayor producto teórico de PCR y priorizando las características ya mencionadas para *Ps. chagasi*. Respetando estos parámetros, los cebadores elegidos fueron el 29F y el 501R, cuyo amplicon teórico era de 490 pb tomando como molde la secuencia F1UMNMG02DPREJ (Figura H, ANEXO I). En la Figura I (ANEXO I) se muestran las características de los cebadores, cuya temperatura de hibridación óptima teórica era de 53 °C (máxima 59,9 °C), y que no presentaban formación de estructura secundaria en ninguno de los dos casos (Figuras H e I, ANEXO I). Los cebadores fueron renombrados siguiendo la nomenclatura del listado general de cebadores, 5F (= 29F) y 40R (= 501R).

Para completar este análisis, ambos cebadores se ubicaron en el AM de la Figura 68 (realizado con las nueve pirosecuencias) para visualizar las secuencias reconocidas por estos cebadores.

5.3 Análisis *in silico* de los cebadores diseñados

El amplicón teórico generado por los cebadores 5F y 40R fue sometido a una búsqueda por homología usando BLASTN (BD:nt). En la Figura 70 se muestra el resultado de esta búsqueda, en la que se identificó *A. taiwanensis* y donde también se observaron las dos regiones (menor y mayor) en el alineamiento.

Figura 70. Resultado de la búsqueda por homología correspondiente al amplicón teórico de los cebadores 5F/40R. A) *Hits* resultantes; el *hit* más relevante se señaló con un recuadro, B) alineamiento del *hit* mas relevante, que presenta los alineamientos mayor y menor.

RID [S31BZ3Y201R](#) (Expires on 06-18 22:34 pm)

Query ID [IdlQuery_259527](#) Database Name [nr](#)
 Description [amplicon RE3 con 5F-40R en Oligo7](#) Description [Nucleotide collection \(nr\)](#)
 Molecule type [nucleic acid](#) Program [BLASTN 2.2.31+](#) [Citation](#)
 Query Length [490](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[Graphic Summary](#)
[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Ascogregarina taiwanensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S rRNA gene, complete sequence	401	510	76%	5e-108	91%	EF666482.1
<input type="checkbox"/>	Goussia carpelli strain 23.28S ribosomal RNA gene, partial sequence	394	394	59%	8e-106	91%	GU593716.1
<input type="checkbox"/>	Besnoitia besnoiti from Israel 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	388	388	61%	4e-104	90%	DQ227420.1
<input type="checkbox"/>	Besnoitia besnoiti from Spain 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	388	388	61%	4e-104	90%	DQ227419.1
<input type="checkbox"/>	Besnoitia besnoiti from Spain 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	388	388	61%	4e-104	90%	DQ227418.1
<input type="checkbox"/>	Besnoitia besnoiti from Portugal 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S rRNA gene, complete sequence	388	388	61%	4e-104	90%	AY833846.1
<input type="checkbox"/>	Besnoitia tarandi large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	388	388	61%	4e-104	90%	AY618184.1
<input type="checkbox"/>	Sarcocystis aridifcanis large subunit ribosomal RNA gene, complete sequence	388	388	61%	4e-104	90%	AF076904.1
<input type="checkbox"/>	Sarcocystis miescheriana large subunit ribosomal RNA gene, complete sequence	388	388	61%	4e-104	90%	AF076902.1
<input type="checkbox"/>	Besnoitia besnoiti large subunit ribosomal RNA gene, complete sequence	385	385	61%	5e-103	90%	AF076900.1

A)

Download [GenBank](#) [Graphics](#) Sort by: [E value](#)

Ascogregarina taiwanensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA genes, complete sequence
 Sequence ID: [gb|EF666482.1|](#) Length: 7309 Number of Matches: 2

Range 1: 4179 to 4471 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
401 bits(217)	5e-108	272/298(91%)	6/298(2%)	Plus/Plus
Query 192	ACAGTTAACCCAGAACTGAAGCGGACACGGGGAAATCCGACTGTTTAAATAAAAAAAAGCA			251
Sbjct 4179	ACAGCTAACTCAGAACTGAAGCGGACACGTGGAATCCGACTGTTTAAATAAAAAAAAGCA			4238
Query 252	TTGTGAAAACCAGCAATGGCTTTGACACAATGTGATTTCTGCCCACTGCTCTGAATGTCA			311
Sbjct 4239	TTGCCGATGGCTTTGATTGGCGTTGACGTAATGTGATTTCTGCCCACTGCTCTGAATGTCA			4298
Query 312	ATCTGGTGAATAATCAGTTAAAGCGCGGGTAAACGGCGGGAGTAATGACTCTCTTAA			371
Sbjct 4299	ATGTGGTGAATA-TTCAACT-AAAGCGCGGGTAAACGGCGGGAGTAATGACTCTCTTAA			4356
Query 372	GGTAGCCAAATGCTCTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAAACGAGATTCTCT			431
Sbjct 4357	GGTAGCCAAATGCTCTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAAACGAGATTCTCT			4416
Query 432	ACTGTCCCTAACCAATCTCTTAGCGTAAACCACAGCCAAGGGAAACGG-CTTGGAAATA			488
Sbjct 4417	ACTGTCCCTAACCAATCTCTTAGCGTAAACCACAGCCAAGGGAAACGGCTTGGAAATA			4471

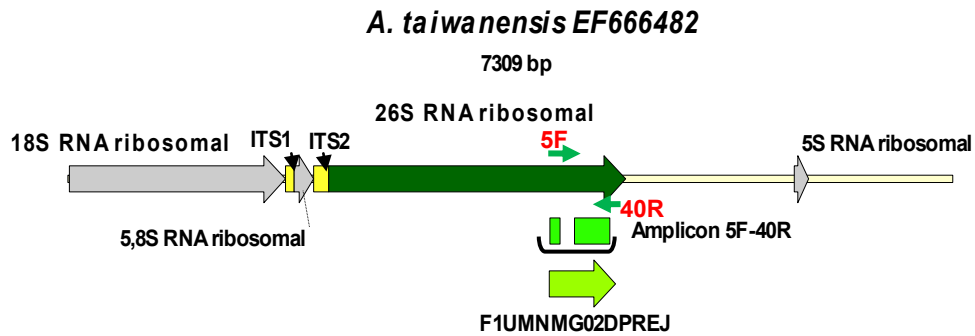
Range 2: 3978 to 4057 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
108 bits(58)	1e-19	73/80(91%)	1/80(1%)	Plus/Plus
Query 3	AAGCCTCTAGTCAGTAGACTAAAGTGGTTAAGGGAAAGTCGGC-AATTAGATCCGTAACCT			61
Sbjct 3978	AAGCCTCTGGTCATTAGGCCAAAAGTAGATAAAGGGAAAGTCGGCAAATTAGATCCGTAACCT			4037
Query 62	TGGAAAAAGGATTGGCTCTG 81			
Sbjct 4038	TGGAAAAAGGATTGGCTCTG 4057			

B)

Teniendo en cuenta las posiciones nucleotídicas obtenidas a través de los alineamientos del BLASTN, se generó un mapa genético de la pirosecuencia, el amplicón teórico y los cebadores 5F/40R (Figura 71). El objetivo de este análisis fue conocer las regiones involucradas para determinar si los cebadores diseñados eran eficaces para la confirmación de dicha especie en flebotomos. De esta manera, se confirmó que el amplicón teórico de los cebadores 5F/40R corresponde al extremo 3' del gen 26S ribosomal y a la misma región de la pirosecuencia.

Figura 71. Esquema de la secuencia de referencia de *A. taiwanensis* (EF666482) del NCBI, junto con la pirosecuencia F1UMNMG02DPREJ (flecha verde claro), los cebadores 5F y 40R (flechas verde oscuro), y el amplicón teórico de los cebadores 5F/40R (rectángulos verdes).



Continuando con el análisis *in silico*, se realizó un análisis de especificidad con 568 de las pirosecuencias obtenidas del SSG, correspondientes a Apicomplejos, Bacterias y Hongos. Para esto, cada una de las pirosecuencias fue analizada con el programa FastPCR para ver si había hibridación con alguno de los dos cebadores. Si alguno de los cebadores (*forward* o *reverse*) hibridaba con alguna pirosecuencia, ésta se analizaba con el programa Oligo 7. Con este programa se verificaba si había amplificación con ambos cebadores. Si se generaba amplicón teórico, éste se analizaba con BLASTN para ver si había detección inespecífica. El siguiente esquema ejemplifica lo mencionado anteriormente.



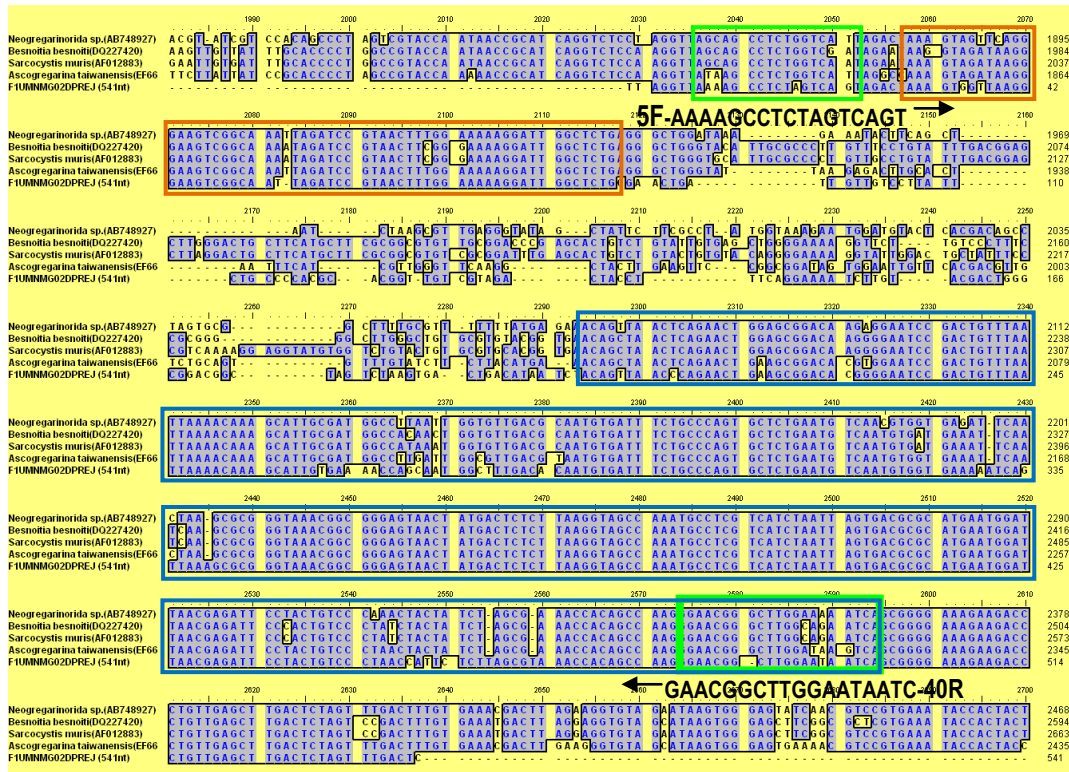
Llevando a cabo la estrategia detallada no se encontró hibridación teórica con las 568 pirosecuencias pertenecientes a otros taxones (Apicomplejos, Bacterias y Hongos).

Para profundizar el análisis *in silico* de los cebadores diseñados (5F/40R), se realizó un AM (Figura 72) con secuencias de referencia obtenidas del GenBank, a partir de los resultados de una búsqueda por homología en base a la pirosecuencia utilizada para diseñar los cebadores (F1UMNMG02DPREJ). Se utilizaron secuencias de las especies *Neogregarinorida* sp. (AB748927), *Besnoitia besnoiti* (DQ227420), *Sarcocystis muris* (AF012883) y *Ascogregarina taiwanensis* (EF666482). En el AM resultante se ubicaron los cebadores diseñados (indicados con recuadro verde; Figura 72) y las dos regiones observadas en el BLASTN (alineamientos menor y mayor). El alineamiento de menor longitud se señaló con un recuadro naranja (Figura 72) y el de mayor longitud con color azul (Figura 72).

Es importante destacar que existen discrepancias entre la secuencia de *A. taiwanensis* del GenBank (EF666482) y la pirosecuencia F1UMNMG02DPREJ y, por ende, también en los cebadores 5F/40R con respecto a la secuencia de referencia (EF666482), particularmente en 4 nt del cebador *forward* y 3 nt del *reverse*. Esto se debe a que los cebadores fueron diseñados en base a la pirosecuencia y no la secuencia del GenBank. Esto se hizo de esta manera por dos razones: por un lado, porque uno de los objetivos de la tesis era la confirmación de los taxones previamente identificados mediante SSG y, por otro, porque se encontraron varias pirosecuencias con elevada similitud a la que se usó como molde para el diseño de los cebadores (Figura 68).

También cabe resaltar que el AM fue realizado usando sólo cinco secuencias de referencia, debido a que no existían más secuencias del gen ribosomal 26S/28S de especies relacionadas. Para poder obtener las secuencias de referencia se realizó una búsqueda en PubMed de otros genes ribosomales 26S/28S de especies relacionadas, pero como la mayoría de las secuencias encontradas eran secuencias parciales, éstas no se pudieron utilizar. Por otro lado, el gen ribosomal 26S de las especies evolutivamente más cercanas, *Ps. chagasi*, *Ps. sergenti* y *Ps. tobbi*, no ha sido secuenciado.

Figura 72. AM de las secuencias de referencia del NCBI y la pirosecuencia F1UMNMG02DPREJ. Naranja = secuencia del alineamiento menor del BLASTN del amplicón 5F/40R; azul = alineamiento mayor; verde = cebadores. Se muestra la secuencia reversa complementaria del cebador *reverse* para poder visualizarlo en la secuencia de referencia de hebra (+).



5.4 Evaluación *in vitro* de los cebadores diseñados para *A. taiwanensis*.

Para realizar la evaluación *in vitro* de los cebadores diseñados, se utilizó la misma estrategia que para *Ps. chagasi*: amplificación por PCR con 5F/40R de las muestras de ADNc originales, y clonado y posterior secuenciamiento del amplicón generado.

Amplificación por PCR de ADNc con los cebadores 5F/40R

En primer lugar, se realizaron amplificaciones con 5F/40R usando todas las muestras de ADNc (SS1, SS2, PP1, PP2). En la Figura 73 se muestra el gel de agarosa obtenido a partir de estas amplificaciones, observándose el producto de PCR esperado de ~490 pb en la muestra SS2. Como la banda que se obtuvo inicialmente era demasiado tenue, se realizaron varios ensayos para mejorar la amplificación. Entre ellos, un gradiente de temperatura de hibridación, y la determinación de la concentración óptima de MgCl₂. En función de los resultados obtenidos, se concluyó que la temperatura de hibridación óptima era de 51°C y la concentración óptima de MgCl₂ de 2,5 mM (no se muestran los resultados de las optimizaciones).

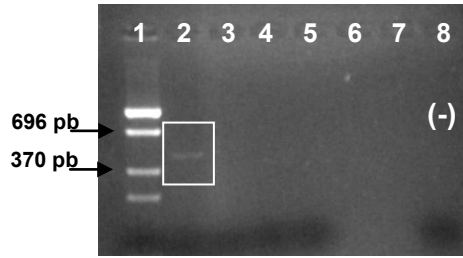


Figura 73. Electroforesis de las amplificaciones con el juego de cebadores 5F/40R. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-*Hae*II; 2. SS2 dilución 1:100; 3. SS1 dilución 1:100; 4. PP2 dilución 1:20; 5. PP1 dilución 1:20; 6. Vacía; 7. Vacía; 8. control negativo.

Con las condiciones óptimas de reacción se realizó una amplificación de mayor volumen (Figura 74 A), obteniéndose el producto de PCR esperado de 490 pb con excelente intensidad. A partir de estos resultados se purificaron los amplicones del gel (Figura 74 B).

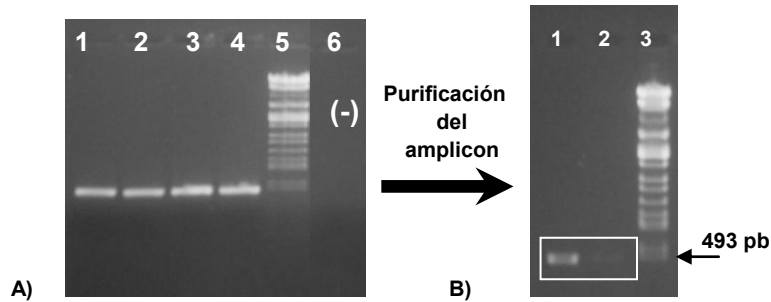


Figura 74. A) Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 5F-40R. Orden de siembra: 1. SS2 dilución 1:100; 2. SS2 dilución 1:100; 3. SS2 dilución 1:100; 4. SS2 dilución 1:100; 5. PM: λ BamHI/*Hind*III/*Eco*RI; 6. control negativo (agua). **B) Electroforesis de las purificaciones.** 1. Purificación de la muestra SS2 dilución 1:100, primera elución; 2. Purificación de la muestra SS2 dilución 1:100, segunda elución; 3. PM: λ BamHI/*Hind*III/*Eco*RI.

El fragmento de PCR se secuenció pero no se obtuvo una buena secuencia (el cromatograma presentó demasiado ruido; no se muestra el resultado). De todas maneras se analizó la secuencia con BLASTN (BD:nt), pero no se obtuvo un resultado concluyente.

Clonado del producto de amplificación

Con el objetivo de resolver el resultado inconcluso del amplicón 5F/40R, se decidió continuar con su clonado (Figura 75). Se utilizó el vector de clonado pBlue Script II KS+ (2961 pb) para clonar el fragmento de 490 pb. La ligación se realizó utilizando relaciones molares vector:inserto de 5:1. El resultado de la transformación

con la mezcla de ligación generó 10 colonias, las cuales fueron enumeradas desde el 101 al 111. La estrategia de clonado se detalla en la Figura 75.

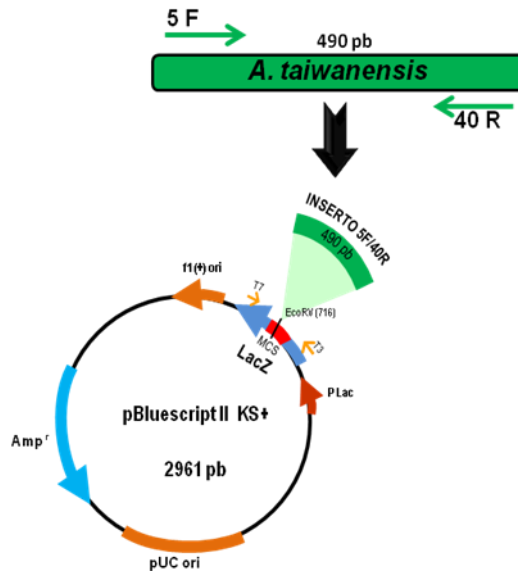


Figura 75. Estrategia de clonado del producto de PCR de 490 pb generado con 5F/40R en el plásmido pBluescript II KS+. El fragmento de 490 pb (rectángulo verde) se ligó al plásmido (2961 pb) generando un clon recombinante de 3451 pb. LacZ: ORF perteneciente al gen lacZ; f1 (+): origen de replicación; MCS: sitio de clonado múltiple, permite la inserción del inserto deseado interrumpiendo la expresión del gen lacZ; T3: sitio de hibridación del cebador universal T3 para el secuenciamiento; T7: sitio de hibridación del cebador universal T7 para el secuenciamiento; Amp^r: resistencia al antibiótico Ampicilina; Promotor Lac: permite inducir la expresión del gen fusión LacZ; pUC ori: origen de replicación.

Posteriormente, se realizó la extracción del ADN plasmídico de las colonias seleccionadas. La Figura 76 muestra algunas de estas extracciones, donde se observa la diferencia de tamaño esperada entre el plásmido recombinante de 3451 pb y el plásmido sin inserto (2961 pb; calles 14 y 15).

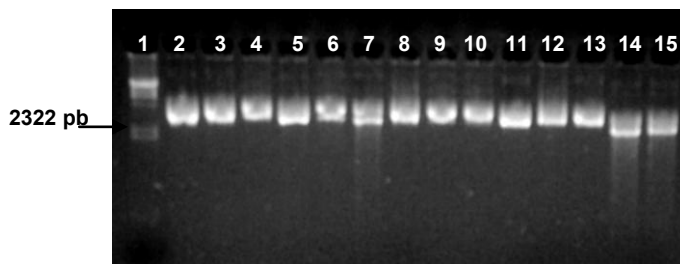


Figura 76. Extracción de ADN plasmídico de posibles clones recombinantes con el inserto 5F/40R. Orden de siembra: **1.** PM: λ /HindIII; **2.** colonia 101 I; **3.** colonia 101 II; **4.** colonia 102 I; **5.** colonia 102 II; **6.** colonia 103 I; **7.** colonia 103 II; **8.** colonia 104 I; **9.** colonia 104 II; **10.** colonia 105 I; **11.** colonia 105 II; **12.** colonia 106 I; **13.** colonia 106 II; **14.** Vector sin inserto pBS; **15.** Vector sin inserto, pBS.

Los clones recombinantes fueron analizados por digestión enzimática simple (con *PvuII*) y doble (con *PvuII* y *HincII*) del ADN plasmídico (ver Materiales y Métodos). Los clones recombinantes verificados por digestión enzimática simple, fueron posteriormente reconfirmados con la digestión doble. De estos resultados se obtuvieron nueve clones con el patrón de restricción esperado. En la Figura 77 se observan algunas de las digestiones de los clones recombinantes. En las calles 2, 3, 6, 7, 20 y 21 se observan los fragmentos generados por los clones 101, 103 y 111 debido a un clonado *antisense* (3'-5') del fragmento (Figura 77 A y C), formando un patrón de bandas de 2513, 479, 241 y 218 pb. En las calles 4, 5, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se observan los clones 102, 104, 105, 106, 109 y 110, cuyo patrón de bandas corresponde a un clonado *sense* (5'a 3') del fragmento, reconocido por cuatro bandas de 2513, 383, 314 y 241pb (Figura 77 B y D).

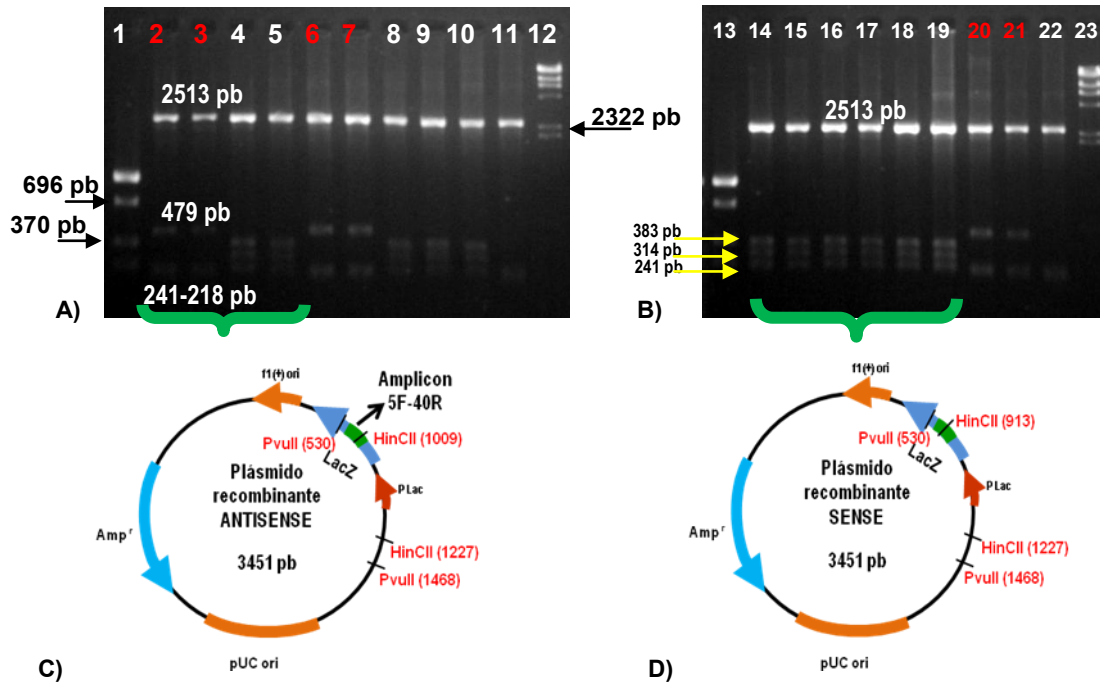


Figura 77. Digestión enzimática doble de los clones recombinantes y constructos recombinantes. **A)** Orden de siembra: 1. PM: pZ2-*Haell*; 2. clon 101 I; 3. clon 101 II; 4. clon 102 I; 5. clon 102 II; 6. clon 103 I; 7. clon 103 II; 8. clon 104 I; 9. clon 104 II; 10. clon 105; 11. vector plasmídico sin inserto; 12. PM: λ *HindIII*. **B)** Orden de siembra: 13. PM: pZ2-*Haell*; 14. clon 106 I; 15. clon 106 II; 16. clon 109 I; 17. clon 109 II; 18. clon 110 I; 19. clon 110 II; 20. clon 111 I; 21. clon 111 II; 22. vector plasmídico sin inserto; 23. PM: λ *HindIII*. **C)** Plásmido recombinante ANTISENSE **D)** Plásmido recombinante SENSE.

Secuenciamiento de los clones recombinantes

De los nueve plásmidos recombinantes se eligieron tres para ser secuenciados con los cebadores universales del vector (T7 y T3-*reverse*), como se describió en Materiales y Métodos. A diferencia de lo que sucedió con el secuenciamiento del fragmento de PCR, los cromatogramas del secuenciamiento de los clones recombinantes fueron excelentes (Tabla G, ANEXO I). Las secuencias resultantes fueron ensambladas y analizadas con BLASTN (BD:nt). Los resultados fueron los esperados en todos los casos, mostrando homología con *A. taiwanensis*, con buenos valores de E-value y porcentajes de cobertura (Tabla 24). De esta manera se pudo confirmar que el fragmento de ADN amplificado a partir de las muestras de ADNc era el esperado.

Tabla 24. Resultado del mejor *hit* obtenido a partir del BLASTN de las secuencias obtenidas a partir de los clones recombinantes del amplicón 5F/40R.

Número de acceso	Mejor <i>hit</i> contra la base de datos nt	Cobertura	E-value	Identidad
EF666482	<i>Ascogregarina taiwanensis</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence	76%	5e-114	93%

CAPÍTULO 6. Evaluación a campo de los cebadores diseñados para *A. taiwanensis*

6.1 Muestreo y recolección de *Lu. longipalpis*; extracción de ADN total

Para determinar si los cebadores diseñados, ya analizados en las muestras de ADNc, eran aptos para la detección de *A. taiwanensis* en otras muestras ambientales, se evaluaron en otros ejemplares de flebótomos. Para ello, los cebadores 5F/40R se utilizaron para analizar los flebótomos capturados en Posadas en Noviembre de 2011, usados previamente para la validación de los cebadores diagnósticos *PsyF/PsyR*. La calidad de las extracciones de ADN de estas muestras ya había sido verificada mediante un control interno con los cebadores 44F/45R (Capítulo 2). Cabe mencionar que en el momento que se realizaron estos experimentos, en el laboratorio sólo se disponía de flebótomos de Posadas.

6.2 Amplificación por PCR y secuenciamiento

Las muestras ambientales KS2-A, KS2-G, KS2-GM y KS1-A fueron analizadas con los cebadores diseñados 5F/40R. En estas amplificaciones se utilizó la polimerasa Taq con 0,1 mg/ml de BSA y 2,5 mM de MgCl₂, obteniéndose producto de amplificación en todas las muestras analizadas. Las Figuras 78 A y B muestran los amplicones obtenidos de ~490 pb. Como control positivo se usó el ADN del clon recombinante 101 y como control negativo agua miliQ.

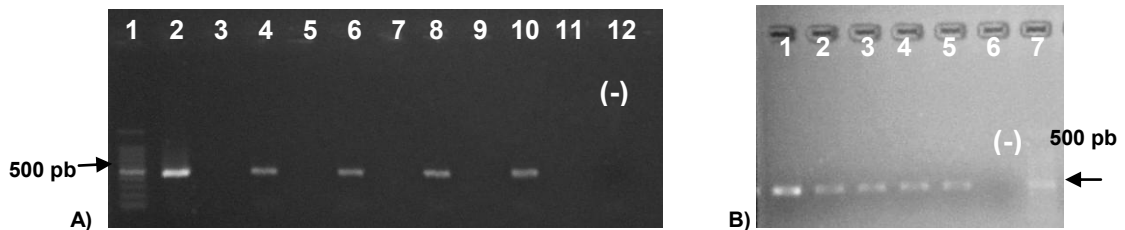


Figura 78. Electroforesis de las amplificaciones de las muestras KS1 y KS2 con los cebadores 5F/40R. A) Orden de siembra: 1. PM de 100 pb; 2. control positivo, clon 101 dilución 1:100; 3. vacía; 4. KS2-A dilución 1:25; 5. vacía; 6. KS2-A dilución 1:50; 7. vacía, 8. KS2-G dilución 1:25; 9. vacía; 10. KS2-G dilución 1:50; 11. vacía; 12. Control negativo. **B)** Orden de siembra: 1. control positivo, clon 101 dilución 1:100; 2. KS1-A dilución 1:25; 3. KS1-A dilución 1:50; 4. KS2-GM dilución 1:25; 5. KS2-GM dilución 1:25; 6. control negativo; 7. PM de 100 pb.

Posteriormente se secuenciaron algunos de los amplicones generados a partir de estas muestras de flebótomos. En particular, se secuenciaron los amplicones

obtenidos a partir de los lotes KS1 y KS2, ambos procesados según el protocolo de Acardi. Las secuencias de ambas muestras mostraron *hit* contra *Ascogregarina taiwanensis* en la búsqueda por homología (BD:nt) (Figura 79). Cabe mencionar que en ambos casos el segundo *hit*, con valores muy cercanos al primero, correspondió a la especie *Goussia carpelli* (Figura 79).

Figura 79. Resultado del BLASTN de las secuencias amplificadas con 5F/40R a partir de KS1 y KS2.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF666482.1	<i>Ascogregarina taiwanensis</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	335	450	74%	2e-88	93%
GU593716.1	<i>Goussia carpelli</i> strain 23 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	324	324	56%	4e-85	89%

También se realizó el ensamblado de estas secuencias y el contig resultante se analizó con BLASTN (BD:nt). Los resultados arrojaron el mismo *hit* tanto en machos como en hembras, y con ambos cebadores (Tabla 25).

Tabla 25. Resultados del BLASTN de machos y hembras de flebotomos de Posadas.

Muestra	Secuenciamiento	Hit	Cobertura	E-value	Identidad
Hembras KS1	Cebador 5F	<i>Ascogregarina taiwanensis</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 26S ribosomal RNA and 5S ribosomal RNA genes, complete sequence (EF666482)	63%	5e-114	92%
	Cebador 40R		70%	3e-96	93%
	Ensamblada		69%	3e-96	97%
Machos KS2	Cebador 5F		64%	5e-114	92%
	Cebador 40R		74%	2e-80	93%
	Ensamblada		72%	2e-88	100%

Los resultados obtenidos indicaban una posible detección de *A. taiwanensis* en muestras ambientales de *Lu. longipalpis*, pero estos resultados no eran concluyentes por dos razones principales. En primera instancia, por no tener un control positivo indiscutible (por ejemplo, mosquitos infectados con *A. taiwanensis*), el cual no fue posible obtener. En segundo lugar, los resultados del secuenciamiento no eran concluyentes debido a que, si bien el mejor *hit* correspondía a *A. taiwanensis*, las secuencias también mostraban homología con *Goussia carpelli*, con valores de E-value e identidad muy cercanos (Figura 79), a diferencia de lo que se había observado en el análisis de *Ps. chagasi*. Por ello, se decidió corroborar la presencia de *A. taiwanensis* utilizando cebadores de bibliografía, para de esta manera definir la

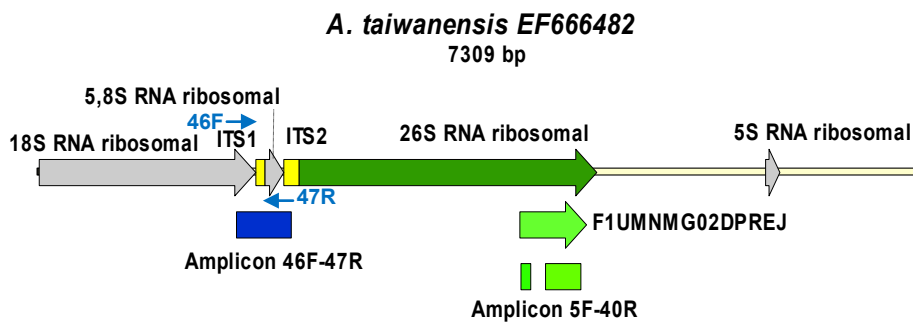
presencia o ausencia de este gregarino en las muestras previamente analizadas, y también para compararlos con los cebadores diseñados (5F/40R).

6.3 Análisis comparativo de los cebadores diseñados (5F/40R) con cebadores diagnósticos publicados para *A. taiwanensis*

Luego de una extensa búsqueda bibliográfica de cebadores diagnósticos para *A. taiwanensis*, se eligieron los cebadores AU y AT (Morales *et al.*, 2005). El primero corresponde a un cebador *forward* que hibrida con el gen 18S ribosomal de dos especies de *Ascogregarina* (*A. taiwanensis* y *A. culicis*). El *reverse* es un cebador especie-específico que hibrida en la región ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) de *A. taiwanensis*. El producto de amplificación teórico corresponde a 450 pb. Siguiendo con la nomenclatura utilizada, se renombraron estos cebadores como 46F (AU) y 47R (AT).

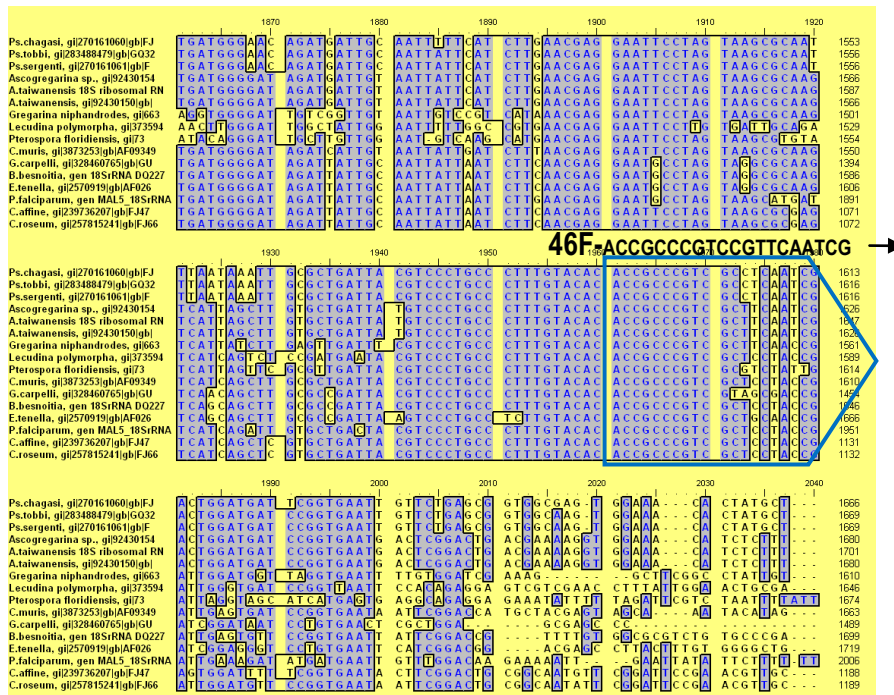
En la Figura 80 se muestra un esquema de los genes ribosomales de *A. taiwanensis*, la pirosecuencia (utilizada para diseñar los cebadores 5F/40R), y los amplicones teóricos de 5F-40R y de 46F-47R (cebadores de bibliografía), con el objetivo de obtener un panorama general de las regiones involucradas.

Figura 80. Esquema de la secuencia de referencia de *A. taiwanensis* (EF666482) de los genes ribosomales, la pirosecuencia F1UMNMG02DPREJ, los amplicones de los cebadores 5F-40R (rectángulo verde) y 46F-47R (rectángulo azul), y los cebadores de bibliografía 46F-47R (flechas azules).



Asimismo, se realizó un AM usando las secuencias 18S ADNr de los taxones ya analizados para *Ps. chagasi* (Figura 20), incluyendo la secuencia de referencia *A. taiwanensis* (EF666482) (Figura 81). En este AM se observa la región de hibridación del cebador 46F de bibliografía y la región conservada entre las secuencias alineadas. Se visualiza sólo el cebador *forward* ya que es el específico de género y además es el único que se encuentra en la región 18S (el otro hibrida en la región ITS2 de *A. taiwanensis*, que no se encuentra en el AM).

Figura 81. AM de las secuencias del ADN ribosomal 18S de varios apicomplejos. Se señala la secuencia correspondiente al cebador 46F.



Una vez elegidos los cebadores de bibliografía (46F/47R) se comenzó con las amplificaciones por PCR de todas las muestras de flebotomos. En primera instancia, las amplificaciones se probaron sin BSA y con diluciones 1:50 de dos muestras de CM1, correspondientes a hembras de Posadas procesadas con dos protocolos diferentes (Acardi y Golczer). Además, en este análisis se incluyeron las muestras de ADNc de *Lu. Longipalpis* machos usadas inicialmente para probar los cebadores diseñados (Figura 82). De estas amplificaciones se obtuvieron resultados poco claros, ya que se esperaba obtener un amplicón a la altura de 450 pb y se obtuvieron bandas entre 200 y 300 pb.

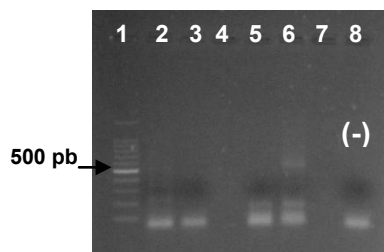


Figura 82. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 46F/47R, sin BSA y 2,5 mM de $MgCl_2$. Orden de siembra: 1. PM de 100 pb; 2. SS2 dilución 1:20; 3. SS2 dilución 1:100; 4. vacía; 5. CM1-A dilución 1:50; 6. CM1-G dilución 1:50; 7. vacía; 8. control negativo (agua).

En ninguna de las muestras se obtuvo el producto de PCR esperado. En la muestra SS2 (dilución 1:20) se observaron bandas, aunque ninguna correspondiente a 450 pb, y en CM1 (protocolo de Golczer; calle 6) se observaron bandas a la altura de ~600 y ~200 pb. Seguidamente se realizó una amplificación con 0,1 mg/ml BSA (Figura 83), y se observaron amplicones en la muestra CM1 (dilución 1:25; calle 4), pero a distintas alturas (no una única banda de 450 pb).

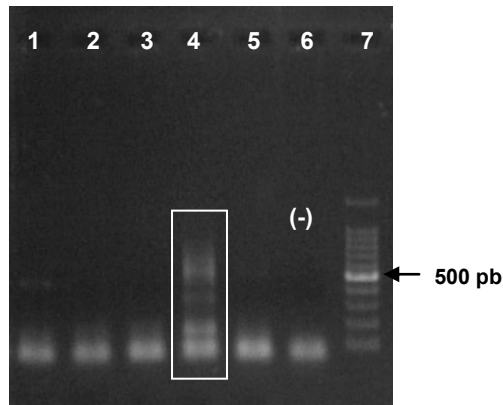


Figura 83. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 46F/47R, 0,1 mg/ml BSA y 2,5 mM de $MgCl_2$. Orden de siembra: 1. clon 101 dilución 1:100; 2. CM1-A dilución 1:25; 3. CM1-A dilución 1:50; 4. CM1-G dilución 1:25; 5. CM1-G dilución 1:50; 6. control negativo (agua); 7. PM de 100 pb.

Por otro lado, los cebadores 46F/47R también se probaron en las muestras KS2 y KS1 obtenidas con los tres protocolos (A, G y GM). Estas amplificaciones fueron realizadas con una concentración final de 0,1 mg/ml de BSA, y diluciones 1:25 y 1:50 de las muestras. La Figura 84 A muestra una banda tenue a la altura esperada en la muestra KS2-A en ambas diluciones probadas (calles 2 y 3). En la Figura 84 B se observa una sombra en la calle 5 correspondiente a la muestra KS2-GM dilución 1:25. En el caso de las hembras no se observó ningún indicio de amplificación en el gel.

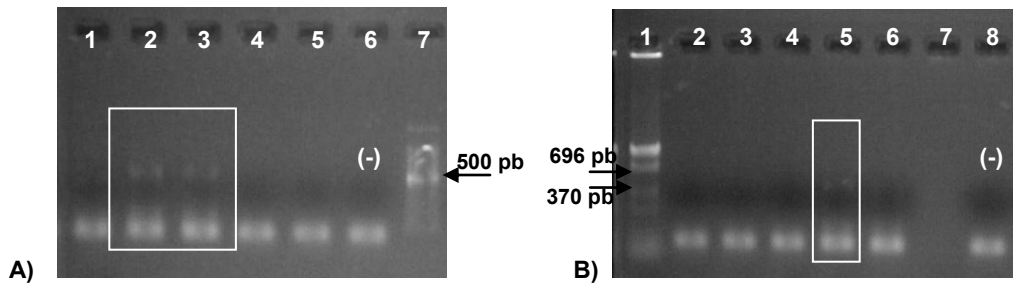


Figura 84. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 46F/47R, con 0,1 mg/ml de BSA y 2,5 mM de MgCl₂. A) Orden de siembra: 1. clon 110 dilución 1:100; 2. KS2-A dilución 1:25; 3. KS2-A dilución 1:50; 4. KS2-G dilución 1:25; 5. KS2-G dilución 1:50; 6. control negativo; 7. PM de 100pb. B) Orden de siembra: 1. PM: pZ2-HaeII; 2. clon 110 dilución 1:100; 3. KS1-A dilución 1:25; 4. KS1-A dilución 1:50; 5. KS2-GM dilución 1:25; 6. KS2-GM dilución 1:50; 7. vacía; 8. control negativo (agua).

Para determinar si los resultados obtenidos anteriormente con las muestras KS2-A y KS2-GM correspondían al amplicón esperado, se realizaron nuevas amplificaciones en las condiciones óptimas de reacción (Figura 85), y se observó amplificación en las muestras. El lote de flebotomos procesados con el protocolo de Acardi mostró una banda a la altura esperada (450 pb) en las dos diluciones probadas, y en el otro lote de muestras (GM), se observaron dos bandas a la altura de 370 y 400 pb, con mayor intensidad en la dilución 1:10 (calle 5).

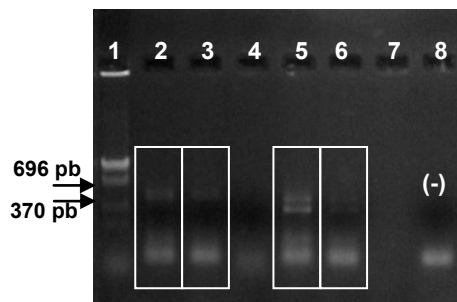


Figura 85. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 46F/47R. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-HaeII; 2. KS2-A dilución 1:10; 3. KS2-A dilución 1:25; 4. KS2-GM puro; 5. KS2-GM dilución 1:10; 6. KS2-GM dilución 1:25; 7. vacía; 8. control negativo (agua).

Se probaron amplificaciones con muestras más concentradas (dilución 1:5), pero no se observó una mejoría en la intensidad de las bandas que confirmara fehacientemente la presencia de *A. taiwanensis*. Lo que sí se pudo determinar fue que la baja intensidad no se debía a una baja concentración de ADN molde.

Continuando con la búsqueda de la optimización de estos cebadores, se realizaron amplificaciones variando la concentración de BSA. Las concentraciones

ensayadas fueron 0,1, 0,25, 0,5 y 2 mg/ml, incluyendo también ausencia de BSA, y los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de 0,25 mg/ml (Figura 86).

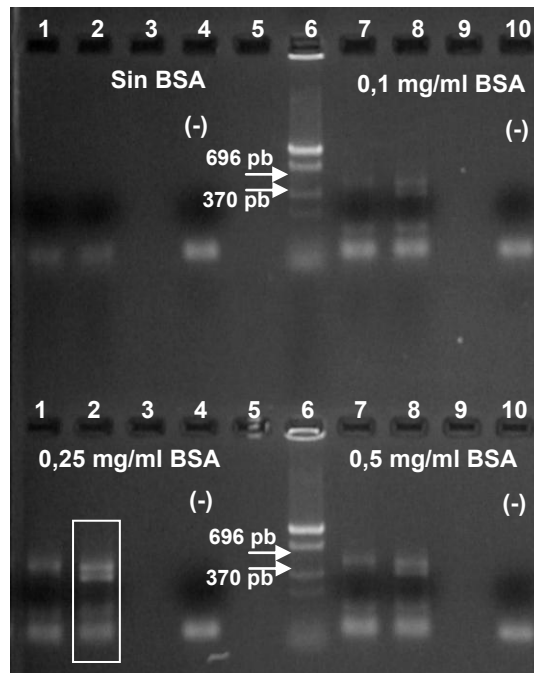


Figura 86. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 46F/47R con diferentes concentraciones de BSA y 2,5 mM de MgCl₂. Orden de siembra: Gel superior: 1. KS2-A dilución 1:10, sin BSA; 2. KS2-GM dilución 1:10, sin BSA; 3. vacía; 4. control negativo, sin BSA; 5. vacía; 6. PM: pZ2-Haell; 7. KS2-A dilución 1:10, 0,1 mg/ml de BSA; 8. KS2-GM dilución 1:10, 0,1 mg/ml de BSA; 9. vacía; 10. Control negativo, 0,1 mg/ml de BSA. Gel inferior: 1. KS2-A dilución 1:10, 0,25 mg/ml de BSA; 2. KS2-GM dilución 1:10, 0,25 mg/ml de BSA; 3. vacía; 4. control negativo, 0,25 mg/ml de BSA; 5. vacía; 6. pZ2-Haell; 7. KS2-A dilución 1:10, 0,5 mg/ml de BSA; 8. KS2-GM dilución 1:10, 0,5 mg/ml de BSA; 9. vacía; 10. Control negativo, 0,5mg/ml de BSA.

Para aumentar la intensidad del producto generado se realizó una re-amplificación (PCR-2) a partir de una amplificación inicial (PCR-1), utilizando los mismos cebadores de bibliografía para detectar *A. taiwanensis* (46F/47R), y usando como molde para la PCR-2, los productos de amplificación de la PCR-1. Esta re-amplificación no alcanzó para obtener una mejoría en la intensidad de los productos (no se muestran los resultados).

Por lo tanto, se utilizó otra estrategia para aumentar la intensidad de los productos de PCR. Se realizó una PCR inicial (PCR-1) para luego purificar los amplicones a partir del gel de agarosa y posteriormente re-amplificarlos. Por lo tanto, la segunda amplificación (PCR-2) con 46F-47R, se realizó a partir del fragmento de ADN purificado a partir del taco de agarosa (Materiales y Métodos), y así se alcanzó

una mejor intensidad en el producto de PCR. En la Figura 87 se muestra el resultado de la purificación de los fragmentos de PCR, amplificados con los cebadores 46F/47R bajo condiciones óptimas de reacción (0,25 mg/ml de BSA y 2,5 mM de MgCl₂).

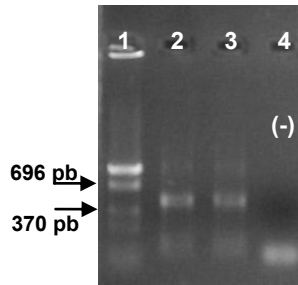


Figura 87. Electroforesis de las purificaciones de la muestra KS2. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-*Haell*; 2. Purif, KS2-A, PCR-2, tubo 1; 3. Purif, KS2-A PCR-2, tubo 2; 4. Control negativo. Nota: se sembraron sólo 2 µl de la purificación.

Como el resultado de esta estrategia fue satisfactorio (Figura 87), ya que se observó un aumento considerable en la intensidad de los productos (teniendo en cuenta que fueron sembrados sólo 2 µl), también se realizó el procedimiento anterior (amplificación-purificación-amplificación) con las muestras que habían dado positivas con los cebadores 46F/47R (KS2-A y KS2-GM). Las purificaciones se realizaron a partir de los productos observados en la Figura 88 (A). En el caso de KS2-GM (calle 9) se cortaron los tacos correspondientes a cada banda por separado, para luego re-amplificar cada una individualmente. En la figura 83 (B) se observan los amplicones purificados y re-amplificados.

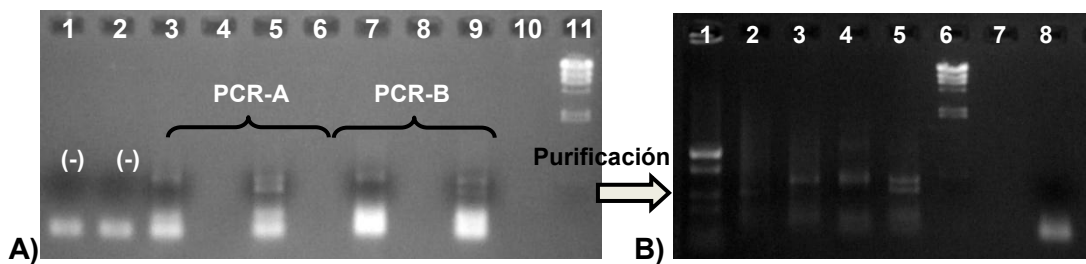
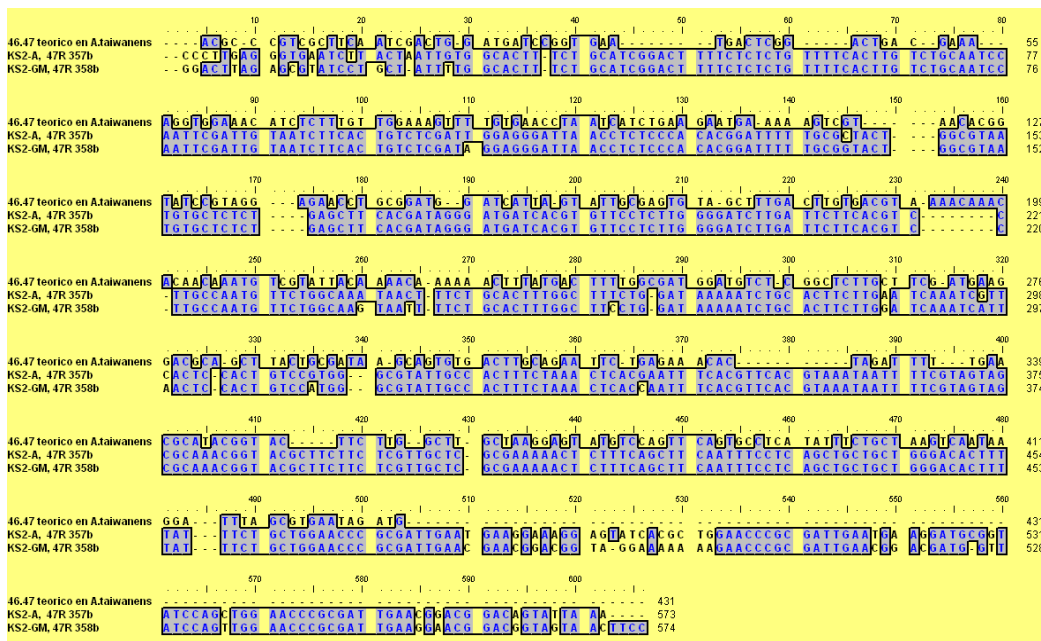


Figura 88. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 46F/47R (A), y purificación de los amplicones (B). **A)** Orden de siembra: 1. control negativo, PCR-A; 2. control negativo, PCR-B; 3. KS2-A, PCR-A; 4. vacía; 5. KS2-GM, PCR-A; 6. vacía; 7. KS2-A, PCR-B; 8. vacía; 9. KS2-GM, PCR-B; 10. vacía; 11. PM: λ *HindIII*. **B)** Orden de siembra: 1: PM: pZ2/*Haell*; 2: KS2-GM, banda chica purificada y re-amplificada; 3: KS2-GM, banda grande purificada y re-amplificada; 4: KS2-A, purificada y re-amplificada, PCR-B; 5: KS2-GM, purificada y re-amplificada, PCR-B; 6: PM: λ *HindIII*; 7: vacía; 8: control negativo.

Una vez obtenidos los amplicones con 46F/47R a partir de las muestras KS2-A y KS2-GM, se realizó el secuenciamiento de los mismos. Aunque los cromatogramas fueron de buena calidad para el secuenciamiento con el cebador *reverse* (47R) (no se muestra este resultado), las búsquedas por homología no dieron resultados significativos (no se muestran los resultados).

Para poder analizar estos resultados se realizó un AM (Figura 89) con las secuencias de los amplicones 46F/47R obtenidas a partir de las muestras KS2 (machos de Posadas, captura 2011), y el amplicón teórico 46F-47R generado a partir de la secuencia de referencia *A. taiwanensis* (NA: 666482). Este AM demostró nuevamente que las secuencias obtenidas tenían muy baja similitud con el amplicón teórico (generado a partir de la secuencia de referencia), confirmando que los amplicones obtenidos no correspondían a *A. taiwanensis*.

Figura 89. AM del amplicón teórico con los cebadores 46F/47R generado a partir de la secuencia de referencia de *A. taiwanensis* (NA: 666482), y las secuencias obtenidas a partir de la amplificación de las muestras KS2-A y KS2-GM con 46F/47R.



6.4 Análisis filogenético de las secuencias amplificadas por PCR con los cebadores 5F/40R

Se realizó un análisis filogenético usando las secuencias amplificadas a partir de las muestras KS1 y KS2 (apartado 6.2) y de los clones 101, 102 y 104 (apartado 5.4). Como ya se ha descrito, todas las secuencias se obtuvieron a partir de amplificaciones con los cebadores 5F/40R. En el caso de los clones, el molde utilizado

para las amplificaciones fue el ADNc de *Lu. longipalpis*. El resto de las secuencias utilizadas para este análisis se obtuvieron del NCBI a partir de búsquedas por homología en base a la pirosecuencia F1UMNMG02DPREJ, seleccionando taxones evolutivamente más cercanos y otros lejanos. El objetivo de este análisis era conocer la posición filogenética de las secuencias obtenidas a partir de los flebotomos capturados en Posadas (ADN y ADNc) con 5F/40R.

Para la construcción del árbol filogenético (Figura 90) se empleó el método de *Maximum Likelihood* mediante el modelo de evolución Kimura 2-parameter (Kimura, 1980). El conjunto de secuencias incluyó, además de las secuencias amplificadas con los cebadores 5F/40R (KS1-A; KS2-A; clon 101, clon 102 y clon 104), 7 secuencias de apicomplejos (*Ascogregarina taiwanensis* NA EF666482, *Neogregarinorida sp.* NA AB748927, *Sarcocystis cf. falcatula* NA AF389341, *Sarcocystis arieticanis* NA AF076904, *Besnoitia besnoiti* NA DQ227420, *Plasmodium falciparum* NA AL844506 y *Goussia carpelli* NA GU593716), y 2 secuencias de dinoflagelados usadas como *outgroups* (*Prorocentrum micans* NA X16108 y *Alexandrium minutum* NA JF906998).

A partir de este análisis se pudo observar que el árbol mostró la topología general esperada. Por otro lado, si bien todas las secuencias amplificadas con los cebadores 5F/40R (KS1-A; KS2-A; clon 101, clon 102 y clon 104) se encontraban en el mismo clado con el resto de los gregarinos, se agruparon en un nodo diferente y bien diferenciado, con un elevado valor de *bootstrap* (98%).

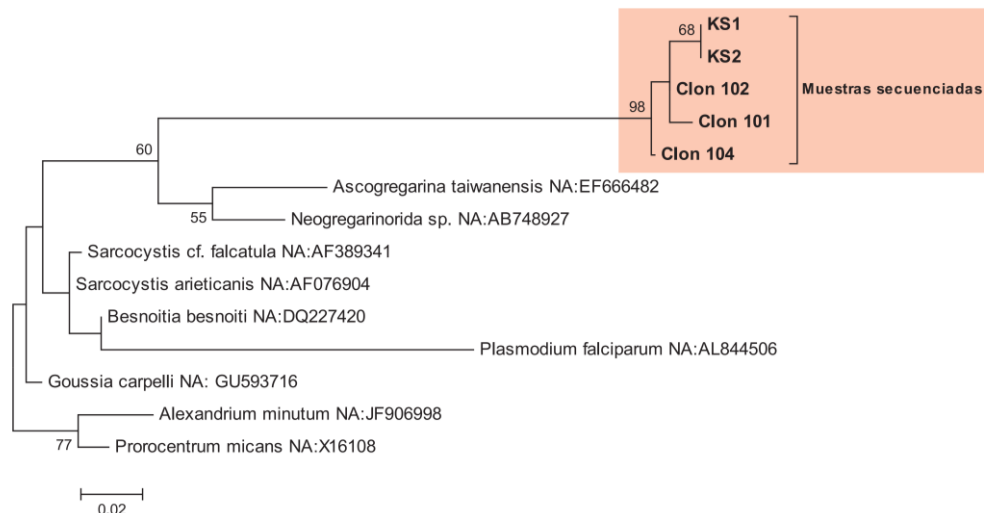


Figura 90. Análisis filogenético de todas las muestras mediante el método de *Maximum Likelihood*. La historia evolutiva se infirió usando el método *Maximum Likelihood* con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2-parameter (K2) (Kimura, 1980). El árbol consenso fue inferido a partir de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). El porcentaje de *bootstrap* se muestra sobre las ramas. El árbol está dibujado a escala y el largo de las ramas

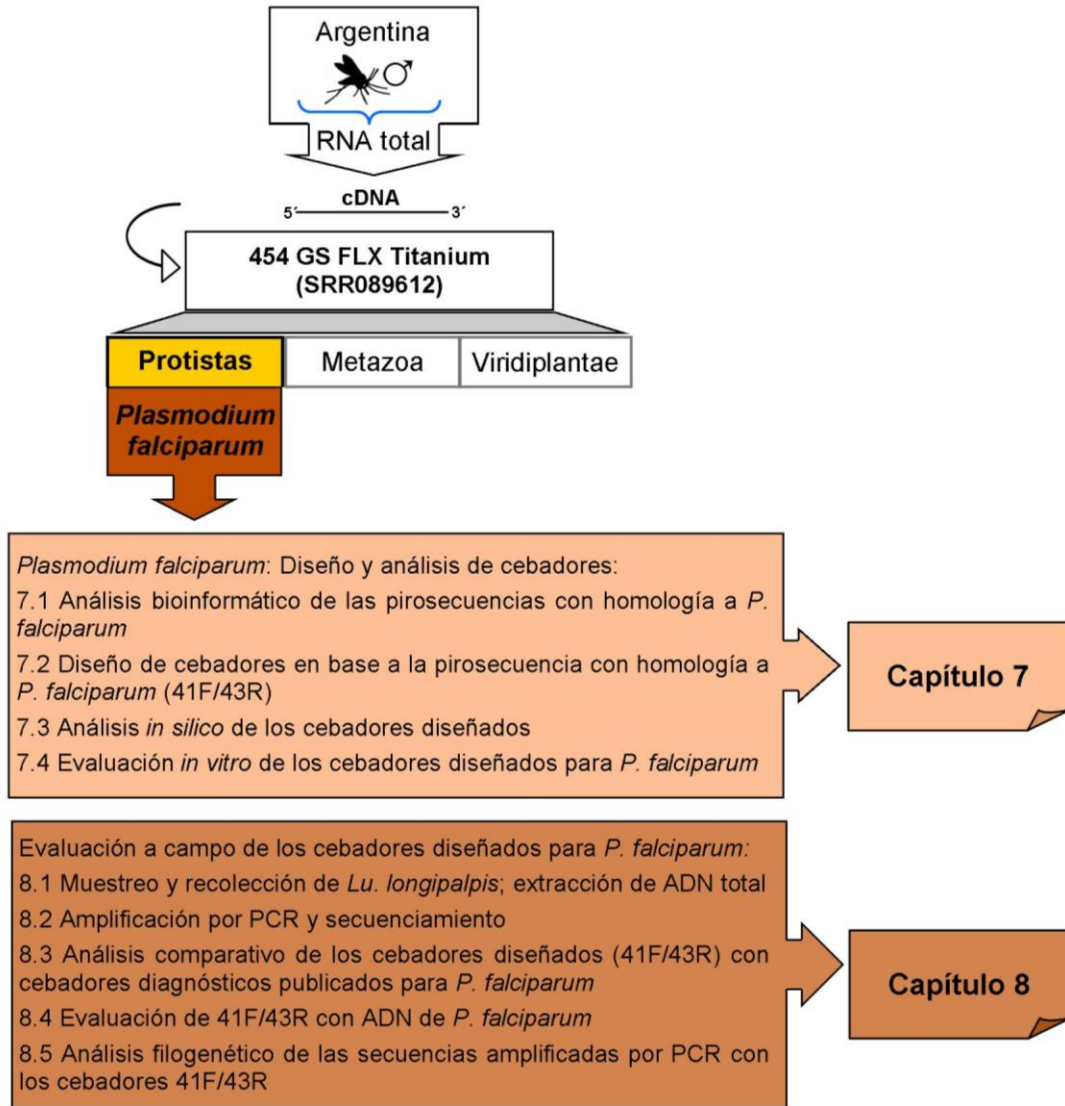
corresponde al número de sustituciones por sitio. El análisis involucró a 14 secuencias nucleotídicas. Hubo un total de 298 posiciones en el conjunto final de datos, eliminando los *gaps*. El análisis evolutivo se realizó en MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Plasmodium falciparum

En esta tercera parte de Resultados y Discusión (Capítulos 7 y 8) se analiza *Plasmodium falciparum*, otro de los taxones identificados en *Lu. longipalpis* machos de Posadas (McCarthy *et al.*, 2011). Debido a su importancia sanitaria, uno de los objetivos específicos de esta tesis fue determinar su asociación con, y significancia en, *Lu. longipalpis*.

Al igual que para *Ps. chagasi* y *A. taiwanensis*, se diseñaron cebadores en base a las pirosecuencias que mostraron homología con *P. falciparum*. Estas secuencias nucleotídicas fueron sometidas a diferentes análisis *in silico* para el diseño de cebadores específicos. Posteriormente, se realizó una validación *in vitro* y a campo de los cebadores diseñados.

A continuación se muestra un esquema que sintetiza el contenido de los Capítulos que describen los Resultados para *P. falciparum*.



CAPÍTULO 7. *Plasmodium falciparum*: Diseño y análisis de cebadores

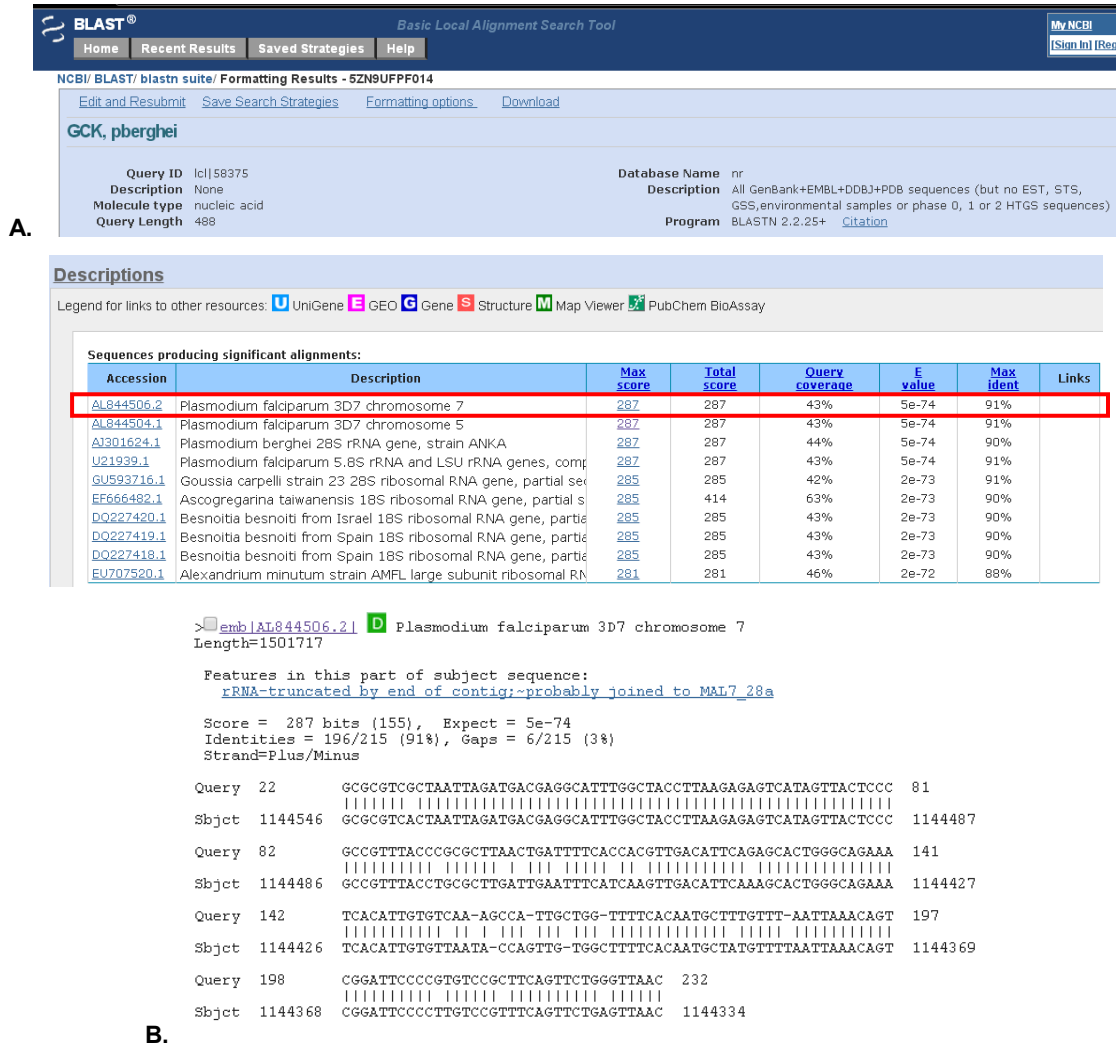
7.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a *P. falciparum*.

En el análisis de referencia (McCarthy *et al.*, 2011) se identificaron 20 pirosecuencias con homología a *P. falciparum*, con valores de E-value que variaban entre 10^{-79} y 10^{-58} . También se encontraron 5 secuencias con homología a *P. berghei* con valores de E-value que variaban entre 10^{-78} y 10^{-51} .

Búsquedas por homología en bases de datos nucleotídicas.

Para comenzar con la selección de las pirosecuencias óptimas para el diseño de los cebadores, se realizó una nueva búsqueda por homología con BLASTN contra BD:nt. Ninguna de las 20 pirosecuencias volvió a dar *hit* con *P. falciparum* y, por lo tanto, no fueron utilizadas para el diseño de los cebadores. Pero de las 5 pirosecuencias que originalmente habían dado *hit* con *P. berghei*, en una nueva búsqueda por homología, 1 de ellas (F1UMNMG02EEGCK) dió como resultado *P. falciparum* (NA: AL844506) con un E-value de 5×10^{-74} y 91% de identidad (originalmente el *hit* había sido *P. berghei* con $E = 3 \times 10^{-66}$). Debido a este nuevo resultado (Figura 91), se utilizó esta pirosecuencia para diseñar los cebadores dirigidos a la detección de *P. falciparum*.

Figura 91. Resultado de la búsqueda por homología de la pirosecuencia F1UMNMG02EEGCK (GCK). **A)** Hits resultantes; el hit más relevante se señala con un recuadro. **B)** Alineamiento del BLAST del primer hit resultante.



Esta pirosecuencia alinea con 210 nt del gen 28S ribosomal de *P. falciparum*. Por otro lado, en base al alineamiento de BLASTN, se pudo observar que la pirosecuencia corresponde a la hebra complementaria.

7.2 Diseño de cebadores en base a la pirosecuencia con homología a *P. falciparum* (41F/43R).

El diseño de los cebadores se hizo en base a la pirosecuencia F1UMNMG02EEGCK (GCK) con el programa Oligo 7. Los parámetros establecidos fueron los mismos que para *Ps. chagasi* y *A. taiwanensis*: un largo de 17 nt +/- 2 nt y un amplicón de 400 pb como mínimo. El programa generó varios juegos de cebadores, de los cuales se seleccionó uno (26F y 410R) con un producto de amplificación teórico

de 401 pb (Figura J, ANEXO I). El resto de los cebadores fueron descartados por presentar alguna característica indeseada (formación de *hairpin*, largo del amplicón, etc.) y/o por presentar hibridación teórica con alguna otra especie. En la Figura J (ANEXO I) se muestran las características de los cebadores elegidos (secuencia, T° de *melting* y ausencia de estructuras secundarias, entre otras). Los cebadores fueron renombrados siguiendo la nomenclatura del listado general de cebadores, 41F (= 26F) y 43R (= 410R).

El producto de amplificación teórico generado por estos cebadores en el programa Oligo7 era de 401 pb, tomando como molde la secuencia F1UMNMG02EEGCK (Figura K, ANEXO I). La secuencia del amplicón comprende los nucleótidos 26 a 426 de la pirosecuencia, y fue analizada con BLASTN (BD:nt). El resultado indicó que el primer *hit* correspondía a la especie *P. falciparum* con un E-value = 7e-72 y una identidad del 90% (Figura 92).

Figura 92. Resultados de la búsqueda por homología del amplicón teórico generado por los cebadores 41F/43R (A) y su alineamiento (B).

A)

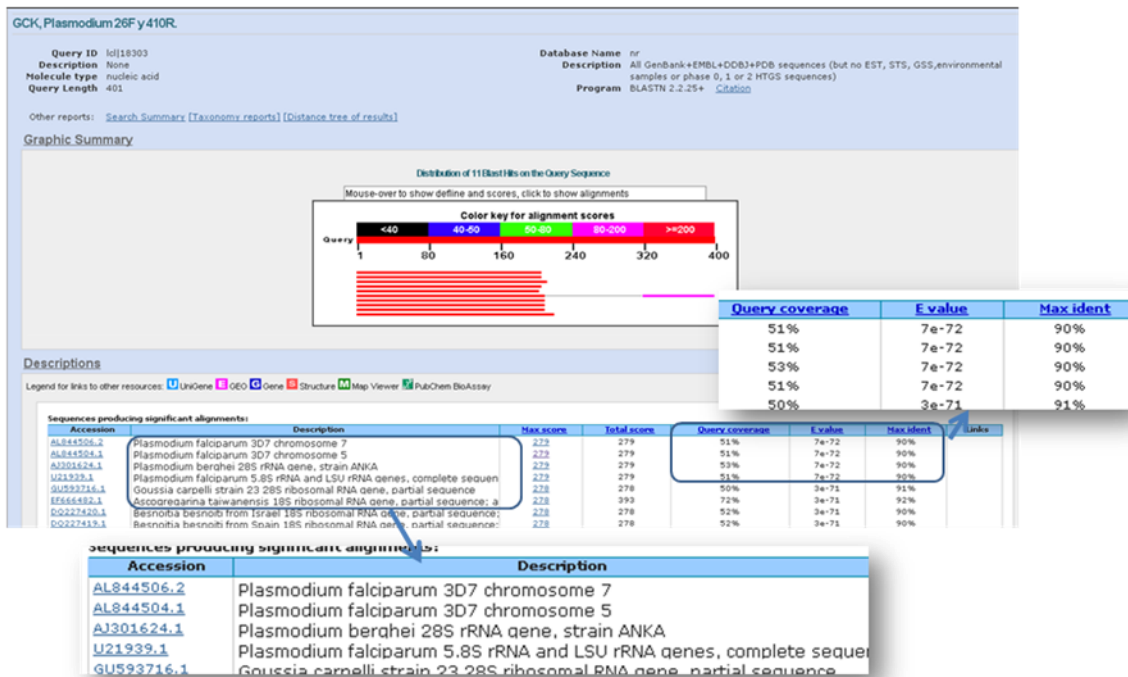
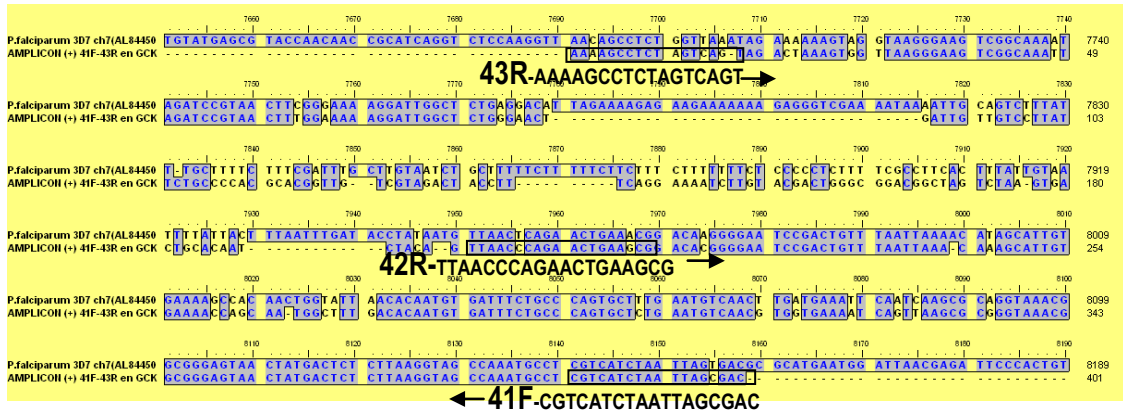
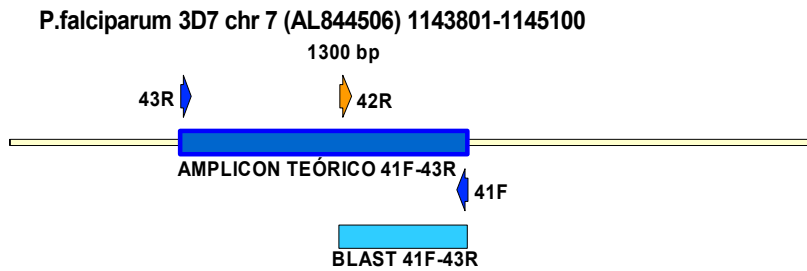


Figura 93. Alineamiento de la secuencia de referencia del NCBI (*P. falciparum* 3D7 ch 7 AL844506.2|:1136386-1152513) y el amplicón 41F/43R hebra (+). También se señalan los cebadores diseñados.



Para conocer con más detalle las regiones involucradas de interés, se hizo un mapa genético (NTI Vector) en base a la secuencia de *P. falciparum* AL844506 (Figura 94). En este mapa se muestra la posición del amplicón teórico 41F/43R (rectángulo azul), se indica el resultado del BLASTN con el amplicón teórico 41F/43R (rectángulo celeste), y se presenta la ubicación de los tres cebadores diseñados, 41F y 43R con flechas azules y 42R con flecha naranja.

Figura 94. Esquema de la secuencia de referencia de *P. falciparum* (AL844506) del NCBI, junto con el amplicón teórico 41F/43R (rectángulo azul), el resultado del BLASTN (rectángulo celeste) y los cebadores diseñados 41F (flecha azul), 42R (flecha naranja) y 43R (flecha azul).



7.3 Análisis *in silico* de los cebadores diseñados

Se evaluó la especificidad *in silico* de los cebadores diseñados utilizando la misma estrategia que para *A. taiwanensis* (apartado 5.3): se analizó el amplicón teórico de los cebadores 41F/43R contra todas las secuencias de Apicomplejos, pero el resultado de este análisis no fue satisfactorio. Asimismo, el cebador 42R mostró hibridación teórica con otras pirosecuencias que tenían homología con otros taxones.

7.4 Evaluación *in vitro* de los cebadores diseñados para *P. falciparum*

Se realizó la evaluación *in vitro* de los cebadores dirigidos a la detección de *P. falciparum*, utilizando la misma estrategia que para *Ps. chagasi* y *A. taiwanensis*. Para esto se realizaron amplificaciones por PCR de las muestras de originales (ADNc), clonado de los amplicones (en algunos casos), y posterior secuenciamiento de los clones.

Amplificación por PCR de ADNc con los cebadores 41F, 42R y 43R

En primer lugar se realizaron amplificaciones con los cebadores diseñados usando las muestras originales de ADNc (SS1, SS2, PP1, PP2). Los resultados de estas amplificaciones con los cebadores 41F/43R (producto esperado: 401 pb) se muestran en la Figura 95, observándose el resultado esperado únicamente en la muestra SS2 (banda de ~400 pb en la calle 2).

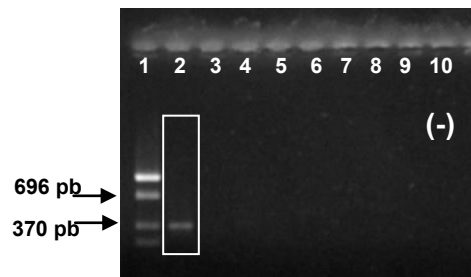


Figura 95. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 41F/43R. Orden de siembra: **1.** PM: pZ2-Haell; **2.** SS2 dilución 1:100; **3.** vacía; **4.** SS1 dilución 1:20; **5.** vacía; **6.** PP2 dilución 1:20; **7.** vacía; **8.** PP1 dilución 1:20; **9.** vacía; **10.** Control negativo (agua).

Del mismo modo, se probaron los cebadores 41F/42R, cuyo producto de amplificación se estimaba en 200 pb. Para estas amplificaciones se utilizaron las mismas muestras, pero se evaluaron dos condiciones diferentes (Figuras 96). En la Figura 96 A se observan los resultados con 2 mM MgCl₂, y en la Figura 96 B con 2,5 mM MgCl₂.

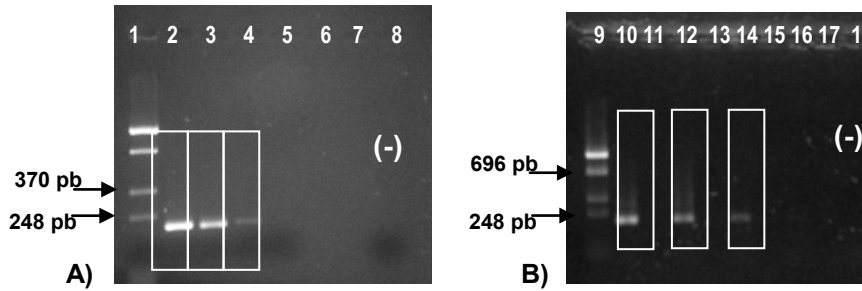


Figura 96. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 41F/42R. A) Orden de siembra: 1. PM: pZ2-Haell; 2. SS2 dilución 1:100; 3. SS1 dilución 1:100; 4. PP2 dilución 1:20; 5. PP1 dilución 1:20; 6 y 7. Vacía; 8. Control negativo. B) 9. PM: pZ2-Haell; 10. SS2 dilución 1:100; 11. Vacía; 12. SS1 dilución 1:20; 13. Vacía; 14. PP2 dilución 1:20; 15. Vacía; 16. PP1 dilución 1:20; 17. Vacía; 18. Control negativo (agua).

Debido a que con 41F/42R, además de haber amplificación en la muestra donde originalmente se identificó *P. falciparum*, también se obtuvo amplificación en otras muestras donde no había sido identificada (SS1 y PP2), se descartó el uso subsiguiente de este cebador (42R).

Por otro lado, se buscó optimizar el producto de amplificación con 41F/43R en la muestra SS2 (Figura 95). Se realizó un gradiente de temperatura de hibridación y también se determinó la concentración óptima de MgCl₂. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluyó que la temperatura de hibridación óptima era de 51°C y la concentración óptima de MgCl₂ 2,5 mM (no se muestran estos resultados). Luego de esta optimización se realizaron varias amplificaciones de mayor volumen (Figura 97 A) para purificar el producto amplificado a partir del gel de agarosa (Figura 97 B).

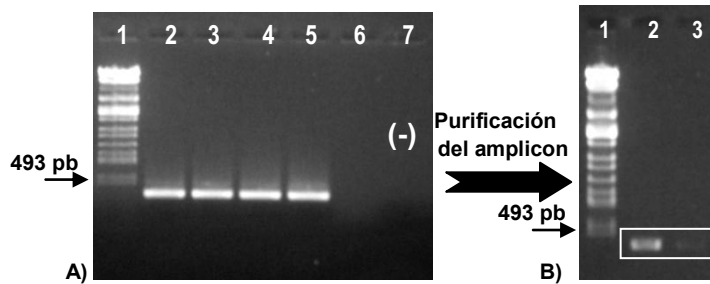


Figura 97. A) Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 41F/43R. Orden de siembra: 1. PM: λ/BamHI+HindIII+EcoRI; 2. SS2 dilución 1:100; 3. SS2 dilución 1:100; 4. SS2 dilución 1:100; 5. SS2 dilución 1:100; 6. vacía; 7. control negativo. B) **Electroforesis de las purificaciones.** 1. PM: λ/BamHI+HindIII+EcoRI; 2. Purificación de la muestra SS2, primera elución; 3. Purificación de la muestra SS2, segunda elución.

El amplicón 41F/43R purificado fue secuenciado (Macrogen) pero, al igual que con *A. tawanensis*, el cromatograma presentó demasiado ruido (no se muestra). Por

ello, los resultados del análisis con BLASTN (BD:nt) no fueron concluyentes porque tenían valores de E-value y porcentajes de cobertura bajos (por ejemplo, *Eimeria rutili* como primer *hit* con e-value de 2×10^{-27} y cobertura del 32%).

Clonado del producto de amplificación con los cebadores 41F/43R

Debido al resultado incierto del secuenciamiento del amplicón 41F/43R purificado, se decidió clonar el producto de PCR usando la misma estrategia que para *A. taiwanensis*. Para ello el fragmento de 401 pb se clonó en el vector pBlue Script II KS+ de 2961 pb, previamente digerido con *EcoRV* (Figura 98). La ligación se realizó utilizando relaciones molares inserto:vector 5:1. El resultado de la transformación de *E. coli* XL-1 Blue con la mezcla de ligación fueron 21 colonias enumeradas desde el 201 al 237. La estrategia de clonado utilizada para el amplicón 41F/43R se detalla en la Figura 98.

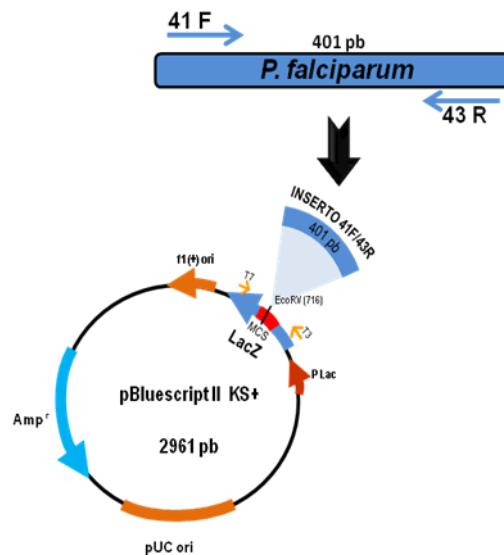


Figura 98. Estrategia de clonado. Se muestra la estrategia utilizada para clonar el producto de PCR de 401 pb generado con 41F/43R (rectángulo azul). El fragmento de interés se ligó al plásmido pBluescript II KS+ de 2961 pb generando un clon recombinante de 3362 pb. LacZ: ORF perteneciente al gen *lacZ*; $f1 (+)$: origen de replicación; MCS: sitio de clonación múltiple, permite la inserción del inserto deseado interrumpiendo la expresión del gen *lacZ*; T3: sitio de hibridación del cebador universal T3 para el secuenciamiento; T7: sitio de hibridación del cebador universal T7 para el secuenciamiento; Amp^r : resistencia al antibiótico Ampicilina; Promotor Lac: permite inducir la expresión del gen fusión *LacZ*; pUC ori: origen de replicación.

Posteriormente, se realizó la extracción del ADN plasmídico de las colonias seleccionadas. En la Figura 99 se observan algunas de estas extracciones, donde se observa la diferencia de tamaño esperada entre el plásmido recombinante (3362 pb) y el plásmido sin inserto (2961 pb).

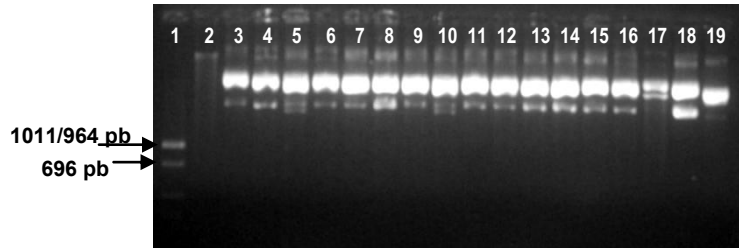


Figura 99. Electroforesis de la extracción de ADN plasmídico de posibles clones recombinantes. Orden de siembra: **1.** PM: pZ2-*HaeII*; **2.** colonia 108; **3.** colonia 201; **4.** colonia 203; **5.** colonia 206; **6.** colonia 208; **7.** colonia 209; **8.** colonia 210; **9.** colonia 211; **10.** colonia 214; **11.** colonia 215; **12.** colonia 219; **13.** colonia 220; **14.** colonia 222; **15.** colonia 224; **16.** colonia 226; **17.** colonia 228; **18.** colonia 232; **19.** Control negativo, vector plasmídico sin inserto.

La confirmación de los clones recombinantes se realizó mediante digestiones enzimáticas simples (con *PvuII*) y dobles (con *PvuII* y *HincII*) del ADN plasmídico (ver Materiales y Métodos). El procedimiento fue el mismo que para *A. taiwanensis*. Los clones recombinantes identificados por digestión enzimática simple fueron posteriormente confirmados por la digestión doble. De estos resultados se obtuvieron 19 clones recombinantes con el patrón de restricción deseado. En la Figura 100 se observan los análisis de restricción de los clones recombinantes.

Los clones recombinantes 201, 203, 208, 210, 211, 219, 220, 222, 224, 226, 228, 233, 234, 235, 236 y 237 mostraron fragmentos generados debido a un clonado *antisense* del inserto, formando un patrón de bandas de 2513, 383, 241, 113 y 112 pb (Figura 100 C). En la Figura 100 A y B (calles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 18 y 19) se observan dichos clones *antisense*. Los clones 209 y 214 presentaron patrones de bandas generados por un clonado *sense* del amplicón, cuyo patrón de bandas fue de 2513, 278, 241, 218 y 112 pb (Figura 100 D). En la Figura 100 A calles 8 y 9 se observan dichos clones *sense*. El clon 232 se descartó por no poseer un patrón de bandas que pertenezca a alguno de los dos sentidos de clonado descritos (Figura 100 B, cruz roja).

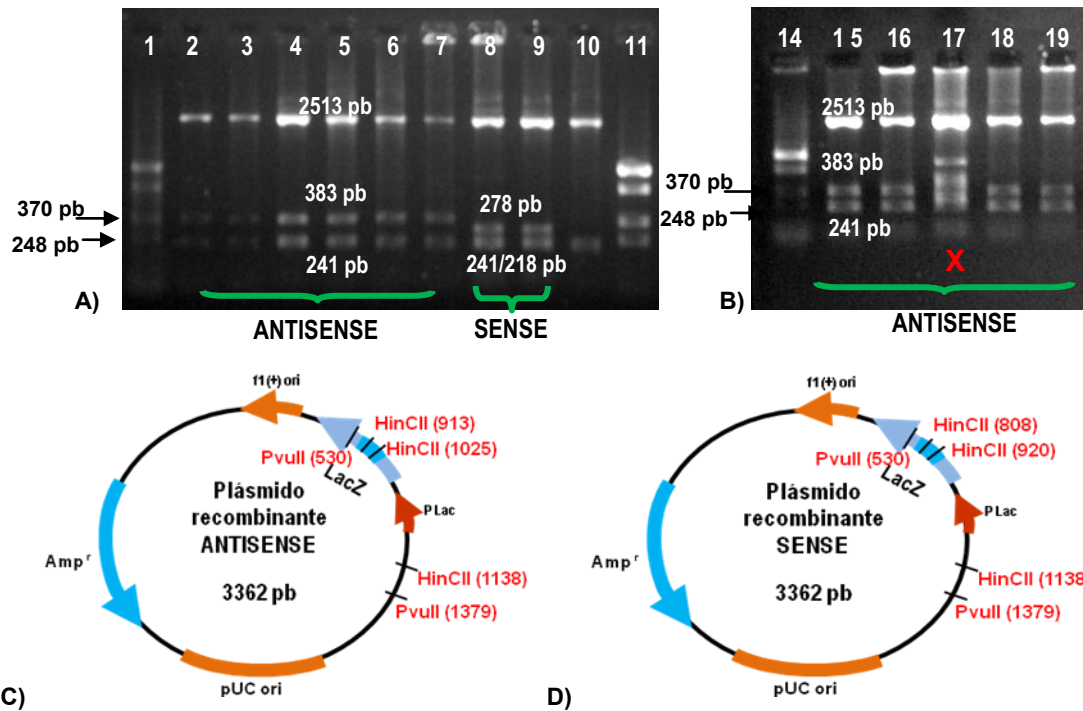


Figura 100. Digestión enzimática doble de los clones recombinantes (A y B) y esquemas de los plásmidos recombinantes (C y D). Orden de siembra: **A)** 1. PM: pZ2-*Haell*; 2. clon 201 I; 3. clon 201 II; 4. clon 203 I; 5. clon 203 II; 6. clon 208 I; 7. clon 208 II; 8. clon 209 I; 9. clon 209 II; 10. vector plasmídico sin inserto; 11. pZ2-*Haell*. **B)** 14. pZ2-*Haell*; 15. clon 210; 16. clon 226 I; 17. clon 232 I; 18. clon 235 I; 19. clon 237 II; 20. vector plasmídico sin inserto. **C)** Plásmido recombinante ANTISENSE **D)** Plásmido recombinante SENSE

Secuenciamiento de los clones recombinantes

De los 19 plásmidos recombinantes se eligieron el 203, 209 y 210 para ser secuenciados con los cebadores universales T7 y T3-*reverse*, como se describió en Materiales y Métodos. Las secuencias obtenidas a partir de los clones recombinantes fueron excelentes (cromatogramas con picos definidos y marcados, sin ruido de fondo; Tabla I, ANEXO I). Sin embargo, ninguna de las secuencias, ensambladas o no, dieron el resultado esperado al ser analizadas con BLASTN (*P. falciparum*), sino que mostraron homología con otros apicomplejos como *A. taiwanensis* y *G. carpelli* (resultados no mostrados).

CAPÍTULO 8. Evaluación a campo de los cebadores diseñados para *P. falciparum*

En este Capítulo se muestran los resultados de la evaluación de los cebadores 41F/43R en amplificaciones con ADN extraído de muestras ambientales de flebotomos.

8.1 Muestreo y recolección de *Lu. longipalpis*; extracción de ADN total

Los flebotomos utilizados para este análisis fueron capturados en Posadas en Noviembre de 2011, y también fueron utilizados en la validación de los cebadores diagnósticos *PsyF/PsyR*. El ADN extraído de estas muestras fue verificado mediante un control interno con los cebadores 44F/45R (Capítulo 2).

Cabe mencionar que, en el momento en que se realizaron estos experimentos, en el laboratorio sólo se disponía de flebotomos de Posadas.

8.2 Amplificación por PCR y secuenciamiento

En todos los ensayos anteriores se utilizaron las muestras originales de ADNc como molde para las amplificaciones y, aunque los resultados no fueron los esperados, se continuó evaluando los cebadores diseñados 41F/43R en muestras biológicas, para terminar de definir la posible asociación de *Plasmodium* con *Lu. longipalpis*.

Las amplificaciones con 41F/43R de las muestras CM1 (procesadas con los protocolos A y G) no generaron producto de amplificación, aún variando las diluciones del molde y la polimerasa utilizada. Por el contrario, con las muestras KS2 A y G, se obtuvo amplificación usando diferentes diluciones. Debido a que el rendimiento de las amplificaciones era bajo, se utilizó 0,1 mg/ml de BSA y la polimerasa Taq y, de esta manera, se logró un aumento en la intensidad del amplicón (Figura 101). Por otro lado, la muestra KS1-A también presentó amplificación con estos cebadores (Figura 101). Como control positivo de las reacciones de amplificación se usaron los clones 203 (dilución 1:100) y 220 (dilución 1:100). Cabe destacar que al momento de realizar estos ensayos no se disponía de muestras de *P. falciparum* que se pudieran utilizar como control positivo para estos cebadores.

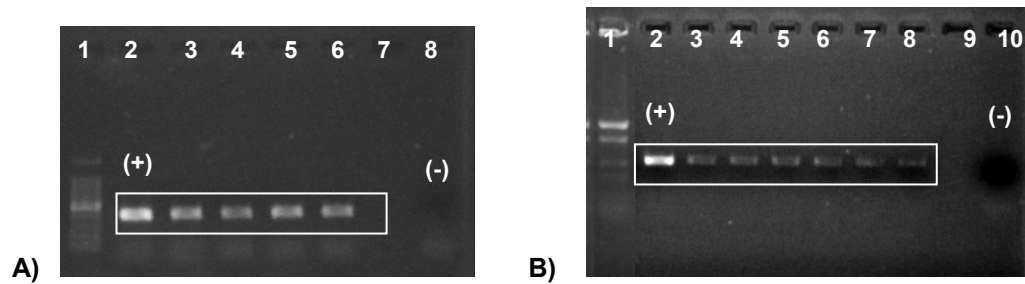


Figura 101. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 41F/43R, con 0,1 mg/ml de BSA y 2,5 mM de $MgCl_2$. **A)** Orden de siembra: 1. PM de 100 pb; 2. control positivo, clon 203 dilución 1:100; 3. KS2-A dilución 1:25; 4. KS2-A dilución 1:50; 5. KS2-G dilución 1:25; 6. KS2-G dilución 1:50; 7. vacía; 8. control negativo (agua). **B)** Orden de siembra: 1. PM: pZ2-Haell; 2. control positivo, clon 220 dilución 1:100; 3. KS1-A dilución 1:25; 4. KS1-A dilución 1:25; 5. KS1-A dilución 1:25; 6. KS2-A dilución 1:25; 7. KS2-A dilución 1:25; 8. KS2-A dilución 1:25; 9. vacía; 10. control negativo (agua).

Con el aumento de la intensidad en el producto de PCR, se realizaron amplificaciones de mayor volumen para purificar los amplicones. Sin embargo, como los rendimientos de las purificaciones eran demasiado bajos, los productos de PCR se enviaron a secuenciar sin purificación previa. Las muestras elegidas para ser secuenciadas fueron KS1 y KS2, ambas procesadas según Acardi.

Secuenciamiento y análisis de los productos de amplificación con los cebadores 41F/43R

El secuenciamiento de las muestras ambientales amplificadas con los cebadores 41F/43R, en todos los casos generó cromatogramas de buena calidad, con picos marcados y bien definidos. En la Tabla J (ANEXO I) se detallan las muestras secuenciadas KS1 y KS2 junto con sus cromatogramas. Con las secuencias resultantes se realizó una búsqueda por homología con BLASTN (BD:nt). Solamente KS2 secuenciada con el cebador 41F arrojó hit contra *P. berghei* (Figura 102 B), pero fue la única muestra y presentó un E-value bajo (e-57) en comparación con otros resultados (e-75) (Figura 102).

Figura 102. Resultado de la búsqueda por homología con BLASTN de las muestras ambientales (KS1 y KS2). En A) se muestra el resultado de KS1, y en B) el resultado de KS2 con el cebador 41F; con una flecha azul se señala el *hit* correspondiente a *P. berghei*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GU593716.1	Goussia carpelli strain 23 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	291	291	53%	3e-75	92%
EF666482.1	Ascogregarina taiwanensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	291	358	67%	3e-75	93%
DQ227420.1	Besnoitia besnoiti from Israel 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	291	291	55%	3e-75	92%
DQ227419.1	Besnoitia besnoiti from Spain 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	291	291	55%	3e-75	92%

A)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
A1301624.1	Plasmodium berghei 28S rRNA gene, strain ANKA	230	230	48%	8e-57	89%
GU593716.1	Goussia carpelli strain 23 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	228	228	46%	3e-56	90%
AL844506.2	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 7	228	228	47%	3e-56	90%
AL844504.1	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 5	228	228	47%	3e-56	90%
EF666482.1	Ascogregarina taiwanensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; anc	228	343	69%	3e-56	93%

B)

También se realizó el ensamblado de las dos secuencias obtenidas para cada una de las muestras, y la secuencia consenso se analizó con BLASTN contra la misma base de datos. Los resultados arrojaron los mismos *hits* que con las secuencias individuales: en primer lugar *Goussia carpelli* strain 23, 28S ribosomal RNA gene, partial sequence (NA GU593716), y en segundo lugar *A. taiwanensis* NA EF666482, con valores muy cercanos a los de *G. carpelli*.

8.3 Análisis comparativo de los cebadores diseñados (41F/43R) con cebadores diagnósticos publicados para *P. falciparum*

Debido a los resultados obtenidos con los secuenciamientos, tanto con las muestras originales de ADNc como con las muestras ambientales de ADN (KS1 y KS2), se decidió analizar la posible asociación de *P. falciparum* con *Lu. longipalpis* utilizando cebadores diagnósticos de bibliografía. Para ello se realizó una extensa búsqueda bibliográfica y se encontraron varios cebadores: rPLU 1 y rPLU 5 (específicos para el gen ribosomal 18S del género *Plasmodium*), rFAL1 y rFAL 2 (específicos de la especie *P. falciparum*) y rPLU 3 y rPLU 4 (específicos del género *Plasmodium*) (Snounou *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999; Snounou y Singh, 2002). Estos cebadores fueron renombrados siguiendo la nomenclatura del listado general de cebadores, 48F (= rPLU 1), 49R (= rPLU 5), 50F (= rFAL1), 51R (= rFAL 2), 52F (= rPLU 3) y 53R (= rPLU 4).

Todos los cebadores se probaron con las muestras ambientales, pero no se obtuvo amplificación en ninguna de ellas. Se realizaron diferentes ensayos variando la concentración de BSA, MgCl₂ y ADN de la muestra. También se probaron amplificaciones con PCR anidada, de acuerdo a las sugerencias de los autores (Snounou *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999; Snounou y Singh, 2002), y amplificaciones directas, pero en ningún caso se obtuvo amplificación. Para la PCR anidada, primero se utilizaron los cebadores 48F/49R. Éstos generan un amplicón que es utilizado como

molde en una segunda PCR con los cebadores 50F/51R, que amplifican una región interna del primer producto de PCR.

Se comenzó con amplificaciones sin BSA y 2,5 mM de MgCl₂, usando como molde el ADN de CM1 (hembras de Posadas). También se probaron las muestras originales de ADNc (SS2). Para estas amplificaciones se hizo una PCR anidada con los cebadores 48F/49R (producto esperado de 1,6 Kb), y luego con 50F/51R (producto esperado de 205 pb). En ninguno de los casos se obtuvo amplificación.

También se realizó una PCR directa con los cebadores 50F/51R, manteniendo las mismas condiciones de reacción. Con las muestras KS2 se comenzó con PCR-anidada con 0,1 mg/ml de BSA, probando dos diluciones de molde (1:25 y 1:50), sin resultado satisfactorio. La PCR-anidada utilizando las muestras KS1-A y KS2-GM con los cebadores 50F/51R y 52F/53R, tampoco generó amplificación con 0,1 mg/ml de BSA y 2,5 mM de MgCl₂, al igual que la PCR directa con los cebadores 52F/53R, y la PCR-anidada con 2 µl de molde de PCR-inicial. También se realizaron PCR-directas con los juegos de cebadores 48F/49R y 52F/53R, con el agregado de 0,1 mg/ml de BSA, pero no se obtuvo amplificación.

De esta manera, quedó confirmado que las muestras biológicas analizadas no presentaban *P. falciparum*.

8.4 Evaluación de 41F/43R con ADN de *P. falciparum*

Para concluir con el análisis de los cebadores diseñados para *P. falciparum* (41F/43R), se obtuvieron muestras de ADN de *P. falciparum*. Las mismas fueron provistas por la Dra. Nagila Costa Secundino (Laboratorio de Medicina Entomológica, Centro de Investigación René Rachou, Fundación Oswaldo Cruz, Brasil). Estas muestras de ADN pertenecían a 5 cepas diferentes de *P. falciparum* (NF54, 44, 99, 134 y S20), y se probaron distintas diluciones con los cebadores diseñados (41F/43R) y con los de bibliografía. Se evaluaron diferentes condiciones de reacción para optimizar las amplificaciones: se aumentó la concentración de MgCl₂ desde 2,5 mM hasta 4 mM (sugerido por los autores de los cebadores de bibliografía); se duplicó la concentración de la Taq polimerasa (0,06 u/µl), y también se varió la concentración del adyuvante BSA (0,1 y 0,5 mg/ml). La mejor amplificación se obtuvo con los cebadores de bibliografía 50F/51R (205 pb) y, de las 5 muestras, se logró amplificar el producto esperado en 4 de ellas. Las condiciones óptimas encontradas fueron 4 mM de MgCl₂ y 0,1 mg/ml de BSA (Figura 103), obteniéndose un amplicón suave pero definido y a la altura esperada.

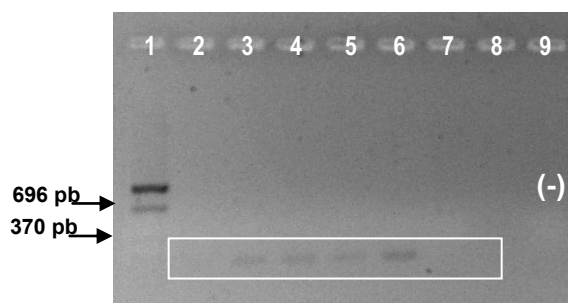


Figura 103. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 50F/51R, con 0,1 mg/ml de BSA y 4 mM de MgCl₂. Orden de siembra: 1. PM: pZ2-HaeII; 2. Pf cepa NF54; 3. Pf S20; 4. Pf 44; 5. Pf 99; 6. Pf 134; 7. SS2 dilución 1:100; 8. Vacía; 9. control negativo.

También se hicieron PCRs con 41F/43R usando las 5 cepas de *P. falciparum* como molde. No se obtuvo amplificación en ninguna de las muestras probadas, incluso al variar las diluciones de las muestras y las condiciones de reacción. De esta manera, quedó confirmado que las secuencias amplificadas en las muestras analizadas previamente no correspondían a *P. falciparum*.

Asimismo, y a modo de una validación más de los cebadores diagnósticos *PsyF-PsyR*, se realizaron amplificaciones con estos cebadores (*PsyF/PsyR*) utilizando las 5 cepas de *P. falciparum* como molde. En un todo de acuerdo con el resultado esperado, estas amplificaciones no generaron amplicones (Figura 27, Capítulo 1).

8.5 Análisis filogenético de las secuencias amplificadas por PCR con los cebadores 41F/43R

Para finalizar con el análisis de las secuencias de este taxón originalmente identificadas en *Lu. longipalpis*, se realizó un análisis filogenético usando las secuencias obtenidas de las amplificaciones con los cebadores diseñados 41F/43R, al igual que se hizo para *Ps. chagasi* y para *A. taiwanensis*. Las secuencias utilizadas para el análisis fueron las de los clones 203 y 210, generados a partir de ADNc de SS2 (apartado 7.4), y las de dos muestras de flebotomos de Posadas KS1 y KS2 (apartado 8.2). El resto de las secuencias utilizadas en el análisis se obtuvieron a partir de una búsqueda por homología (DB:nt) en base a la pirosecuencia GCK.

Para la construcción del árbol filogenético (Figura 104) se empleó el método de *Maximum Likelihood* mediante el modelo de evolución Kimura 2-parameter (Kimura, 1980). El conjunto de secuencias incluyó, además de las secuencias correspondientes a las muestras amplificadas con los cebadores 41F/43R (KS1-A; KS2-A; clon 203 y clon 210), 9 secuencias de apicomplejos (*Ascogregarina taiwanensis* NA EF666482,

Neogregarinorida sp. NA AB748927, *Sarcocystis* cf. *falcatula* NA AF389341, *Sarcocystis arieticanis* NA AF076904, *Besnoitia besnoiti* NA DQ227420, *Plasmodium falciparum* NA AL844506, *P. falciparum* NA JQ684659, *P. berghei* NA LK023127 y *Goussia carpelli* NA GU593716) y 1 secuencia de dinoflagelado usada como *outgroup* (*Prorocentrum micans* NA X16108). La construcción del AF fue realizada de la misma manera que para *A. taiwanensis*, utilizando los mismos programas.

Este análisis mostró que las muestras secuenciadas (KS1-A; KS2-A; clon 203 y clon 210) se agruparon formando un clado muy bien soportado (100%) y diferenciado del resto de los Apicomplejos. Asimismo, se pudo observar que nuestras secuencias se encuentran algo más relacionadas con los gregarinos que con *Plasmodium*.

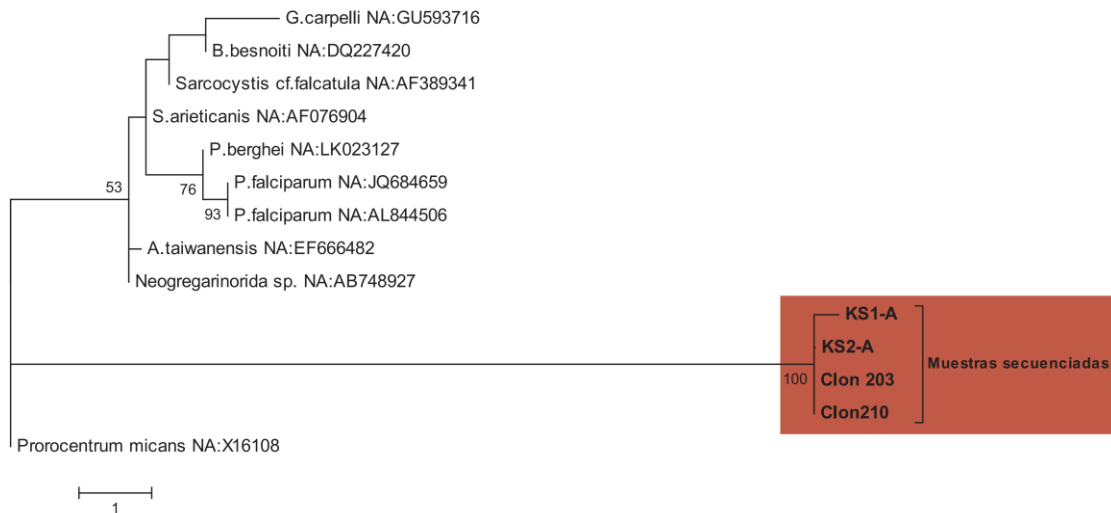
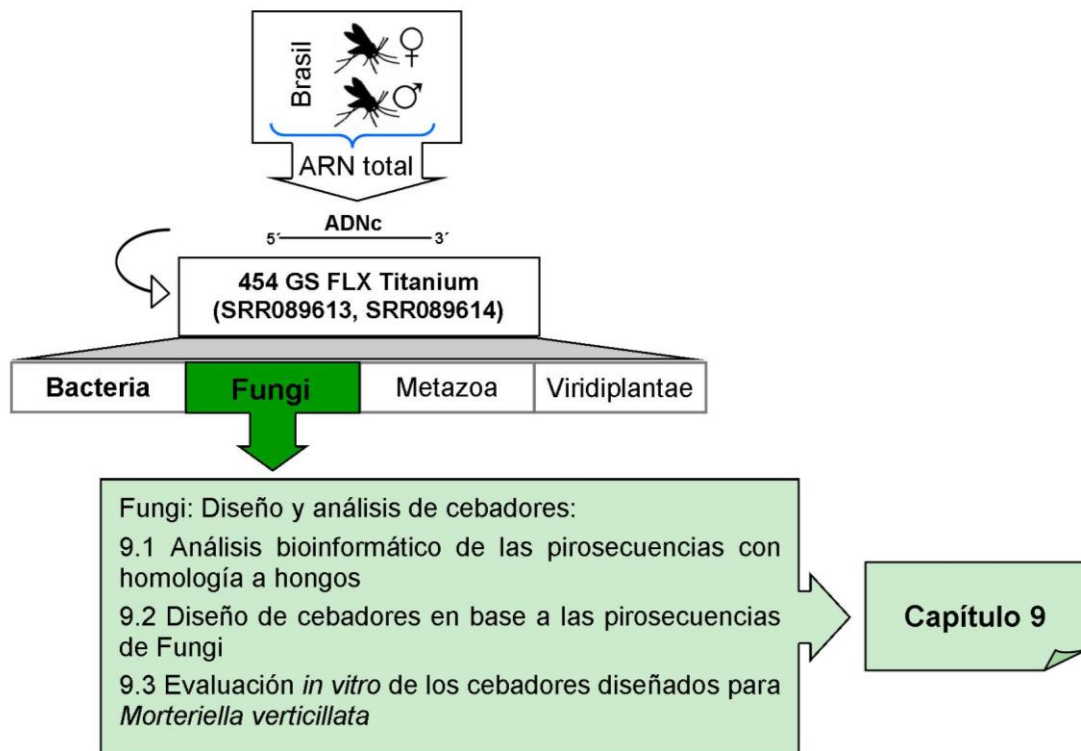


Figura 104. Análisis filogenético de todas las muestras mediante el método de *Maximum Likelihood*. La historia evolutiva se infirió usando el método *Maximum Likelihood* con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2-parameter (K2) (Kimura, 1980). El árbol consenso fue inferido a partir de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). Sobre las ramas se indican los valores de *bootstrap* mayores a 50 y la barra representa 1 sustitución por sitio. El árbol está dibujado a escala y el largo de las ramas corresponde al número de sustituciones por sitio. El análisis involucró a 14 secuencias nucleotídicas. Hubo un total de 282 posiciones en el conjunto final de datos, eliminando los *gaps*. El análisis evolutivo se realizó en MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011)

HONGOS

Los hongos encontrados en el estudio de referencia de esta tesis (McCarthy *et al.*, 2011) son ubicuos en los diversos ambientes frecuentados por los flebótomos. Por ello, probablemente eran indicativos de los patrones de comportamiento y hábitos de alimentación del vector, y formaban parte de su microbiota transiente. Sin embargo, para poder analizar estas interacciones con más detalle, en esta cuarta parte de Resultados y Discusión (Capítulo 9) se describe el diseño y análisis preliminar de cebadores diagnósticos para estos taxones.

A continuación se muestra un esquema que sintetiza el contenido del Capítulo.



CAPÍTULO 9. FUNGI: Diseño y análisis de cebadores

Las pirosecuencias con homología a hongos únicamente se identificaron en machos y hembras de Brasil (PP1 y PP2), y mostraron homología al gen ARNr. En PP1 y PP2 se identificaron originalmente 4 especies: *Peronospora conglomerata*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Mortierella verticillata* y *Toxicocladosporium irritans*.

9.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a hongos

Como ya se ha mencionado, se identificaron cuatro especies diferentes y las pirosecuencias mostraron homología con diferentes regiones ribosomales. Los valores de E-value variaron entre 1 e-103 y 2 e-60. En la Tabla 26 se detalla la cantidad de pirosecuencias que mostraron homología con cada especie.

Tabla 26. Especies identificadas pertenecientes al Reino Fungi, número de pirosecuencias por especie y largo de las pirosecuencias.

Espece	Pirosecuencia	Largo (nt)
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> 18S	F1UMNMG03GP6IO	230
<i>Mortierella verticillata</i> 28S	F1UMNMG04I7AIE/ F1UMNMG04JM8VM/ F1UMNMG04JCHGB	242
<i>Peronospora conglomerata</i> LSU	F1UMNMG03F59DZ/ F1UMNMG03GNMFL	316/ 319
<i>Toxicocladosporium irritans</i> rRNA gene	F1UMNMG04I9HZC	241

Búsquedas por homología en bases de datos nucleotídicas

Se volvieron a hacer las búsquedas por homología de estas pirosecuencias con BLASTN contra la base de datos nt. Los resultados volvieron a arrojar los mismos *hits* con todas las pirosecuencias, excepto en el caso de *T. irritans*. En esta nueva búsqueda la pirosecuencia correspondiente (F1UMNMG04I9HZC) dió *hit* con otro hongo, *Dothideales* sp. LSU, con un valor de E-value de 5 e-100, y con *T. irritans* en segunda instancia, con un valor de e-value mayor (2e-99).

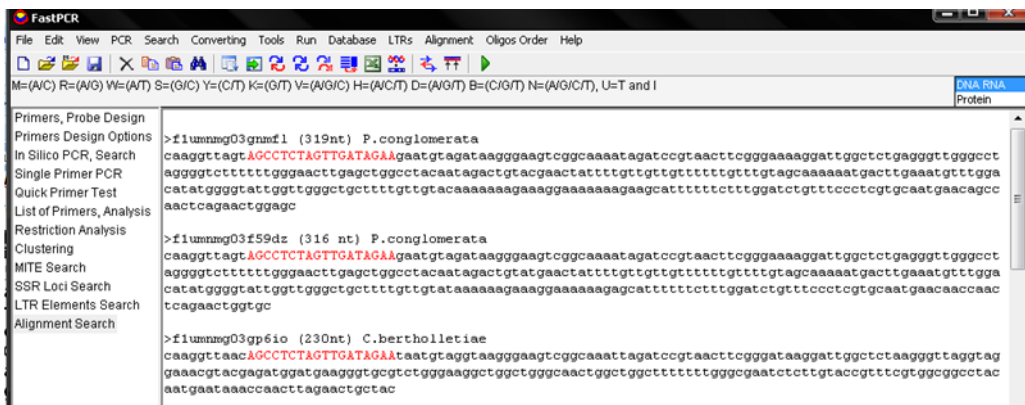
9.2 Diseño de cebadores en base a las pirosecuencias de Fungi

P. conglomerata y *C. bertholletiae*

Se comenzó con el diseño de los cebadores para *P. conglomerata*. Mediante el programa Oligo 7 se diseñaron los cebadores *forward* 207F, de 21 nt de largo, y

reverse 207R12, de 19 nt (Tabla 27). Una vez obtenidos los cebadores se continuó con el análisis *in silico* a través del programa FastPCR. Los resultados mostraron que una secuencia más corta del cebador *forward* 207F presentaba hibridación teórica con otras pirosecuencias con homología a hongos. Es decir que una secuencia de 18 nt hibridaría con la pirosecuencia de *C. bertholletiae* generando un posible producto de PCR. En la Figura 105 se observan las pirosecuencias involucradas, y en rojo la secuencia del cebador *forward* tal cual se observó en el programa FastPCR. En función de este resultado, se utilizó este cebador *forward* acertado (207Fmd) para ambas especies (*P. conglomerata* y *C. bertholletiae*), y se diseñó un cebador *reverse* específico para cada una de ellas. De esta manera, se diseñó otro cebador *reverse* para *C. bertholletiae*, llamado 22R1 (Tabla 27). Los productos de PCR teóricos eran de 198 pb y 206 pb para *C. bertholletiae* y *P. conglomerata*, respectivamente.

Figura 105. Imagen del análisis del programa FastPCR con las pirosecuencias de hongos. La secuencia en rojo corresponde al cebador 207Fmd.



M. verticillata

Se utilizaron las pirosecuencias con homología a *M. verticillata* para diseñar los cebadores *forward* 105F5 y *reverse* 105R6 (Tabla 27) con el programa Oligo 7. El producto teórico de ambos cebadores fue de 105 pb con una T óptima de 53,8 °C.

Tabla 27. Listado de cebadores diseñados para identificar hongos. Se muestran las especies de hongos identificadas, los cebadores diseñados, la secuencia, la T° m, y el largo. ^a Las letras F y R indican que se trata de un oligonucleótido *forward* o *reverse*, respectivamente.

Nombre ^a	Secuencia	TM (°C)	Largo (nt)	Especies blanco
105F5	TCTAAGTTGAATGTTAAGCG	50,1	20	<i>Mortierella verticillata</i>
105R6	CTCTTACGGAACTATCTGG	50,7	19	
207Fmd	AGCCTCTAGTTGATAGAA	48	18	<i>Peronospora Conglomerata</i> , <i>Cunninghamella bertholletiae</i>
207R12	CAATACCCCATATGTCCAA	51	19	<i>Peronospora Conglomerata</i>
22R1	TTCATTGTAGGCCGCCACGA	61,5	20	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>

Control de especificidad teórica

La posible hibridación con otros taxones se verificó usando el programa FastPCR, como se ha descrito previamente. Cada uno de los cebadores seleccionados se sometió a este análisis con las pirosecuencias que mostraron homología con los otros taxones identificados. La ventaja de este programa es que permite realizar el análisis con varias secuencias simultáneamente y, aunque correspondan a regiones diferentes, el resultado no se ve afectado. Por el contrario, en el caso de un alineamiento, los resultados se fuerzan si las secuencias no poseen características similares.

9.3 Evaluación *in vitro* de los cebadores diseñados para *M. verticillata*

El análisis *in vitro* de los cebadores diseñados se realizó solamente para *M. verticillata* con los cebadores 105F5 y 105R6, cuyo producto teórico de amplificación era de 105 pb. Al igual que con los otros taxones las primeras amplificaciones se realizaron usando como molde las muestras originales de ADNc. Estas amplificaciones se muestran en la Figura 106 (1,8 % agarosa), en donde se observó producto de PCR en las muestras SS1 y PP2 en las dos diluciones analizadas.

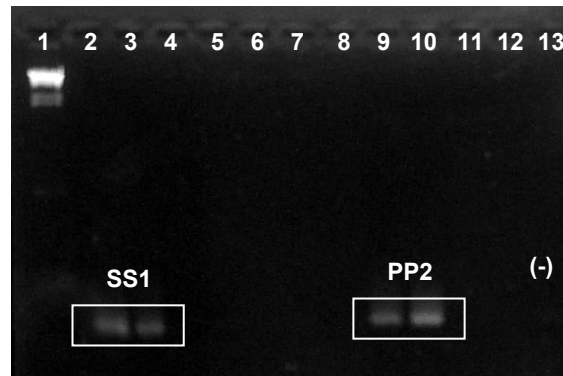


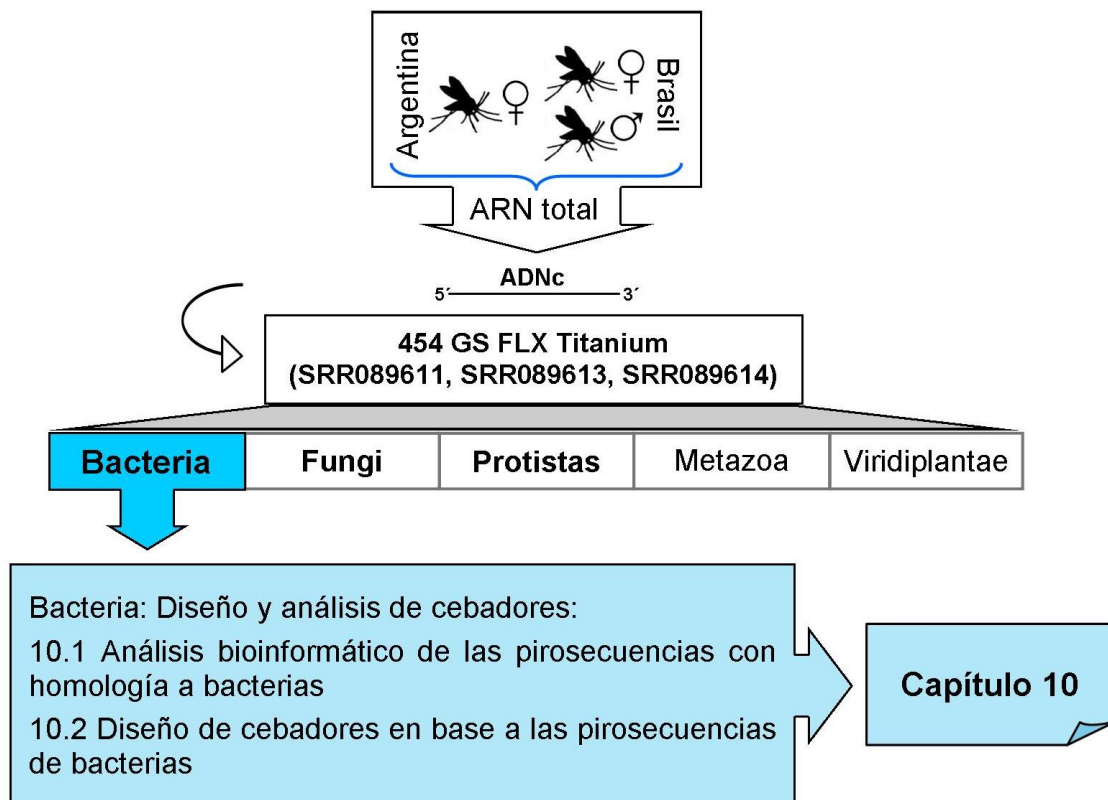
Figura 106. Electroforesis de las amplificaciones con los cebadores 105F5/105R6. Orden de siembra: 1. PM: λ -HindIII; 2. SS1 dilución 1:20; 3. SS1 dilución 1:100; 4. SS2 dilución 1:20; 5. SS2 dilución 1:100; 6. Vacía; 7. PP1 dilución 1:20; 8. PP1 dilución 1:100; 9. PP2 dilución 1:20; 10. PP2 dilución 1:100; 11 y 12. Vacía; 13. Control negativo (agua).

En el estudio de referencia (McCarthy *et al.*, 2011), *M. verticillata* únicamente fue identificado en PP2. En este sentido, se observó el producto de amplificación esperado en PP2, pero también se observó amplificación en SS1, donde no se habían identificado secuencias de hongos por SSG. Debido a esta amplificación inespecífica, no se continuó con el análisis de estos cebadores.

BACTERIA

Las bacterias encontradas en *Lu. longipalpis* de Posadas (McCarthy *et al.*, 2011) son ubicuas en los diversos ambientes frecuentados por los flebótomos. Por ello, al igual que los hongos, probablemente eran indicativas de los patrones de comportamiento y hábitos de alimentación del vector, y formaban parte de su microbiota transiente. Sin embargo, para poder analizar estas interacciones con más detalle, en esta quinta y última parte de Resultados y Discusión (Capítulo 10), se describe el diseño de cebadores diagnósticos para estos taxones.

A continuación se muestra un esquema que sintetiza el contenido del Capítulo.



CAPÍTULO 10. BACTERIA: Diseño y análisis de cebadores

En el estudio de referencia (McCarthy *et al.*, 2011), las bacterias se identificaron en hembras de Argentina y Brasil (SS1 y PP1) y en machos de Brasil (PP2). En ese estudio se identificaron diez bacterias diferentes, seis de las cuales mostraron homología a nivel especie y cuatro a diversas muestras ambientales no cultivables. Las bacterias identificadas incluyeron a *Acinetobacter baumannii*, *Anoxybacillus flavithermus*, *Geobacillus kaustophilus*, *Streptomyces coelicolor*, *Propionibacterium acnes*, *Leifsonia xyli*, *Ralstonia pickettii*, *Alistipes putredensis*, *Veillonella sp.* (no cultivable) y *Proteobacterium* (no cultivable).

10.1 Análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a bacterias

Para comenzar con el análisis bioinformático de las pirosecuencias con homología a bacterias, éstas se clasificaron en dos grupos. Un grupo incluyó a las que mostraron homología con secuencias genómicas de las especies *A. flavithermus*, *G. kaustophilus*, *S. coelicolor*, *P. acnes*, *A. baumannii* y *L. xyli*. El otro grupo incluyó a las que mostraron homología con secuencias ribosomales correspondientes a *A. putredensis*, *Veillonella sp.* y *Proteobacteria*. La pirosecuencia con homología a *R. pickettii* se analizó independientemente porque provenía de un plásmido. Los valores de E-value de las búsquedas por homología variaban entre 0 y 4 e-65. En la Tabla 28 se detallan los taxones bacterianos identificados y las pirosecuencias que mostraron homología con cada uno.

Tabla 28. Taxones bacterianos identificados y pirosecuencias que mostraron homología con cada taxón.

Taxón	Pirosecuencia
<i>Acinetobacter baumannii</i>	F1UMNMG04I7PZH/ F1UMNMG04JF5QN
<i>Alistipes putredensis</i>	F1UMNMG01AZNC5/ F1UMNMG01BHKSQ
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	F1UMNMG03G6Y9M
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	F1UMNMG03GDY4D
<i>Leifsonia xyli</i>	F1UMNMG04JFO7X
<i>Propionibacterium acnes</i>	F1UMNMG03G4HFZ
<i>Proteobacterium 16S</i>	F1UMNMG04JYGCK
<i>Ralstonia pickettii 12D plasmid</i>	F1UMNMG03GGGUE/ F1UMNMG03HHXIE
<i>Streptomyces coelicolor</i>	F1UMNMG03HMYPX
<i>Veillonella sp. 16S</i>	F1UMNMG04I0IYG

Alineamiento múltiple de las pirosecuencias con homología a bacterias

Como ya se ha mencionado, las pirosecuencias bacterianas fueron agrupadas según el tipo de secuencia con el que presentaban homología (genómico o ribosomal). En las Tablas 29 y 30 se detallan las pirosecuencias incluidas en cada grupo.

Debido a que las pirosecuencias del grupo “genómico” (Tabla 29) presentaban un alto grado de diversidad entre sí, no se pudo realizar un AM con las mismas.

Tabla 29. Pirosecuencias que presentaron homología con secuencias bacterianas genómicas.

Especie	Secuencia
<i>Acinetobacter baumannii</i>	F1UMNMG04I7PZH
	F1UMNMG04JF5QN
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	F1UMNMG03G6Y9M
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	F1UMNMG03GDY4D
<i>Propionibacterium acnes</i>	F1UMNMG03G4HFZ
<i>Streptomyces coelicolor</i>	F1UMNMG03HMYPX

Por otro lado, en el segundo grupo había 4 pirosecuencias con homología al gen 16S (Tabla 30). Para ver el grado de similitud entre ellas, se hizo un AM con estas pirosecuencias (Figura 107). Este AM mostró que, excepto por las pirosecuencias F1UMNMG01AZNC5 y F1UMNMG01BHKSQ (ambas con homología a *A. putredensis*), las secuencias eran muy diferentes entre sí. Únicamente se observó una región conservada de ~60 nt en el extremo 5' de las pirosecuencias correspondientes a *A. putredensis* y *Veillonella sp.* (F1UMNMG04I0IYG). Esta región se indica con un recuadro en la Figura 107.

Tabla 30. Pirosecuencias con homología al gen 16S ADNr.

Especie	Secuencias
<i>Alistipes putredensis</i>	F1UMNMG01BHKSQ
	F1UMNMG01AZNC5
<i>Proteobacterium</i>	F1UMNMG04JYGCK
<i>Veillonella sp.</i>	F1UMNMG04I0IYG

Figura 107. Alineamiento múltiple de las pirosecuencias correspondientes a secuencias ribosomales bacterianas. Recuadro: región más conservada entre estas secuencias.



10.2 Diseño de cebadores en base a las pirosecuencias de bacterias

Con la información obtenida del análisis previo, se continuó con el diseño de los cebadores de todas las especies bacterianas identificadas. Se diseñaron cebadores en base a las pirosecuencias con el programa Oligo 7, buscando seleccionar cebadores que tuvieran un producto de amplificación >200 pb, sin formación de estructuras secundarias, y sin hibridación inespecífica con otros taxones. En pocos casos se optó por generar los cebadores con el programa FastPCR o manualmente.

A continuación se describe el diseño de cada uno de los cebadores, sus características, y las especies que detectaría.

A. putredensis y *Veillonella* sp.

El AM realizado anteriormente con las pirosecuencias de *A. putredensis* y *Veillonella* sp. (Figura 107), mostró la posibilidad de obtener un cebador *forward* para ambas especies debido a que presentaban una pequeña región conservada (Figura 107, recuadro). Debido a que los programas Oligo 7 y FastPCR no generaban un cebador *forward* en esa región, el diseño se realizó manualmente y se denominó sGC21. Los cebadores *reverse*, denominados 269R4 y 282R3, diseñados con Oligo 7, identificarían a *A. putredensis* y *Veillonella* sp., respectivamente (Tabla 31). Los productos teóricos para *A. putredensis* eran de 428 pb en el caso de la pirosecuencia F1UMNMG01AZNC5 y de 432 pb para la pirosecuencia F1UMNMG01BHKSO, con una temperatura de hibridación (Th) óptima de 54,7 °C. El producto teórico para *Veillonella* sp. era de 282 pb, con una Th óptima de 54 °C.

Proteobacterium

En el caso de *Proteobacterium* se logró obtener un juego de cebadores *forward* (1F1) y *reverse* (31R1) mediante el programa FastPCR. Algunos datos de los cebadores se detallan en la Tabla 31. El producto teórico era de 387 nt, con una Th óptima de 60,1 °C.

A. baumannii

Se consiguió obtener un juego de cebadores para *A. baumannii* a partir de las dos pirosecuencias con el programa Oligo 7. Se seleccionaron los cebadores que generaban mayor producto de PCR, el *forward* 296F10 y el *reverse* el 296R13 (Tabla 31). Ninguno de los cebadores presentó posible formación de *hairpin*, y el producto teórico era de 296 pb con Th óptima de 50,4 °C.

A. flavithermus

Los cebadores dirigidos a *A. flavithermus* se obtuvieron mediante el Oligo 7. Los cebadores elegidos que generaban el producto teórico de mayor longitud (275F2 y 275R4), no mostraron hibridación teórica con ninguna otra especie, pero el *reverse* presentaba posible formación de *hairpin*. Se buscó acortar el cebador para evitar la estructura secundaria, pero no fue posible. Con otro cebador *reverse* (246R3) y el mismo *forward* 275F2, el producto de PCR no alcanzaba el largo deseado (llegaba a 150 pb). Consecuentemente se eligió otro *forward* (246F1), llegando al largo deseado de 246 pb, con una Th óptima de 52,9 °C (Tabla 31).

G. kaustophilus

Mediante Oligo 7 se obtuvo un juego de cebadores para *G. kaustophilus* (213F5 y 213R9) con un producto teórico de 213 pb, una Th óptima de 51,9 °C, y sin formación de estructura secundaria ni hibridación teórica con otras especies (Tabla 31).

L. xyli

Los cebadores 2F1_7-26 y 1R1_481-500 se diseñaron para *L. xyli* con los programas FastPCR y Oligo 7. Los cebadores generados por el Oligo 7 tenían un producto teórico de sólo 168 pb y el *forward* formaba *hairpin*. Por ello se descartó el cebador *forward* y mantuvo únicamente el *reverse*. Con el FastPCR se obtuvo un *forward* sin hibridación teórica con otras especies y sin formación de *hairpin*. Con este

nuevo *forward*, el producto teórico era de 494 pb con una Th óptima de 59,3 °C (Tabla 31).

Propionibacterium acnes

Para la pirosecuencia con homología a *Propionibacterium acnes* se eligieron los únicos cebadores generados por el programa Oligo 7 (Tabla 31). Los cebadores no presentaron hibridación teórica con otras secuencias ni formación de *hairpin*, y su producto de amplificación teórica era de 217 pb con una Th óptima de 55,5 °C.

***R. picketti* (plásmido 12D)**

Para diseñar estos cebadores inicialmente se usó el programa Oligo 7. Pero como los productos de PCR no superaban los 100 pb, se realizó una búsqueda a través del programa FastPCR. Luego de analizar varias opciones que fueron descartadas por formación de *hairpin*, entre otros, se seleccionaron los cebadores 6F1_35 y 11R1_414 (Tabla 31). Ambos cebadores sufrieron recortes de nt para evitar la formación de *hairpin*, en el caso del *forward* cuatro nt del extremo 5', y en el caso del *reverse*, sólo dos nt del extremo 5'. El producto teórico de ambos cebadores era de 393 pb con una Th óptima de 61,8 °C.

S. coelicolor

La pirosecuencia correspondiente a *S. coelicolor* fue usada para diseñar los cebadores *forward* 387F22 y *reverse* 17R3 con Oligo 7 y FastPCR (Tabla 31). Primero se usó el Oligo 7, pero como el *reverse* hibridaba con secuencias de hongos, se descartó. Por otro lado, el *forward* presentaba estructura *hairpin* y, para eliminarla, se descartó el último nt del extremo 3'. Con el programa FastPCR se obtuvo el *reverse* y, como también presentaba estructura *hairpin*, se eliminaron los cuatro últimos nt del extremo 3'. El producto teórico era de 248 pb con Th óptima de 63,8 °C.

Tabla 31. Listado de los cebadores diseñados en base a las pirosecuencias con homología a bacterias. ^a Las letras F o R indican que se trata de cebadores *forward* o *reverse*, respectivamente.

Nombre ^a	Secuencia nucleotídica	Tm (°C)	Largo (nt)	Especies blanco
sGC21-F	ACGAGTTTGATCATGGCTCAG	57,4	21	<i>Alistipes putredensis</i> y <i>Veillonella</i> sp.
269R4	GTTTACAACATCATAGAGCC	49,6	19	<i>Alistipes putredensis</i>
282R3	CTACGGTGTAATAGTCCTT	49,9	19	<i>Veillonella</i> sp.
1F1	GTGACACTTTACCGCGGCTG	60,8	20	<i>Proteobacteria</i> 16S
31R1	ACGTAGGTGATCTGCCCTTTG	59,2	21	<i>Proteobacteria</i> 16S
296F10	GCTTTAATATCTGGACGATG	50,4	20	<i>Acinetobacter baumannii</i>
296R13	CAGACTTTAAAAGCGCAAG	50,1	19	<i>Acinetobacter baumannii</i>
246F1	CGACCAAATACAATGAACC	50,8	19	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>
246R3	GTTCAACAGAAATAACCGT	50	19	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>
213F5	ATTGATTATTGTTATTCCGAT	50	21	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
213R9	GTACTCTTTTGTATTCGCTTC	49,8	22	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
2F1	AGTAACGGAGGCGCCAAAG	61,6	20	<i>Leifsonia xyli</i>
1R1	CCCCTTAGATGCTTTCAG	57,5	19	<i>Leifsonia xyli</i>
217F20	GACCGATAATGATGAAACCAA	51,7	21	<i>Propionibacterium acnes</i>
217R21	GTTCCCTACTACATGCTGA	52,8	19	<i>Propionibacterium acnes</i>
6F1_35	GCACATCGCCGTCGTCACA	62,5	19	<i>Ralstonia picketti</i> 12D plasmid
11R1_414	TGCTAGCCAGGCCATCAG	58,8	18	<i>Ralstonia picketti</i> 12D plasmid
387F22	CTGTACGGGGAGGTTGTTC	57,5	19	<i>Streptomyces coelicolor</i>
17R3	GTGTCCCCGTCGCTGAGCA	63,6	19	<i>Streptomyces coelicolor</i>

**RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y
PERSPECTIVAS**

3. RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

RESUMEN DE RESULTADOS

Psychodiella chagasi

En esta tesis se desarrolló el primer ensayo basado en PCR para la detección e identificación de infecciones naturales de gregarinos en *Lu. longipalpis* adultos. Para esto, se diseñaron los cebadores diagnósticos *PsyF/PsyR* en base a las pirosecuencias con homología a *Ps. chagasi* (SSU rRNA, NA: FJ865354) identificadas previamente en *Lu. longipalpis* machos de Posadas (McCarthy *et al.*, 2011). Los cebadores diagnósticos amplifican un fragmento de 207 pb del gen SSU ARNr de *Psychodiella* (Figura 11), y su especificidad y sensibilidad fueron confirmadas por análisis *in silico* (Figura 11.B) e *in vitro* (Figura 11.C), y por validaciones a campo (Figura 28).

Previamente se habían registrado infecciones naturales de *Lu. longipalpis* con *Ps. chagasi* en ejemplares de Lapinha (Minas Gerais) (Adler y Mayrink, 1961) y Jacobina (Bahia) en Brasil (Lantova *et al.*, 2010), y recientemente se habían identificado secuencias de *Ps. chagasi* en *Lu. longipalpis* machos de Posadas (McCarthy *et al.*, 2011). En esta tesis se confirmó la infección de *Lu. longipalpis* de Posadas con *Ps. chagasi*, mediante microscopía óptica y análisis molecular (Caligiuri *et al.*, 2014) (Figura 28).

Dado lo que se conoce actualmente sobre la patogenicidad de los gregarinos, estos parásitos podrían ser usados como agentes de biocontrol, y se han explorado varias estrategias en este sentido. Diferentes estudios en gregarinos de mosquitos, han mostrado que la mortalidad del hospedador aumenta bajo condiciones de *stress* en larvas (Comiskey *et al.*, 1999; Comiskey *et al.*, 1999; Tseng, 2004) y a dosis elevadas (Sulaiman, 1992). De manera similar, un estudio reciente mostró que *Ps. sergenti* es dañino para su hospedador (*Ph. sergenti*) en condiciones de laboratorio, y que los efectos del parásito pueden ser influenciados por factores ambientales (Lantova *et al.*, 2011). Más aún, se demostró que la severidad de una infección gregarina (*Ascogregarina culicis*) sobre su hospedador natural (*Aedes aegypti*) variaba de acuerdo al origen geográfico del parásito, y entre diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* (Sulaiman, 1992). Asimismo, las tasas de infección en adultos y la intensidad de la infección, variaron significativamente entre dos poblaciones de *Lu. longipalpis*

provenientes de Colombia y Brasil (Wu y Tesh, 1989). En este sentido, una estrategia interesante consiste en infectar hospedadores naturales con ooquistes de localidades distantes, ya que parecen producir una mortalidad más elevada en hospedadores con los que no han co-evolucionado (Sulaiman, 1992). Cabe resaltar que la mayoría de los ensayos de campo y estudios para determinar tasas de infección, distribución y estacionalidad, se han enfocado en gregarinos de mosquitos (*Ascogregarina*) y, debido a la escasez de estos estudios en gregarinos de flebótomos (*Psychodiella*), los resultados relacionados con el impacto de estos parásitos sobre sus hospedadores no son concluyentes. Debido a esto, y a que la población Argentina de *Lu. longipalpis* se diferencia significativamente de las poblaciones brasileras (Salomon *et al.*, 2010), desarrollamos un ensayo diagnóstico para detectar *Psychodiella* en flebótomos, de manera de poder analizar la incidencia de las infecciones naturales de gregarinos en estos hospedadores.

En este contexto, el análisis por microscopía óptica de 390 ejemplares (macho y hembra) de *Lu. longipalpis* capturados en Posadas, mostró que 20 se encontraban parasitados por *Ps chagasi* (Figura 28.A.1) (Tabla 10). El estado gamonte del parásito se encontró en 14 machos adultos de Posadas (Tabla 11) (10 A, 13 A, 59 A, 208 A, 213 A, 241 A, 251 A, 253 A, 273 A, 279 A, 291 A, 314 A, 350 A, 386 A), y el estado ooquiste en 6 hembras y 1 macho de Posadas (1SA, SA1 y 13 A). Este análisis se realizó en adultos de *Lu longipalpis*, en donde los gregarinos se localizan en la cavidad corporal (Lantova *et al.*, 2010; Lantova y Volf, 2014). Dado que se encontraron ooquistes en adultos de *Lu. longipalpis*, esto confirmó que el gregarino estaba completando su ciclo de vida y, en función de que algunos de estos adultos eran hembras, el parásito se estaría transmitiendo a la progenie.

La microscopía ha sido el método elegido para el diagnóstico de infecciones gregarinas en flebótomos ((Adler y Mayrink, 1961; Lewis *et al.*, 1970), entre otros). Sin embargo, la correcta identificación de las especies de *Psychodiella* y el nivel de detección por microscopía, dependen de la experiencia del operador y del tiempo invertido en el análisis de cada muestra. Para superar algunas de las limitaciones de este método, en esta tesis se desarrolló un ensayo basado en PCR para el diagnóstico de *Psychodiella sp.* en *Lu. longipalpis*. Las etapas *in silico* e *in vitro* de validación de los cebadores diagnósticos *PsyF/PsyR* indicaron que eran muy sensibles y específicos a nivel de género. Más aún, durante la validación *in vitro*, se obtuvieron amplificaciones robustas y específicas cuando se usó una dilución 1:100 de la muestra original de ADNc, donde se habían procesado 100 flebótomos y sólo se habían

identificado 4 piosecuencias con homología a *Ps. chagasi*, junto con otras especies de apicomplejos (McCarthy *et al.*, 2011) (Figura 11.C).

Sin embargo, para maximizar el valor del ensayo diagnóstico, era importante combinar la sensibilidad y especificidad de los cebadores diseñados con un método sencillo para la extracción de ADN. En este sentido, los protocolos de extracción de ADN total para flebotomos (de Pita-Pereira *et al.*, 2005; Acardi *et al.*, 2010) son más apropiados que el protocolo utilizado en el estudio de referencia (extracción de ARN total, y síntesis y amplificación de ADNc) (McCarthy *et al.*, 2011), para los análisis a gran escala. Sin embargo, la amplificación y detección subsiguientes pueden verse afectadas por la eficiencia de extracción, y por la matriz de ADN genómico y de otras biomoléculas, tales como pigmentos o proteínas. Para evaluar este aspecto, se extrajo ADN de flebotomos capturados en el campo, y solamente se amplificó el fragmento esperado en las muestras de adultos infectados con gregarinos, confirmando la robustez y especificidad del ensayo. Más aún, este es el primer estudio en que se amplificaron secuencias de gregarinos a partir de ADN total extraído de un solo adulto infectado naturalmente, en contraste con estudios previos en los que las secuencias de gregarinos fueron amplificadas directamente a partir de extractos de ADN gregarino (Leander *et al.*, 2003; Votypka *et al.*, 2009; Lantova *et al.*, 2010). Esto representa una ventaja particularmente significativa para los ensayos a campo.

Por otro lado, y de acuerdo a Acardi *et al.* (2010), asumiendo que el contenido total de ADN de *Ps. chagasi* es similar al de *A. taiwanensis* debido a su cercanía filogenética, esto es, aproximadamente 22 femtogramos por genoma (el genoma de *A. taiwanensis* se ha estimado en 20 Mb (Templeton *et al.*, 2010)), y considerando que el límite de detección de este ensayo se calculó en 0,1 femtogramos, estimamos que este ensayo puede detectar un genoma gregarino por flebotomo, lo cual lo haría un método diagnóstico mucho más sensible que el análisis por microscopía convencional.

Asimismo, el análisis filogenético de las secuencias amplificadas durante la validación a campo, mostró que nuestras secuencias formaban un nodo bien soportado con *Ps. chagasi* de *Lu. longipalpis* (Figura 38). Esto confirmó nuestro análisis *in silico* previo, que indicó que la región amplificada por *PsyF/PsyR*, de 207 pb, era apropiada para identificar *Psychodiella* sp. (Figura 11.B). Esto fue particularmente significativo considerando que la posición filogenética de *Psychodiella* sp. dentro del Phylum Apicomplexa, previamente se había determinado usando el largo total de las secuencias SSU ADNr (~1,750 bp) amplificadas con cebadores universales (Votypka *et al.*, 2009; Lantova *et al.*, 2010).

De los ejemplares de *Lu. longipalpis* capturados en Argentina (Posadas), un total de 110 adultos fueron analizados molecularmente con los cebadores *PsyF/PsyR* en grupos de 5 o 10 adultos (separados por sexo; $5 \times 10 + 3 \times 5 = 65$ hembras, $4 \times 10 + 1 \times 5 = 45$ machos). Mediante el ensayo diagnóstico se detectó infección gregarina en todos los grupos de hembras, y en 4 de los 5 grupos de machos (sólo 1 grupo de 10 machos no mostró infección por este método diagnóstico). Asimismo, de 41 adultos (1 hembra, 40 machos) que fueron analizados individualmente con ambos métodos, por microscopía se identificó infección gregarina en 5 adultos (1 hembra, 4 machos), mientras que el ensayo diagnóstico detectó 7 flebótomos parasitados (1 hembra, 6 machos) (Tabla D, Material Complementario). Por otro lado, el análisis por microscopía de 390 adultos de *Lu. longipalpis* capturados en Argentina (336 machos y 54 hembras), permitió identificar gamontes en la cavidad corporal de 14 machos (10A, 13A, 59A, 208A, 213A, 241A, 251A, 253A, 273A, 279A, 291A, 314A, 350A, 386A), y ooquistes en 1 macho (13A) y 6 hembras (1SA y SA1) (Tabla 10).

De los 164 flebótomos capturados en Brasil (64 correspondientes a *Lu. longipalpis*) y analizados individualmente por microscopía, sólo se encontró infección con ooquistes en 1 macho (80B) de *Lu. longipalpis* de Jacobina. Después de observar los 64 ejemplares de *Lu. longipalpis* al microscopio, se procesaron y analizaron molecularmente 35 de estos especímenes (23 hembras, 12 machos; no se incluyó la muestra 80B), y se detectó infección gregarina en 1 sólo macho (44 B).

En nuestros análisis por microscopía de los ejemplares de *Lu. longipalpis* capturados a campo, las infecciones con ooquistes se pudieron detectar utilizando la herramienta “campo oscuro” del microscopio. Esto se menciona para remarcar la necesidad de adquirir un buen manejo de la técnica para poder identificar las infecciones gregarinas por esta metodología. En este sentido, la muestra 13A (Argentina) representa un ejemplo paradigmático, ya que en este ejemplar sólo se habían detectado gamontes pero, al realizar un corte transversal del abdomen del flebótomo, se observó una infección abundante con ooquistes. Asimismo, la infección en las muestras 1SA y SA1 (Argentina) se identificó luego de la disección de las hembras, a diferencia de lo que ocurrió con el único ejemplar de Brasil donde se identificaron ooquistes (80B), que se observaron en el ejemplar entero (no hubo disección).

Como ya se ha mencionado, hasta la fecha, estas parasitosis se han identificado por microscopía durante disecciones de rutina de flebótomos capturados en el campo o de ejemplares de colonia. La identificación a nivel género y especie se realiza por medición y posterior comparación de dimensiones (longitud y ancho). Sin embargo, la

detección de la infección y la correcta identificación de especies, dependen de la experiencia del operador y del tiempo invertido en examinar cada muestra, como se pudo comprobar en esta tesis. Estas limitaciones del análisis por microscopía óptica fueron evidentes con las muestras 2A, 15A (Argentina) y 44B (Brasil), en las que la infección gregarina no se observó por microscopía óptica y sólo se identificó mediante el ensayo diagnóstico. Por otro lado, las mediciones de los gamontes y oocistos encontrados en los flebótomos de Argentina y Brasil, y su comparación con los valores publicados (Lantova *et al.*, 2010), confirmaron que el parásito correspondía a *Ps. chagasi* (Tabla 11 y Figura 44).

Se han descrito infecciones naturales de *Ps. chagasi* en cuatro otras especies de flebótomos neotropicales: *Lu. sallesi*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. townsendi* y *Lu. evandroi* (Wu y Tesh, 1989; Ostrovska *et al.*, 1990). Debido a que la patogenicidad y especificidad por el hospedador natural son características fundamentales en un agente de control biológico, en esta tesis también se analizó la presencia de infecciones naturales de este gregarino en otras especies del género *Lutzomyia* capturadas en Brasil: *Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, *Lu. renei* y *Lu. umbratilis*. Se analizaron 100 ejemplares totales mediante microscopía óptica, de los cuales 67 fueron procesados individualmente y analizados con los cebadores diagnósticos (*PsyF/PsyR*). Estos análisis no detectaron infección gregarina en ninguna de las muestras. Por otro lado, los estudios de la especificidad de los gregarinos hacia sus hospedadores han arrojado resultados contradictorios. Por un lado, se ha sugerido que *Ps. chagasi* tiene un amplio rango de hospedadores entre las especies de flebótomos del Nuevo Mundo (Levine, 1977). Sin embargo, en otro estudio se demostró que tiene una especificidad de hospedador estricta (Wu y Tesh, 1989). Nuestro registro de infecciones naturales de *Ps. chagasi* sería concordante con los resultados de este segundo estudio, ya que únicamente encontramos infección en *Lu. longipalpis* de Argentina y Brasil (no se encontraron parásitos en las otras cuatro especies analizadas, *Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, *Lu. renei* y *Lu. umbratilis*, provenientes de Brasil).

Un estudio derivado de las observaciones de los flebótomos al microscopio comprendió el análisis de las glándulas secretoras de feromonas (GF), que se visualizan como manchas redondas de color blanquecino bajo contraste negro, aproximadamente del tamaño del segmento. Desde 1969 se conocen dos patrones morfológicos diferentes para estas glándulas (Mangabeira, 1969; Ward *et al.*, 1985): 1 glándula en el IV segmento abdominal (1GF), o 2 glándulas en los segmentos abdominales III y IV (2GF). Nosotros registramos los dos fenotipos en *Lu. longipalpis*

de Argentina y Brasil (1GF y 2GF). De los 371 machos de *Lu. longipalpis* analizados por microscopía, 35 provenían de Brasil y 336 de Posadas. En los ejemplares de Brasil, las GF se reconocieron en un total de 22 machos y se observaron los dos patrones fenotípicos: 15 machos 2GF (Estado de Bahía) y 7 machos 1GF (Estado de Minas Gerais). En los 336 machos de Argentina (Posadas) las GF se encontraron en una proporción mucho menor, pero también se observaron ambos patrones morfológicos: 33 machos 2GF y 3 machos 1GF (Tabla 13). Por otro lado, a través de un análisis detallado de las glándulas, observamos que las glándulas en los machos 2GF tienen límites bien definidos, en comparación con los ejemplares 1GF, y que esta diferencia es mucho más notoria en los ejemplares de Brasil. También observamos una diferencia de tamaño importante entre los grupos 1GF y 2GF (Tabla 14), siendo de mayor tamaño las glándulas del grupo 1GF.

Como se mencionó en la Introducción, los machos de *Lu. longipalpis* con el fenotipo 1GF están distribuidos ampliamente y en forma discontinua en América Central y del Sur. Por otro lado, los machos con el fenotipo 2GF están más concentrados en las regiones del Noreste de Brasil (Ward *et al.*, 1985). También se han registrado otros tipos de variaciones en las poblaciones de *Lu. longipalpis* de América Central y del Sur, de comportamiento, morfológicas y bioquímicas (Dias *et al.*, 1998; Lampo *et al.*, 1999; Araki *et al.*, 2009), así como la existencia de aislamiento reproductivo entre poblaciones, probablemente mediada por la secreción de diferentes feromonas sexuales (Ward *et al.*, 1988). En un estudio reciente de poblaciones naturales de *Lu. longipalpis* del Estado de Maranhão (Brasil), se mostró una clara diferenciación genética entre las poblaciones 1GF y 2GF de *Lu. longipalpis* (Silva *et al.*, 2011). La distancia genética más corta se observó entre las poblaciones de machos 1GF (capturados en municipios vecinos separados por 100 km de distancia), mientras que la mayor distancia genética se observó entre poblaciones de los mismos municipios pero con diferentes fenotipos (1GF o 2GF), generando dos clados bien diferenciados. Un clado incluía las poblaciones 1GF de Caxias y Codó, y el otro las poblaciones 2GF de Raposa y Codó (Silva *et al.*, 2011). Por otro lado, en un estudio donde se analizaron las feromonas y el gen *per* de *Lu. longipalpis* de Posadas (Argentina) (Salomón *et al.*, 2010), se vio que esta población producía la misma feromona (Germ) que *Lu. longipalpis* de Paraguay y de muchas poblaciones de Brasil. Sin embargo, el análisis del gen *per* mostró que la población de Argentina sería una especie hermana diferente de las que se encuentran en el Noreste y Sudeste de Brasil (Araki *et al.* 2009). En este contexto, se han identificado dos grandes grupos de poblaciones de *Lu. longipalpis* en Brasil. Un grupo probablemente representa una sola

especie distribuida mayormente en las regiones costeras del Norte y Noreste de Brasil, que produce el mismo tipo de cantos de apareamiento y la misma feromona. El segundo grupo es más heterogéneo y probablemente está conformado por varias especies hermanas incipientes con diferentes niveles de divergencia genética, que producen distintas combinaciones de cantos de apareamiento y de feromonas. Esto demuestra un elevado nivel de divergencia y de complejidad en el flujo génico entre poblaciones de *Lu. longipalpis* en Brasil (Araki *et al.*, 2009).

Por todo lo expuesto, es factible que la co-existencia de los dos fenotipos (1GF y 2GF) en *Lu. longipalpis* machos de Posadas, esté indicando la presencia de diferentes poblaciones. Este análisis debería profundizarse ya que existen antecedentes de especies hermanas de *Lu. longipalpis* en una misma localidad (Sobral, Estado de Ceará). Los machos de las dos poblaciones simpátricas de esa localidad, también se diferencian en el número de glándulas abdominales (1GF o 2GF), y producen dos tipos de feromonas (Ward *et al.*, 1988). Asimismo, las colonias de laboratorio establecidas a partir de estas dos poblaciones simpátricas muestran aislamiento reproductivo (Ward *et al.*, 1988), y su condición de especies hermanas se confirmó mediante análisis molecular de los genes *period* (Bauzer *et al.*, 2002) y *cacophony* (Bottecchia *et al.*, 2004), y por microsatélites (Maingon *et al.*, 2003). También se ha demostrado que sus cantos de apareamiento son muy diferentes (Souza *et al.*, 2004).

Por otro lado, en esta tesis se identificaron machos 1GF y 2GF de *Lu. longipalpis* infectados con *Ps. chagasi*. Específicamente, en la muestra 44B (Lapinha, Minas Gerais), que presentaba el fenotipo 1GF, se detectó *Ps. chagasi* con los cebadores *PsyF-20R*, y en la muestra 80B (Jacobina, Bahía), que presentaba el fenotipo 2GF, los ooquistes de *Ps. chagasi* se observaron al microscopio. Aunque esto se debe analizar con más detalle en un mayor número de muestras, sugeriría que *Ps. chagasi* parasita indistintamente a cualquiera de las especies hermanas del complejo de especies de *Lu. longipalpis*.

El cebador diagnóstico especie específico (20R) fue diseñado con el objetivo de detectar las infecciones de *Ps. chagasi* junto con *PsyF*. Como era de esperarse, los cebadores *PsyF/20R* confirmaron las infecciones ya detectadas previamente, validándose a través de la amplificación y posterior secuenciamiento de las muestras SA1 y KS2. Para completar el análisis de estos cebadores, se analizaron muestras de flebótomos de laboratorio infectados experimentalmente con gregarinos: *Lu. longipalpis* infectado con *Ps. chagasi*, y *Ph. sergenti* infectado con *Ps. sergenti*. Se observaron por microscopía 56 de estos ejemplares, de los cuales 4 especímenes de *Lu. longipalpis* (2 machos y 2 hembras) y 4 de *Ph. sergenti* (2 machos y 2 hembras)

fueron analizados individualmente mediante el ensayo diagnóstico con *PsyF/20R* y *PsyF/PsyR*. Los resultados del análisis de las muestras de *Lu. longipalpis* infectadas experimentalmente con *Ps. chagasi* (amplificación y secuenciamiento), fueron los esperados con ambos juegos de cebadores (*PsyF/20R* y *PsyF/PsyR*). Sin embargo, los resultados del análisis de las muestras de *Ph. sergenti* infectadas experimentalmente con *Ps. sergenti* no fueron concluyentes. Si bien las amplificaciones con *PsyF/PsyR* dieron el resultado esperado, el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas a partir de estas amplificaciones (Tabla 21), mostró que presentaban homología con *Ps. chagasi* y no con *Ps. sergenti*. Por otro lado, al amplificar estas muestras (*Ph. sergenti* infectadas con *Ps. sergenti*) con *PsyF/20R*, se obtuvo amplificación (leve) en las dos hembras procesadas (11C y 19C). Este resultado fue inesperado ya que se esperaba ausencia de amplificación en las 4 muestras de *Ph. sergenti*. Los productos de amplificación fueron secuenciados y analizados con BLASTN, y los resultados indicaron que presentaban homología con *Ps. chagasi*. Como se observa en la Figura 65, además de los nt diferentes entre *Ps. chagasi* y *Ps. sergenti* en la región variable usada para el diseño del cebador 20R, también hay 6 nt diferentes entre ambas especies a lo largo del amplicón. Sin embargo, en las secuencias amplificadas a partir de las hembras (11C y 19C), donde se deberían haber observado los nt específicos de *Ps. sergenti*, se encontraron los nt específicos de *Ps. chagasi*. Por lo tanto, el dilema planteado y para analizar en un futuro es ¿por qué se obtuvieron secuencias de *Ps. chagasi* si se usaron como molde flebótomos infectados con *Ps. sergenti*?

En resumen, *Ps. chagasi* se encuentra en la cavidad corporal y glándulas accesorias de adultos de *Lu. longipalpis* (Adler y Mayrink, 1961). Todos sus estados, incluyendo gamontes, gametocistos y ooquistes, ocurren en larvas y adultos de ambos sexos, y se han descrito en *Lu. longipalpis* de Lapinha (Minas Gerais, Brasil) (Adler y Mayrink, 1961) y Jacobina (Bahía, Brasil) (Lantova *et al.*, 2010). En esta tesis se identificaron dos de los estados del ciclo biológico de *Ps. chagasi* (gamontes y ooquistes) en *Lu. longipalpis* de Argentina (Posadas, Provincia de Misiones), mediante análisis por microscopía óptica, y molecular, con los 3 cebadores diagnósticos diseñados (*PsyF*, *PsyR* y 20R). De esta manera, observamos dos estados del ciclo biológico de *Ps. chagasi* en *Lu. longipalpis* de Argentina, que corresponden al primer registro de infecciones naturales del parásito en este vector en Argentina.

Ascogregarina taiwanensis

Otro aspecto importante de esta tesis fue el análisis de la asociación y significancia de *A. taiwanensis* con *Lu. longipalpis* adultos. *A. taiwanensis* es un parásito natural de *Aedes albopictus* (Lantova y Volf, 2014) que aumenta su mortalidad y disminuye su capacidad reproductiva (Comiskey *et al.*, 1999), por lo que representa un potencial agente de biocontrol de este insecto-vector. En el análisis metagenómico de referencia (McCarthy *et al.*, 2011) se identificaron pirosecuencias con homología a *A. taiwanensis* en *Lu longipalpis*, un hospedador no natural. Su importancia radicaba en que potencialmente representaba un nuevo registro de parasitosis de *A. taiwanensis*, así como una posible co-infección de *A. taiwanensis* y *Ps. chagasi* en *Lu. longipalpis*. Por ello se diseñaron los cebadores 5F/40R en base a las pirosecuencias de *A. taiwanensis*, con los cuales se obtuvo amplificación en las muestras originales de machos de Posadas (Figuras 73 y 74), en las que este gregarino había sido identificado previamente (McCarthy *et al.*, 2011). El clonado y posterior secuenciamiento de este producto amplificado con los cebadores 5F/40R, volvió a mostrar homología con *A. taiwanensis* (Tabla 24). Sin embargo, todos los resultados mostraban a la especie *Goussia carpelli* como segundo *hit*, con valores muy cercanos a los de *A. taiwanensis* (Figura 79). Debido a la incertidumbre planteada por estos resultados, las muestras se analizaron también con cebadores diagnósticos publicados (46F/47R) para *A. taiwanensis* (Morales *et al.*, 2005). Las amplificaciones generadas en *Lu. longipalpis* machos de Posadas fueron de baja definición y nitidez, y con tamaños variados. La búsqueda por homología de estas secuencias no produjo resultados significativos con ninguna secuencia. Sumado a esto, el alineamiento entre las secuencias de las dos muestras amplificadas con 46F/47R, con el amplicón teórico 46F/47R de la secuencia de referencia (*A. taiwanensis* NA: 666482), mostró muy bajo porcentaje de identidad entre ellas (Figura 89). En conjunto, estos resultados indicaron que las secuencias de ADN amplificadas con 5F/40R y 46F/47R a partir de *Lu. longipalpis* de Posadas no correspondían a *A. taiwanensis*. Sin embargo, restaría confirmar este resultado con una amplificación a partir de ADN de *A. taiwanensis* con los cebadores diseñados (5F/40R) y los de bibliografía (46F/47R).

En este punto resulta pertinente traer a colación las limitaciones inherentes a las búsquedas por homología, debidas a que los resultados dependen de las secuencias depositadas en las bases de datos públicas. Actualmente, las únicas secuencias de *Ps. chagasi* que se encuentran en las bases de datos públicas corresponden a la subunidad ribosomal 18S (FJ865354 y las siete secuencias generadas en esta tesis, [JX963634](#)-[JX963638](#), [KC113486](#) y [KC113487](#)). Por ende, no hay secuencias de otras

regiones del genoma de *Ps. chagasi*. Esto plantea una incógnita acerca de las pirosecuencias que mostraron homología con *A. taiwanensis* ya que, en función de los resultados obtenidos en esta tesis, es muy probable que esas pirosecuencias no correspondan a *A. taiwanensis*, sino a *Ps. chagasi* y que, por la ausencia de secuencias de *Ps. chagasi* de la región ribosomal 26S en las bases de datos, no fueron reconocidas como tales. De ser así, todas las secuencias identificadas como *A. taiwanensis* en las búsquedas por homología, en realidad corresponderían a *Ps. chagasi*, y los cebadores diseñados 5F/40R estarían dirigidos a la región 26S de *Ps. chagasi*. En el análisis filogenético de las secuencias obtenidas a partir de las muestras amplificadas con los cebadores diseñados 5F/40R (Figura 90), se obtienen dos clados correspondientes a gregarinos, uno formado por las secuencias de ascogregarinos de GenBank, y otro formado por las secuencias amplificadas con 5F/40R a partir de *Lu. longipalpis* de Posadas. Es decir que en la topología del árbol generado, las secuencias de *A. taiwanensis* de las bases de datos, se mantienen separadas de las secuencias amplificadas a partir de los flebótomos de Posadas. Esto le daría sustento a nuestra hipótesis de que las secuencias amplificadas con 5F/40R en realidad son de *Ps. chagasi* y no de *A. taiwanensis*.

Plasmodium falciparum

El otro taxón analizado en detalle fue *P. falciparum*, por ser un importante patógeno humano que fue identificado en *Lu. longipalpis*, un vector no natural. Las secuencias amplificadas con el juego de cebadores diseñados 41F/43R no mostraron homología con esta especie. Para las amplificaciones se utilizaron clones del amplicón 41F/43R (generados a partir de la muestra original de ADNc), y varios lotes de flebótomos salvajes (machos y hembras). Las secuencias obtenidas a partir de estas muestras presentaron homología con secuencias de otros apicomplejos (*A. taiwanensis* y *G. carpelli*). Sumado a esto, para probar la especificidad de los cebadores diseñados, se realizaron amplificaciones con 41F/43R a partir del ADN de 5 cepas diferentes de *P. falciparum*. En función de la ausencia de amplificación en estas reacciones, se pudo confirmar que los cebadores 41F/43R no eran capaces de reconocer secuencias de *P. falciparum*. Por otro lado, también se realizaron amplificaciones con cebadores diagnósticos de bibliografía (rFAL1/ rFAL 2) a partir de estas mismas muestras de *P. falciparum*, y se obtuvo amplificación (Figura 103). Estos resultados demostraron que los cebadores diseñados no eran aptos para la detección de *P. falciparum*. Además, al igual que para *A. taiwanensis*, es muy probable que las

pirosecuencias que mostraron homología con *P. falciparum* no correspondan a esa especie sino a *Ps. chagasi* y que, debido a que no hay secuencias de *Ps. chagasi* de esa región en las bases de datos, no fueron reconocidas como tales. De ser así, todas las secuencias identificadas como *P. falciparum* en las búsquedas por homología, en realidad corresponderían a *Ps. chagasi*, y los cebadores diseñados 41F/43R amplificarían secuencias de *Ps. chagasi*. Por otro lado, el AF generado con las secuencias amplificadas con los cebadores diseñados 41F/43R y secuencias de la base de datos, demostró que las secuencias obtenidas con 41F/43R a partir de flebótomos de Posadas formaban un clado bien diferenciado del de *P. falciparum* (Figura 104). La topología del AF evidenció que esas secuencias no corresponden a *Plasmodium* sp. y que posiblemente sean secuencias pertenecientes a gregarinos, particularmente *Psychodiella*, ya que también formaron un clado claramente diferenciado del de *Ascogregarina*.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A continuación se resumen los resultados más significativos de esta tesis.

Se desarrolló el primer ensayo basado en PCR para la detección e identificación de infecciones gregarinas en flebótomos, mediante la amplificación selectiva de un fragmento de ADN del gen de la subunidad pequeña de ARNr (SSU rDNA) (Resultados: Capítulos 1 y 2; (Caligiuri *et al.*, 2014)). Este ensayo comprende: 1) la extracción de ADN total del hospedador; 2) la amplificación por PCR de un fragmento del gen SSU ADNr del parásito utilizando cebadores con homología a regiones conservadas a nivel de género; y 3) la identificación del parásito a nivel de género por comparación del fragmento amplificado con un patrón de tamaños preestablecido, e identificación del parásito a nivel de especie mediante secuenciación del amplicón y posterior comparación de la secuencia resultante con secuencias de bases de datos informáticas.

Seguidamente se evaluó la aplicabilidad de este ensayo diagnóstico para estudios de campo (Resultados: Capítulo 3; (Caligiuri *et al.*, 2014)). Los resultados indicaron que el ensayo diagnóstico es muy versátil para estudios de campo, y que se puede adaptar a diferentes diseños de muestreo. Sumado a esto, el ensayo diagnóstico permitió detectar infecciones gregarinas en flebótomos que habían sido analizados previamente por microscopía y que, de acuerdo a ese análisis, no tenían infecciones aparentes.

También se diseñaron y evaluaron cebadores diagnósticos para identificar el parásito a nivel de especie (*Ps. chagasi*) (Resultados: Capítulo 4). Se utilizó el ensayo diagnóstico desarrollado con estos nuevos cebadores, para analizar flebótomos infectados experimentalmente con dos especies diferentes del parásito, *Ps. chagasi* y *Ps. sergenti*.

Estos resultados demostraron no sólo la presencia de *Ps. chagasi* en *Lu. longipalpis* de Posadas, donde no se había descrito previamente, sino también su persistencia en diversas regiones de América del Sur (Posadas, Argentina; Jacobina y Lapinha, Brasil). El uso de *Ps. chagasi* como método de control a campo no se ha considerado eficiente, porque el parásito parece tener un rango limitado y un efecto mínimo sobre la biología del flebótomo en condiciones naturales (Soares y Turco, 2003). Sin embargo, se han observado variaciones geográficas en la patogenicidad de otros gregarinos, ya que algunas cepas asiáticas de *A. culicis* son patogénicas para *Ae. aegypti*, mientras que una cepa de *A. culicis* de EEUU o *A. taiwanensis* no lo serían (Reyes-Villanueva *et al.*, 2003). En este contexto, se debería explorar esta

posibilidad con *Ps. chagasi* para poder determinar su patogenicidad para las poblaciones de *Lu. longipalpis* en Argentina.

Por otro lado, el análisis de diferentes flebótomos con los cebadores diagnósticos diseñados para *A. taiwanensis* y *P. falciparum*, permitió descartar la asociación de estos apicomplejos con los ejemplares analizados (Resultados: Capítulos 5-8).

También se diseñaron cebadores diagnósticos para varias de las especies de hongos y bacterias identificadas en ejemplares de *Lu. longipalpis* (Resultados: Capítulos 9 y 10). Estos cebadores servirán para analizar las interacciones entre estas especies y los flebótomos en más detalle.

Por último, el flujo de trabajo desarrollado en esta tesis para los diversos análisis bioinformáticos, dejó de manifiesto las ventajas y limitaciones de esta metodología. Por un lado, la enorme utilidad de las búsquedas por homología para rápidamente identificar los taxones presentes en una muestra, cuya identificación a través de los enfoques clásicos sería significativamente más lenta, si es que se puede realizar. Por otro lado, las limitaciones inherentes a las bases de datos públicas, ya que los resultados de las búsquedas por homología están condicionados por los datos contenidos y la falta de datos en las mismas.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis han permitido cumplir con el objetivo principal de la misma (establecer la significancia de los taxones previamente encontrados en *Lu. longipalpis*, con particular énfasis en los posibles agentes de control biológico y en los agentes etiológicos de importancia médica y veterinaria) y, consecuentemente, aportan información de suma relevancia sobre la biología de *Lu. longipalpis*, vector de Leishmaniasis Visceral, y de uno de sus parásitos naturales, *Ps. chagasi*, con potencial para ser usado como agente de control biológico de este vector.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Análisis de las secuencias

Las pirosecuencias utilizadas en esta tesis fueron obtenidas del SRA (Sequence Read Archive) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con número de acceso (NA) SRA026595. Las pirosecuencias utilizadas (SRA026595) fueron editadas y analizadas con los programas WinEdt versión 5.5 y BioEdit versión 7.0.5.3 (Thompson *et al.*, 1994; Hall, 1999). Los alineamientos múltiples (AM) de secuencias nucleotídicas fueron realizados mediante ClustalW versión 1.4 (Thompson *et al.*, 1994) ejecutado con BioEdit. Las búsquedas por homología de las secuencias fueron realizadas con BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) contra la base de datos nucleotídica no redundante (secuencias nucleotídicas parcialmente no redundantes de todas las divisiones tradicionales de GenBank, EMBL y DDBJ, excepto GSS, STS, PAT, EST, HTG y WGS; denominada nr). Los mapas genéticos fueron realizados usando el programa NTI Vector versión 10.3.0 (Invitrogen).

4.2 Diseño de cebadores

Varios programas fueron utilizados para el diseño y análisis de los cebadores, incluyendo Oligo7 (Rychlik, 2007), FastPCR (Kalendar *et al.*, 2011) y AmplifX (<http://ifrj.nord.univ-mrs.fr/AmplifX>). Para la elección de los cebadores se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: temperatura de hibridación, longitud (≥ 18 nt), largo del producto de amplificación (> 200 pb), probabilidad reducida o nula de formación de estructuras secundarias (*hairpin* o dímeros) y especificidad teórica.

La Tabla A (ANEXO I) muestra las características de los cebadores diseñados (como largo y producto teórico de amplificación) para *Psychodiella chagasi* (PsyF 5'-TAGTGACAAGAAATATCGGT-3', PsyR 5'-CACTGCCATAAATGACCTG-3' y 20R 5'-CTTCATCTCGTCATTGACGG-3'), *Ascogregarina taiwanensis* (5F 5'-AAAAGCCTCTAGTCAGT-3' y 40R 5'-GATTATTCCAAGCCGTTTC-3'), y *Plasmodium falciparum* (41F 5'-GTCGCTAATTAGATGACG-3', 42R 5'-TTAACCCAGAACTGAAGCG-3' y 43R 5'-AAAAGCCTCTAGTCAGT-3').

4.3 Amplificaciones por PCR con los cebadores diseñados

Para las amplificaciones se utilizó como molde el ADN total extraído de los flebotomos. El ADN complementario (ADNc) previamente amplificado a partir del

ARN total extraído de machos (SS2 y PP2) y hembras (SS1 y PP1) de *Lu. longipalpis* de zona endémica (SS) y no endémica (PP) de LV (McCarthy *et al.*, 2011), se utilizó únicamente en las amplificaciones iniciales para el posterior clonado de los amplicones. Se utilizaron distintas diluciones del ADNc (1:100 y 1:20).

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo utilizando los cebadores *PsyF/PsyR* y *PsyF/20R* para *Psychodiella chagasi*, *5F/40R* para *Ascogregarina taiwanensis*, y *41F/43R* y *41F/42R* para *Plasmodium falciparum*. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 10 µl, conteniendo una solución amortiguadora de PCR 1X (Tris-HCl 200 mM; pH 8.4; KCl 500 mM); 2 mM o 2.5 mM MgCl₂; una concentración de 0,125 mM de la mezcla de nucleótidos (dNTPs); donde se incluyeron 0,03 U/µl ADN Polimerasa Taq-Pegasus® (Productos Bio-Lógicos), 0,5 µM de cada cebador, con distintas concentraciones de *Bovine Serum Albumin* (BSA) (0 a 3 mg/ml), y se completó la reacción con agua miliQ. Los ensayos de PCR se realizaron en Thermo Hybaid MBS 0,2S PCR Thermal Cycler y GenMax Thermal Cycler modelo TC-S (Bioer-Genbiotech), bajo las siguientes condiciones de ciclado: 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, temperatura de hibridación óptima (51°C) durante 30 segundos y 74°C durante 60 segundos; y una extensión final de 74°C durante 7 minutos. Luego de la amplificación, los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio (10 µg/ml) o 1:10.000 GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (Genbiotech).

En el caso de los amplicones que fueron secuenciados (Macrogen), el volumen final de PCR fue de 25 µl por triplicado. Para el clonado de los productos de amplificación se usó la polimerasa PFU (Promega), debido a que minimiza el error de polimerización. Los volúmenes usados, condiciones de ciclado, y visualización de los resultados, fueron los ya descriptos.

4.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN en función de su tamaño, se llevó a cabo en geles de agarosa 1% (p/v). Las electroforesis se desarrollaron en cubetas horizontales a voltaje constante (90 V) y como solución amortiguadora se utilizó TAE 1X (TAE 50X: Tris-HCl 2 M, pH 7,2, EDTA 50 mM, pH 8, ácido acético glacial 57,1 ml y agua bidestilada hasta 1 l). Las muestras se prepararon mezclando el ADN con solución amortiguadora de carga de alta densidad, compuesto por azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v). Para la visualización del ADN se añadió al gel de agarosa bromuro de etidio (10 µg/ml) o 1:10.000 GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain

(Genbiotech), y se utilizaron transiluminadores de luz UV (340 nm) y LED (470 nm), respectivamente.

El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó con fragmentos de ADN de tamaño conocido. Como marcadores de peso molecular (PM) se utilizaron:

- ADN del fago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* (Fermentas). Los fragmentos generados tienen un tamaño de 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564 y 120 pb.
- ADN del fago Lambda digerido con las enzimas *BamHI*, *HindIII* y *EcoRI* (Fermentas). Los fragmentos generados tienen un tamaño de 15721, 9035, 3775, 2752, 2564, 2409, 2396, 2027, 1709, 1375, 1120, 947, 831, 784, 564 y 493 pb.
- PM de 100 pb (Takara).
- ADN del plásmido pZERO™-2 de Invitrogen digerido con la endonucleasa de restricción *HaeIII* (Fermentas). Los fragmentos generados tienen un tamaño de 1011, 964, 696, 370 y 248 pb.

4.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de los geles de agarosa

La recuperación de fragmentos de ADN a partir de los geles de agarosa se realizó utilizando LiCl y etanol absoluto. Dicho protocolo se inicia cortando el taco de agarosa que contiene el fragmento de ADN a purificar, este taco de agarosa se introduce en un tubo de 1,5 ml con guata, por donde se eluye el ADN luego de ser centrifugado a 14.000 g durante 1 minuto, y es recuperado en otro tubo de 1,5 ml. Luego se agregan 0,1 volúmenes LiCl 8 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se mezcla la solución formada para luego incubar la misma durante 30 minutos a -80°C. Pasado ese tiempo se centrifuga a máxima velocidad durante 30 minutos, obteniéndose un sedimento pequeño, el cual se lava con etanol 70 % y se seca en estufa. Se resuspende el sedimento resultante en 10 µl de agua miliQ.

Las purificaciones utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.6 Digestión del ADN con Endonucleasas de Restricción

Las digestiones del ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo según las condiciones de la solución amortiguadora de reacción y temperatura especificadas por el fabricante. El volumen total de reacción fue de 10 µl y el tiempo de incubación fue de 16 horas para la digestión de plásmidos.

Las digestiones dobles se realizaron con dos enzimas de restricción a la vez, cuando la solución amortiguadora de reacción era común para ambas enzimas, de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante.

4.7 Tratamiento de clones recombinantes

Ligación de fragmentos

Para el clonado de los fragmentos deseados, se usó un vector de clonado digerido con la enzima de restricción *EcoRV* (Fermentas), con el objetivo de conseguir extremos romos. Los fragmentos obtenidos de la amplificación del ADNc utilizando los oligos diseñados, fueron purificados con el protocolo de purificación de fragmentos a partir de agarosa detallado anteriormente, y de la misma manera se purificaron los plásmidos digeridos a partir del gel de agarosa.

La ligación de los fragmentos con los plásmidos fue llevada a cabo a través de la ADN ligasa del fago T4, y con una relación molar 5:1 (vector: inserto). La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente (~22°C) durante 16 horas, y los plásmidos recombinantes se recuperaron en *E. coli* XL1-Blue o Top 10, mediante transformación con los productos de la reacción de ligación.

El tratamiento del ADN con las proteínas enzimáticas se llevó a cabo siguiendo los protocolos habituales (Sambrook y Russell, 2001) y según las recomendaciones de los fabricantes.

Se utilizaron dos tipos de vectores de clonado, uno fue el vector de ADN plasmídico pBlue Script II KS+ (pBS) (Fermentas), con resistencia a Ampicilina, de 2961 pares de bases (pb). La búsqueda de los clones recombinantes se realizó mediante el sistema azul/blanco descrito más adelante. El otro vector de clonado fue pZERO™-2 (pZ2) de Invitrogen, con resistencia a Kanamicina y un tamaño de 3297 pb, que presenta el sistema del gen letal *ccdB* para la selección de los clones recombinantes (descrito más adelante).

Cepas bacterianas

-*Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen) genotipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 nupG recA1 araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galE15 galK16 rpsL* (Str^R) *endA1* λ⁻, empleada para la transformación y propagación del plásmido pZERO™-2 (Invitrogen).

http://openwetware.org/index.php?title=E._coli_genotypes&oldid=853128

-*Escherichia coli* cepa XL-1 Blue (Stratagene) genotipo: endA1 gyrA96 (nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), empleada para la transformación y propagación del plásmido pBlue Script II KS+. http://openwetware.org/index.php?title=E._coli_genotypes&oldid=853128

Cultivo de las cepas bacterianas

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* Top 10 y XL1-Blue, fue medio líquido LB (Luria-Bertani), compuesto por extracto de levadura al 0,5 % (p/v), bactotripton a al 1 % (p/v) y NaCl al 1 % (p/v). El medio sólido LB-agar se obtuvo añadiendo agar al medio LB líquido hasta una concentración final del 1,5 % (p/v). Para el crecimiento de las bacterias XL1-Blue también se incluyó tetraciclina (10 µg/ml) en el medio de cultivo.

Condiciones de cultivo de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio líquido LB a 37°C durante 12-16 horas. Los medios se inocularon a partir de colonias aisladas crecidas sobre medio sólido o bien a partir de *stocks* de células en glicerol 30 %. Para la selección de clones generados con el vector pBlue Script II KS+ se utilizó el antibiótico Ampicilina, añadido al medio de cultivo esterilizado a una concentración final de 50 µg/ml. En el caso de los clones generados a partir de pZEROTM-2, se usó Kanamicina a la misma concentración. Los medios LB se esterilizaron en autoclave. Los componentes sensibles al calor, como los antibióticos, fueron esterilizados por filtración (Millipore 0,22 µm) y añadidos al medio de cultivo esterilizado en autoclave después de que la temperatura del medio alcanzó <50°C. Para mantener las cepas viables durante largos períodos de tiempo, éstas se conservaron a -80°C en glicerol al 30 % (v/v).

Selección de los clones transformantes de *E. coli*

El vector de clonado pZEROTM-2 utilizado porta el gen de resistencia a Kanamicina y además cuenta con un gen letal llamado ccdB, que no permite el crecimiento de las células Top10. Sin embargo, si el marco de lectura del gen ccdB es interrumpido por la inserción del fragmento de interés, hay crecimiento de las bacterias. En este sentido, la selección de los transformantes se basó en el hecho de que sólo las células transformadas con el plásmido recombinante pueden crecer en un medio de cultivo que contenga Kanamicina 50 µg/ml. La selección de los clones que portaban los plásmidos recombinantes se realizó inoculando colonias en 5 ml de

medio LB-Kanamicina y creciendo el cultivo durante 16 horas. Luego se extrajo el ADN plasmídico y se digirió con enzimas de restricción para verificar la presencia del inserto.

Los clones recombinantes generados con el vector pBS en *E. coli* cepa XL-1 Blue, fueron seleccionados a través de un medio de cultivo que contenía Ampicilina (50 µg/ml) y mediante la visualización de colonias azules o blancas por el agregado de los sustratos correspondientes (IPTG y X-gal) a la placa de selección. Los nucleótidos 2833-2765 (hebra complementaria) codifican para un péptido señal correspondiente al extremo 5' del gen lacZ, que codifica el fragmento N-terminal de la beta-galactosidasa. Este fragmento permite la detección azul / blanco de los clones recombinantes mediante el uso de sus correspondientes sustratos. Si el fragmento de interés se inserta, esta secuencia se interrumpe y el fragmento no se expresa, por lo tanto las colonias que portan los plásmidos recombinantes son de coloración blanca. Por otro lado, los clones no recombinantes se verán azules en este mismo medio.

Confirmación de clones recombinantes

La confirmación de los clones portadores de plásmidos recombinantes se realizó por digestión del ADN plasmídico con endonucleasas de restricción, específicas para el vector y amplicón. La digestión simple se llevó a cabo mediante la enzima *PvuII* (Fermentas), y para las digestiones dobles se utilizaron dos enzimas simultáneamente, *HinCII* (Biolabs) y *PvuII*, usando la solución amortiguadora de reacción común para ambas enzimas.

En todos los casos las digestiones se llevaron a cabo según las condiciones de reacción y temperatura especificadas por el fabricante. El volumen total de reacción fue de 10 µl y el tiempo de incubación fue de 16 horas para la digestión de los plásmidos.

4.8 Extracción de ADN plasmídico a partir de *E. coli*

Se usó el protocolo STET PREP (Theilmann y Blissard) para un cotejo rápido del ADN plasmídico de las células transformadas de *E. coli*. Este método se basa en la utilización de una solución STET: 8 % Sacarosa; 0,5 % Triton X-100; 50 mM EDTA (ph 8); 10 mM Tris-H (ph 8). Brevemente, las células bacterianas presentes en 5 ml de cultivo crecido durante 12-16 horas en medio LB con antibiótico, se sedimentaron mediante centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto, y se resuspendieron en 200 µl del buffer STET. Luego se agregó la enzima Lisozima a concentración final 10 µg/ml, mezclando suavemente durante 3 segundos. Dicha mezcla primero se

incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego a 100 °C durante 40 segundos, e inmediatamente después se transfirieron los tubos a un baño con hielo durante 2 minutos. A continuación se centrifugaron los tubos a máxima velocidad durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico y se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto, y se mezcló y centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos. El ADN precipitado se lavó con etanol 70 %, se secó brevemente y resuspendió en 30 µl de buffer TE conteniendo RNasa A. Por último se incubó a 37°C durante 15 minutos para que actúe la enzima.

Para obtener ADN plasmídico de mayor pureza, se utilizó el mismo protocolo anteriormente detallado, pero se agregó una extracción con cloroformo: isoamílico (24:1) luego de la precipitación de los restos celulares y antes de la precipitación con etanol absoluto. Se resuspendió en agua miliQ en un volumen final de 30 µl.

También se utilizó el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

4.9 Cuantificación de las muestras de ADN

El ADN de las muestras fue cuantificado usando el programa Image J, que calcula la concentración de ADN de las muestras en base a imágenes de los geles de agarosa, utilizando la intensidad lumínica emitida por el ADN-Bromuro de Etidio. El marcador de peso molecular Lambda digerido con *HindIII* (Lambda/*HindIII*) fue utilizado como referencia. También se realizaron mediciones con el microespectrofotómetro AQ-07 (Genbiotech) usando 8 µl de muestra, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

4.10 Preparación de células *E. coli* competentes

Como ya se ha mencionado, las cepas de *E. coli* utilizadas para la transformación con ADN fueron Top 10 y XL1-Blue. Para la preparación de las células competentes se inocularon 5 ml de medio de cultivo LB a partir de una colonia bacteriana y se incubó durante 12 horas a 37°C. Luego este cultivo se utilizó para inocular 75 ml de medio LB, el cual fue incubado a 37°C con agitación vigorosa, hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. Seguidamente, las células se recogieron por centrifugación a 9.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Éstas se resuspendieron en 30 ml de MgCl₂ 50 mM, previamente enfriado en hielo, y se incubaron a 4°C durante 15 minutos. Se sedimentaron nuevamente por centrifugación (9.000 rpm, 5 minutos a 4°C), y se resuspendieron suavemente en 5,6 ml de CaCl₂ 50 mM y 1,7 ml de glicerol estéril 50 % v/v. Finalmente se tomaron alícuotas de 60 µl en tubos de 1,5 ml estériles que se conservaron a -80°C.

4.11 Transformación de células bacterianas competentes

El proceso de transformación de *E. coli* fue mediante choque térmico. Las células competentes se descongelaron en hielo durante 5-10 minutos. A 60 µl de células se le añadieron 5 µl de ADN plasmídico circular, o bien toda la mezcla de ligación, y se mantuvo en agua/hielo durante 20 minutos. A continuación, la mezcla se incubó a 42°C durante 1 minuto, y nuevamente se mantuvo en agua/hielo durante 5 minutos. Luego se añadió 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación suave, para permitir la recuperación de las bacterias. Por último, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 9000 rpm durante 10 segundos, se resuspendieron en 200 µl de medio fresco, y se sembraron diferentes diluciones en placas de Petri que contenían medio de cultivo LB sólido con antibiótico, en función del vector de clonado utilizado. Las placas se incubaron a 37°C durante 12 a 16 horas.

4.12 Secuenciamiento convencional

El ADN de los clones recombinantes en las concentraciones requeridas, puro y sin presencia de ARN, fue secuenciado por la empresa MacroGen Inc. (Korea), usando secuenciamiento convencional por Sanger con cebadores universales como SP6 y T7 para el vector de clonado pZ2, y T7 y T3 para el vector pBS. Los secuenciamientos de los amplicones purificado con QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) o sin purificar, se llevaron a cabo con los cebadores diseñados utilizados para su amplificación. Para obtener el ensamblado de las secuencias resultantes se usó SeqMan Pro versión 7.1 (Lasergene, DNASTAR).

4.13 Muestras biológicas

Todas las capturas de los flebótomos fueron realizadas con mini trampas de luz CDC (Sudia y Chamberlain, 1988) en los peridomicilios seleccionados, previa autorización de los propietarios. Los flebótomos capturados fueron transportados al laboratorio correspondiente (Misiones o Belo Horizonte) en donde fueron mantenidos a bajas temperaturas (-20°C) hasta su envío a nuestro laboratorio para su posterior análisis molecular. Los adultos machos y hembras fueron trasladados en alcohol 70 % o RNAlater® (Qiagen). Las muestras en el laboratorio fueron almacenadas a -80°C.

La identificación de los especímenes de *Lu. longipalpis* de Misiones (505 flebótomos) y su diferenciación en sexos estuvo a cargo de la Dra. Ma. Soledad

Santini, Enrique Adolfo Sandoval y Dra. Soraya Acardi. La nomenclatura usada para cada grupo de flebótomos de Posadas fue la siguiente:

- CM1: hembras de *Lu. longipalpis* de Posadas, Misiones; período de captura 2009 (McCarthy *et al.*, 2011).
- KS1 y KS2: hembras y machos, respectivamente, de *Lu. longipalpis* de Posadas, Misiones; período de captura Noviembre del 2011.
- SA1 y 1SA: 5 hembras y 1 hembra, respectivamente, de la especie *Lu. longipalpis* de Posadas, Misiones; periodo de captura 2010. Ejemplares previamente analizados por Dra. Soraya Acardi, observando presencia de gregarinos mediante microscopía. 1SA se trasladó y almacenó individualmente en tubo de 1,5 ml conteniendo alcohol 70%.
- CM1.5 y CM1.10: cinco y diez hembras de *Lu. longipalpis* de Posadas, Misiones; período de captura 2009.
- KS1/2.5 y KS1/2.10: cinco y diez hembras/machos respectivamente de *Lu. longipalpis* de Posadas, Misiones; período de captura Noviembre del 2011.

Las muestras KS fueron provistas por Enrique Adolfo Sandoval del Laboratorio de Vectores, Secretaría de Calidad de Vida, Municipalidad de Posadas (Posadas, Misiones, Argentina). Las muestras CM fueron provistas a la Dra. Christina B. McCarthy (McCarthy *et al.*, 2011) por la Dra. María Soledad Santini del Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemo-Epidemias (CeNDIE) Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Ministerio de Salud, Buenos Aires (Argentina). Las muestras SA fueron provistas por la Dra. Soraya Acardi del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Posadas (Misiones, Argentina) (Tabla A, Material Complementario).

Los 164 flebótomos del género *Lutzomyia* procedentes de diferentes localidades de Brasil (Tabla B, Material Complementario) fueron enviados en tubos de 1,5 ml en alcohol 70 %, separados por especie y sexo. Fueron provistos por la Dra. Nagila Secundino del Laboratorio de Entomología Médica del Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz en Belo Horizonte (Minas Gerais, Brasil). Estos ejemplares son identificados con la letra B.

Los flebótomos de colonias de laboratorio procedentes de la República Checa, un total de 56 muestras (Tabla C, Material Complementario), fueron enviados en tubos de 1,5 ml en alcohol 70 %, separados por especie. Fueron provistos por Jan Votýpka del Departamento de Parasitología de la Universidad Charles de Praga (República Checa). Estos ejemplares son identificados con la letra C.

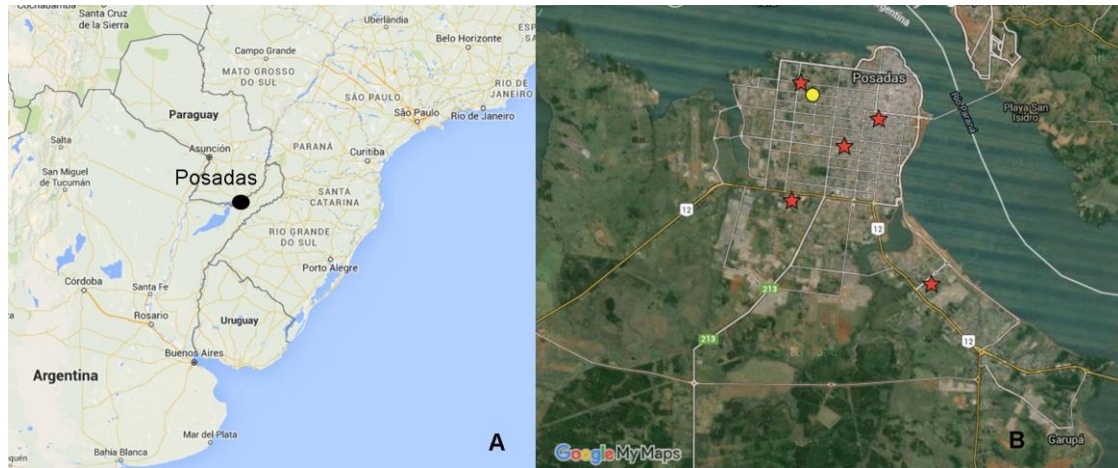
4.14 Áreas de estudio

En esta tesis se utilizaron varios grupos de flebótomos adultos de *Lu. longipalpis*. La gran mayoría (505 de un total de 725 flebótomos analizados), fueron recolectados en Posadas, capital de Misiones (Argentina) (27°23'S; 55°53'W, Figura 108 A), zona endémica de LV en donde *Lu. longipalpis* se distribuye en parches de alta y baja abundancia (Fernandez *et al.*, 2010). La captura correspondiente a las seis hembras infectadas (SA1 y 1SA) provistas por Soraya Acardi, fue realizada en Diciembre de 2010 (27° 22' 3.96" S, 55° 55' 33.78" O) (Figura 108 B). El peridomicilio estudiado presentaba, en el momento de la captura, un gallinero con 18 gallinas, con sombra durante todo el día, árboles de naranja, limón y plátanos separados por 2-5 metros, y un patio limpio sin hojas ni material orgánico acumulado (Caligiuri *et al.*, 2014). Este muestreo incluyó 38 sitios más y fue llevado a cabo para otros estudios (Acardi *et al.*, 2010; Fernandez *et al.*, 2010; Salomón *et al.*, 2010; Santini *et al.*, 2010; Santini *et al.*, 2012).

El resto de los especímenes de *Lu. longipalpis* de Posadas analizados en esta tesis se capturó durante Noviembre de 2011, y los sitios de muestreo se señalan en la Figura 108 B (27° 25' 53.2" S, 55° 52' 50.8" E; 27° 21' 50.3" S, 55° 55' 49.7" E; 27° 24' 12.7" S, 55° 56' 01.7" E; 27° 23' 07.0" S, 55° 54' 49.7" E y 27° 22' 34.0" S, 55° 54' 02.8" E). El sector muestreado estuvo conformado por 5 casas que contenían gallineros, en la mayoría de los casos con gallinas, y también había perros, gatos y, en una sola casa, codornices y conejos. La flora predominante incluía árboles de palta, mango y banana, y los patios estaban ordenados y limpios en la mayoría de los peridomicilios.

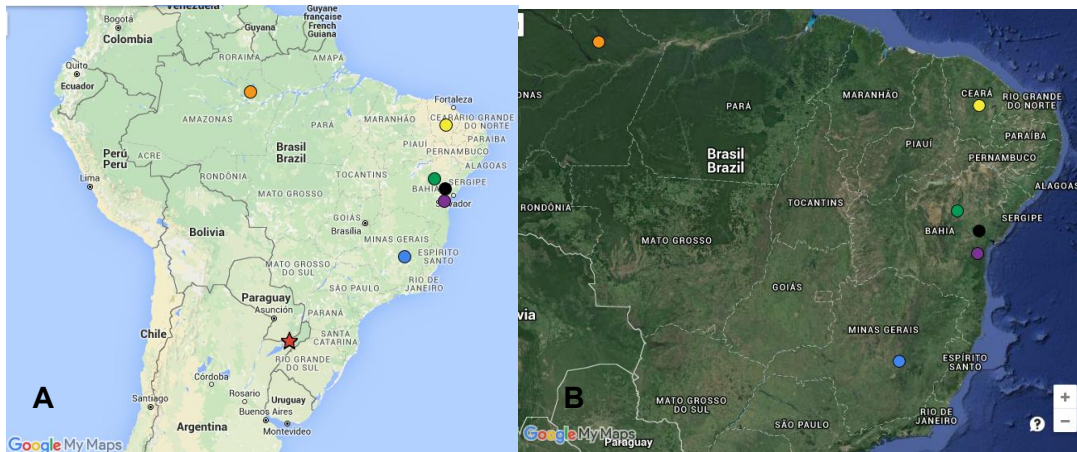
En todas estas capturas las trampas fueron colocadas en peridomicilios domésticos que respondían al criterio de "peor escenario", es decir, ambientes peridomésticos donde la probabilidad de encontrar flebótomos era mayor (Feliciangeli *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2010).

Figura 108. Ubicación de los sitios de captura en Argentina. (A) Se indica la capital de Misiones (Posadas, mostrada con un punto negro) en donde fueron capturados los especímenes de *Lu. longipalpis*. (B) Imagen satelital de la ciudad de Posadas, donde se señala la ubicación de los sitios de captura. El círculo amarillo indica el sitio de captura correspondiente a las muestras SA1 y 1SA, y las 5 estrellas rojas señalan los sitios de captura del resto de las muestras (KS).



Los 164 flebótomos de Brasil corresponden a cinco especies del género *Lutzomyia* (*Lu. longipalpis*, *Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, *Lu. umbratilis* y *Lu. renei*) capturadas en diferentes localidades. *Lu. intermedia* fue capturada en la ciudad de Corte de Pedra en el Estado de Bahía. *Lu. migonei* fue capturado en el Estado de Ceará, y los ejemplares de *Lu. umbratilis* fueron capturados en la ciudad Presidente Figueiredo del Estado de Amazonas. Los ejemplares de *Lu. longipalpis* fueron capturados en tres regiones de Brasil: ciudad de Lapinha Estado de Minas Gerais, al igual que la especie *Lu. renei*, y dos ciudades distintas (Cavunge y Jacobina) del Estado de Bahía. En la Figura 109 se muestran los sitios de captura, y en la Tabla B (Material Complementario) se detalla cada especie.

Figura 109. Ubicación de todos los sitios de captura en Sudamérica (A). Imagen satelital de parte de Brasil donde se muestra la ubicación de los sitios de captura (B). En Argentina, Posadas (*Lu. longipalpis*): estrella roja. En Brasil, Cavunge (*Lu. longipalpis*): círculo negro; Jacobina (*Lu. longipalpis*): círculo verde; Lapinha (*Lu. longipalpis* y *Lu. renei*): círculo azul; Ceará (*Lu. migonei*): círculo amarillo; Presidente Figueiredo (*Lu. umbratilis*): círculo naranja; y Corte de Pedra (*Lu. intermedia*): círculo violeta.



4.15 Microscopia óptica

Los ejemplares de *Lu. longipalpis* capturados en Posadas (Misiones, Argentina), así como cada uno de los ejemplares capturados en Brasil (*Lu. longipalpis*, *Lu. intermedia*, *Lu. migonei*, *Lu. umbratilis* y *Lu. renei*), y los flebótomos de laboratorio provenientes de la República Checa, fueron analizados con el microscopio (microscopio Leitz DMRB, Leica). Cada ejemplar fue colocado en un porta objeto con PBS 1X y fotografiado con una cámara digital Canon Power Shot A590 de 8.0 megapíxeles. En las Tablas A a E (Material Complementario) se detallan los ejemplares analizados de cada país.

4.16 Mediciones de los ooquistes y gamontes de *Ps. chagasi*

El tamaño y la forma de los ooquistes y gamontes de los gregarinos fueron observados y medidos bajo microscopía óptica (JENA, Carl Zeiss). En el caso de las hembras de Posadas infectadas con ooquistes (SA1 y 1SA), las fotografías fueron tomadas con una cámara digital FE-100 (Olympus).

Las mediciones fueron realizadas con el programa Piximetre versión 5.4 (<http://ach.log.free.fr/Piximetre>) (Horak y Cheype, 2007). Se midieron largo (L), ancho (A= ancho) y la relación largo/ancho (L/A) de los ooquistes. La identificación taxonómica de los gregarinos fue realizada por comparación de las dimensiones de los ooquistes con las que recientemente fueron publicadas para *Ps. chagasi*, *Ps. tobbi* y *Ps. sergenti* (Lantova *et al.*, 2010). Para comparar las medias de L, A y L/A entre ooquistes, se usó un test-t para diferentes tamaños muestrales y diferentes varianzas (Tabla 7). Los ejemplares que presentaban gamontes fueron analizados del mismo modo, comparándose las dimensiones de los gamontes con los recientemente publicados para *Ps. chagasi*, *Ps. tobbi* y *Ps. sergenti* (Lantova *et al.*, 2010).

4.17 Mediciones de las glándulas secretoras de feromonas de *Lutzomyia* sp.

Las glándulas secretoras de feromonas fueron observadas y medidas bajo microscopía óptica (JENA, Carl Zeiss), al igual que las diferentes formas del parásito, utilizando las mismas herramientas (microscopio óptico, cámara fotográfica y programa para mediciones).

4.18 Extracción de ADN genómico de flebótomos

Un total de 13 grupos, conteniendo 5 o 10 flebótomos cada uno, fueron usados para las extracciones de ADN de *Lu. longipalpis*, siguiendo los protocolos descritos por Acardi (A) (Acardi *et al.*, 2010) y Golczer (G) (Golczer y Arrivillaga, 2008). También se realizó un tercer protocolo utilizando como base el protocolo de Golczer (Golczer y Arrivillaga, 2008) con una leve modificación (GM): adición de dos volúmenes de las soluciones requeridas hasta el paso de precipitación del ADN. Todas las muestras se resuspendieron en 20 µl de agua miliQ. A continuación se detalla con qué protocolo fue procesado cada grupo:

CM1: protocolos Acardi (A) y Golczer (G).

KS1, SA1 y 1SA: protocolo Acardi (A).

KS2: protocolos Acardi (A), Golczer (G) y modificación del protocolo de Golczer (GM).

CM1.5; CM1.10; KS1.5; KS1.10; KS2.5 y KS2.10: protocolo Acardi (A).

El método de extracción de ADN genómico a partir de los flebótomos (individuales o grupales) de acuerdo al protocolo descrito por Acardi, fue llevado a cabo agregando 30 µl de solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 5 mM; NaCl 200 mM y SDS 0,2 %) con el agregado de la enzima Proteinasa K (0,42 µg/µl). Luego de machacar el insecto con un micropistillo (Eppendorf), se agregó buffer de lisis hasta llegar a 500 µl y se incubó durante 8 horas a 58 °C, agitando con vortex cada media hora. Seguidamente se agregaron 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) mezclando por inversión suave 1-2 minutos. Inmediatamente se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm, transfiriendo a un tubo nuevo la fase superior (aproximadamente 480 µl), a la cual se agregaron 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclando por inversión suave 1-2 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 14.000 rpm, transfiriendo a un tubo nuevo la fase superior (aproximadamente 460 µl), a la cual se agregaron 700 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclando por inversión suave 1-2 minutos. Luego, se centrifugó 3 minutos a 14.000 rpm para transferir a otro tubo la fase superior (aproximadamente 400 µl). Seguidamente se agregaron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2,5

volúmenes de alcohol absoluto, mezclando suavemente por inversión. Posteriormente se incubó toda la noche a -20°C . Luego, se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos, descartando el sobrenadante y secando el sedimento durante 5 minutos a 37°C . Finalmente, se resuspendió el *pellet* en 20 μl de agua miliQ. Este protocolo estándar de extracción de ADN fue optimizado como se describe en Resultados: Capítulo 3, y las muestras procesadas de Argentina y Brasil se detallan en las Tablas D y E (Material Complementario).

El método de extracción de ADN genómico a partir de los flebótomos (grupales) de acuerdo al protocolo descrito por Golczer, se realizó usando una solución amortiguadora de lisis conteniendo NaCl 0,1 M; sacarosa 0,2 M; EDTA 50 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,25 y SDS 0,05 %. Primero se agregaron 25 μl de la solución amortiguadora en el tubo de 1,5 ml que contenía a los flebótomos. Los ejemplares fueron homogeneizados con un micropistillo (Eppendorf). Luego, se agregaron otros 25 μl de la solución amortiguadora y se incubó a 65°C durante 2 horas, mezclando con golpes suaves cada media hora. La precipitación de proteínas se realizó con 14 μl de acetato de potasio 8 M mezclando por inversión, y luego incubando en hielo durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos y se tomó el sobrenadante para ser transferido a un tubo nuevo. EL ADN se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente con 100 μl de etanol absoluto frío. Se volvió a centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se agregaron 100 μl de etanol 70 % frío y se incubó toda la noche a -20°C . Seguidamente se centrifugó la mezcla a 14.000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se lavó dos veces con etanol absoluto durante 10 minutos. Después de secar a temperatura ambiente, el ADN se resuspendió en 20 μl de agua miliQ.

4.19 Control interno de las extracciones de ADN genómico

Gen cacophony

Todas las extracciones de ADN de *Lu. longipalpis* fueron verificadas mediante un control interno con cebadores específicos (Peixoto *et al.*, 2001; Lins *et al.*, 2002), para confirmar la presencia y calidad del ADN obtenido. La Tabla B (ANEXO I) muestra los cebadores mencionados, cuyo producto de amplificación esperado es de ~ 225 pb.

Las reacciones de amplificación con estos cebadores (44F y 45R) se realizaron en volumen final 10 μl usando 1 μl de molde (a partir de diferentes diluciones 1:10, 1:25 o 1:50), 0,125 mM de dNTPs, solución amortiguadora para PCR 1X (Tris-HCl

200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM), 2-2,5 mM de MgCl₂, distintas concentraciones de BSA (0 a 3 mg/ml), 0,5 μM de cada uno de los cebadores (*forward* y *reverse*), 0,03 U/μl de Taq-polimerasa Pegasus de PBL, y completando la reacción con agua miliQ. Las condiciones de ciclado usadas fueron las planteadas en la publicación de referencia (Lins *et al.*, 2002). Como control negativo se usó agua miliQ. Las amplificaciones se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal 1 % teñido con bromuro de etidio (10 μg/ml) en un transiluminador con luz UV.

Gen 18S ribosomal

Algunas de las extracciones de ADN fueron verificadas mediante un segundo control interno con cebadores universales para eucariotas, F-566 y R-1200 (Hadziavdic *et al.*, 2014), renombrados según nuestra lista de cebadores como 54F y 55R, respectivamente. Según datos publicados, estos cebadores amplifican en promedio un fragmento de 650 pb correspondiente a las regiones V4 y V5 del gen ribosomal 18S. En la tabla C (ANEXO I) se presentan los cebadores mencionados.

Las reacciones de amplificación con los cebadores 54F/55R se realizaron en volumen final 10 μl usando 1 μl de molde (a partir de diferentes diluciones 1:10, 1:25 o 1:50), 0,125 mM de dNTPs, solución amortiguadora para PCR 1X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM), 2 a 3,5 mM de MgCl₂, 0,1 a 0,5 mg/ml de BSA, 0,5 μM de cada uno de los cebadores (*forward* y *reverse*), 0,03 U/μl de Taq-polimerasa Pegasus de PBL, y completando la reacción con agua miliQ. Las condiciones de ciclado usadas fueron las planteadas en la publicación de referencia (Hadziavdic *et al.*, 2014). Como control negativo se usó agua miliQ. Las amplificaciones se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal 1 % teñido con 1:10.000 GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (Genbiotech).

4.20 Cebadores diagnósticos de bibliografía

Se realizó una búsqueda bibliográfica para cebadores diagnósticos de *Ascogregarina taiwanensis*, *Psychodiella chagasi* y *Plasmodium falciparum*. La búsqueda se realizó en bases de datos bibliográficas como Pubmed. En el caso de *Ascogregarina taiwanensis*, se eligió el juego de cebadores especie-específico AU-AT que amplifica secuencias del gen 18S Ribosomal y de la región ITS2 (Morales *et al.*, 2005). Para *Plasmodium falciparum*, se eligieron los cebadores rFAL1-rFAL2 (especie-específicos); rPLU1-rPLU5 (género-específicos) y rPLU3-rPLU4 (género-específicos), que amplifican secuencias del gen 18S Ribosomal (Snounou *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999; Snounou y Singh, 2002). En la tabla D ANEXO I se detalla

cada uno de los cebadores de bibliografía usados. En el caso de *Psychodiella chagasi* no se encontraron cebadores específicos de esta especie y tampoco del género.

Las amplificaciones usando cebadores de bibliografía para la especie *Ascogregarina taiwanensis* y *Plasmodium falciparum*, fueron realizadas siguiendo las condiciones de reacción y ciclado planteadas en las publicaciones de referencia. Se probaron en las distintas muestras de flebótomos (machos y hembras) sometidas a los distintos protocolos usados A (Acardi *et al.*, 2010), G (Golczer y Arrivillaga, 2008) y GM (Golczer Modificado).

4.21 Amplificación con los cebadores de bibliografía para *Plasmodium sp.*

Las reacciones de amplificación de PCR para la confirmación de *P. falciparum* se llevaron a cabo con varios cebadores de bibliografía (Snounou *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999; Snounou y Singh, 2002): 48F/49R (producto 1,6 kb, género *Plasmodium*), 50F/51R (producto 205 pb, especie *Plasmodium falciparum*) y 52F/53R (producto 235 pb, género *Plasmodium*).

Para las amplificaciones se usaron diferentes diluciones del ADN de las muestras (1:25, 1:50 y 1:100), y éstas se realizaron en un termociclador ThermoHybaid MBS 0,2S PCR Thermal Cyclor o GenMax Thermal Cyclor modelo TC-S (Bioer-Genbiotech). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 10 µl, donde se incluyeron 0,03 a 0,06 U/µl de la enzima Taq ADN polimerasa de PBL (Productos Bio-Lógicos); 0,5 µM de cada cebador; solución amortiguadora de reacción 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM); una concentración de 0,125 mM de dNTPs; con distintas concentraciones de BSA desde 0 a 3 mg/ml; 2 mM a 4 mM de MgCl₂, y se completó la reacción con agua miliQ. Las condiciones de ciclado usadas para cada juego de cebadores fueron las establecidas por los autores (Snounou *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999; Snounou y Singh, 2002). Es importante destacar que se realizaron dos tipos de amplificaciones con los cebadores de *P. falciparum*, PCR-anidada y PCR-directa, de acuerdo a lo sugerido por los autores. PCR anidada se refiere a la PCR con un juego de cebadores (48F y 49R), y luego una segunda PCR con otro juego de cebadores (50F y 51R), que amplifican una región interna del producto de ADN amplificado en primer lugar. Así el fragmento más largo producido en la primera ronda de PCR se utiliza como ADN molde para la segunda PCR.

Luego de cada amplificación, los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa horizontal 1 %, teñido con bromuro de etidio (10 µg/ml).

4.22 Amplificación con los cebadores de bibliografía para *A. taiwanensis*

Las reacciones de amplificación usando los cebadores de bibliografía de *A. taiwanensis* se realizaron en volumen final 10 µl usando 1µl de ADN usando diferentes diluciones (1/10, 1/25 o 1/50), 0,125 mM de dNTPs, solución amortiguadora para PCR 1X (Tris-HCl 200mM, pH 8,4; KCl 500mM), 2,5 mM de MgCl₂, con distintas concentraciones de BSA desde 0 a 2 mg/ml, 0,5 µM de cada uno de los cebadores (*forward* y *reverse*), 0,03 unidades/µl de Taq-polimerasa Pegasus de PBL, y completando la reacción con agua miliQ. Las condiciones de ciclado usadas fueron las establecidas por los autores (Morales *et al.*, 2005). Como control negativo se usó agua miliQ. Al finalizar las amplificaciones los productos se someten a electroforesis en gel de agarosa horizontal 1 % teñido con bromuro de etidio (10 µg/ml).

4.23 Análisis filogenético de secuencias

El análisis filogenético se realizó mediante el método de *Maximum Likelihood* (ML). El análisis incluyó secuencias obtenidas del secuenciamiento convencional de los amplicones *PsyF/PsyR*, *5F/40R* y *41F/43R*, y los clones *5F/40R* y *41F/43R* obtenidos del ADNc (SS2). Además de las secuencias de interés, se usaron varias secuencias obtenidas del GenBank, incluyendo secuencias de apicomplejos y secuencias de dinoflagelados que fueron usados como *outgroup*. El conjunto de secuencias fue editado con el programa BioEdit versión 7.0.5.3 (Thompson *et al.*, 1994; Hall, 1999) y el alineamiento múltiple (AM) fue realizado con ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) a través del programa BioEdit. Los modelos de sustitución usados para los análisis fueron elegidos mediante el programa JModelTest software versión 0.1.1 (Posada y Buckley, 2004; Posada, 2008), teniendo en cuenta el *Akaike Information Criterion* (AIC) y el *Bayesian Information Criterion* (BIC), y “Find Best-Fit Substitution Model” a través del programa Mega 5. Los arboles filogenéticos fueron generados y editados mediante el programa Mega 5 versión 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). El *bootstrap* de cada árbol consenso fue inferido a partir de 1.000 replicas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard-Hansen, J., N. Nombela and J. Alvar (2010). "Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases." *Trop Med Int Health* **15**(11): 1281-1288.
- Acardi, S. A., D. J. Liotta, M. S. Santini, C. M. Romagosa and O. D. Salomón (2010). "Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**(6): 796-799.
- Adler, S. and W. Mayrink (1961). "A gregarine, *Monocystis chagasi* n. sp., of *Phlebotomus longipalpis*. Remarks on the accessory glands of *P. longipalpis*." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **3**: 230-238.
- Aguilar, C. M., E. Fernandez, R. Fernandez, D. C. Cannova, E. Ferrer, Z. Cabrera, W. J. Souza and S. G. Coutinho (1998). "Urban visceral leishmaniasis in Venezuela." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**(1): 15-16.
- Alexander, B. (1995). "A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia." *Am J Trop Med Hyg* **52**(4): 354-359.
- Alexander, B. (2000). "Sampling methods for phlebotomine sandflies." *Med Vet Entomol* **14**(2): 109-122.
- Alexander, B. and M. Maroli (2003). "Control of phlebotomine sandflies." *Med Vet Entomol* **17**(1): 1-18.
- Alexander, B., J. P. Mutebi, D. Hearne, G. C. Lanzaro, R. D. Ward and J. G. C. Hamilton (1998). "Current status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**(II): 31-33.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.
- Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. Lopez-Velez and J. Moreno (2008). "The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years." *Clin Microbiol Rev* **21**(2): 334-359, table of contents.
- Amora, S. S., C. M. Bevilaqua, F. M. Feijo, D. A. N and V. M. M. do (2009). "Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors." *Neotrop Entomol* **38**(3): 303-310.
- Andrade, B. B., C. I. de Oliveira, C. I. Brodskyn, A. Barral and M. Barral-Netto (2007). "Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights." *Scand J Immunol* **66**(2-3): 122-127.
- Araki, A. S., F. M. Vigoder, L. G. Bauzer, G. E. Ferreira, N. A. Souza, I. B. Araujo, J. G. Hamilton, R. P. Brazil and A. A. Peixoto (2009). "Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(1): e365.
- Arrivillaga, J. C. and M. D. Feliciangeli (2001). "*Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela." *J Med Entomol* **38**(6): 783-790.
- Arrivillaga, J. C., D. E. Norris, M. D. Feliciangeli and G. C. Lanzaro (2002). "Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences." *Infect Genet Evol* **2**(2): 83-95.
- Artemiev, M. M. (1980). "A revision of sandflies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, Phlebotominae, *Phlebotomus*)." *Zoologicheskyy Zhurnal* **59**: 1177-1192.
- Ayala, S. (1971). "Gregarine infections in the Californian sandfly, *Lutzomyia vexatrix occidentis*." *J. Invert. Path.* **17**: 440-441.
- Bajorath, J., W. Hinrichs and W. Saenger (1988). "The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium." *European Journal of Biochemistry* **176**: 441-447.
- Bates, P. A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." *Int J Parasitol* **37**(10): 1097-1106.
- Bates, P. A. and M. E. Rogers (2004). "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*." *Curr Mol Med* **4**(6): 601-609.
- Bauzer, L. G., J. S. Gestó, N. A. Souza, R. D. Ward, J. G. Hamilton, C. P. Kyriacou and A. A. Peixoto (2002). "Molecular divergence in the period gene between two putative sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex." *Mol Biol Evol* **19**(9): 1624-1627.

- Bauzer, L. G., N. A. Souza, R. D. Maingon and A. A. Peixoto (2007). "Lutzomyia longipalpis in Brazil: a complex or a single species? A mini-review." Mem Inst Oswaldo Cruz **102**(1): 1-12.
- Bauzer, L. G., N. A. Souza, R. D. Ward, C. P. Kyriacou and A. A. Peixoto (2002). "The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of Lutzomyia longipalpis." Insect Mol Biol **11**(4): 315-323.
- Bejarano, E. E., S. Uribe, W. Rojas and I. Dario Velez (2002). "Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban Leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(5): 645-647.
- Bonfante-Garrido, R., S. Barroeta, M. A. Mejia de Alejos, E. Melendez, C. Arredondo, R. Urdaneta and I. Urdaneta (1984). "[Urban cutaneous leishmaniasis in Barquisimeto, Venezuela]." Bol Oficina Sanit Panam **97**(2): 105-110.
- Bottechia, M., S. G. Oliveira, L. G. Bauzer, N. A. Souza, R. D. Ward, K. J. Garner, C. P. Kyriacou and A. A. Peixoto (2004). "Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of Lutzomyia longipalpis." J Mol Evol **58**(6): 754-761.
- Bray, D. P., G. B. Alves, M. E. Dorval, R. P. Brazil and J. G. Hamilton (2010). "Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector Lutzomyia longipalpis to experimental chicken sheds treated with insecticide." Parasit Vectors **3**: 16.
- Bray, D. P., K. K. Bandi, R. P. Brazil, A. G. Oliveira and J. G. Hamilton (2009). "Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) to traps in the field." J Med Entomol **46**(3): 428-434.
- Brazil, R. P., S. M. P. Oliveira, C. M. G. Dias, J. D. Andrade Filho and F. A. L. (1996). "Natural infection of New World phlebotomine sandflies (Diptera:Psychodidae) with Ascogregarina." Mem. Inst. Oswaldo Cruz **91** (Suppl.): 116.
- Brazil, R. P. and L. Ryan (1984). "Nota sobre a infeccao de *Lutzomyia evandroi* (Diptera: Psychodidae) por *Ascocystis chagasi* (Adler & Mayrink, 1961) no estado do maranhao." Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio J. **79**: 375-376.
- Caligiuri, L. G., S. A. Acardi, M. S. Santini, O. D. Salomon and C. B. McCarthy (2014). "Polymerase chain reaction-based assay for the detection and identification of sand fly gregarines in *Lutzomyia longipalpis*, a vector of visceral leishmaniasis." J Vector Ecol **39**(1): 83-93.
- Caligiuri, L. G. and C. B. McCarthy (2011). Estrategia para confirmar la presencia y asociaci3n de microorganismos identificados en Lutzomyia longipalpis, vector de Leishmaniasis Visceral. XIV Jornadas Argentinas de Microbiolog3a y 3ra Jornada de Microbiolog3a e Infectolog3a del NEA; Asociaci3n Argentina de Microbiolog3a (AAM), Resistencia, Chaco.
- Caligiuri, L. G., E. A. Sandoval and C. B. McCarthy (2012). Strategy for identifying Psychodiella chagasi, a putative control agent for Lutzomyia longipalpis, Visceral Leishmaniasis vector. 5th International Conference on Industrial Bioprocesses (IFIB-2012), National Taiwan University of Science and Technology, Taipei, Taiwan.
- Caligiuri, L. G., E. A. Sandoval, M. S. Santini, S. A. Acardi, O. D. Salom3n, L. Tartaglino and C. B. McCarthy (2014). Testing the versatility of a Psychodiella sp. diagnostic assay in field surveys. VIII International Symposium on Phlebotomine Sandflies (ISOPS VIII), Puerto Iguaz3, Misiones, ISOPS VIII.
- Cameron, M. M., F. A. Pessoa, A. W. Vasconcelos and R. D. Ward (1995). "Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly Lutzomyia longipalpis in Ceara State, Brazil." Med Vet Entomol **9**(3): 263-272.
- Campbell-Lendrum, D., J. P. Dujardin, E. Martinez, M. D. Feliciangeli, J. E. Perez, L. N. Silans and P. Desjeux (2001). "Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities." Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(2): 159-162.
- Canese, A. (2000). "Leishmaniosis visceral canina en el 3rea metropolitana de la 'Gran Asunci3n', Paraguay." Medicina (Buenos Aires) **60**(3): 65.
- Carreno, R. A., D. S. Martin and J. R. Barta (1999). "*Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences." Parasitol. Res. **85**(11): 899-904.
- Carvalho, G. M., C. M. Gontijo, A. L. Falcao and J. D. Andrade Filho (2010). "Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a Leishmania-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil." J Med Entomol **47**(6): 972-976.

- Casanova, C. (2001). "A soil emergence trap for collections of phlebotomine sand flies." Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(2): 273-275.
- Clopton, R. E. (2000). Order Eugregarinorida Leger, 1900. The Illustrated Guide to the Protozoa. 2nd ed. J. J. Lee, G. F. Leedale and P. Bradbury. Lawrence, KS, Allen Press, Inc.: 1:205-288, 353-369.
- Coelho, M. d. V. and A. L. Falcao (1964). "Aspects of the life-cycle of "*Monocystis chagasi*" Adler and Mayrink, 1961." Revista Brasileira de Biologia **24**: 417-421.
- Comiskey, N. M., R. C. Lowrie, Jr. and D. M. Wesson (1999). "Effect of nutrient levels and *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) infections on the vector competence of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae)." J Med Entomol **36**(1): 55-61.
- Comiskey, N. M., R. C. Lowrie, Jr. and D. M. Wesson (1999). "Role of habitat components on the dynamics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from New Orleans." J. Med. Entomol. **36**(3): 313-320.
- Corradetti, A. (1952). "The epidemiology and control of oriental sore in Abruzzo, Italy." Am J Trop Med Hyg **1**(4): 618-622.
- Cortes, L. A. and J. J. Fernandez (2008). "[Species of *Lutzomyia* involved in an urban focus of visceral and cutaneous leishmaniasis]." Biomedica **28**(3): 433-440.
- Costa, C. H. (2008). "Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil." Cad Saude Publica **24**(12): 2959-2963.
- Costa, C. H., R. B. Gomes, M. R. Silva, L. M. Garcez, P. K. Ramos, R. S. Santos, J. J. Shaw, J. R. David and J. H. Maguire (2000). "Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*." J Infect Dis **182**(3): 997-1000.
- Courtenay, O., R. J. Quinnell, L. M. Garcez and C. Dye (2002). "Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission." Parasitology **125**(Pt 5): 407-414.
- Courtenay, O., R. J. Quinnell, L. M. Garcez, J. J. Shaw and C. Dye (2002). "Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission." J Infect Dis **186**(9): 1314-1320.
- Croan, D. G., D. A. Morrison and J. T. Ellis (1997). "Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences." Mol Biochem Parasitol **89**(2): 149-159.
- Chen, W., S. Wu, C. Chow and C. Yang (1997). "Sporogonic development of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Lien and Levine) (Apicomplexa: Lecudinidae) in its natural host *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae)." J Eukaryo Microbio **44**: 326-331.
- Chen, W. J. (1999). "The life cycle of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa:Lecudinidae)." Parasitol Today **15**(4): 153-156.
- Chen, W. J., C. Y. Chow and S. T. Wu (1997). "Ultrastructure of infection, development and gametocyst formation of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in its mosquito host, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)." J Eukaryot Microbiol **44**(2): 101-108.
- Chen, W. J. and M. H. Fan-Chiang (2001). "Directed migration of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in its natural host *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)." J Eukaryot Microbiol **48**(5): 537-541.
- Chen, W. J. and C. H. Yang (1996). "Developmental synchrony of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) within *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)." J Med Entomol **33**(2): 212-215.
- De Barjac, H., I. Larget and R. Killick-Kendrick (1981). "Toxicite de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, serotype H14, pour les larves de phlebotomes, vecteurs de leishmanioses." Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique **74**: 485-489.
- de Pita-Pereira, D., C. R. Alves, M. B. Souza, R. P. Brazil, A. L. Bertho, A. de Figueiredo Barbosa and C. C. Britto (2005). "Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay." Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **99**(12): 905-913.
- de Pita-Pereira, D., M. A. Cardoso, C. R. Alves, R. P. Brazil and C. Britto (2008). "Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay." Acta Trop **107**(1): 66-69.

- de Souza, N. A., R. D. Ward, J. G. Hamilton, C. P. Kyriacou and A. A. Peixoto (2002). "Copulation songs in three siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)." Trans R Soc Trop Med Hyg **96**(1): 102-103.
- de Souza Rocha, L., C. B. Dos Santos, A. Falqueto and R. P. Brazil (2015). "Natural infection of *Evandromyia lenti* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae) by *Psychodiella chagasi* (Adler & Mayrink) (Apicomplexa: Lecudinidae)." J Vector Ecol **40**(2): 419-421.
- Deane, L. M. (1956). *Leishmaniose Visceral no Brasil*. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária: 1-162.
- Depaquit, J., M. Grandadam, F. Fouque, P. E. Andry and C. Peyrefitte (2010). "Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review." Euro Surveill **15**(10): 19507.
- Desjeux, P. (1996). "Leishmaniasis. Public health aspects and control." Clin Dermatol **14**(5): 417-423.
- Desjeux, P. (2001). "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide." Trans R Soc Trop Med Hyg **95**(3): 239-243.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **27**(5): 305-318.
- Dias, E. S., C. L. Fortes-Dias, J. M. Stiteler, P. V. Perkins and P. G. Lawyer (1998). "Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **40**(1): 49-53.
- Dillon, R. J. and V. M. Dillon (2004). "The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions." Annu Rev Entomol **49**: 71-92.
- Dougherty, M. J. and R. D. Ward (1991). "Methods of reducing *Ascogregarina chagasi* parasitaemia in laboratory colonies of *Lutzomyia longipalpis*." Parassitologia **33** Suppl: 185-191.
- Dujardin, J. P., E. M. Torrez, F. Le Pont, D. Hervas and D. Sossa (1997). "Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex." Med Vet Entomol **11**(4): 394-400.
- Dye, C. (1996). "The logic of visceral leishmaniasis control." Am J Trop Med Hyg **55**(2): 125-130.
- Feliciangeli, M. D., O. Delgado, B. Suarez and A. Bravo (2006). "Leishmania and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in west central Venezuela." Trop Med Int Health **11**(12): 1785-1791.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap." Evolution **39**(4): 783-791.
- Fernandez, M. S., O. D. Salomon, R. Cavia, A. A. Perez, S. A. Acardi and J. D. Guccione (2010). "Lutzomyia longipalpis spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina." Acta Trop **114**(2): 81-87.
- Fischer, D., P. Moeller, S. M. Thomas, T. J. Naucke and C. Beierkuhnlein (2011). "Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change." PLoS Negl Trop Dis **5**(11): e1407.
- Galati, E. A. B. (2003). "Classificacao de phlebotominae. Flebotomíneos do Brasil (ed. by E. F. Rangel & R. Lainson)." FIOCRUZ, Rio de Janeiro: 23-51.
- García, A. L., R. Parrado, E. Rojas, R. Delgado, J. C. Dujardin and R. Reithinger (2009). "Leishmaniasis in Bolivia: comprehensive review and current status." Am J Trop Med Hyg **80**(5): 704-711.
- García, J. J., T. Fukuda and J. J. Becnel (1994). "Seasonality, prevalence and pathogenicity of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in mosquitoes from Florida." J Am Mosq Control Assoc **10**(3): 413-418.
- Gebre-Michael, T., M. Balkew, A. Ali, A. Ludovisi and M. Gramiccia (2004). "The isolation of *Leishmania tropica* and *L. aethiopia* from *Phlebotomus* (Paraphlebotomus) species (Diptera: Psychodidae) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia." Trans R Soc Trop Med Hyg **98**(1): 64-70.
- Gleason, J. M. (2005). "Mutations and natural genetic variation in the courtship song of *Drosophila*." Behav Genet **35**(3): 265-277.
- Golczer, G. and J. Arrivillaga (2008). "Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: Lutzomyia)." Revista Colombiana de Entomología **34**(2): 199-202.

- Gomes, R., C. Teixeira, M. J. Teixeira, F. Oliveira, M. J. Menezes, C. Silva, C. I. de Oliveira, J. C. Miranda, D. E. Elnaïem, S. Kamhawi, J. G. Valenzuela and C. I. Brodskyn (2008). "Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(22): 7845-7850.
- Gomes, R. B., C. Brodskyn, C. I. de Oliveira, J. Costa, J. C. Miranda, A. Caldas, J. G. Valenzuela, M. Barral-Netto and A. Barral (2002). "Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity." J Infect Dis **186**(10): 1530-1534.
- Gomez, B., E. Sanchez and M. D. Feliciangeli (1998). "Man-vector contact of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in north-central Venezuela as assessed by blood meal identification using dot-ELISA." J Am Mosq Control Assoc **14**(1): 28-32.
- Gossage, S. M., M. E. Rogers and P. A. Bates (2003). "Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle." Int J Parasitol **33**(10): 1027-1034.
- Gould, I. T., M. S. Perner, M. S. Santini, S. B. Saavedra, G. I. Bezzi, M. I. Maglianese, J. G. Antman, J. A. Gutiérrez and O. D. Salomón (2013). "Leishmaniasis visceral en la Argentina. Notificación y situación vectorial (2006-2012)." Medicina (B Aires) **73**: 104-110.
- Gouveia, C., M. D. Asensi, V. Zahner, E. F. Rangel and S. M. Oliveira (2008). "Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae)." Neotrop Entomol **37**(5): 597-601.
- Hadziavdic, K., K. Lekang, A. Lanzen, I. Jonassen, E. M. Thompson and C. Troedsson (2014). "Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers." PLoS One **9**(2): e87624.
- Hailu, A., T. Di Muccio, T. Abebe, M. Hunegnaw, P. A. Kager and M. Gramiccia (2006). "Isolation of *Leishmania tropica* from an Ethiopian cutaneous leishmaniasis patient." Trans R Soc Trop Med Hyg **100**(1): 53-58.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.
- Hamilton, J. G. (2008). "Sandfly pheromones. Their biology and potential for use in control programs." Parasite **15**(3): 252-256.
- Hamilton, J. G., R. P. Brazil and R. Maingon (2004). "A fourth chemotype of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jaibas, Minas Gerais State, Brazil." J Med Entomol **41**(6): 1021-1026.
- Hamilton, J. G., M. J. Dougherty and R. D. Ward (1994). "Sex pheromone activity in a single component of tergal gland extract of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Northeastern Brazil." J Chem Ecol **20**(1): 141-151.
- Hamilton, J. G., R. D. Maingon, B. Alexander, R. D. Ward and R. P. Brazil (2005). "Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil." Med Vet Entomol **19**(4): 480-488.
- Hamilton, J. G. C., H. C. Ibbotson, A. M. Hooper, K. Mori, J. A. Picket and S. Sano (1999). "9-Methylgermacrene-B confirmed by synthesis as the sex pheromone of the sandfly 57 *Lutzomyia longipalpis* from Lapinha, Brazil, and the absolute stereochemistry defined as 9S." Chem Commun **8**: 2335-2336.
- Handman, E. and D. V. Bullen (2002). "Interaction of *Leishmania* with the host macrophage." Trends Parasitol **18**(8): 332-334.
- Hasegawa, M., H. Kishino and T. Yano (1985). "Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA." J Mol Evol **22**(2): 160-174.
- Hilz, H., U. Wieggers and P. Adamietz (1975). "Stimulation of Proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of Nucleic Acids and the degradation of "Masked" proteins." European Journal of Biochemistry **56**: 103-108.
- Horak, E. and J. L. Cheype (2007). "*Entoloma dragonosporum* (Singer) E. Horak et E. luteosplendidum sp. nov.: Deux espèces remarquables de la Guyane française." Bulletin de la Société Mycologique de France **123**(3-4): 251-262.
- Hostomska, J., I. Rohousova, V. Volfova, D. Stanneck, N. Mencke and P. Volf (2008). "Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*." Vector Borne Zoonotic Dis **8**(4): 443-450.
- Hynes, R. K. and S. M. Boyetchko (2006). "Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations." Soil Biol Biochem **38**: 845-849.

- Jacobson, R. L. and Y. Schlein (1999). "Lectins and toxins in the plant diet of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) can kill *Leishmania major* promastigotes in the sandfly and in culture." Ann Trop Med Parasitol **93**(4): 351-356.
- Kalendar, R., D. Lee and A. H. Schulman (2011). "Java web tools for PCR, *in silico* PCR, and oligonucleotide assembly and analysis." Genomics **98**(2): 137-144.
- Kamhawi, S. (2000). "The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections." Microbes Infect **2**(14): 1765-1773.
- Kamhawi, S. (2006). "Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?" Trends Parasitol **22**(9): 439-445.
- Katzin, A. M., E. S. Kimura, C. O. Alexandre and A. M. Ramos (1991). "Detection of antigens in urine of patients with acute falciparum and vivax malaria infections." Am J Trop Med Hyg **45**(4): 453-462.
- Kelly, D. W. and C. Dye (1997). "Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*." Anim Behav **53**: 721-731.
- Kelly, D. W., Z. Mustafa and C. Dye (1997). "Differential application of lambda-cyhalothrin to control the sandfly *Lutzomyia longipalpis*." Med Vet Entomol **11**(1): 13-24.
- Killick-Kendrick, R. (1990). "Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review." Med Vet Entomol **4**(1): 1-24.
- Killick-Kendrick, R. (1999). "The biology and control of phlebotomine sand flies." Clin Dermatol **17**(3): 279-289.
- Killick-Kendrick, R., M. Killick-Kendrick, N. Quala, R. Nawi, R. Ashford and Y. Tang (1989). "Preliminary observations of a tetradonematid nematode of phlebotomine sand flies of Afghanistan." Ann. Parasitol. Hum. Comp. **64**: 332-339.
- Killick-Kendrick, R., J. A. Rioux and M. e. a. Bailly (1984). "Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes." Annales de Parasitologie Humaine et Comparée **59**: 555-572.
- Killick-Kendrick, R., T. J. Wilkes, M. Bailly, I. Bailly and L. A. Righton (1986). "Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly." Trans R Soc Trop Med Hyg **80**(1): 138-142.
- Kimura, M. (1980). "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. ." Journal of Molecular Evolution **16**: 111-120.
- Kishore, K., V. Kumar, S. Kesari, D. S. Dinesh, A. J. Kumar, P. Das and S. K. Bhattacharya (2006). "Vector control in leishmaniasis." Indian J Med Res **123**(3): 467-472.
- Klein, T. A., D. G. Young, S. R. Telford, Jr. and R. Kimsey (1987). "Experimental transmission of *Plasmodium mexicanum* by bites of infected *Lutzomyia vexator* (Diptera: Psychodidae)." J Am Mosq Control Assoc **3**(2): 154-164.
- Kuhls, K., M. Z. Alam, E. Cupolillo, G. E. Ferreira, I. L. Mauricio, R. Oddone, M. D. Feliciangeli, T. Wirth, M. A. Miles and G. Schonian (2011). "Comparative microsatellite typing of new world *leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1155.
- La Scola, B. and D. Raoult (2004). "*Acinetobacter baumannii* in human body louse." Emerg Infect Dis **10**(9): 1671-1673.
- Lainson, R., R. Killick-Kendrick, E. Canning, J. Shaw, R. Ward, A. Leaney and J. Nicholas (1977). "Microsporidia of Brazilian sandflies." Trans R Soc Trop Med Hyg **71**.
- Lainson, R. and E. F. Rangel (2005). "*Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(8): 811-827.
- Lainson, R., J. J. Shaw, L. Ryan, R. S. Ribeiro and F. T. Silveira (1985). "Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector." Trans R Soc Trop Med Hyg **79**(2): 223-226.
- Lampo, M., D. Torgerson, L. M. Marquez, M. Rinaldi, C. Z. Garcia and A. Arab (1999). "Occurrence of sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Venezuela: first evidence from reproductively isolated sympatric populations." Am J Trop Med Hyg **61**(6): 1004-1009.

- Lane, R., A. Phillips, D. H. Molyneux, G. Procter and R. D. Ward (1985). "Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone?" Ann Trop Med Parasitol **79**(2): 225-229.
- Lane, R. and R. D. Ward (1984). "The morphology and possible function of abdominal patches in males of two forms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae)." Serie Entomologie Medicale et Parasitologie **22**: 245-249.
- Lane, R. P. (1993). Sandflies (Phlebotominae). Medical Insects and Arachnids. London, Chapman & Hall.
- Lane, R. P. and S. Bernardes Dde (1990). "Histology and ultrastructure of pheromone secreting glands in males of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*." Ann Trop Med Parasitol **84**(1): 53-61.
- Lantova, L., K. Ghosh, M. Svobodova, H. R. Braig, E. Rowton, P. Weina, P. Volf and J. Votypka (2010). "The life cycle and host specificity of *Psychodiella sergenti* n. sp. and *Ps. tobbi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) in sand flies *Phlebotomus sergenti* and *Ph. tobbi* (Diptera: Psychodidae)." J. Invertebr. Pathol. **105**(2): 182-189.
- Lantova, L., M. Svobodova and P. Volf (2011). "Effects of *Psychodiella sergenti* (Apicomplexa, Eugregarinorida) on its natural host *Phlebotomus sergenti* (Diptera, Psychodidae)." J Med Entomol **48**(5): 985-990.
- Lantova, L. and P. Volf (2014). "Mosquito and sand fly gregarines of the genus *Ascogregarina* and *Psychodiella* (Apicomplexa: Eugregarinorida, Aseptatorina)--overview of their taxonomy, life cycle, host specificity and pathogenicity." Infect Genet Evol **28**: 616-627.
- Lanzaro, G. C., K. Ostrovska, M. V. Herrero, P. G. Lawyer and A. Warburg (1993). "*Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations." Am J Trop Med Hyg **48**(6): 839-847.
- Leander, B. S., R. E. Clopton and P. J. Keeling (2003). "Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**(Pt 1): 345-354.
- Leng, Y. J. (1987). "A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*." Ann Trop Med Parasitol **81**(3): 311-317.
- Levine, N. D. (1977). "Revision and checklist of the species (other than *leucodina*) of the aseptate gregarine family *Lecudinidae*." J Protozool **24**(1): 41-52.
- Lewis, D., R. Lainson and J. Shaw (1970). "Determination of parous rates in phlebotomine sandflies, with special reference to Amazon species." Bull. Ent. Res. **60**: 209-219.
- Lewis, D. J. (1982). "A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae)." Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology) **45**: 121-209.
- Lewis, D. J., D. G. Young, G. B. Fairchild and D. M. Minter (1977). "Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae)." Systematic Entomology **2**: 319-332.
- Lindh, J. M., O. Terenius and I. Faye (2005). "16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts." Appl Environ Microbiol **71**(11): 7217-7223.
- Lins, R. M., S. G. Oliveira, N. A. Souza, R. G. de Queiroz, S. C. Justiniano, R. D. Ward, C. P. Kyriacou and A. A. Peixoto (2002). "Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies." Insect Mol Biol **11**(2): 117-122.
- Lins, R. M., N. A. Souza and A. A. Peixoto (2008). "Genetic divergence between two sympatric species of the *Lutzomyia longipalpis* complex in the paralytic gene, a locus associated with insecticide resistance and lovesong production." Mem Inst Oswaldo Cruz **103**(7): 736-740.
- Luitgards-Moura, J. F., E. G. Castellon Bermudez, A. F. Rocha, P. Tsouris and M. G. Rosa-Freitas (2002). "Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazonica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(5): 737-742.
- Maia-Elkhoury, A. N., W. A. Alves, M. L. Sousa-Gomes, J. M. Sena and E. A. Luna (2008). "Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges." Cad Saude Publica **24**(12): 2941-2947.

- Maingon, R. D., R. D. Ward, J. G. Hamilton, L. G. Bauzer and A. A. Peixoto (2008). "The *Lutzomyia longipalpis* species complex: does population sub-structure matter to Leishmania transmission?" Trends Parasitol **24**(1): 12-17.
- Maingon, R. D., R. D. Ward, J. G. Hamilton, H. A. Noyes, N. Souza, S. J. Kemp and P. C. Watts (2003). "Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceara State, Brazil." Mol Ecol **12**(7): 1879-1894.
- Mangabeira, O. (1969). "Sobre a sistemática e biologia dos flebotomos do Ceará." Rev Bras Mal Doen Trop **21**: 3-26.
- Mangabeira, O. (1969). "Sobre a sistemática e biologia dos Phlebotomus do Ceará." Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais.
- Maroli, M., M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel and L. Gradoni (2013). "Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern." Med Vet Entomol **27**(2): 123-147.
- Matos, E., I. Mendonca and C. Azevedo (2006). "Vavraia lutzomyiae n. sp. (Phylum Microspora) infecting the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae, Phlebotominae), a vector of human visceral leishmaniasis." Eur J Protistol **42**(1): 21-28.
- McCarthy, C. B., L. A. Diambra and R. V. Rivera Pomar (2011). "Metagenomic analysis of taxa associated with *Lutzomyia longipalpis*, vector of visceral leishmaniasis, using an unbiased high-throughput approach." PLOS Negl. Trop. Dis. **5**(9): e1304.
- McCarthy, C. B., M. S. Santini, P. F. Pimenta and L. A. Diambra (2013). "First Comparative Transcriptomic Analysis of Wild Adult Male and Female *Lutzomyia longipalpis*, Vector of Visceral Leishmaniasis." PLoS One **8**(3): e58645.
- Molina-Cruz, A., R. J. DeJong, C. Ortega, A. Haile, E. Abban, J. Rodrigues, G. Jaramillo-Gutierrez and C. Barillas-Mury (2012). "Some strains of *Plasmodium falciparum*, a human malaria parasite, evade the complement-like system of *Anopheles gambiae* mosquitoes." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(28): E1957-1962.
- Molyneux, D. H. and R. W. Ashford (1983). The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic Animals. London, Taylor & Francis.
- Morales, M. E., C. B. Ocampo, H. Cadena, C. S. Copeland, M. Termini and D. M. Wesson (2005). "Differential identification of Ascogregarina species (Apicomplexa: Lecudinidae) in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by polymerase chain reaction." J Parasitol **91**(6): 1352-1357.
- Morrison, A. C., C. Ferro, R. Pardo, M. Torres, M. L. Wilson and R. B. Tesh (1995). "Nocturnal activity patterns of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia." J Med Entomol **32**(5): 605-617.
- Morton, I. E. and R. D. Ward (1990). "Response of female sandflies (*Lutzomyia longipalpis*) to pheromone-baited sticky traps in the laboratory." Ann Trop Med Parasitol **84**(1): 49-51.
- Mukherjee, S., M. Q. Hassan, A. Ghosh, K. N. Ghosh, A. Bhattacharya and S. Adhya (1997). "Short report: Leishmania DNA in Phlebotomus and Sergentomyia species during a kala-azar epidemic." Am J Trop Med Hyg **57**(4): 423-425.
- Munsterman, L. E., A. C. Morrison, C. Ferro, R. Pardo and M. Torres (1998). "Genetic structure of local population of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in central Colombia." J Med Entomol **35**: 82-89.
- Nieves, E. and P. F. Pimenta (2000). "Development of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae)." J Med Entomol **37**(1): 134-140.
- Noyes, H. A., B. A. Arana, M. L. Chance and R. Maingon (1997). "The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade." J Eukaryot Microbiol **44**(5): 511-517.
- Oliveira, S. M., B. A. Moraes, C. A. Goncalves, C. M. Giordano-Dias, J. M. D'Almeida, M. D. Asensi, R. P. Mello and R. P. Brazil (2000). "[Prevalence of microbiota in the digestive tract of wild females of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae)]." Rev Soc Bras Med Trop **33**(3): 319-322.
- Orlando, T. C., M. A. Rubio, N. R. Sturm, D. A. Campbell and L. M. Floeter-Winter (2002). "Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting

- Leishmania in the subgenus Leishmania (Leishmania)." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(5): 695-701.
- Ostrovskaya, K., A. Warburg and J. Montoya-Lerma (1990). "*Ascogregarina saraviae* n. sp. (Apicomplexa: Lecudinidae) in *Lutzomyia lichi* (Diptera: Psychodidae)." J. Protozool. **37**(2): 69-70.
- Paperna, I., Y. Boulard, S. H. Hering-Hagenbeck and I. Landau (2001). "Description and ultrastructure of *Leishmania zuckermani* n. sp. amastigotes detected within the erythrocytes of the South African gecko *Pachydactylus turneri* Gray, 1864." Parasite **8**(4): 349-353.
- Peixoto, A. A., C. A. Gomes, P. R. de Amoretty, R. M. Lins, A. C. Meireles-Filho, N. A. de Souza and C. P. Kyriacou (2001). "New molecular markers for phlebotomine sand flies." Int J Parasitol **31**(5-6): 635-639.
- Perira de Oliveira, S. M., B. A. de Moraes, C. A. Goncalves, C. M. Giordano-Dias, M. L. Vilela, R. P. Brazil, J. M. D'Almeida, M. D. Asensi and R. P. Mello (2001). "[Digestive tract microbiota in female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from colonies feeding on blood meal and sucrose plus blood meal]." Cad Saude Publica **17**(1): 229-232.
- Perkins, F. O., J. R. Barta, R. E. Clopton, M. A. Peirce and S. J. Upton (2000). Phylum Apicomplexa (Levine, 1970). Illustrated Guide to the Protozoa. 2nd ed. J. J. Lee, Leedale, G.F., Bradbury, P. Lawrence Kansas, Allen Press: 190-369.
- Poinar, G., C. Ferro, A. Morales and R. Tesh (1993). "*Anandarema phlebotophaga* n. gen; n.sp. (Allantonematoda: Tylenchida), a new nematode parasite of phlebotomine sand flies (Psychodidae: Diptera) with notes on experimental infections of these insects with parasitic rhabditoids." Fundam Appl Nematol **16**: 11-16.
- Posada, D. (2008). "jModelTest: phylogenetic model averaging." Mol Biol Evol **25**(7): 1253-1256.
- Posada, D. and T. R. Buckley (2004). "Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests." Syst. Biol. **53**(5): 793-808.
- Quinnell, R. J. and C. Dye (1994). "Correlates of the peridomestic abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil." Med Vet Entomol **8**(3): 219-224.
- Quintana, M. G., O. D. Salomon and M. S. De Grosso (2010). "Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a primary forest-crop interface, Salta, Argentina." J Med Entomol **47**(6): 1003-1010.
- Ramallo-Ortigao, J. M., S. Kamhawi, M. B. Joshi, D. Reynoso, P. G. Lawyer, D. M. Dwyer, D. L. Sacks and J. G. Valenzuela (2005). "Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*." Insect Mol Biol **14**(6): 703-712.
- Rangel, E. F. and M. L. Vilela (2008). "*Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil." Cad Saude Publica **24**(12): 2948-2952.
- Rani, A., A. Sharma, R. Rajagopal, T. Adak and R. K. Bhatnagar (2009). "Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector." BMC Microbiol **9**: 96.
- Reithinger, R., C. R. Davies, H. Cadena and B. Alexander (1997). "Evaluation of the fungus *Beauveria bassiana* as a potential biological control agent against phlebotomine sand flies in Colombian coffee plantations." J Invertebr Pathol **70**(2): 131-135.
- Reyes-Villanueva, F., J. J. Becnel and J. F. Butler (2003). "Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae to *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) from Florida." J Invertebr Pathol **84**(1): 47-53.
- Rioux, J. A., R. Killick-Kendrick, A. J. Leaney, D. P. Turner, M. Bailly and C. J. Young (1979). "Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France—12. Dispersion horizontale de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Espérience preliminaires." Annales de Parasitologie Humane et Comparée **54**: 673-682.
- Rogers, M. E., M. L. Chance and P. A. Bates (2002). "The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*." Parasitology **124**(Pt 5): 495-507.

- Rogers, M. E., T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. Ferguson and P. A. Bates (2004). "Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG." Nature **430**(6998): 463-467.
- Rohousova, I., J. Hostomska, M. Vlkova, T. Kobets, M. Lipoldova and P. Volf (2011). "The protective effect against Leishmania infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure." Int J Parasitol **41**(5): 481-485.
- Rohousova, I., S. Ozensoy, Y. Ozbel and P. Volf (2005). "Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies." Parasitology **130**(Pt 5): 493-499.
- Rohousova, I. and P. Volf (2006). "Sand fly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission." Folia Parasitol (Praha) **53**(3): 161-171.
- Rohousova, I., V. Volfova, S. Nova and P. Volf (2012). "Individual variability of salivary gland proteins in three Phlebotomus species." Acta Trop **122**(1): 80-86.
- Rychlik, W. (2007). "OLIGO 7 primer analysis software." Methods Mol Biol **402**: 35-60.
- Salomón, O., A. Sinagra, M. Nevot, G. Barberian, P. Paulin, J. Estevez, A. Riarte and J. Estevez (2008). "First visceral leishmaniasis focus in Argentina." Mem Inst Oswaldo Cruz **103**(1): 109-111.
- Salomon, O. D., S. A. Acardi, D. J. Liotta, M. S. Fernandez, E. Lestani, D. Lopez, A. V. Mastrangelo, M. Figueroa and G. Fattore (2009). "Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazu falls area of Argentina." Acta Trop **109**(1): 5-11.
- Salomon, O. D., A. S. Araki, J. G. Hamilton, S. A. Acardi and A. A. Peixoto (2010). "Sex pheromone and period gene characterization of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) from Posadas, Argentina." Mem. Inst. Oswaldo Cruz **105**(7): 928-930.
- Salomón, O. D., A. S. Araki, J. G. Hamilton, S. A. Acardi and A. A. Peixoto (2010). "Sex pheromone and period gene characterization of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) from Posadas, Argentina." Mem Inst Oswaldo Cruz **105**(7): 928-930.
- Salomón, O. D., M. S. Fernández, M. S. Santini, S. B. Saavedra, N. Montiel, M. Ramos, J. Rosa, E. Szelag and M. Martínez (2011). "Distribución de *Lutzomyia longipalpis* en la mesopotamia Argentina, 2010." Medicina (Buenos Aires) **71**(1): 22-26.
- Salomón, O. D. and P. W. Orellano (2005). "*Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(5): 475-476.
- Salomon, O. D., M. G. Quintana, G. Bezzi, M. L. Moran, E. Betbeder and D. V. Valdez (2010). "*Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina." Acta Trop **113**(1): 84-87.
- Salomón, O. D., L. K. Ramos, M. G. Quintana, S. A. Acardi, M. S. Santini and A. Schneider (2009). "[Distribution of vectors of visceral leishmaniasis in the Province of Corrientes, 2008]." Medicina (B Aires) **69**(6): 625-630.
- Salomón, O. D., S. Sosa Estani, G. C. Rossi and G. R. Spinelli (2001). "Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y la situación de la leishmaniasis visceral en la Argentina." Medicina (B Aires) **61**: 174-178.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
- Sanchez-Garcia, L., M. Berzunza-Cruz, I. Becker-Fauser and E. A. Rebollar-Tellez (2010). "Sand flies naturally infected by *Leishmania* (L.) mexicana in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico." Trans R Soc Trop Med Hyg **104**(6): 406-411.
- Sandoval, C. M., V. M. Angulo, R. Gutiérrez, G. Muñoz and C. Ferro (1998). "Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) posibles vectores de leishmaniasis en la ciudad de Bucaramanga, Santander, Colombia." Biomédica **18**: 161-168.
- Santini, M. S., M. S. Fernandez, A. A. Perez, A. E. Sandoval and O. D. Salomon (2012). "*Lutzomyia longipalpis* abundance in the city of Posadas, northeastern Argentina: variations at different spatial scales." Mem Inst Oswaldo Cruz **107**(6): 767-771.
- Santini, M. S., O. D. Salomón, S. A. Acardi, E. A. Sandoval and T. L. (2010). "*Lutzomyia longipalpis* behavior and control at an urban visceral leishmaniasis focus in Argentina." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **52**(4): 187-191.
- Scorza, J. V. (1985). "El papel del cafeto en la endemidad de la leishmaniasis cutánea en Venezuela." Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental **25**: 82-88.
- Scorza, J. V. and M. Carnevali (1981). Evidence for allocating *Monocystis chagasi* Adler & Mayrink, 1961 to the genus *Ascocystis* Grasse, 1953 (Gregarina: Lecudinidae).

- Parasitologic topics: a presentation volume to P. C. C. Garnham on the occasion of his 80th birthday. E. V. Canning, Society of Protozoology Special Publication: 229-231.
- Scorza, J. V. and E. Rojas (1990). "La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo." Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental **30**: 14-16.
- Schlein, Y. and R. L. Jacobson (1994). "Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of the sand flies." Am J Trop Med Hyg **50**(1): 20-27.
- Schlein, Y., R. L. Jacobson and G. C. Muller (2001). "Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **65**(4): 300-303.
- Schlein, Y., R. L. Jacobson and J. Shlomai (1991). "Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector." Proc Biol Sci **245**(1313): 121-126.
- Schlein, Y., I. Polacheck and B. Yuval (1985). "Mycoses, bacterial infections and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis." Parasitology **90** (Pt 1): 57-66.
- Secundino, N. F., M. S. Araujo, G. H. Oliveira, C. L. Massara, O. S. Carvalho, R. M. Lanfredi and P. F. Pimenta (2002). "Preliminary description of a new entomoparasitic nematode infecting *Lutzomyia longipalpis* sand fly, the vector of visceral leishmaniasis in the New World." J Invertebr Pathol **80**(1): 35-40.
- Secundino, N. F., I. Eger-Mangrich, E. M. Braga, M. M. Santoro and P. F. Pimenta (2005). "*Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition." J Med Entomol **42**(6): 928-938.
- Senghor, M. W., A. A. Niang and J. e. a. Depaquit (2011). Canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Sergentomyia* species (Diptera: Psychodidae) in Senegal: ecological, parasitological and molecular evidences. 7th International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Kuadasi.
- Service, M. (1985). Some ecological considerations basic to the biocontrol of Culicidae and other medically important insects. Integrated Mosquito Control Methodologies. M. Laird. London, Academic Press. **2**: 9-30.
- Shakarian, A. M. and D. M. Dwyer (2000). "Pathogenic leishmania secrete antigenically related chitinases which are encoded by a highly conserved gene locus." Exp Parasitol **94**(4): 238-242.
- Sharma, U. and S. Singh (2008). "Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control." J Vector Borne Dis **45**(4): 255-272.
- Shortt, H. E. and C. S. Swaminath (1927). "*Monocystis mackiei* n. sp. parasitic in *Phlebotomus argentipes*." Ann. Brun. Indian J. Med. Res. **15**: 539-553.
- Silva, M. H., M. D. Nascimento, F. S. Leonardo, J. M. Rebelo and S. R. Pereira (2011). "Genetic differentiation in natural populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) with different phenotypic spot patterns on tergites in males." Neotrop Entomol **40**(4): 501-506.
- Singh, B., A. Bobogare, J. Cox-Singh, G. Snounou, M. S. Abdullah and H. A. Rahman (1999). "A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies." Am J Trop Med Hyg **60**(4): 687-692.
- Snounou, G. and B. Singh (2002). "Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites." Methods Mol Med **72**: 189-203.
- Snounou, G., S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong and K. N. Brown (1993). "High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction." Mol Biochem Parasitol **61**(2): 315-320.
- Soares, R. P. and S. J. Turco (2003). "*Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review." An Acad Bras Cienc **75**(3): 301-330.
- Souza, N. A., F. M. Vigoder, A. S. Araki, R. D. Ward, C. P. Kyriacou and A. A. Peixoto (2004). "Analysis of the copulatory courtship songs of *Lutzomyia longipalpis* in six populations from Brazil." J Med Entomol **41**(5): 906-913.
- Spencer, J. and J. Olson (1982). "Evaluation of the combined effects of methoprene and the protozoan parasite *Ascogregarina culicis* (Eugregarinida, Diplocystidae), on *Aedes* mosquitoes." Mosq News **42**: 384-390.
- Spiegel, C. N., L. G. Batista-Pereira, J. A. Bretas, A. E. Eiras, A. M. Hooper, A. A. Peixoto and M. J. Soares (2011). "Pheromone gland development and pheromone production in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)." J Med Entomol **48**(3): 489-495.

- Spiegel, C. N., R. P. Brazil and M. J. Soares (2002). "Ultrastructure of male sex pheromone glands in abdominal tergites of five *Lutzomyia* sandfly species (Diptera: Psychodidae)." Arthropod Structure & Development **30**(3): 219-227.
- Spiegel, C. N., P. Jeanbourquin, P. M. Guerin, A. M. Hooper, S. Claude, R. Tabacchi, S. Sano and K. Mori (2005). "(1S,3S,7R)-3-methyl-alpha-himachalene from the male sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) induces neurophysiological responses and attracts both males and females." J Insect Physiol **51**(12): 1366-1375.
- Steinhaus, E. A. (1960). "The Importance of Environmental Factors in the Insect-Microbe Ecosystem." Bacteriol Rev **24**(4): 365-373.
- Sudia, W. D. and R. W. Chamberlain (1988). "Battery-operated light trap, an improved model. By W. D. Sudia and R. W. Chamberlain, 1962." J Am Mosq Control Assoc **4**(4): 536-538.
- Sulaiman, I. (1992). "Infectivity and pathogenicity of *Ascogregarina culicis* (Eugregarinida: Lecudinidae) to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)." J. Med. Entomol. **29**(1): 1-4.
- Svobodova, M., B. Alten, L. Zidkova, V. Dvorak, J. Hlavackova, J. Myskova, V. Seblova, O. E. Kasap, A. Belen, J. Votypka and P. Volf (2009). "Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*." Int J Parasitol **39**(2): 251-256.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." Mol. Biol. Evol. **28**(10): 2731-2739.
- Templeton, T. J., S. Enomoto, W. J. Chen, C. G. Huang, C. A. Lancto, M. S. Abrahamsen and G. Zhu (2010). "A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*." Mol. Biol. Evol. **27**(2): 235-248.
- Templeton, T. J., S. Enomoto, W. J. Chen, C. G. Huang, C. A. Lancto, M. S. Abrahamsen and G. Zhu (2010). "A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*." Mol Biol Evol **27**(2): 235-248.
- Teodoro, U., T. Silveira, D. Santos, E. Santos, A. Santos, O. Oliveira and J. Kühl (2001). "Frequência da fauna de flebotomíneos no domicílio e em abrigos de animais domésticos no peridomicílio, nos municípios de Cianorte e Doutor Camargo – estado do Paraná –." Brasil. Rev Patol Trop **30**: 209-233.
- Tesh, R. B., J. Boshell, G. B. Modi, A. Morales, D. G. Young, A. Corredor, C. Ferro de Carrasquilla, C. de Rodriguez, L. L. Walters and M. O. Gaitan (1987). "Natural infection of humans, animals, and phlebotomine sand flies with the Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus in Colombia." Am J Trop Med Hyg **36**(3): 653-661.
- Theodor, O. (1948). "Classification of the Old World species of the subfamily phlebotominae (Diptera, Psychodidae)." Bull Entomol Res **39**(Pt 1): 85-115.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-4680.
- Tolezano, J. E. (1994). "Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **89**(3): 427-434.
- Travassos da Rosa, A. P., R. B. Tesh, J. F. Travassos da Rosa, J. P. Herve and A. J. Main, Jr. (1984). "Carajas and Maraba viruses, two new vesiculoviruses isolated from phlebotomine sand flies in Brazil." Am J Trop Med Hyg **33**(5): 999-1006.
- Travi, B., Y. Osorio, N. Guarín and H. Cadena (1998). "*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis." Exp Parasitol **88**: 73-75.
- Tseng, M. (2004). "Sex-specific response of a mosquito to parasites and crowding." Proc. Biol. Sci. **271** Suppl 4: S186-188.
- Uribe, S. (1999). "The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission." Mem Inst Oswaldo Cruz **94**(6): 729-734.
- Vaughan, A. M., S. A. Mikolajczak, N. Camargo, V. Lakshmanan, M. Kennedy, S. E. Lindner, J. L. Miller, J. C. Hume and S. H. Kappe (2012). "A transgenic *Plasmodium falciparum* NF54 strain that expresses GFP-luciferase throughout the parasite life cycle." Mol Biochem Parasitol **186**(2): 143-147.
- Vieira, J. and G. Coelho (1998). "Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle." Rev Soc Bras Med Trop **31**(2): 85-92.

- Vilela, M. L., C. G. Azevedo, B. M. Carvalho and E. F. Rangel (2011). "Phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) and putative vectors of leishmaniasis in impacted area by hydroelectric plant, State of Tocantins, Brazil." *PLoS One* **6**(12): e27721.
- Volf, P. and V. Volfova (2011). "Establishment and maintenance of sand fly colonies." *J Vector Ecol* **36 Suppl 1**: S1-9.
- Votykka, J., L. Lantova, K. Ghosh, H. Braig and P. Volf (2009). "Molecular characterization of gregarines from sand flies (Diptera: Psychodidae) and description of *Psychodiella* n. g. (Apicomplexa: Gregarinida)." *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**(6): 583-588.
- Wahba, M. M. (2000). "The influence of *Bacillus sphaericus* on the biology and histology of *Phlebotomus papatasi*." *J Egypt Soc Parasitol* **30**(1): 315-323.
- Walsh, R. and J. Olson (1976). "Observations on the susceptibility of certain mosquito species to infection by *Lankesteria culicis* (Ross)." *Mosq News* **36**: 536-545.
- Walters, L. L., G. L. Chaplin, G. B. Modi and R. B. Tesh (1989). "Ultrastructural biology of *Leishmania* (Viannia) panamensis (=Leishmania braziliensis panamensis) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association." *Am J Trop Med Hyg* **40**(1): 19-39.
- Warburg, A. (1991). "Entomopathogens of phlebotomine sand flies: laboratory experiments and natural infections." *J Invertebr Pathol* **58**(2): 189-202.
- Warburg, A. and K. Ostrovska (1991). "Host-parasite relationships of *Ascogregarina chagasi* (Eugregarinorida, Aseptatorina, Lecudinidae) in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae)." *Int. J. Parasitol.* **21**(1): 91-98.
- Warburg, A. and P. F. Pimenta (1995). "A cytoplasmic polyhedrosis virus in the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*." *Med Vet Entomol* **9**(2): 211-213.
- Ward, R. A., N. D. Levine and G. B. Craig (1982). "*Ascogregarina* nom. nov. for *Ascocystis Grassé*, 1953 (Apicomplexa, Eugregarinorida)" *The Journal of Parasitology* **68**(2): 331.
- Ward, R. D., A. Phillips, B. Burnet and C. B. Marcondes (1988). The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. *Biosystematics of haematophagous insects*. M. W. Service, Oxford University Press: 258-269.
- Ward, R. D., A. L. Ribeiro, L. Ryan, A. L. Falcao and E. F. Rangel (1985). "The distribution of two morphological forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae)." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **80**(2): 145-148.
- Watts, P. C., J. G. Hamilton, R. D. Ward, H. A. Noyes, N. A. Souza, S. J. Kemp, M. D. Feliciangeli, R. Brazil and R. D. Maingon (2005). "Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela." *Am J Trop Med Hyg* **73**(4): 734-743.
- WHO (2002). "Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis." *Wkly Epidemiol Rec* **77**(44): 365-370.
- WHO (2010). "Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the Expert Committee on the Control of Leishmaniasis." *Technical report series, WHO (Edit.):* 949.
- Wilson, V. C. L. C. and B. A. Southgate (1979). Lizard Leishmania. *Biology of the kinetoplastida, vol. 2*. W. H. R. Lumsden, Evans, D.A. London, Academic Press: 241-268.
- Wu, W. K. and R. B. Tesh (1989). "Experimental infection of Old and New World phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) with *Ascogregarina chagasi* (Eugregarinorida: Lecudinidae)." *J Med Entomol* **26**(4): 237-242.
- Young, D. and M. Duncan (1994). "Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand-flies in Mexico, West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)." *Mem. Amer. Entomol. Inst.* **54**: 1-881.
- Young, D. G. and D. J. Lewis (1977). "Pathogens of Psychodidae (phlebotomine sand flies)." *Bull. World Health Organ.* **55 Suppl 1**: 9-17.
- Young, D. G. and P. V. Perkins (1984). "Phlebotomine sandflies of North America (Diptera: Psychodidae)." *Journal of the American Mosquito Control Association* **44**: 263-304.
- Yuval, B. and A. Warburg (1989). "Susceptibility of adult phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) to *Bacillus thuringiensis* var. israeliensis." *Ann Trop Med Parasitol* **83**(2): 195-196.
- Zayed, M. E. and A. S. Bream (2004). "Biodiversity of the microbial flora associated with two strains of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)." *Commun Agric Appl Biol Sci* **69**(3): 229-234.
- Zerpa, O., M. Ulrich, M. Benitez, C. Avila, V. Rodriguez, M. Centeno, D. Belizario, S. G. Reed and J. Convit (2002). "Epidemiological and immunological aspects of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**(8): 1079-1083.

Zhang, L. M. and Y. J. Leng (1997). "Eighty-year research of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in China (1915-1995). II. Phlebotomine vectors of leishmaniasis in China." Parasite 4(4): 299-306.

6. ABREVIATURAS Y GLOSARIO

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario

dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

M: molar

Tris: trihidroximetil aminometano

EBI: European Bioinformatics Institute

Nomenclatura de cebadores:

11F = PsyF= cebador forward 207F21 diseñado en Oligo7 para la detección de Apicomplejos: *Psychodiella chagasi*.

12R = PsyR= Cebador reverse 207R24 diseñado en Oligo7 para la detección de Apicomplejos: *Psychodiella chagasi*.

5F = Cebador 29F diseñado en Oligo 7 para la detección de *Ascogregarina taiwanensis*.

40R = cebador 501R diseñado en Oligo 7 para la detección de *Ascogregarina taiwanensis*.

41F = Cebador 26F diseñado en Oligo 7 para la detección de *Plasmodium falciparum*.

42R = Cebador 184R diseñado en Oligo 7 para la detección de *Plasmodium falciparum*.

43R = Cebador 410R diseñado en Oligo 7 para la detección de *Plasmodium falciparum*.

44F = 5Llcac, Gene *cacophony* IVS6 region in sand flies of the Neotropical genus *Lutzomyia*. Lins *et al.*, 2002. Peixoto *et al.*, 2001.

45R = 3Llcac, Gene *cacophony* IVS6 region in sand flies of the Neotropical genus *Lutzomyia*. Lins *et al.*, 2002. Peixoto *et al.*, 2001.

46F = AU: cebador universal que hibrida al DNA 18S de dos especies de *Ascogregarina (taiwanensis y culicis)*. Morales *et al.*, 2005. *forward*

47R = AT: cebador de *A. taiwanensis* que hibrida en la región ITS2. Morales *et al.*, 2005. *reverse*

48F= rPLU1, rRNA 18S, para el género *Plasmodium*. Snounou y Singh (2002).

49R = rPLU5, rRNA 18S, para el género *Plasmodium*. Snounou y Singh (2002).

50F= rFAL1, 18S rRNA de *P. falciparum*. Singh, Snounou (1999).

- 51R= rFAL2, 18S rRNA de *P. falciparum*. Singh, Snounou (1999).
- 52F= rPLU3, Para el género *Plasmodium*. Snounou y Singh (2002).
- 53R= rPLU4, Para el género *Plasmodium*. Snounou y Singh (2002).
- 54F= F-566, para rRNA eucariotas. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. Hadziavdic *et al.* (2014).
- 55R = R-1200, para rRNA eucariotas. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. Hadziavdic *et al.* (2014).
- 56R = 20R, cebador reverse específico de *Psychodiella chagasi*

GLOSARIO

Clado: agrupamiento que incluye al ancestro común y a todos los descendientes (vivos y extintos) de ese ancestro.

Expect value (E-value): parámetro que describe el número de *hits* que uno puede esperar observar por azar cuando realiza una búsqueda en una base de datos de determinado tamaño. Cuanto más cercano a cero sea, más significativo será el *hit*.

Flebótomos salvajes = flebótomos capturados a campo = muestras ambientales

Gap (espacio): una base en una secuencia y ninguna en la otra.

Hit: secuencia de la base de datos que tiene homología con la secuencia de interés (*query*).

Identidad: medida en que dos secuencias (de nucleótidos o aminoácidos) tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en un alineamiento, a menudo se expresa como un porcentaje. (según BLAST: Jan Fassler y Peter Cooper).

ITS: Internal transcribed spacer, se refiere al ADN no codificante situado entre las secuencias de la subunidad pequeña y grande del RNA ribosomal.

Mismatch (diferencia): secuencias con un nucleótido desigual.

***P. falciparum* NF54:** cepa transgénica de *P. falciparum* NF54, expresa GFP-luciferasa (Vaughan *et al.*, 2012).

***P. falciparum* S20:** cepa aislada de un paciente de Rondonia, Brasil (Katzin *et al.*, 1991).

7. ANEXO I

FIGURAS

Figura A. Características de los cebadores diseñados *PsyF* y *PsyR* según Oligo 7.

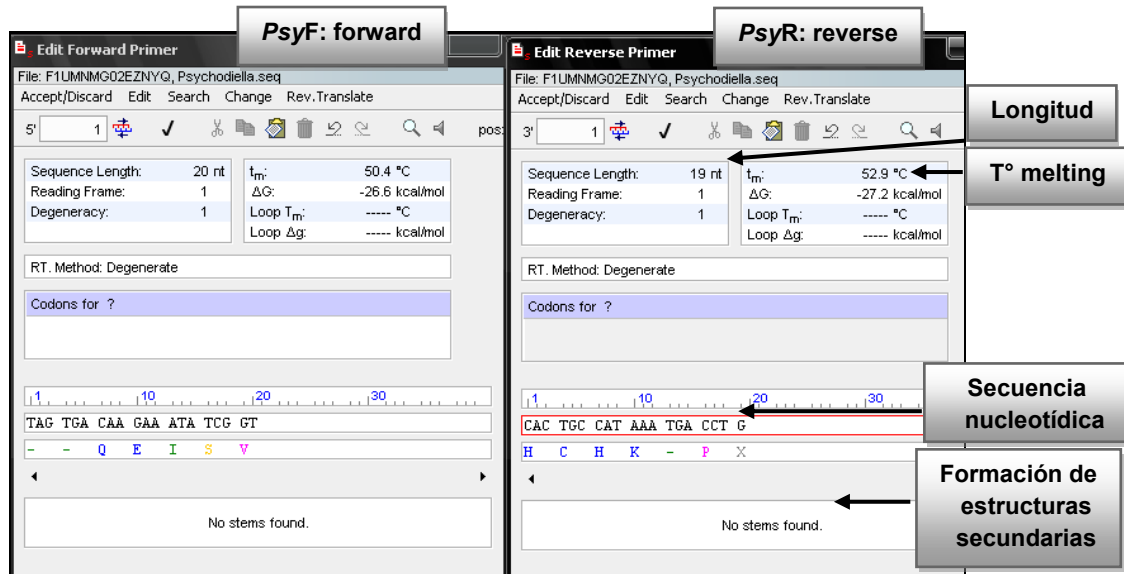
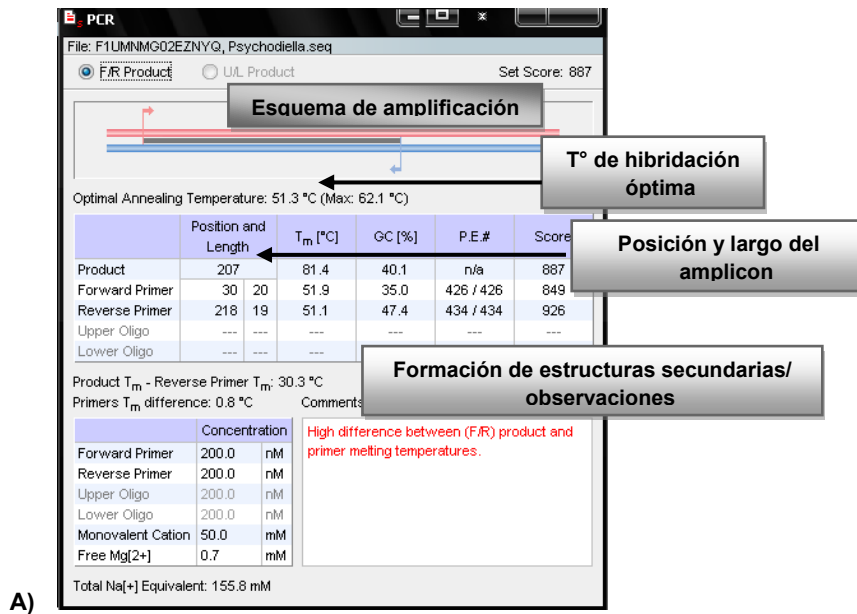


Figura B. Detalle del producto de amplificación teórico en el programa Oligo 7 usando como molde las pirosecuencias A) NYQ y B) PC4.



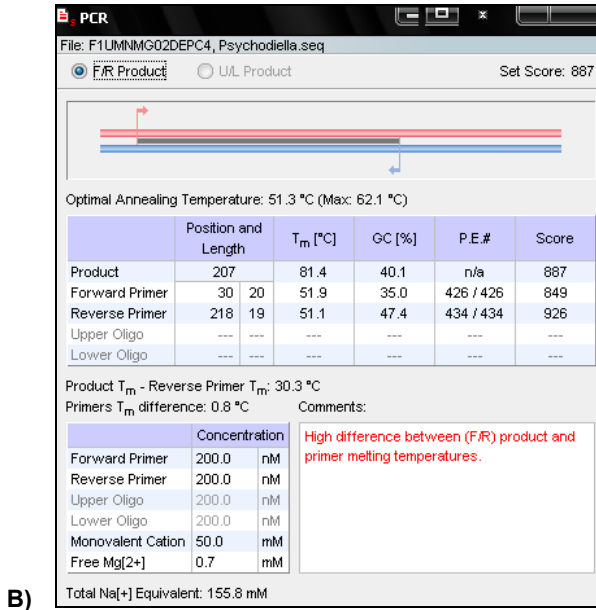


Figura C. Cromatograma obtenido del secuenciamiento de la muestra SA1 usando el cebador PsyF.

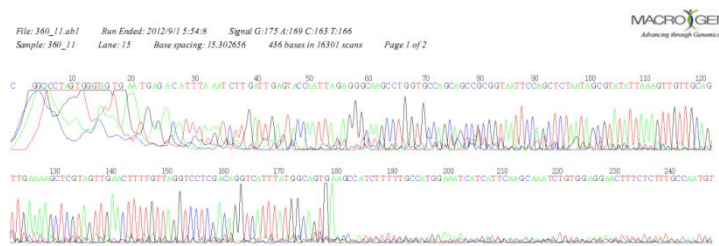


Figura D. Cromatograma resultante del re-secuenciamiento de la muestra KS2-GM.

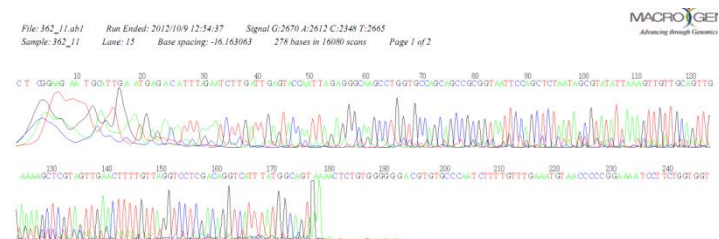


Figura E. Características del cebador 20R según Oligo 7.

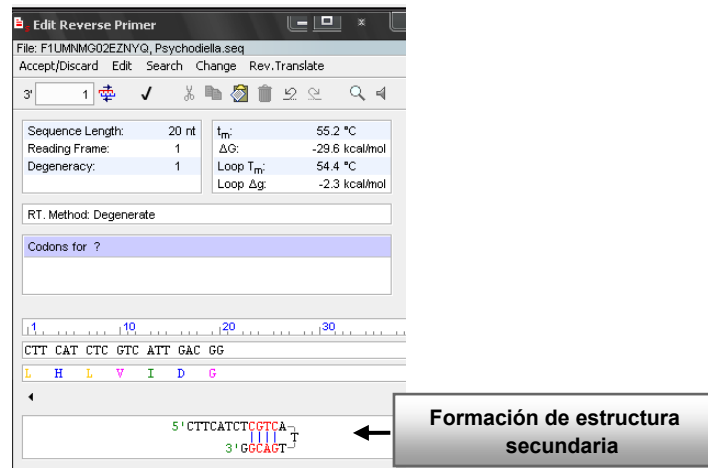


Figura F. Detalles del amplicón teórico obtenido con los cebadores *PsyF* y 20R en el programa Amplif X.

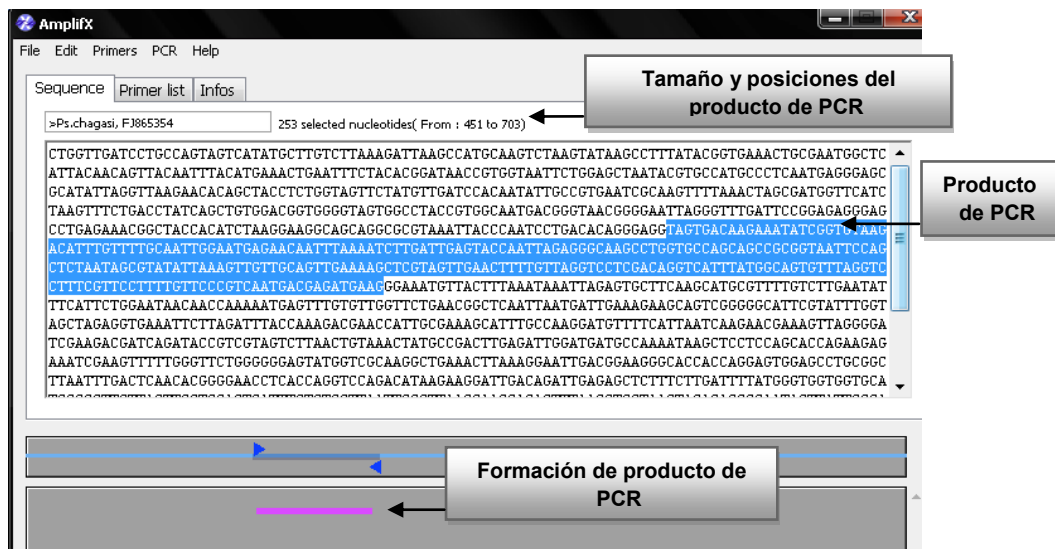


Figura G. Detalles del amplicón teórico obtenido con los cebadores *PSYF* y 20R en el programa Oligo 7.

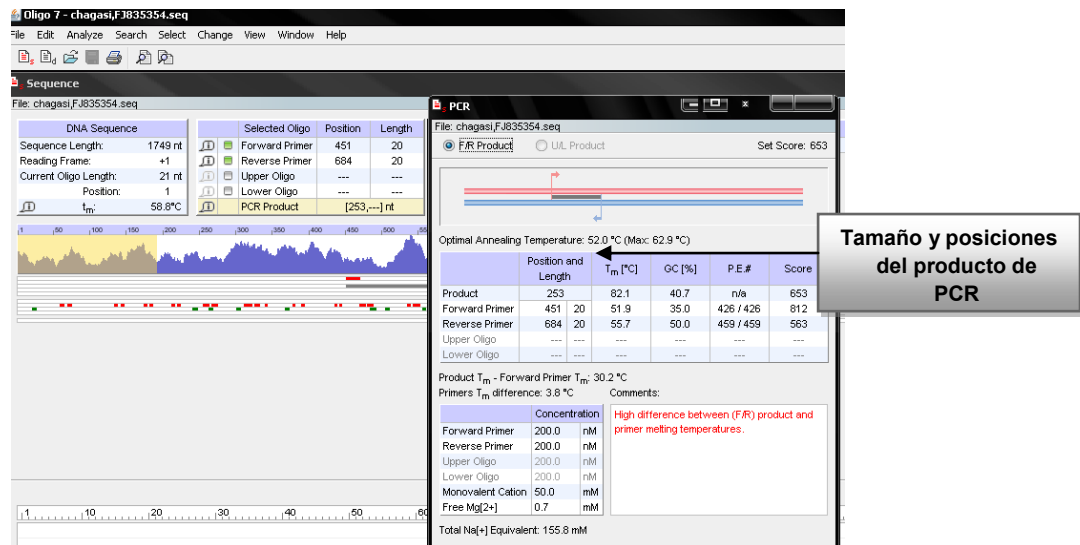


Figura H. Características de los cebadores 5F y 40R según Oligo 7.

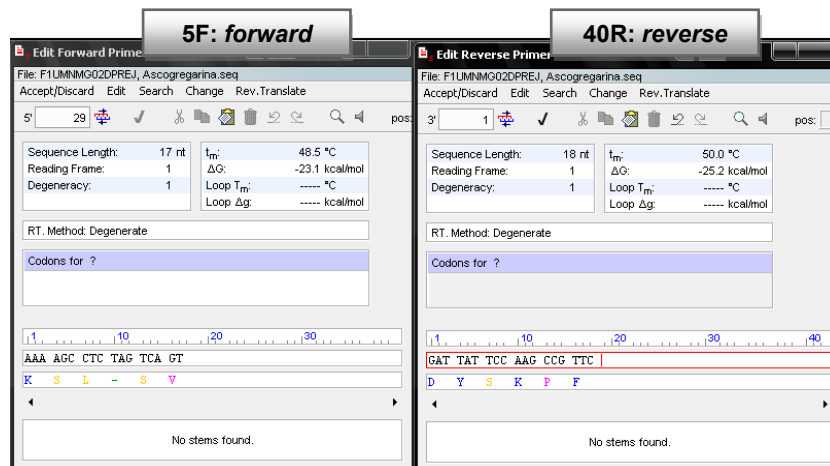


Figura I. Detalle del producto de amplificación teórico en el programa Oligo 7 usando como molde la pirosecuencia F1UMNMG02DPREJ.

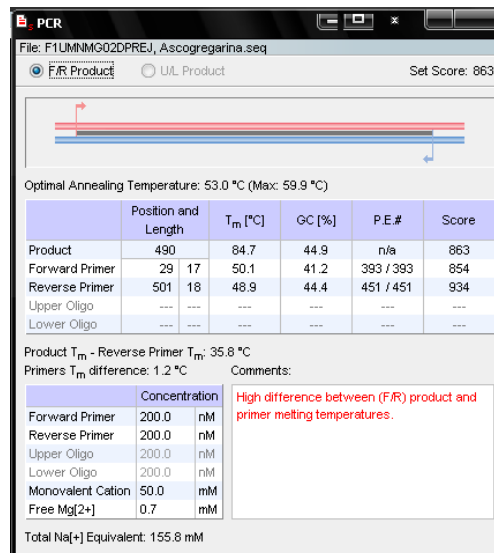


Figura J. Detalles de los cebadores obtenidos a través del programa Oligo 7.

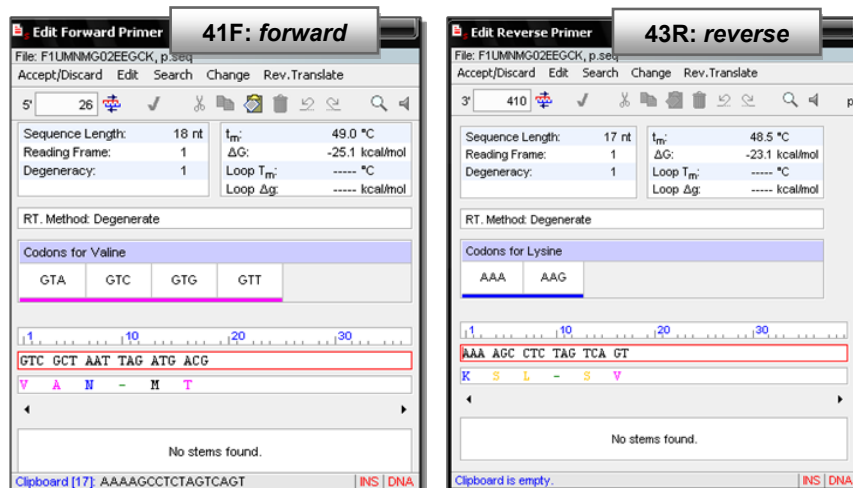


Figura K. Detalle del producto de amplificación teórico en el programa Oligo 7 con los cebadores 41F y 43R.

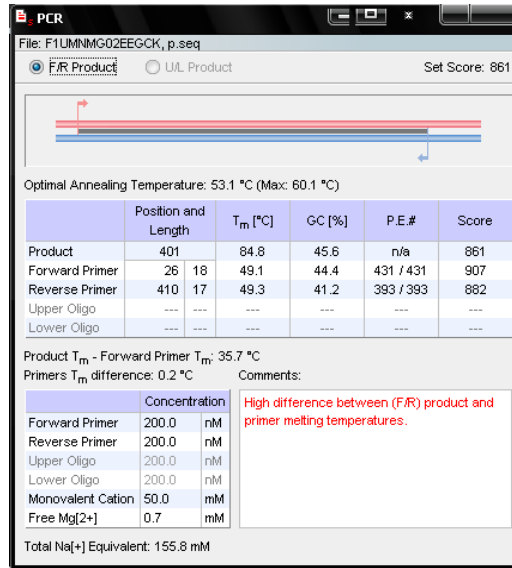
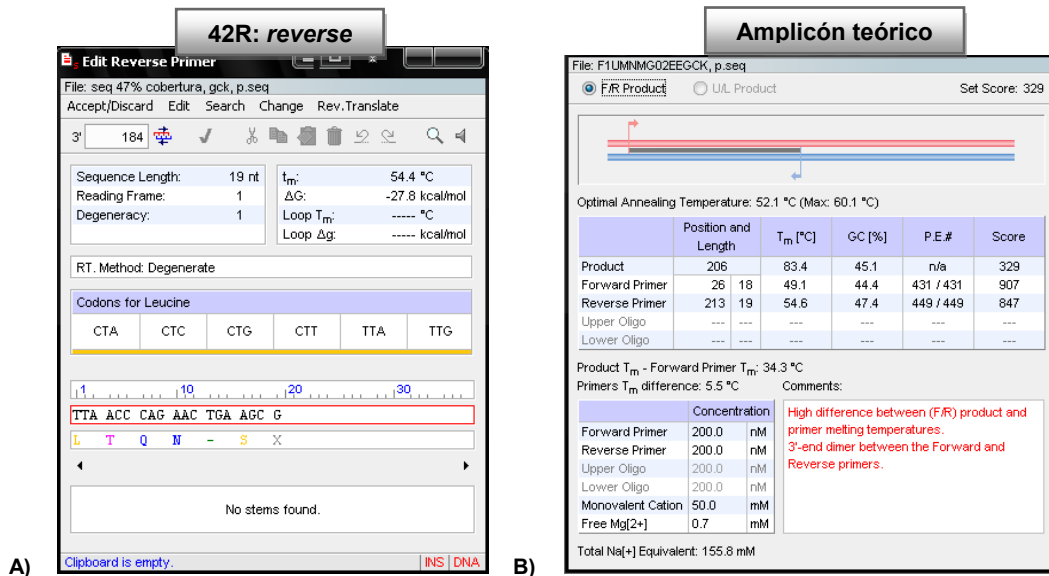


Figura L. Detalles del cebador 42R (A) y su producto teórico (B) mediante el programa Oligo 7.



TABLAS

Tabla A. Listado de los cebadores diseñados.

Ps. chagasi

Cebador	Producto teórico de PCR	Longitud (nt)
PsyF	207 pb	20
PsyR		19
20R	PsyF/20R: 253 pb	20

A. taiwanensis

5F	490 pb	17
40R		19

P. falciparum

41F	41F/42R: 200 pb	18
42R		19
43R	41F/43R: 400 pb	17

Tabla B. Cebadores de bibliografía usados como control interno de extracciones de ADN.

Nombre	Secuencia	Producto teórico de PCR	Características	Longitud (nt)
44F (5Llcac)	GTGGCCGAACATAATGTTAG	225 pb	Gen <i>cacophony</i> region IVS6 en flebótomos del género <i>Lutzomyia</i> .	20
45R (3Llcac)	CCACGAACAAGTTCAACATC			20

Tabla C. Cebadores de bibliografía usados como segundo control interno de extracciones de ADN.

Cebador	Secuencia	Producto teórico de PCR	Características	Longitud (nt)
54F (F-566)	CAGCAGCCGCGGTAATTCC	770 pb (<i>Lutzomyia</i> sp.)	regiones V4 y V5 del gen ribosomal 18S	19
55R (R-1200)	CCCGTGTTGAGTCAAATTAAGC	613 pb (<i>Psychosiella</i> sp.)		22

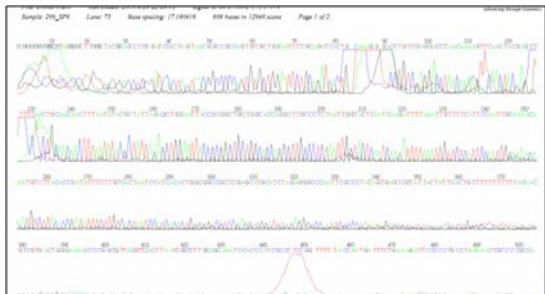
Tabla D. Listado de los cebadores de bibliografía.

Cebador	Secuencia	Producto teórico de PCR	Características	Longitud (nt)
46F (AU)	ACCGCCCGTCCGTTCAATCG	450 pb	Cebador universal que hibrida en el gen 18S de dos especies de <i>Ascogregarina</i> (<i>A. taiwanensis</i> y <i>A. culicis</i>)	20
47R (AT)	GAGAAGCCGTCGTCAATACAGC		Cebador de <i>A. taiwanensis</i> que hibrida en la región ITS2.	20
48F (rPLU1)	TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA	1,6 kb, género <i>Plasmodium</i>	18S rRNA del género <i>Plasmodium</i> .	24
49R (rPLU5)	CCTGTTGTTGCCTTAACTTC			21
50F (rFAL1)	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAAT ATATT	205 pb	18S rRNA de la especie <i>P. falciparum</i> .	30
51R (rFAL2)	ACACAATGAACTCAATCATGACTAC CCGTC			30
52F (rPLU3)	TTTTTATAAGGATAACTACGGAAAA GCTGT	235 pb	18S rRNA del género <i>Plasmodium</i> .	30
53R (rPLU4)	TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCC AATACC			30

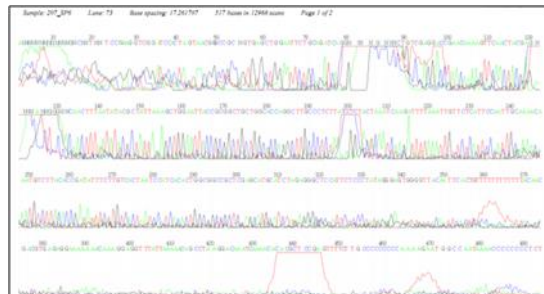
Tabla E. Resultado del secuenciamiento de 8 clones recombinantes (inserto *PsyF/PsyR*) con los cebadores universales SP6 y T7.

Cromatograma y BLASTN

Clon 50



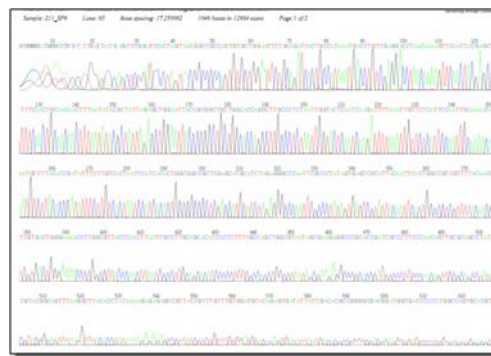
Clon 51



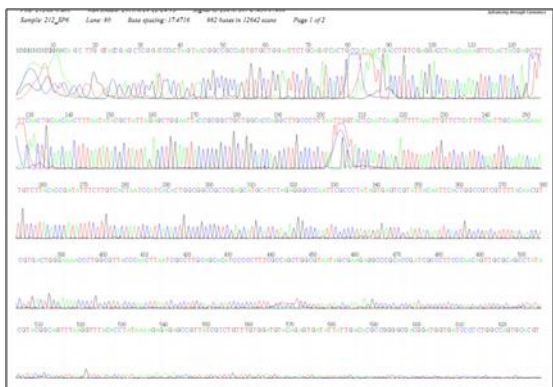
Clon 58



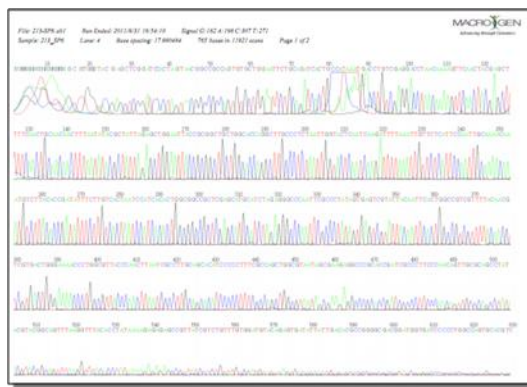
Clon 64



Clon 69



Clon 90



Clon 91

Clon 93

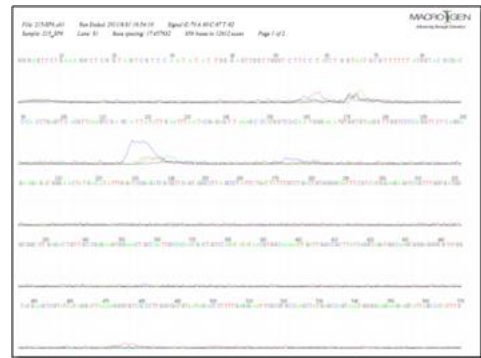
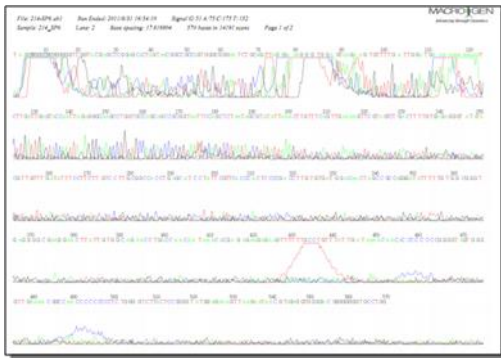
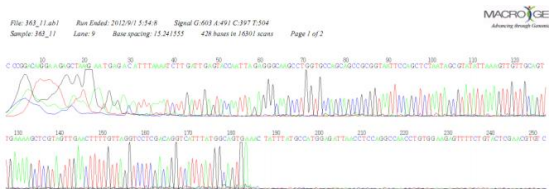


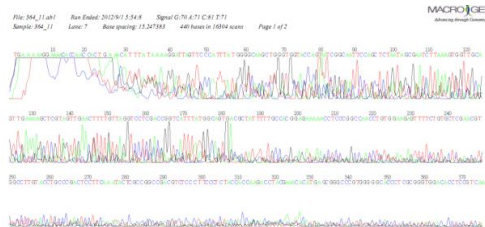
Tabla F. Cromatogramas obtenidos del secuenciamiento de las muestras CM1, KS1 y KS2 con los cebadores *PsyF* y *PsyR*.

Muestras y Cromatogramas

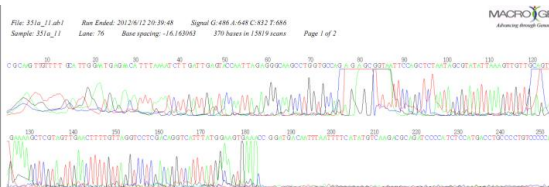
CM1-A secuenciada con *PsyF*



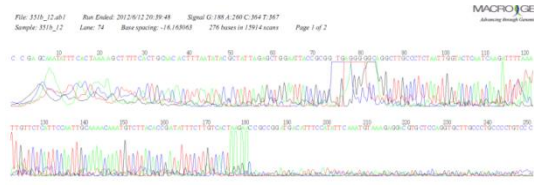
CM1-G secuenciado con *PsyF*



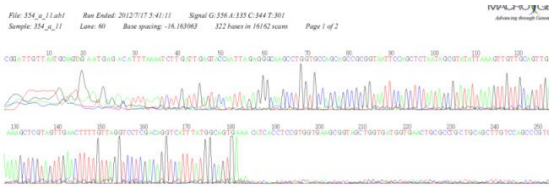
KS1-A secuenciada con *PsyF*



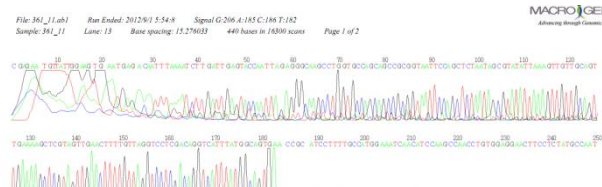
KS1-A secuenciada con *PsyR*



KS2-A secuenciada con *PsyF*



KS2-G secuenciada con *PsyF*



KS2-GM secuenciada con *PsyF*

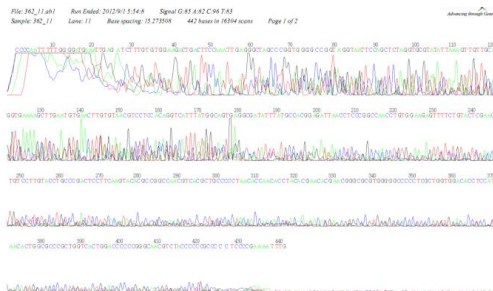
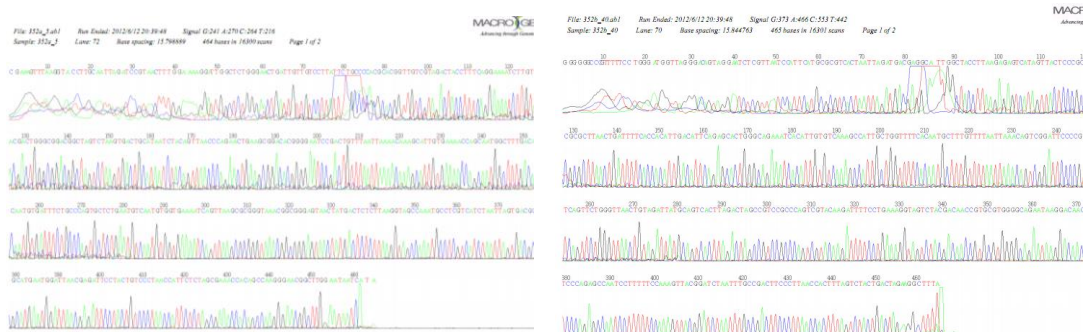


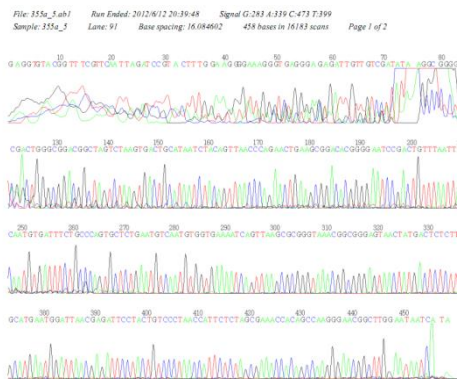
Tabla H. Cromatogramas resultantes del secuenciamiento de las muestras KS1 y KS2 con los dos cebadores, 5F y 40R.

Muestras y cromatogramas

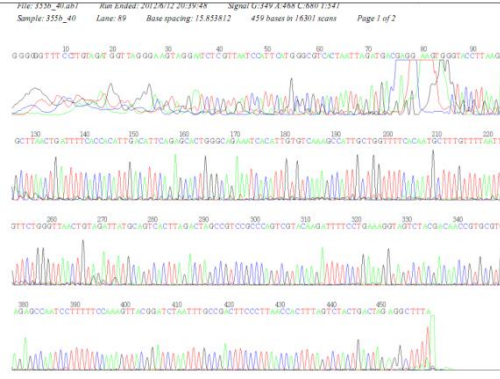


Muestra KS1 secuenciada con cebador 5F

Muestra KS1 secuenciada con cebador 40R



Muestra KS2 secuenciada con cebador 5F



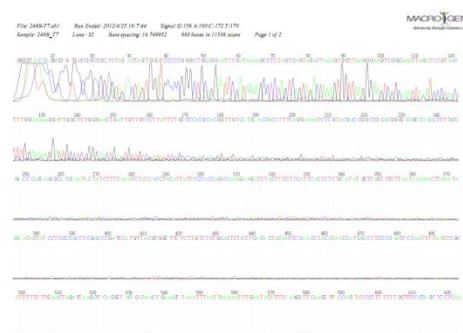
Muestra KS2 secuenciada con cebador 40R

Tabla I. Cromatogramas obtenidos del secuenciamiento de los clones 203, 209 y 210 (inserto 41F/43R) con los cebadores universales T3 y T7.

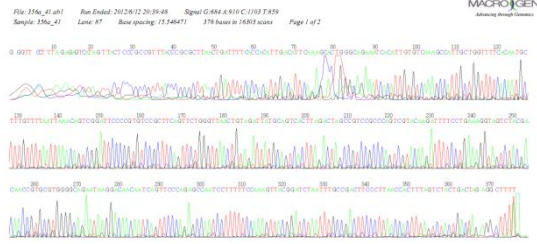
Muestra y Cromatograma



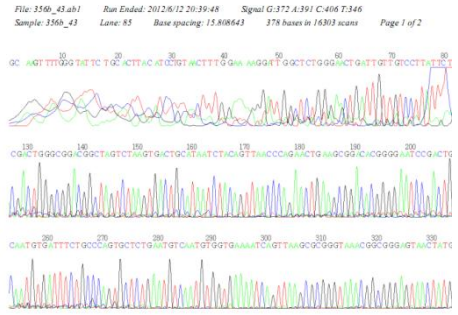
203, secuenciado con cebador T3



203, secuenciado con cebador T7



KS2 secuenciada con cebador 41F



KS2 secuenciada con cebador 43R

MATERIAL COMPLEMENTARIO

Tabla A. Detalle de las muestras analizadas de *Lu. longipalpis* de Posadas (Argentina) diferenciadas por sexo y técnica aplicada.

Argentina: Especímenes capturados a campo					
	Especie	Sexo	Procesadas		Microscopio óptico
			Total	Detalle de las muestras	
Extracciones individuales	<i>Lu. longipalpis</i>	Macho	44	1 A; 2 A; 4 A; 5 A; 6 A; 7 A; 8 A; 9 A; 10 A; 11 A; 12 A; 13 A; 14 A; 15 A; 16 A; 17 A; 18 A; 21 A; 22 A; 23 A; 24 A; 25 A; 26 A; 27 A; 28 A; 29 A; 30 A; 32 A; 33 A; 34 A; 35 A; 36 A; 40 A; 42 A; 45 A; 46 A; 47 A; 49 A; 51 A; 56 A; 59 A; 119 A; 146 A; 213 A.	336
		Macho	10	KS2; O.N30; KS2; O.N2; KS2; O.N3; KS2; O.N4; KS2; O.N8; KS2; S.O.N30; KS2; S.O.N2; KS2; S.O.N3; KS2; S.O.N4; KS2; S.O.N8	0
		Hembra	1	1SA	49
Extracciones grupales		Macho	45	KS2; A, KS2; G, KS2; GM, KS2.10, KS2.5	0
		Hembra	65	CM1; A, CM1; G, KS1; A, CM1.10, KS1.10, SA1, CM1.5, KS1.5	5

Tabla B. Detalle de las muestras analizadas de flebótomos capturados en Brasil, diferenciadas por sexo, especie y procedencia.

Brasil: Especímenes capturados a Campo					
Especie	Sexo	Procesadas		Microscopio óptico	Lugar
		Total	Detalle de las muestras		
<i>Lu. intermedia</i>	Macho	14	2; 3; 4; 5; 19; 20; 62; 63; 110; 111; 112; 113; 114; 115	19	Corte de Pedra, Bahía
	Hembra	10	21; 22; 59; 60; 61; 64; 65; 116; 117; 118	10	
<i>Lu. migonei</i>	Macho	4	8; 9; 33; 34	14	Ceará
	Hembra	2	23; 24	10	
<i>Lu. umbratilis</i>	Macho	12	10; 11; 71; 72; 73; 74; 98; 99; 100; 101; 102; 103	13	Presidente Figueiredo, Amazonas
	Hembra	10	25; 26; 67; 68; 69; 70; 94; 95; 96; 97	10	
<i>Lu. renei</i>	Macho	4	17; 18; 57; 58	10	Lapinha, Minas Gerais
	Hembra	11	16; 52; 53; 54; 55; 104; 105; 106; 107; 108; 109	14	
<i>Lu. longipalpis</i>	Macho	4	6; 7; 31; 93	12	Cavunge, Bahía
	Hembra	11	27; 28; 29; 30; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92	11	
	Macho	4	12; 13; 35; 36	13	Jacobina, Bahía
	Hembra	7	37; 48; 49; 50; 78; 81; 85	8	
	Macho	4	14; 15; 44; 45	10	Lapinha, Minas Gerais
	Hembra	7	39; 40; 41; 42; 75; 76; 77	10	

Tabla C. Detalle de las muestras analizadas correspondientes a flebotomos de laboratorio provenientes de República Checa, diferenciadas por sexo, especie y técnica aplicada.

República Checa: Especímenes de Laboratorio				
Especie	Sexo	Procesadas		Microscopio óptico
		Total	Detalle de las muestras	
<i>Lu. longipalpis</i>	Macho	2	37; 38	15
	Hembra	2	43; 44	15
<i>Ph. sergenti</i>	Macho	2	5; 8	14
	Hembra	2	11; 19	12

Tabla D. Detalle de los ejemplares de *Lu. longipalpis* capturados en Posadas (Argentina) que fueron analizados por ambos métodos (microscopía y ensayo diagnóstico).

Designación de la muestra	Sexo	Microscopio	Control interno: PCR 44F-45R o PCR 54F-55R	PCR <i>PsyF</i> - <i>PsyR</i> o PCR <i>PsyF</i> -20R
1SA	Hembra	Ooquiste	✓	✓
1A	macho		✓	X
2A	macho		✓	✓
4A	macho		X	X
5A	macho		✓	X
6A	macho		✓	X
7A	macho		✓	X
8A	macho		✓	X
9A	macho		✓	X
10A	macho	Gamonte	X	✓
11A	macho		✓	X
12A	macho		X	X
13A	macho	Gamonte/ Ooquiste	✓	✓
14A	macho		✓	X
15A	macho		X	✓
16A	macho		✓	X
17A	macho		✓	X
18A	macho		✓	X

21A	macho		✓	X
22A	macho		X	X
23A	macho		✓	X
24A	macho		✓	X
25A	macho		X	X
26A	macho		✓	X
27A	macho		✓	X
28A	macho		✓	X
29A	macho		✓	X
30A	macho		✓	X
32A	macho		✓	X
33A	macho		✓	X
34A	macho		✓	X
35A	macho		✓	X
36A	macho		✓	X
40A	macho		✓	X
42A	macho		✓	X
45A	macho		✓	X
46A	macho		✓	X
47A	macho		✓	X
49A	macho		✓	X
51A	macho		✓	X
56A	macho		✓	X
59A	macho	Gamonte	X	✓
119A	macho		✓	X
146 A	macho		✓	X
213A	macho	Gamonte	✓	✓

Tabla E. Detalle de los ejemplares de *Lu. longipalpis* capturados en Brasil que fueron analizados por ambos métodos (microscopía y ensayo diagnóstico).

Designación de la muestra	Sexo	Lugar de captura	Microscopio	Control interno: PCR 44F-45R o PCR 54F-55R	PCR <i>PsyF-PsyR</i> o PCR <i>PsyF-20R</i>
6B	macho	Cavunge, Brasil		✓	X
7B	macho	Cavunge, Brasil		✓	X
12B	macho	Jacobina, Brasil		✓	X
13B	macho	Jacobina, Brasil		✓	X
14B	macho	Lapinha, Brasil		✓	X
15B	macho	Lapinha, Brasil		✓	X
27B	hembra	Cavunge, Brasil		✓	X
28B	hembra	Cavunge, Brasil		✓	X
29B	hembra	Cavunge, Brasil		✓	X
30B	hembra	Cavunge, Brasil		✓	X
31B	macho	Cavunge, Brasil		✓	X
35B	macho	Jacobina, Brasil		✓	X
36B	macho	Jacobina, Brasil		✓	X
37B	hembra	Jacobina, Brasil		X	X
39B	hembra	Lapinha, Brasil		✓	X
40B	hembra	Lapinha, Brasil		✓	X
41B	hembra	Lapinha, Brasil		✓	X
42B	hembra	Lapinha, Brasil		X	X
44B	macho	Lapinha, Brasil		✓	✓
45B	macho	Lapinha, Brasil		✓	X
48B	hembra	Jacobina, Brasil		✓	X
49B	hembra	Jacobina, Brasil		✓	X
50B	hembra	Jacobina, Brasil		✓	X
75B	hembra	Lapinha, Brasil		✓	X
76B	hembra	Lapinha, Brasil		✓	X
77B	hembra	Lapinha, Brasil		✓	X
78B	hembra	Jacobina, Brasil		✓	X
81B	hembra	Jacobina, Brasil		✓	X
85B	hembra	Jacobina, Brasil		✓	X

86B	hembra	Cavunge, Brasil
87B	hembra	Cavunge, Brasil
88B	hembra	Cavunge, Brasil
89B	hembra	Cavunge, Brasil
90B	hembra	Cavunge, Brasil
91B	hembra	Cavunge, Brasil
92B	hembra	Cavunge, Brasil
93B	macho	Cavunge, Brasil

✓	X
✓	X
✓	X
✓	X
✓	X
✓	X
✓	X
✓	X