



UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POST GRADO
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**Identificación de proteínas de *Dermatobia hominis* con potencial
inmunogénico para la formulación de una vacuna experimental**

GILBERTO ANTONIO ESKILDSEN TUÑON

Asesor: Mgtr. Argentina Ying

Co-asesor: Dr. Antonio Osuna

Trabajo de Investigación para optar
por el título de Master en Biotecnología.

Panamá. 2012

ST

19 AUG 2014

APROBACION

Presidente del Jurado: Mgtr. Argentina Ying

Jurado: Dr. Azael Saldaña

Jurado: Dr. Antonio Osuna

Dr. Tomás A. Diez
Coordinador del Programa de Maestría

Ob.

DEDICATORIA

Dedico la culminación de este trabajo de maestría a DIOS por haberme dado la vida, inteligencia, sabiduría y oportunidad de llegar a ser un profesional.

A mi madre María Iluminada Tuñón que gracias a su inmenso amor y sacrificio me lleno siempre de fe y confianza para hacer realidad mis sueños.

A mis otras tres madres: mi abuela Eva María Chacón de Tuñón por regalarme la oportunidad de compartir a su lado toda su sabiduría y experiencia, a mi tías: Jilma Tuñón y Lilia Núñez que siempre estuvieron en los momentos oportunos para aconsejarme.

A mi esposa Persis Baloyes por su amor, sacrificio y paciencia, quien muchas veces cuidó de nuestros hijos sola, para que yo alcanzara las metas propuestas.

Por último y no menos importantes a mi razón de vida, a mis dos amores, mis hijos: Marie Claire Eskildsen Baloyes y Gian Luccas Eskildsen Baloyes, fueron y son en los momentos más difíciles el cargador de mis baterías, la paz después de la tormenta.

AGRADECIMIENTO

Deseo manifestar un reconocimiento público al Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá (MIDA) en especial al Ingeniero Nodier Villamonte, coordinador del Programa para el Control del Tórsalo en Chiriquí, sin el y todo su apoyo logístico este trabajo no fuera posible.

A la Profesora Argentina Ying. Por su tutoría en este trabajo y por la confianza depositada en mí con la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación.

Al Dr. Antonio Osuna, a Gloria González y a todo el grupo de Parasitología del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, por su tutoría en este trabajo de tesis.

A la Dra. Evelia Quiroz, Dra. Nora, a las profesoras Indira, Alexa y Dayra, a Gaspar y el resto del personal docente y administrativo del Departamento de Microbiología Humana que me apoyaron en el desarrollo de este trabajo.

A los profesores de la Facultad de Medicina y del Programa de Maestría en Biotecnología, por contribuir en mi formación y brindarme las herramientas necesarias para hacer frente a los retos presentados. A la Vicerrectoría de Investigación y Post Grado de la Universidad de Panamá y en especial al Dr. Juan Antonio Gómez por todo su apoyo.

INDICE GENERAL

Capítulo I.	Resumen	1
	Resumen en inglés	2
Capítulo II.	Introducción	3
Capítulo III.	Fundamentación Teórica	5
	3.1 Miasis causada por <i>Dermatobia hominis</i>	5
	3.2 Biología de la <i>Dermatobia hominis</i>.	8
	3.3 Epidemiología del Tórsalo	13
	3.4 El Ganado Bovino	15
	3.5 Tórsalo en Humanos	17
	3.6 Tratamiento del Tórsalo	19
	3.7 Impacto Económico	21
	3.8. Estudios Previos	25
Capítulo IV.	Metodología	27
	4.1 Colecta de Especímenes	27
	4.2 Obtención de L1 en el Laboratorio	28
	4.3 Liofilización de Larvas	31
	4.4 Preparación de Homogenado Proteico	31
	4.5 Electroforesis en gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	32
	4.6 Tinción de Azul de Coomassie	33

	4.7	Inmunoblot	34
	4.8	Interpretación del Inmunoblot	36
	4.9	Espectrometría de Masas (MS)	37
	4.10	Análisis Bioinformático	37
	4.10.1	Alineamiento Múltiple	38
	4.10.2	Selección de Epítopes Antigénicos	39
	4.11	Síntesis de Péptidos Sintéticos	40
	4.12	Dot Blot	40
Capítulo V		Resultados	43
	5.1	Resultados Obtenidos de las Giras de Campo	43
	5.2	Cría de <i>Dermatobia hominis</i>	49
	5.3	Análisis de proteínas	51
	5.4	Primer Análisis por Espectrofotometría de Masas (MS)	56
	5.5	Análisis Bioinformático. Homología	56
	5.6	Segundo Análisis por Espectrofotometría de Masas.	59
	5.7	Producto del Análisis Bioinformático. Regiones Antigénicas.	63
	5.8	Dot Blot	64
Capítulo VI		Discusión	65
Capítulo VII		Conclusiones	70
Capítulo VIII		Recomendaciones	72
Capítulo IX		Referencias Bibliográficas	73

Capitulo X	Anexos	79
	10.1 Tinción con Nitrato de Plata	79
	10.2 Preparación de Gel de Poliacrilamida	79
	10.3 Preparación de Bufer de Muestra	80
	10.4 Soluciones. Tensión de Azul de Coomassie	80
	10.5 Bufer de Corrida	80
	10.6 Extracción de ADN	81
	10.7 Extracción de ARN Total	84
	10.8 Aislamiento de mRNA Poly A a Partir de RNA total	87

INDICE DE CUADROS

Cuadro I.	Principales Agentes Etiológicos de Miasis.	6
Cuadro II.	Familias de artrópodos que poseen especies vectores de la <i>Dermatobia hominis</i> .	10
Cuadro III.	Patogénesis de la Miasis.	12
Cuadro IV.	Resultados Obtenidos en las Giras de Campo	45
Cuadro V.	Proteínas Identificadas por el Mascot.	57
Cuadro VI	Análisis del Clustal Tres Formas de ARK.	59
Cuadro VII	Análisis del Clustal de las Cuatro Formas de ARK.	61
Cuadro VIII	Análisis del Clustal del Creatina del <i>Bos taurus</i> (gi: 60097925) vs Arginina quinasa (gi: 328679756).	63
Cuadro IX	Secuencias Peptídicas Seleccionadas	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Adulto de <i>Dermatobia hominis</i> .	7
Figura 2.	Transportador forético con huevos adheridos de <i>Dermatobia hominis</i>	9
Figura 3.	<i>Dermatobia hominis</i> . Ciclo de vida	11
Figura 4	Distribución de <i>Dermatobia hominis</i>	14
Figura 5.	Raza Holstein	15
Figura 6.	Raza Cebú	16
Figura 7.	Miasis por <i>Dermatobia hominis</i> en el cuero cabelludo	18
Figura 8.	Causas de Perdida por <i>Dermatobia hominis</i> en América Central	22
Figura 9.	Ubicación geográfica de las giras de colecta	44
Figura 10.a	Bovino blanco de la raza cebú infestado con <i>Dermatobia hominis</i>	45
Figura 10.b	Bovino de color pardo infestado con <i>Dermatobia hominis</i>	46
Figura 10.c	Bovinos de color blanco y marrón infestados con <i>Dermatobia hominis</i>	46
Figura 10.d	Bovino color negro con infestación en el área lateral derecha	47
Figura 11. a	Nódulo con larvas de <i>Dermatobia hominis</i>	48
Figura 11b.	Nódulo con larvas de <i>Dermatobia hominis</i> infectados	48
Figura 12	Ejemplares adultos de <i>Dermatobia hominis</i>	49
Figura 13	Transportadores foréticos con huevos de <i>Dermatobia hominis</i>	50
Figura 14	Larva infectante de primer estadio emergiendo de un grupo de huevos	50
Figura 15	Larvas liofilizadas de <i>Dermatobia hominis</i>	51

Figura 16	Gel Teñido con Nitrato de Plata	52
Figura 17	Electroforesis de homogenado teñido con Azul de Coomassie	52
Figura 18	Western blot de las proteínas de <i>Dermatobia hominis</i> .	54
Figura 19	SDS-PAGE 12% de homogenado de Larvas L2 y L3.	55
Figura 20	Espectros obtenidos por el Maldi TofTof	58
Figura 22	Alineamiento múltiple de secuencias de las tres formas de ArK	58
Figura 23	Alineamiento múltiple de secuencias de las cuatro formas de ArK	60
Figura 24	Alineamiento múltiple de la creatina quinasa del <i>Bos taurus</i> vs arginina quinasa.	62
Figura 25	Dot Blot	64

I. RESUMEN

En Panamá, la miasis causada por *Dermatobia hominis* (tórsalo) es la principal causa de pérdida en la producción ganadera por 14 millones de dólares por año (Barsallo et al., 2005); en Brasil las pérdidas se han estimado por el orden de los 250 millones de dólares anuales (Grisi et al., 2002). Los casos humanos en Panamá no son de registro obligatorio, pero se han reportado en todas las provincias. *D. hominis* ya ha presentado indicios de resistencia a la ivermectina, principal fármaco utilizado para el control de esta miasis, utilizándose en concentraciones mayores, lo que contamina las carnes y leche dentro del periodo de tratamiento del animal. El análisis integral de esta problemática plantea la necesidad de buscar nuevas estrategias de manejo para el control del tórsalo. En ese sentido durante esta investigación se identificó secuencias peptídicas con características antigénicas para ser probados como una posible estrategia inmunológica para el control del tórsalo, que nos permita en el futuro ayudar a minimizar el impacto económico de este parásito en la región. Con este objetivo se realizaron giras de colecta de sueros de bovinos infestados y larvas de diferentes estadios a partir de las cuales se estableció una colonia de *D. hominis* bajo condiciones controladas de laboratorio, se prepararon homogenados celulares a partir de las larvas. La búsqueda de proteínas inmunogénicas en los homogenados se realizó mediante estudios electroforéticos (SDS-PAGE), western blot, que posteriormente se identificaron mediante análisis de huella peptídica por espectrometría de masas (MS) utilizando el software MASCOT. De los resultados obtenidos por el MS, 16 secuencias pépticas fueron identificadas correspondientes a la proteína arginina quinasa, obteniéndose una cobertura del 57 %, dicha proteína ha sido descrita en otros trabajos como potencial blanco terapéutico o para el desarrollo de vacunas. Mediante el análisis de epítopes antigénicos se identificó un péptido de 13 aminoácidos que fue reconocido por el suero de bovinos infectados (dot blot), resultados que nos permiten sugerir la realización una segunda fase de inmunización con el objetivo de demostrar experimentalmente la eficacia del mismo como una posible estrategia inmunológica para el control del tórsalo.

I. SUMMARY

In Panama, myiasis caused by *Dermatobia hominis (torsalo)* is the leading cause of loss in livestock production nearby 14 million per year (Barsallo et al., 2005). In Brazil the losses have been estimated in the order of \$ 250 million annually (Grisi et al., 2002). Human cases in Panama are not notifiable, but have been reported in all provinces. *D. hominis* has already presented evidence of resistance to ivermectin, the main drug used to control this myiasis, if used in high concentrations, may contaminates the meat and milk within the treatment period of the animal. The comprehensive analysis of this problem raises the need for new management strategies to control this parasite. In that sense during our research we identified a peptide sequences with antigenic to be tested as a possible immunological strategy to control this myiasis. This allow us in the future to help minimize the economic impact of this parasite in the region. To achieve these objectives we collected sera from infected bovines and different larval stages and we established a colony of *D. hominis* under controlled laboratory conditions, and the cell homogenates were prepared from larvae. The search for immunogenic proteins in the homogenates was performed using electrophoretic studies (SDS-PAGE), Western blotting, which was subsequently identified using peptide mass fingerprint analysis by mass spectrometry (MS) using the MASCOT software. From the results obtained by the MS, 16 Peptic sequences corresponding to arginine kinase protein were identified, obtaining a coverage of 57%, this protein has been described in other papers or as potential therapeutic target for vaccine development. By analysis of antigenic epitopes identified a 13 amino acid peptide that was recognized by sera from infected cattle (dot blot), results that allow us to suggest conducting a second phase of immunization in order to demonstrate experimentally the effectiveness thereof as a possible immunological strategy for controlling torsalo.

II. INTRODUCCION

Dermatobia hominis (Linnaeus, 1781), es una mosca biontófaga causante de miasis obligatoria, que presenta una distribución geográfica en las zonas cálidas y húmedas del sur de México, Centro y Sur América cuya afección tiene impacto principalmente en la actividad ganadera de la región. La hembra adulta no se alimenta, pega sus huevos usualmente en el abdomen de insectos que previamente captura. El insecto que sirve de transportador forético, deposita las larvas de primer estadio en la piel expuesta del huésped, la que penetra activamente permaneciendo en ella de uno a dos meses hasta convertirse en larva de tercer estadio que cae al suelo para pupar.

La causa principal de pérdida en la producción ganadera en Panamá, es atribuida a la miasis causada por *Dermatobia hominis*. De acuerdo a Barsallo et al, (2005) en Panamá, el costo que genera el control del tórsalo en la producción de carne vacuna es de B/5, 474,399.26, desglosados de la siguiente forma: B/. 3, 855,582.00 en aplicación de ivermectina, B/. 912,580.00 en aspersion de otros químicos y B/. 706,237.26 de pérdida por merma. En tanto que en la producción de leche el gasto asciende a B/. 2, 348,087.08 y las pérdidas ocasionadas por pérdida del cuero no apto para exportación se estiman en B/. 5, 578,048.58. Todos estos rubros suman B/. 13, 400,534.92.

El impacto económico en América Central no está documentado, sin embargo, en Brasil se ha estimado por el orden de los 250 millones de dólares por año (Grisi et al 2002). Se estima que 20 a 40 nódulos pueden causar una merma de hasta 12% del peso vivo del

animal y en vacas lecheras una disminución de un 20% de la producción láctea. Se observó que 65% de los cueros revisados en varios mataderos estaban tan afectados por nódulos, que resultaron inutilizados para su venta a empresas curtidoras (Jiménez, 2000). En un estudio realizado en Brasil (Oliveira, 1996) se afirma que el 89% de las pieles examinadas en la región de San Carlos estado de Sao Paulo, Brasil; poseían perforaciones causadas por tórsalo.

El efecto que tiene la miasis sobre la fauna silvestre y en los humanos está poco documentado, no obstante a pesar del subregistro de las miasis humanas son cada vez más frecuentes los reportes de tórsalo en personas que hacen turismo ecológico en Centro y Sur América. Estos turistas desarrollan la miasis cuando retornan a sus países con poca expectativa de diagnóstico acertado y es común el manejo médico inadecuado de la afección. En Panamá en lo referente al factor social, el tórsalo afecta mayormente a los pequeños productores, a los indígenas y a la industria nacional del cuero, de hecho los casos humanos se han descrito en todas las provincias (Molano y Ying, 2005).

Con este estudio proponemos iniciar la utilización de nuevas alternativas de control del tórsalo, fundamentadas en la búsqueda de potenciales antígenos para la implementación de nuevas estrategias que permitan el control de esta miasis, con miras a disminuir las pérdidas económicas al reducir el uso de agentes químicos que contaminan el ambiente, y futuros casos de resistencia a estos químicos, además de minimizar la contaminación de las carnes, grasas o sus derivados y mejorar la producción al disminuir las pérdidas por merma.

III. FUNDAMENTACION TEORICA

3.1 MIASIS CAUSADA POR *Dermatobia hominis*

La miasis es la invasión de tejido de un vertebrado por una larva de mosca (díptera), las larvas de *D. hominis* necesitan alimentarse con una dieta alta en proteínas para su crecimiento, desarrollo y la producción de huevos en su estado adulto. Las miasis pueden ser catalogadas con base al grado de asociación de la especie de mosca a su huésped. Se reconocen tres tipos de miasis; accidental, facultativa y obligatoria (Forero et al., 2008).

Las moscas que causan miasis están representadas por un amplio espectro de especies (Cuadro 1.), en las especies de moscas que causan miasis obligatorias, las larvas siempre son biontófagas por lo que requieren de un individuo vivo para su subsistencia como es el caso de *D. hominis* entre otras (Moissant et al., 2004)

Entre algunos géneros y especies causantes de miasis se reportan: *Cochliomyia hominivorax*, *Calliphora* spp, *Oestrus ovis*, *Sarcophaga* spp (Alkorta et al., 2001; Merino et al., 2000). Las miasis ocasionadas por estos géneros se caracterizan por la presencia de numerosos ejemplares larvales, que causan una severa acción traumática ejercida por las numerosas cerdas y espinas quitinosas que presentan en sus diferentes segmentos, lo que puede conllevar a procesos infecciosos secundarios, pérdida de apéndices (orejas, miembros) e incluso la muerte (Cordero et al., 1999).

Cuadro 1. PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE MIASIS

Familia	Género	Localización	Detalle
<i>Sarcophagidae</i>	<i>Sarcophaga</i>	Cutáneas: ulcerante	Es una miasis cutánea ulcerosa que afecta a los animales domésticos.
<i>Cuterebridae</i>	<i>Dermatobia</i>	Cutáneas: forunculosa	Es una miasis cutánea forunculosa que afecta bovinos y humanos.
<i>Oestridae</i>	<i>Oestrus</i>	Cavitarias: nasal	Se desarrolla en la cavidad nasal, afecta los senos paranasales y criba etmoidal y no al tejido subcutáneo.
<i>Gasterophilidae</i>	<i>Gasterophilus</i>	Cavitarias: Gastroentérica	Afecta el lumen gastrointestinal de los equinos provocando gastritis.
<i>Calliphoridae</i>	<i>Cochliomyia</i>		Miasis cutánea ulcerante producida por el gusano barrenador.
	<i>Lucilla</i>	Cutáneas: ulcerante	Miasis que se encuentra difundida en los rebaños de oveja (ovinos) del mundo.
	<i>Chrysomya</i>		Miasis cutánea que tiene como hospederos animales de sangre caliente.

Fuente: Otranto y Stevens, 2002

En Panamá la miasis causada por las larvas de *D. hominis* es conocida como “tórsalo”. La mosca de *D. hominis* mide de 15 a 17 mm (Figura 1), el cuerpo es poco velludo, tiene color azul acerado con tonos grisáceos, frente y antenas de color amarillo, tórax de color castaño con estrías y reflejos azulados; las alas son hialinas. El abdomen es corto y ancho de color azul brillante, los ojos en los especímenes vivos son de color ladrillo. La arista de la antena está minuciosamente emplumada en el lado dorsal (García, 2006).

Figura 1. Adulto de *Dermatobia hominis*.



Fuente: Campos Pereira, Universidad de Sao Paulo.

Las larvas de diferentes estadios se encuentran en piel y tejido subcutáneo de bovino, ovinos, equino, cerdo, perros, gatos, gallinas, venados, jaguar, monos, conejos y el hombre., etc. La existencia de otras enfermedades, como las infecciones secundarias complican el cuadro sintomatológico (como por ejemplo: staphilocóccicas, streptocóccicas, tétanos, micosis, etc.) causando que las típicas pápulas eritematosas, que aparecen al principio, se transformen en pustulosas y/o descarguen fluido serosanguinolento.

Cuando las larvas parásitas entran en el tejido subcutáneo del hospedador dejan expuesto los espiráculos, abertura que eventualmente se contamina y facilita la aparición de infecciones secundarias, con lo cual éste pierde integridad y con esto la capacidad de defenderse a la acción patógena de diferentes parásitos y microorganismos (hongos y bacterias).

El grado de complejidad que tenga cada caso depende en gran medida de la zona corporal en donde esté desarrollada la miasis y de la presencia o no de infecciones secundarias (Benavides, 1996).

3.2 BIOLOGÍA DE *Dermatobia hominis*.

Clasificación taxonómica de *D. hominis*:

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Díptera

Familia: Cuterebridae

Género: *Dermatobia*

Especie: *Dermatobia hominis*

D. hominis abunda mucho en la zona boscosa de América Tropical. La hembra fecundada y en condiciones de efectuar postura, deposita cada vez más o menos 30-60 huevos largos y cónicos provistos de un opérculo (Figura 2), sobre la superficie posterolateral del abdomen de los artrópodos generalmente hematófagos a cuya superficie quedan adheridos mediante una sustancia especial que la hembra secreta en el momento de la postura.

Figura 2. Transportador forético con huevos adheridos de *Dermatobia hominis*



Fuente: Eskildsen y Ying. 2012

Estos artrópodos pueden ser moscas, del género *Stomoxys*, *Anthomya*, *Synthesomya*; mosquitos de los géneros, *Janthinosoma*, *Psorophora* y otros Culicidae y, garrapatas del género *Amblyoma* (Cuadro II). Durante el vuelo, las moscas hembras adultas depositan y adhieren los huevos en el abdomen de artrópodos, casi siempre hematófagos (Mateus, 1997). A estos vectores mecánicos se les denomina foréticos y a éste fenómeno de transporte: foresia.

Los huevos, conteniendo la larva L1 dentro, pueden permanecer de 6 a 30 días sobre el abdomen de estos insectos a la espera de algún hospedador. En caso de que la hembra adulta no encuentre al vector mecánico, puede depositar los huevos en hojas de plantas, cumpliendo éstas la función de vector mecánico (Shell, 2002).

Cuadro II. FAMILIAS DE ARTROPODOS QUE POSEEN ESPECIES VECTORES DE *Dermatobia hominis*.

Familia del vector	Numero de especies.
Culicidae	24
Muscidae	11
Fanniidae	6
Calliphoridae	5
Sarcophagidae	2
Simuliidae	2
Anthomyiidae	1
Tabanidae	1
Ixodidae	1

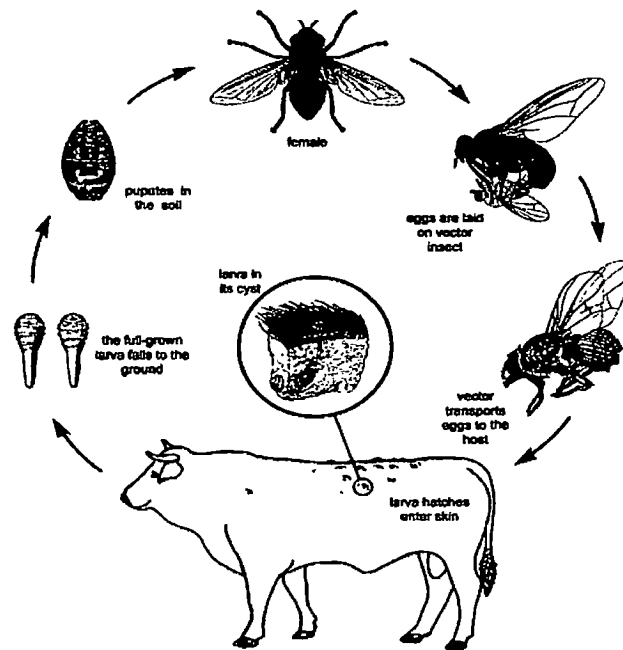
Fuente: Guimarães y Papavero 1999.

El tiempo de viabilidad de la larva dentro de los huevos depende de la humedad y la temperatura, ya que éstas son muy sensibles a la deshidratación. Otros autores (Mourier y Banegas, 1970) afirman que después de 6 días de incubación, se pueda dar la eclosión de las larvas de primer estadio, las cuales son capaces de penetrar activamente la piel intacta de un huésped adecuado que esté presente en el momento de la visita del insecto transportador (Mourier y Banegas, 1970)

D. hominis utiliza un mecanismo de infestación indirecta, las larvas permanecen dentro del huevo sobre el cuerpo del artrópodo transportador; al encontrar un huésped y ser estimuladas por su temperatura, abandonan al transportador e inician la fase de

penetración por sus propios medios o a través de la lesión dejada por la picadura del artrópodo hematófago (Shell, 2002).

Figura 3. *Dermatobia hominis*. Ciclo de vida



Fuente: Guimarães, J.H. & N. Papavero. 1999.

Una vez que la L1 alcanza al hospedador, atraviesa activamente la piel sana (tarda de 5 a 10 minutos), en 12 a 16 días muda a larva de segundo estadio (L2) y larva de tercer estadio (L3) respectivamente. En este punto es donde empieza la miasis (Cuadro III). Este desarrollo lleva un tiempo de 10 días, período en el cual la parasitosis se puede agravar porque da lugar a la aparición de infecciones cutáneas secundarias. Cuando L3 sale del hospedador cae al suelo. En este punto termina la miasis. Una vez en el suelo se entierra a

unos 5-6 cm de profundidad, se transforma en pupa o crisálida, y así permanece entre 30 y 60 días (dependiendo de los factores climáticos). Los adultos emergen de las pupas, pudiendo llegar a vivir entre 7 y 14 días. La hembra puede depositar de a 30 a 60 huevos cada vez, y entre 100 a 400 durante de toda su vida (Bordeau, 2000).

Cuadro III. PATOGENESIS DE LA MIASIS

ESTADIO	Patogénesis de las Miasis ACCION	REACCION
Primero	Penetración Consumo celular (acciones físicas y proteolíticas)	Ninguna o prurito leve. Pápula eritematosa y prurito intenso
Segundo	Consumo de tejido (mayores acciones físicas y proteolíticas)	Respuesta Inflamatoria violenta. Inicio de la formación de un estroma quístico. Leve eosinofilia. Infecciones secundarias
Tercero	Reacción a cuerpo extraño Daño severo del tejido (Incremento de las actividades físicas y proteolíticas)	Formación de forúnculo Exudado seroso Polimorfonucleares, eosinófilos y linfocitos. Infecciones agravadas y necrosis

Fuente: Shell. 2002

Cuando las larvas parásitas entran al tejido subcutáneo del hospedador facilitan la aparición de infecciones secundarias, debido a que se lo van comiendo a lo largo de este proceso. El tejido pierde su integridad y la capacidad de defenderse a la acción patógena de los diferentes parásitos, hongos y bacterias ((Benavides, 1998 en Ardila, 2006).

3.3 EPIDEMIOLOGÍA DEL TORSALO

El tórsalo, está presente en todos los países latinoamericanos con la excepción de Chile y algunas islas en el Caribe (Figura 4). La miasis foruncular causada por *D. hominis* es endémica en todo Centro y del Sur América (Vijay, 2012); también es un problema endémico del sur de México (Ardila, 2006) y se encuentra ampliamente distribuido en zonas húmedas de América tropical. Su distribución da la impresión de estar comprendida entre el trópico de cáncer por el norte y el trópico de Capricornio por el sur, extendiéndose desde México hasta Argentina. (Neel, 1995).

La miasis foruncular causada por la larva de la *D. hominis* se le conoce con diferentes nombres en América latina: Ura (Argentina), Berne (Brasil), Baro, Nuche (Colombia), Tupe, Colmoyote (México), en Panamá se le conoce comúnmente como “tórsalo”.

En Argentina tiene una amplia distribución, abarcando una superficie de aproximadamente 60.000 Km²; su incidencia es mayor en el nordeste argentino, siendo una importante ectoparasitosis en el Norte de la provincia de Corrientes.

Figura 4. Distribución de *Dermatobia hominis*.



Fuente: C. Roxanne Connelly, University of Florida. 2008

En Panamá la problemática del tórsalo se presenta en todas las provincias, encontrándose el mayor porcentaje en Coclé, Veraguas, Chiriqui, Herrera, Panamá y las Comarcas indígenas. Los casos en humanos y animales silvestres son muy frecuentes. El tórsalo en Panamá afecta mayormente a los pequeños productores, a los indígenas y a la industria nacional del cuero, de hecho los casos humanos se han descrito en todas las provincias (Molano y Ying, 2005).

3.4 EL GANADO BOVINO

En el ganado bovino la mayor infestación se observa es en animales de pelaje oscuro y razas europeas. Observándose un aumento de casos de agosto hasta octubre y desde fines de febrero hasta abril. No obstante, durante todas las estaciones es posible observar animales con cierto nivel de infección (Aiello, 1998). Mateus (1977, 1985, 1987) afirma que el ganado cebú es menos receptivo al tórsalo que otros *Bos taurus*, como el Holstein (Figura 5). Por su parte, el criollo sanmartinero, de los Llanos Orientales de Colombia, de pelaje de color rojo a rojo cereza, es altamente susceptible al parasitismo y plantea el estudio de resistencia mediante pruebas inmunológicas con alérgenos de la larva del parásito (López, 1980), mediante un experimento en el cual pinta animales con tinta, la mitad del cuerpo de color negro y la mitad blanco, demostrando que los portadores de tórsalo prefieren el color negro, lo que explica por qué los animales de pelaje oscuro muestran mayor grado de parasitismo.

Figura 5. Raza Holstein



Fuente: Ardila, 2006.

Una gran movilidad de la piel debido a músculos subcutáneos fuertes es un mecanismo protector contra el ataque de ectoparásitos. El cebú (Figura 6.) tiene bien desarrollada la capa muscular subcutánea y una elevada sensibilidad de la función táctil que le permite agitar la piel con energía para rechazar y sacudirse los insectos. También posee una resistencia natural, ya que su piel tiene un tejido denso, que dificulta la penetración de los insectos succionadores de sangre.

Figura 6. Raza Cebú



Fuente: Ardila, 2006.

Las glándulas sebáceas del cebú producen una secreción oleosa, lubricante de los pelos y que se va depositando sobre la piel durante la vida del animal, produciendo un olor característico, semejante a un fuerte olor a maní rancio, que contribuye a repeler insectos. Se observa sobre todo en días muy calurosos bajo la forma de mancha grasosa de color amarillo, depositada sobre todo entre los pliegues cutáneos del cuello, papada y región axilar, con un olor no muy perceptible por el olfato del hombre.

Algunas razas, tales como el Brahman, son mucho más resistentes a las moscas y al tórsalo, ya que tienen tres veces más pelo por unidad de superficie y la piel es más gruesa que la mayoría de las razas inglesas y continentales.

Dentro de la misma raza, algunos individuos son más resistentes que otros. Es posible la selección genética sobre el rasgo “resistente al tórsalo”. Muchos científicos creen que la herencia para la resistencia contra estos dos factores puede ser muy alta. (Vergara, 2000).

3.5 TORSALO EN HUMANOS

En los Estados Unidos, Australia y algunos países europeos se han presentado casos en humanos luego de viajes a zonas rurales de países latinoamericanos.

Debido a su epidemiología el tórsalo en humanos es más común en países de Centro y Sur America, sin embargo, debido al aumento del turismo ecológico y el consecuente aumento de los viajes generalizados, esta miasis foruncular se ha vuelto cada vez más frecuente en personas de América del Norte y Europa (Vijay, 2012).

El diagnóstico erróneo y mal manejo de la miasis en humanos puede ocurrir frecuentemente debido a la limitada conciencia del personal de salud de estas regiones de la presencia del tórsalo fuera de las zonas endémicas (Vijay, Op.citp.).

Figura 7. Miasis por *Dermatobia hominis* en el cuero cabelludo.



Fuente: <http://actasdermo.org/es/miasisydelycueroycabelludoyen/articulo/13048796/>

Casos de miasis humana de la población (Figura 7) en áreas no endémicas son diagnosticados cuando los viajeros llevan el parásito luego de viajes turísticos Haruki et al. (2005) reportaron 33 casos de *D. hominis* en Japón de 1974 a 2005, como resultado de los viajes al extranjero a Centro y Sur América; un tercio de los casos denunciados ocurrieron durante los últimos seis años del estudio. Otros seis diferentes estudios han documentado, desde 1999, siete casos de miasis por *D. hominis* en los Estados Unidos (Lawson et al., 2005; Liebert et al., 2004; Maier et al., 2004; Marty et al., 2005; Millikan 1999; Sampson et al., 2002).

3.6 TRATAMIENTO DEL TORSALO

Los parásitos externos constituyen uno de los problemas más graves para la ganadería bovina. Sus efectos no sólo se derivan de su acción como parásitos en sí, sino de su capacidad de transmitir a sus hospederos importantes enfermedades causadas por diferentes agentes como: virus, protozoarios, bacterias y rickettsias (Ardila, 2006). Lo anterior, resulta en pérdidas de producción y productividad, además de contaminación de alimentos para el consumo humano. Tradicionalmente, en nuestro país, el control de los parásitos externos se ha efectuado mediante la aplicación continuada de compuestos químicos acaricidas e insecticidas. Esta estrategia tiene entre otros inconvenientes: altos costos, contaminación ambiental, desarrollo de quimiorresistencia, depósito de residuos en productos y subproductos de origen animal.

Actualmente, la intensidad y la periodicidad en el uso de químicos están siendo analizadas en muchos países, recomendándose reducir el empleo de compuestos químicos y aplicarlos sólo cuando sea necesario.

Aún con estas consideraciones, en el control químico frecuentemente se cometen muchos errores como el desconocimiento de la especie de ectoparásito que tiene el ganado, una ausencia de criterio técnico para elegir el compuesto a emplear, uso de concentraciones más bajas o altas que las recomendadas, aplicación de insuficiente solución acaricida o insecticida o ivermectina por animal, intervalos inadecuados entre baños, inadecuada o ninguna sujeción del animal, falta de registros sobre producto empleado y fecha de aplicación, enfoques más modernos.

Es excelente el resultado que se obtiene con la aplicación de productos con Ivermectina como base farmacológica, ya sea como preventivo o para el control de larvas presentes en los nódulos. La protección alcanza hasta los 40 días, no siendo visibles nódulos hasta los 2 meses posteriores a la aplicación. Otros tratamientos caseros incluyen el uso de aceite quemado o aceite mineral acompañado de metrifonatos o de ésteres metálicos.

Según un estudio realizado en Argentina para evaluar la eficacia de la ivermectina al 3.15%, los resultados permitieron apreciar al día 30 después de la aplicación una eficacia del 100 % en el ganado tratado. Algunos nódulos que parecían estar activos, al ser comprimidos manualmente expulsaban su contenido seropurulento, notándose pequeñas partículas de quitina de las larvas muertas afectadas y destruidas por efecto de la droga. (Morriena et al., 2009).

Otro tratamiento alternativo consiste en la remoción química, se efectúa aplicando compresas de cloroformo o de éter, aspersiones de cloroformo al 15% diluido en aceite, cubriendo la herida con un aerosol de un insecticida de acción inmediata. Entre otros productos utilizados en el tratamiento contra el tórsalo están los insecticidas de contacto y sistémicos en distintas formulaciones, los órganos fosforados, como el diclorvos y fentión son utilizados en América Latina como aerosoles y productos para rociado.

Recientemente se han desarrollado varios estudios para comprobar la eficacia de tratamientos homeopáticos (García, 2006; Ardila, 2006).

3.7 IMPACTO ECONOMICO

La causa principal de pérdidas en la producción ganadera en Panamá, es atribuida a la miasis causada por *D. hominis*. Estas pérdidas ascienden a 14 millones de dólares anuales, de los cuales 5.4 millones corresponden a gastos para el control, 2.3 millones de dólares a la merma en la producción de leche, y 5.5 millones a pérdidas debido a la baja calidad del cuero no apto para exportación (Barsallo et al., 2005). Además de los costos ocasionados a la salud humana y su incidencia en el turismo. El impacto económico en América Central no está totalmente documentado, no obstante en Brasil se ha estimado por el orden de los 250 millones de dólares por año (Grisi et al., 2002), considerando que la parasitación de 20 a 40 larvas del insecto pueden causar una merma de hasta 12% del peso del ganado de carne y una disminución de un 20% de la producción láctea. En un estudio realizado por Oliveira (1996) se afirma que el 89% de las pieles examinadas en la región de San Carlos estado de Sao Paulo, Brasil poseían perforaciones causadas por tórsalo.

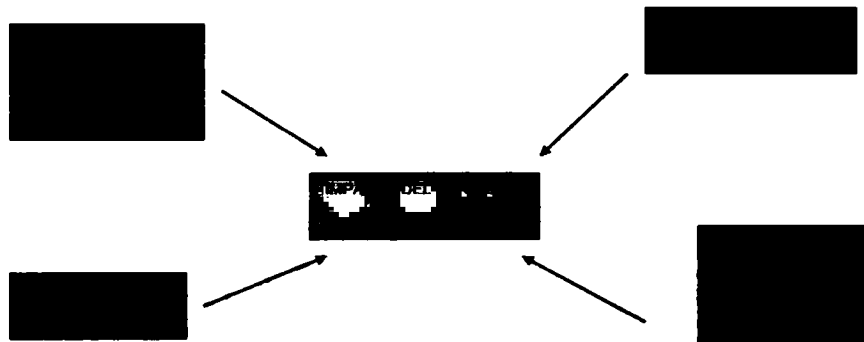
Se pueden resumir las causas de pérdidas económicas por el tórsalo en cuatro aspectos, producción de carne y leche, costos enfocados al control, daños en el cuero y la salud humana y el turismo (Figura 8).

Producción de carne y leche: Existen pocos estudios sobre pérdidas directas de la producción; se reportan descensos de entre un 18 a 25 por ciento en la producción diaria de leche y de entre un 10 y 14 por ciento en la ganancia diaria de peso (Pérez y Arrá, 2002).

Aumento de los costos de producción por su combate por medios químicos: Esta estimación se hace a partir de información generada a nivel de finca, de los costos de combate, asumiendo niveles variables de infestación.

El daño a los cueros: éste es otro factor de importantes pérdidas económicas. Los daños a los cueros se agrupan en dos categorías: los mecánicos (fierros, alambres, heridas) y los causados por enfermedades y parásitos.

Figura 8. Causas de Pérdida por *Dermatobia hominis* en America Central



Fuente: Pérez y Arrá, 2002.

Existe una lista muy amplia de problemas en los cueros derivados de parásitos y enfermedades. Las dermatomicosis (hongos), dermatitis bacterial, herpes (gabarros) y queratosis alérgicas son algunas de ellas, pero en nuestro medio las dos más importantes son el tórsalo y las garrapatas.

Estudio realizados por Pérez y Arrá en el año 2002 con industriales del cuero en los tres países de mayor industria del cuero: Costa Rica, Panamá y Guatemala. Todos coincidieron en que el tórsalo es el principal daño que se observa en los cueros

centroamericanos (Pérez y Arrá, op cit). Ello se da porque la mayoría de los daños mecánicos pueden disimularse mediante procesos “cosméticos” (lijado, pintura) pero el tórsalo perfora el cuero, lo que, luego de la cicatrización en el animal vivo, deja el cuero más débil y sujeto a rupturas durante la elaboración de productos finales.

El impacto en la salud humana: En todas las descripciones del tórsalo y su epidemiología se menciona al humano como un huésped frecuente de la larva. Ello ocurre primordialmente en el medio rural debido al ecosistema en que se desarrolla. Más de la mitad de la población de América Central vive en el medio rural; la mayoría de las personas en Latinoamérica que han vivido en el campo, han sufrido o han escuchado o visto casos de tórsalo en humanos. Los niños pequeños son los más susceptibles. Existen casos documentados de niños fallecidos por larvas que penetraron al cerebro y de infecciones secundarias severas causadas por tórsalos que se rompen en el proceso de extracción o de otros patógenos que penetran a través del tórsalo (Pérez y Arrá, 2002). Los productos químicos de combate al tórsalo pueden dejar contaminantes en la carne y la leche, constituyéndose es otro efecto negativo potencial al hombre. El impacto del tórsalo en los humanos ha sido subestimado por el Sector Salud y con el desarrollo del concepto de ecoturismo, turismo de aventura y otras actividades recreativas asociadas con visitas al medio rural (principalmente el selvático), este problema será cada vez más valorado y se dimensionará mejor su impacto negativo (Pérez y Arrá, Op. cit.).

Impacto sobre el turismo y el ambiente: el turismo se ha convertido en una de las actividades económicas más importantes de la Región Centroamericana. Desde 1980 el número de turistas que visitan esta región crece a una tasa anual de casi un 5 por ciento y

dado el crecimiento publicaciones de infestaciones por tórsalo a los turistas se podría visualizar un impacto negativo a la afluencia del turista a la Región Centroamericana. Además, se han dado decenas de descripciones de infestaciones de visitantes principalmente de países desarrollados que manifiestan el problema luego de retornar a sus países (Thanapatcharoena, 2012) (Jhon y Henderson, 2006).

El impacto económico de este descenso en este renglón podría llegar a ser muy significativo (Pérez y Arrá, supra cit). El daño principal al ambiente está asociado a la utilización de los químicos para el control y combate del parásito ~~misma~~ y sus vectores. El baño por aspersion con insecticidas son utilizados sobre y sub dosificados causando intoxicaciones a los animales y a los operarios, así como la acumulación de insecticidas en el aire, agua o creando resistencia a los vectores asociados.

La cuantificación de las pérdidas en Centroamérica, según Perez y Arrá. 2002.

Las pérdidas causadas por el tórsalo en América Central están en los siguientes rubros:

- Menor producción de carne y leche (descenso en un 10% en parasitados)
- Costos por el combate químico (US\$ 2.40 por animal tratado)
- Daños a los cueros (30% de los cueros pierden US\$ 10 c/u por los daños)
- Descenso en el número de turistas (1 de cada 10 mil turistas cancela)

Asumiendo que:

- el 30 por ciento del hato sufre de esta parasitosis,
- el 70 por ciento de la población bovina recibe tratamientos contra el tórsalo,

- el 30 por ciento de los cueros de la Región pierden US\$ 10 de valor y
- uno de cada 10 mil turistas desiste de viajar por temor a infestarse, se pierden anualmente más de **US\$ 51 millones** por causa del tórsalo en Centroamérica (casi US\$ 5 por cada bovino presente en Centroamérica).

En el caso específico de Colombia las pérdidas han sido calculadas en \$108 millones anuales (Peña et al., 1980).

3.8 ESTUDIOS PREVIOS.

Algunos trabajos relacionados con alternativas de solución a este problema se han enfocado en el estudio de proteasas de excreción/secreción producidas por la larva de primer estadio, las cuales pueden guardar relación con el proceso de penetración de la larva (Oliveira et al., 1996).

Ya en varios agentes que causan miasis, se han encontrado proteasas, enfocándose dichas investigaciones en la respuesta inmunológica, inmunidad adquirida y el desarrollo de vacunas, con especial atención en especies como *Lucilia cuprina* (Sandeman et al., 1990), *Hypoderma lineatum* (Moire, 1998; Otranto, 2001), *Chrysomya bezziana* (Muharsini et al., 2000) y *Oestrus ovis* (Tabouret et al., 2003; Angulo et al., 2007).

Un estudio mas reciente en busca de proteasas de larvas de *D. hominis*, reveló la existencia de pocas fracciones de proteolisis pero con una gran actividad,

predominantemente en las fracciones de alto peso molecular, especialmente en la L1, mientras que en el gel de L2 y L3 se evidenció una amplia gama de actividad proteolítica, revelándose un aumento progresivo de la actividad proteasa del primero al tercer estadio de larvas (Oliveira et al., 2010) El predominio de las proteasas de serina en L2 y L3 y la gran actividad trípica presentada por L3, fueron atribuidas a una actividad trófica de las larvas en crecimiento, ya que la viabilidad de las moscas adultas depende estrictamente de la capacidad de larvas para asimilar nutrientes del hospedador

Fernández et al., (2012) describieron la secuencia de una proteína de 50 kDa (nombrada Dh50), que al ser alineadas con secuencias en diferentes bases de datos, no se encontró ninguna similitud con las proteínas descritas hasta ahora, lo que puede ser indicativo que es específica para *D. hominis*. La proteína fue seleccionada, purificada, y se administrada a los animales anteriormente libres de ectoparásitos. Después de la inmunización, realizaron una prueba exposición en campo, obteniendo resultados con 91% de protección, lo que indica que el control tórsalo podría ser potencialmente logrado a través de la vacunación. La inmunización con *D. hominis* con el extracto crudo larvas L3 también produjo inmunidad similar a la observada en el grupo que recibió la proteína Dh50 (Fernandes et al., 2012).

IV. METODOLOGIA

4.1 COLECTA DE ESPECIMENES.

Las giras de campo para colecta de larvas de *D. hominis* y muestras de sangre de ganado vacuno infestado naturalmente, se realizaron en coordinación con el Programa Nacional para el Control del Tórsalo del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA). Las provincias seleccionadas fueron: Chiriquí, Veraguas, Colón y la Comarca Ngöbe Buglé, se coordinaron visitas previas a los ganaderos de los lugares más afectados, para la verificación de la no aplicación de ivermectina u otro químico para el control del tórsalo o ectoparásitos. Las fincas donde la aplicación de ivermectina u otro agente químico en el ganado bovino fuese superior a los 3 meses eran incluidas en el estudio, esto con el objetivo de garantizar la viabilidad de las larvas y el éxito del establecimiento de las colonias en el laboratorio. Una vez explicado el objetivo del estudio a cada uno de los propietarios, se solicitó su consentimiento para la colecta de las larvas.

Las giras de colecta en su mayoría se realizaron en la estación lluviosa, temporada donde el ciclo de vida de la *D. hominis* es favorecido y por mayor incidencia de tórsalo.

Una vez ubicada la finca seleccionada para la colecta, el ganado era reunido en un área determinada, con la ayuda de los ganaderos y personal para el Control del Tórsalo del MIDA. La selección se basó en la búsqueda de los animales más afectados según la

cantidad de forúnculos observados. Las larvas eran extraídas una vez que el animal era inmovilizado con la ayuda de sogas.

Las larvas fueron obtenidas por medio de presión manual en el área de la lesión, lavadas con solución salina estéril para eliminar la sangre y el material purulento producido por la infección secundaria de los forúnculos. Seguidamente fueron clasificadas según el estadio y movilidad de las mismas. Un porcentaje de las larvas de tercer estadio (L3) se ubicó en cámaras con una mezcla de tierra y aserrín previamente esterilizada mediante horno o autoclave. El resto de las larvas L3 y el 100% de las L2 fueron conservadas en nitrógeno líquido o RNA later y ubicadas a -80 °C. Las larvas con poca movilidad y/o muertas fueron descartadas.

4.2 OBTENCION DE LARVAS DE PRIMER ESTADIO EN EL LABORATORIO

El desarrollo de adultos *D. hominis* para obtener el estadio infectante (L1) se realizó siguiendo un protocolo experimental descrito en estudios previos. (Lello y Peracoli, 1993) con algunas modificaciones. Establecida en el Departamento de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá.

Protocolo:

- Inmediatamente después de la colecta, las larvas L3 fueron lavadas con solución salina y colocadas en cámaras plásticas conteniendo la mezcla de tierra y aserrín previamente esterilizada. El espesor de la capa de tierra era de 4-5 cm.

- Las larvas se ubicaron en la superficie de la tierra para que se introdujeran naturalmente en ella. Las cámaras se cubrieron con una malla de tul para facilitar la aeración y evitar el escape de las moscas adultas.
- Las cámaras de tierra fueron transportadas al laboratorio de Microbiología Humana de la Facultad de Medicina e incubadas en un ambiente de 25 °C, poca luz y humedad relativa (HR) no controlada (alrededor de un 80%).
- Diariamente la tierra era rociada con agua para evitar la resequedad de la misma; además se colocaron envases con agua para aumentar la humedad del ambiente.
- Pasados diez días las pupas formadas fueron retiradas de la tierra y lavadas con agua, secadas a temperatura ambiente y nuevamente ubicadas en las cámaras con tierra.
- Cercano al tiempo de emergencia de las moscas adultas (28-30 días), se retiró la malla de tul de las cámaras de tierra y se introdujeron en jaulas caseras (misma condición ambiental).
- Al emerger las moscas fueron clasificadas de acuerdo al sexo y ubicadas en otras jaulas dependiendo de la cantidad, cuando alcanzaron un día de edad.

- Las jaulas con las moscas se mantuvieron bajo una condición ambiental de 28°C y 80% HR e iluminación suficiente, desde la parte superior. Esto favorece la cópula (Banegas et al., 1966)
- Se aplicó agua a microaspersión en el ambiente para que las gotas de humedad ayudasen a saciar la sed de las moscas. Se colocaron cajas petri con algodón humedecido con agua que sirvieron de bebedero.
- Las jaulas fueron mantenidas en un ambiente oscuro a 24 °C.
- Una vez las moscas hembras alcanzaron los dos días de edad, las jaulas fueron pasadas a un ambiente con 28 °C e iluminación. Se introdujeron varios ejemplares de *Musca domestica* como insectos foréticos, a razón de 5 a 10 *M. domestica* por pareja.
- Las jaulas fueron observadas diariamente para monitorear el periodo de vida de los adultos y verificar la presencia de foréticos con huevos de *D. hominis* adheridos a su abdomen.
- Los huevos no fueron retirados de los vectores hasta luego de 5-7 días, al menos que murieran los foréticos, en este caso los huevecillos fueron retirados con pinzas y se colocados en cajas petri sobre algodón húmedo.

- Una vez colectados, los huevos fueron tratados con RNA later y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso.

4.3 LIOFILIZACIÓN DE LARVAS

Las larvas conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron liofilizadas utilizando un liofilizador Teistar lioalfa-6.

4.4 PREPARACIÓN DEL HOMOGENADO PROTEICO:

- Preparamos homogenados a partir de cada uno de los estadios larvarios. Para ello, las larvas liofilizadas fueron pulverizadas con la ayuda de un mortero.
- Por cada gramo de tejido de larvas se añadieron 10 volúmenes (peso/volumen) de tampón de lisis y se mezclaron 2 minutos con ayuda de un vortex y se finalmente se termino de lisar con ayuda de un sonicador.
- Las muestras fueron centrifugaron a alta velocidad y posteriormente se tomo el sobrenadante, el cual fue colocado en viales que se calentaron en un termo bloque a $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.

- Fijando previamente las tapas de los viales, se colocaron en un vaso químico con agua y se calentaron en un termo bloque a 96 °C durante 5 minutos.
- Centrifugamos las muestras a 3,500 rpm x 10 minutos y separamos el sobrenadante.
- El sobrenadante resultante se utilizó para la realizar la electroforesis (SDS-PAGE).

4.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

Una vez preparados cada uno de los homogenados correspondientes a los estadios larvarios en tampón de carga (0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% (p/v) SDS, 20% glicerol, y 0.2% (p/v) de azul de bromofenol y calentados a 95 °C durante 5 minutos, las muestras y el marcador de peso molecular (Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis Cat: 17-0446-01, Presicion Plus Protein, cat: 161-0363, Bio Rad) se procedió a la separación electroforética de sus componentes proteicos a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 12 % de acuerdo al método de Laemmli (1970).

Utilizando el sistema Mini-Protean 3 de Bio-Rad en tampón de corrida conteniendo 100mM Tris-HCl, 0.1% SDS pH 8.3 a 100 voltios constantes en una fuente de alimentación (PowerPack HV cat: 164-5056 Biorad) a temperatura ambiente hasta que el azul de bromofenol alcanzase el final del gel. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 y se destiñó con solución destiñidora/fijadora conteniendo 40% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético.

4.6 TINCIÓN DE AZUL DE COMASSIE

- Se sumergió el gel durante 1 hora y 30 minutos y agitación continua en una solución conteniendo 0.25 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% metanol y 10% ácido acético. Posteriormente destiñéndose en agitación por 5 minutos con una solución de: metanol al 30%, ácido acético 10% y agua destilada 60% Este paso se repitió hasta eliminar el tinte del fondo del gel. Finalmente el gel fue mantenido en agua destilada.
- Se procedió a analizar el patrón de bandas de cada carril y a definir el carril en donde se dio la mejor separación y visualización de las bandas dependiendo del volumen de muestra aplicada en cada carril.

4.7 INMUNOBLOT

La detección de proteínas inmunogénicas se llevó a cabo mediante inmunoblot. Para ello, las muestras de los homogenados de los estadios larvarios fueron cargadas por duplicados en geles SDS-PAGE al 12% como se describe arriba. Al finalizar la electroforesis, cada gel fue cortado por la mitad, cada una conteniendo las mismas muestras. Una mitad fue teñida con azul de Coomassie y la otra mitad fue transferida a una membrana de nitrocelulosa para la realización del inmunoblot como se detalla a continuación.

- Las membranas de nitrocelulosa (Hybond™-c extra GE), papel filtro y el gel (SDS-PAGE) fueron incubados en tampón de transferencia conteniendo 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanol durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Seguidamente se colocamos la membrana de nitrocelulosa sobre el gel, asegurándose que no se formasen burbujas. El sándwich para la transferencia se preparó en el sistema de Bio Rad. La transferencia se realizó a 140 voltios durante 45 minutos.
- Marcamos con una aguja la ubicación de las bandas del marcador de peso molecular, para contar con una marca de referencia en caso de que luego de la transferencia no se observaran claramente.

- Cortamos en tiras cada carril, distinguiendo bien las que se utilizarían con los sueros como controles negativos y positivos.
- Bloqueamos las membranas con tampón de bloqueo conteniendo 2% de leche descremada y 0,3% Tween-20 en PBS durante toda la noche a 4°C.
- Se realizaron 4 lavados por 5 minutos cada uno con tampón de lavado (PBS, 0,3% Tween 20).
- Como anticuerpos primarios, empleamos pools de sueros de animales infectados por *D. hominis* y como control negativo, sueros de animales sanos. Los sueros fueron diluidos 1:250 en tampón de bloqueo, las tiras fueron incubadas con cada uno de estos anticuerpos primarios durante dos horas a 37 °C en agitación continua
- Repetimos los lavados y seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario anti vaca www.abcam.com (anticuerpo policlonal de cabra anti vaca IgG HRP) marcado con peroxidasa diluido 1:200 en tampón de bloqueo.
- Las membranas fueron incubadas una hora a 37 °C en agitación constante y en oscuridad.
- Repetimos los lavados nuevamente, seguidamente las membranas fueron incubadas en el tampón sustrato de la peroxidasa (0.1M Tris-HCl, pH 7.4, 0.05% 3-3' Diaminobencidina tetrahidroclorhídrico (DAB) y 30% H₂O₂ (50 µl/100 ml)) durante unos 20 minutos.
- Detuvimos la reacción con agua destilada.

4.8 INTERPRETACION DEL INMUNOBLOT

- Analizamos cada uno de los carriles y sus respectivas bandas.
- Iniciamos por analizar el marcador de peso molecular utilizado, la ubicación de cada una de las bandas y su tamaño correspondiente.
- Posteriormente se le asignó una numeración a cada una de las bandas más fuertes observadas en los carriles de muestras, según el estadio de la larva utilizado.
- Se calculó el peso molecular de cada una de las bandas numeradas.
- Una vez establecido el peso molecular de cada una de las bandas, estas se ubicaron en la otra mitad del gel que fue teñida con azul de Coomassie.
- La mitad del gel teñido con azul de Coomassie fue procesado y conservado con agua calidad mili Q, con el objetivo de cortar las bandas más inmunogénicas según el resultado del inmunoblot y su posterior envió para el respectivo análisis por espectrofotometría de masas.

4.9 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para identificar las proteínas de las bandas con mayor reactividad en el western blot, estas fueron identificadas y cortadas de los geles duplicados y teñidos con Coomassie y enviados al **Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe** para la digestión en gel con tripsina y posterior sometimiento a MALDI-TOF desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz), acoplada a un analizador TOF (Time-Of-Flight, tiempo de vuelo) para producir las huellas peptídicas de masas. Los resultados fueron comparados con las base de datos NCBI utilizando el servidor MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

4.10 ANALISIS BIOINFORMÁTICO.

Las huellas peptídicas obtenidas del estudio por MS y MS/MS de las 11 bandas se analizaron detalladamente utilizando las principales bases de datos: National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Database of *Drosophila* Genes & Genomes (FlyBase) <http://flybase.org/> y la European Data Base Institute (EMBL-EBI) <http://www.ebi.ac.uk/Databases/protein.html>.

Un análisis de cada una de las proteínas que coincidieron con el resultado de la huella peptídica fue realizado mediante una revisión de la literatura previa (tesis, artículos)

previa que la relacionara como potencial blanco para la elaboración de una vacuna. Las proteínas estructurales como por ejemplo actina, miosina, fibronectina no fueron tomadas en cuenta como posibles blancos de estudio.

4.10.1 ALINEAMIENTO MULTIPLE.

Una vez seleccionado un posible blanco, fue analizado utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ubicando las principales especies en donde se describía la presencia de una proteína similar. Tomando en cuenta la relación filogenética y el porcentaje de identidad de la huella peptídica versus una proteína consenso de secuencia completa se seleccionó la misma para realizar un posterior alineamiento múltiple utilizando la herramienta Multiple Sequence Alignment de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Se ingresó la secuencia completa de la proteína en estudio en formato FASTA y se realizó un BLAST contra la especie *B. taurus*. El resultado del alineamiento fue analizado buscando las proteínas que mayor puntaje obtuvieron, se observó la homología, el porcentaje de identidad y los huecos (gaps) entre una secuencia y otra.

Posteriormente se ubicó dentro de la secuencia de la proteína en estudio las regiones correspondientes al sitio catalítico y las regiones en donde el porcentaje de identidad versus las proteínas de *B. taurus* fuera mínimo.

Ingresamos la secuencia completa de la proteína en estudio en formato FASTA y realizamos un BLAST contra la especie *B. taurus*. El resultado del alineamiento fue analizado buscando las proteínas que mayor puntaje obtuvieron, se observó la homología, el porcentaje de identidad y los huecos (gaps) entre una secuencia y otra.

Posteriormente ubicamos dentro de la secuencia de la proteína en estudio las regiones correspondientes al sitio catalítico y las regiones en donde el porcentaje de identidad versus las proteínas del *B. taurus* fuera mínimo.

4.10.2 SELECCIÓN DE EPITOPES ANTIGENICOS

Fue utilizado el software European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) de biología molecular, específicamente la aplicación ANTIGENIC <http://emboss.sourceforge.net/> programa diseñado para predecir sitios potencialmente más antigénicos de una secuencia peptídica.

Sumado al análisis de las secuencias peptídica de mayor puntuación, se tomaron en cuenta los péptidos con menor identidad en relación al *B. taurus*.

Fundamento de la herramienta ANTIGENIC: se basa en estudios previos donde el análisis de los datos de los sitios antigénicos determinados experimentalmente en proteínas ha revelado que los residuos hidrofóbicos Leu Cys, Val, se producen en la superficie de una proteína y tienen más probabilidades de ser una parte de los sitios antigénicos. También se hace uso de las propiedades fisicoquímicas de los residuos de

aminoácidos y sus frecuencias de ocurrencia en los epítomos conocidos experimentalmente.

4.11 SINTESIS DE PEPTIDOS.

Una vez identificadas las secuencias peptídicas de interés (péptido antigénico) se sintetizó un péptido sintético para ser utilizado en pruebas de dot blot y en futuras inmunizaciones experimentales. Los péptidos fueron sintetizados en GenScript http://www.genscript.com/protein_service.html

4.12 DOT BLOT

La antigenicidad de los péptidos seleccionados mediante la herramienta Antigenic fue determinada inicialmente mediante dot blot utilizando el péptido sintético seleccionado con sueros de ganado bovino infestado naturalmente por *D. hominis* y utilizando como anticuerpo secundario un anti vaca. www.abcam.com (anticuerpo policlonal de cabra anti vaca IgG HRP)

Procedimiento:

- Se realizaron dos diluciones del antígeno (péptido sintético) en PBS y se agregó una gota de cada dilución en la tira de nitrocelulosa correspondiente. Se dejaron

secar a temperatura ambiente las tiras de nitrocelulosa por aproximadamente 5 min.

- Se incubaron todas las tiras con el tampón de bloqueo (leche desnatada al 2% en PBS 0.1% Tween 20) por 30 min en agitación a temperatura ambiente.
- Se realizaron 3 lavados por 5 min con tampón de lavado (PBS 0.3% Tween 20).
- Se incubaron las tiras por 30 min a 37°C, con diferentes diluciones de anticuerpo primario (“pooles” de suero de ganado vacuno infestado con *D. hominis* y “pooles” negativos) en PBS, 0.1% Tween 20.
- Se lavaron 3 veces por 5 min con tampón de lavado y se incubaron por 30 min a 37 °C con el anticuerpo secundario anti vaca marcado con peroxidasa (1:1000) diluido en PBS 0.1% Tween 20. Se lavaron 3 veces por 5 min con tampón de lavado.
- Se preparó el sustrato de la peroxidasa: 20 ml Tris HCL + 0.01 g DAB + 10 ul peróxido de hidrógeno.

- Las tiras fueron incubadas con el sustrato por aproximadamente 10 min a temperatura ambiente en oscuridad y se lavaron con agua destilada.
Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente.

V. RESULTADOS

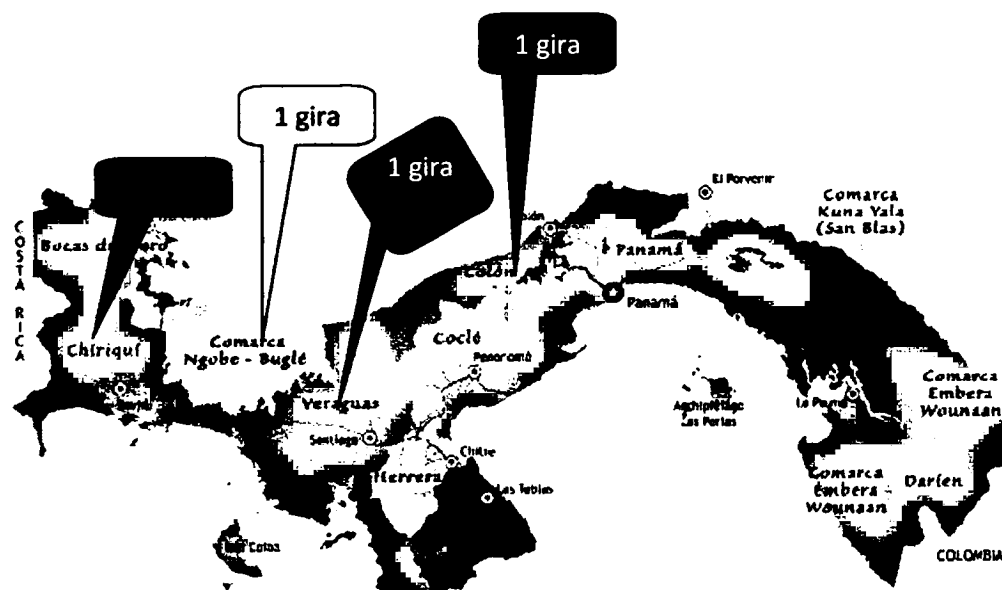
5.1 RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS GIRAS DE CAMPO.

- Realizamos en total 9 giras de campo (Figura 9), de las cuales seis fueron en la provincia de Chiriquí, una en la provincia de Veraguas, en la Comarca Ngöbe Buglé y en Colón. Ver cuadro de resultados de las giras de campo (Cuadro IV).
- Se obtuvieron en total de 519 larvas L3, de las cuales 389 se ubicaron en cámaras de tierra para establecer una cría de *D. hominis* y 130 para conservación a – 80°C. Un total de 22 L2 fueron colectadas, las cuales en su totalidad se transportaron conservadas en RNA later y se conservaron a – 80 °C.
- Un total de 70 bovinos infestados fueron sangrados. Los 70 sueros colectados se preservaron con glicerol (1:1 v/v) y posteriormente fueron almacenados a -20 °C. Adicionalmente se obtuvo el suero de 5 animales sin exposición a *D. hominis* como controles negativos

Ubicación y fecha de las áreas en donde se realizaron las giras de campo:

- Provincia de Veraguas, Calobre: 28 de enero de 2011.
- Comarca Ngöbe Buglé, Paredón: 9 y 10 de marzo de 2011.
- Provincia de Chiriquí, Río Sereno: 7,8 y 9 de abril de 2011.
- Provincia de Chiriquí, Río Sereno: 26 y 27 de mayo 2011.
- Provincia de Colón, Quebrada Bonita: 28 de junio de 2011.
- Provincia de Chiriquí El Roble de Bugaba: 12 de octubre de 2011.
- Provincia de Chiriquí, David: |2 18 y 19 de mayo 2012.
- Provincia de Chiriquí: 22 de junio 2012.
- Provincia de Chiriquí, Dolega, El Flor 30 y 31 de agosto de 2012.

Figura 9. Ubicación geográfica de las giras de colecta.



Fuente: Eskildsen y Ying, 2011

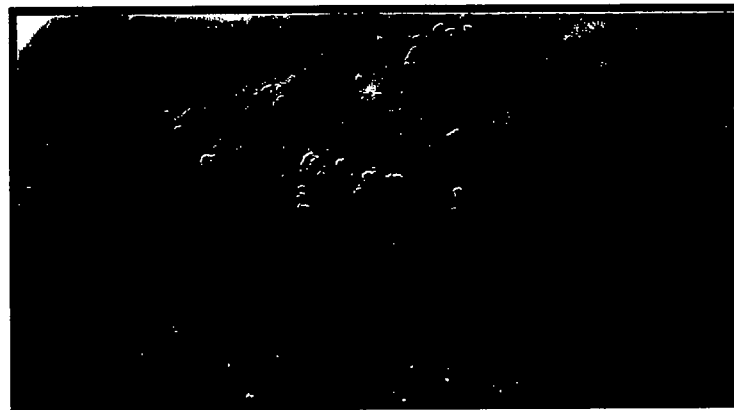
Cuadro IV. RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS GIRAS DE CAMPO.

Total de Giras realizadas.	Larvas L3 (cámaras de tierra)	Larvas L3 (- 80 ° C)	Larvas L2 (- 80 ° C)	Sueros (animales infestados)
9	389	130	22	70

Fuente: Eskildsen y Ying, 2011

- Del total de ganado bovino reconocimos ejemplares de diferentes razas y colores infestados con larvas de *D. hominis* en diferentes partes de la anatomía del animal (Figura 10 a, b, c y d).

Figura 10a. Bovino blanco de la raza cebú infestado con *Dermatobia hominis*.



Fuente: Eskildsen y Ying, 2011. (Finca de la Comarca Ngöbe Buglé)

Figura 10 b. Bovino de color pardo infestado con *Dermatobia hominis*.



Fuente: Eskildsen y Ying. 2011 (Finca de el Roble de Bugaba, Chiriquí)

Figura 10c. Bovinos de color blanco y marrón infestados con *Dermatobia hominis*.



Fuente: Eskildsen y Ying. 2011 (Finca de Río Sereno, Chiriquí)

Figura 10d. Bovino de color negro con infestación en el área lateral derecha.



Fuente: Eskildsen y Ying. 2011 (Finca de David Chiriquí)

- De los animales infestados por larvas de *D. hominis* se observó que el área mayormente afectada correspondía a la región lateral torácico-abdominal derecha (Figura 2 d) y en cuanto al color se observaron casos de tórsalo en diferentes razas y colores de ganado, sin embargo fue más frecuente en animales de color oscuro.
- Se encontraron animales afectados con gran cantidad nódulos causados por la presencia de múltiples larvas, los cuales presentan infecciones bacterianas produciéndose secreciones purulentas (Figura 11a y 11b).

Figura 11a. Nódulo con larvas de *Dermatobia hominis*.



Fuente: Eskildsen y Ying. 2011 (Finca en Comarca Ngöbe Buglé)

Figura 11b. Nódulo con larvas de *D. hominis* infectados.

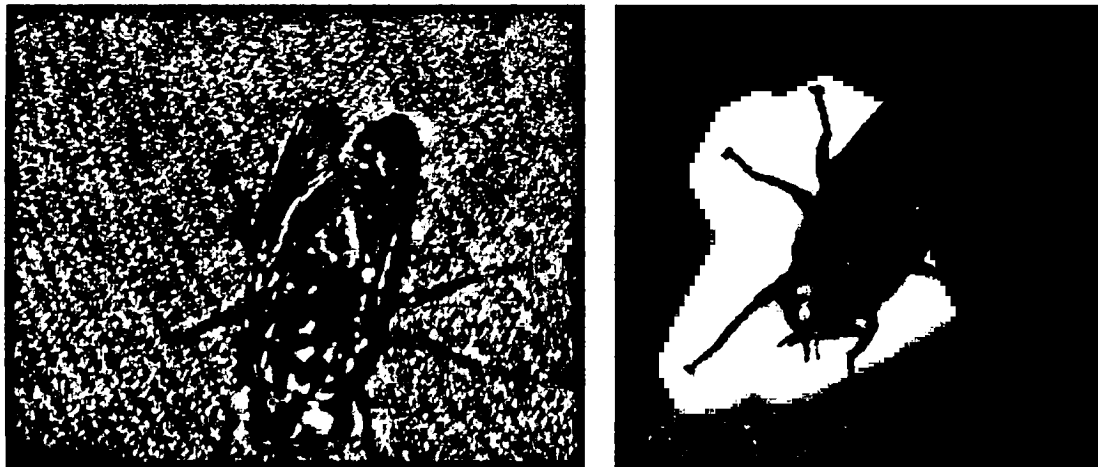


Fuente: Eskildsen y Ying. 2011 (Finca en Dolega Chiriquí)

5.2 CRIA DE *Dermatobia hominis*.

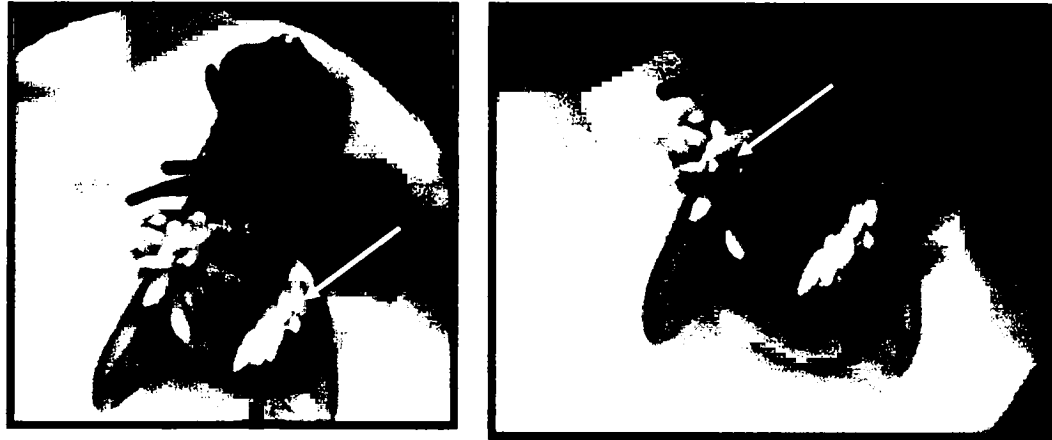
- La metodología implementada para el establecimiento de una cría en el laboratorio permitió el desarrollo adultos de *D. hominis*. Obtuvimos un total de 35 adultos entre machos y hembras de *D. hominis* (Figura. 12); a los cuales una vez apareados se les colocó dentro de las jaulas especímenes de *M. domestica* como transportadores foréticos.
- De los transportadores foréticos se obtuvo un total de 160 huevos de *D. hominis* (Figura 13). En cada transportador forético se pudo registrar un total de 40 a 50 huevos ubicados en el abdomen. Los cuales obtuvimos luego de una incubación de seis a siete días, L1 (Figura 14), las cuales fueron conservadas a -80 °C.

Figura12. Ejemplares adultos de *Dermatobia hominis*.



Fuente: Eskildsen y Ying. 2011

Figura13. Transportadores foréticos con huevos de *Dermatobia hominis*.



Fuente: Eskildsen y Ying. 2011

Figura 14. Larva infectante de primer de estadio emergiendo de un grupo de huevos.

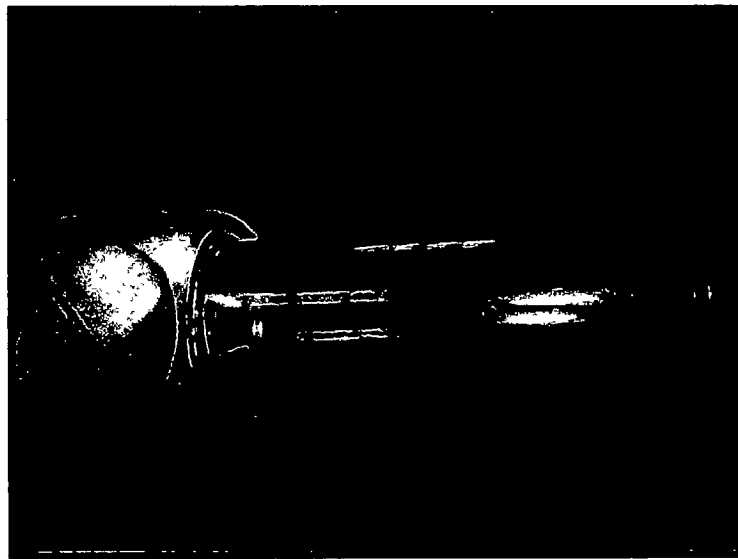


Fuente: Eskildsen y Ying. 2011.

5.3 ANALISIS DE PROTEINAS.

- Resultado del proceso de liofilización de las larvas de segundo y tercer estadio se obtuvieron más 500 mg de larvas liofilizadas para el estudio de electroforesis de proteínas (Figura 15).

Figura 15. Larvas liofilizadas de *Dermatobia hominis*.

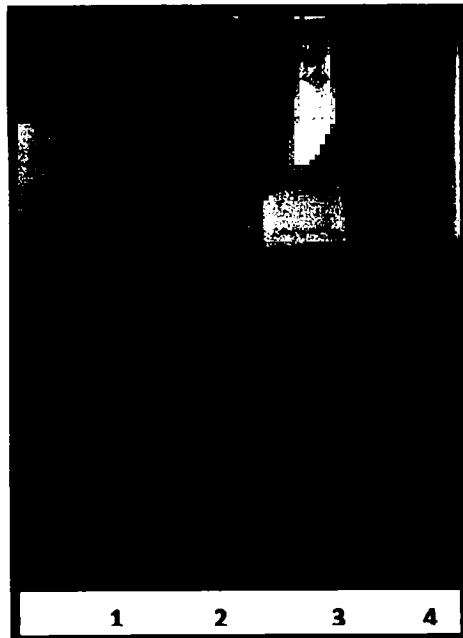


Fuente: Eskildsen y Ying, 2011

El patrón electroforético de las proteínas que constituyen el homogenado de las larvas, de cada uno de los estadios larvarios de *D. hominis*, fue obtenido mediante SDS-PAGE 12% y tinción con nitrato de plata y con Azul de Coomassie (Figura 16 y 17). Se observó

una mayor resolución y por ende un mejor análisis de las bandas en los geles teñidos con azul de Coomassie. En total se observaron 18 bandas bien definidas en las muestras diluidas, algunas de mayor grosor comparadas con otras de menor intensidad (Figura 17).

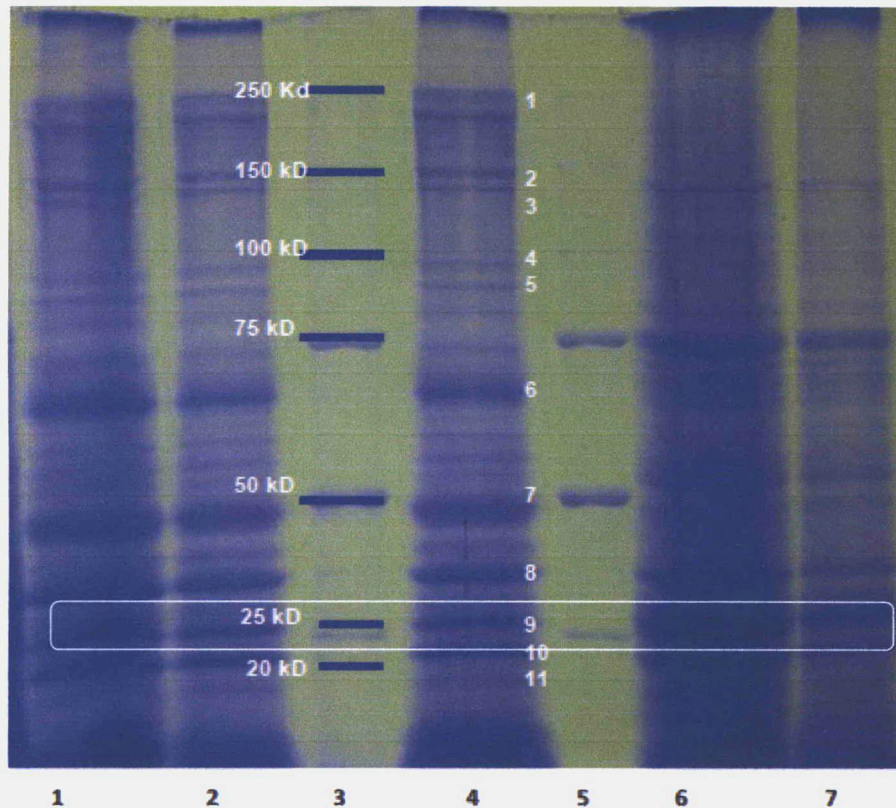
Figura 16. SDS-PAGE 12% de los homogenados de Larvas en tinción con nitrato de plata



Fuente: Eskildsen y Cedeño, 2011.

Carril 1: homogenado de L2 diluido 1:2, Carril 2: homogenado de L3 diluido 1:2, Carril 3: marcador de peso molecular, Carril 4: homogenado de L3 sin diluir.

Figura 17. Gel SDS-PAGE 12% de homogenado de larvas L2 y L3 de *D. hominis* teñido con azul de Coomassie.



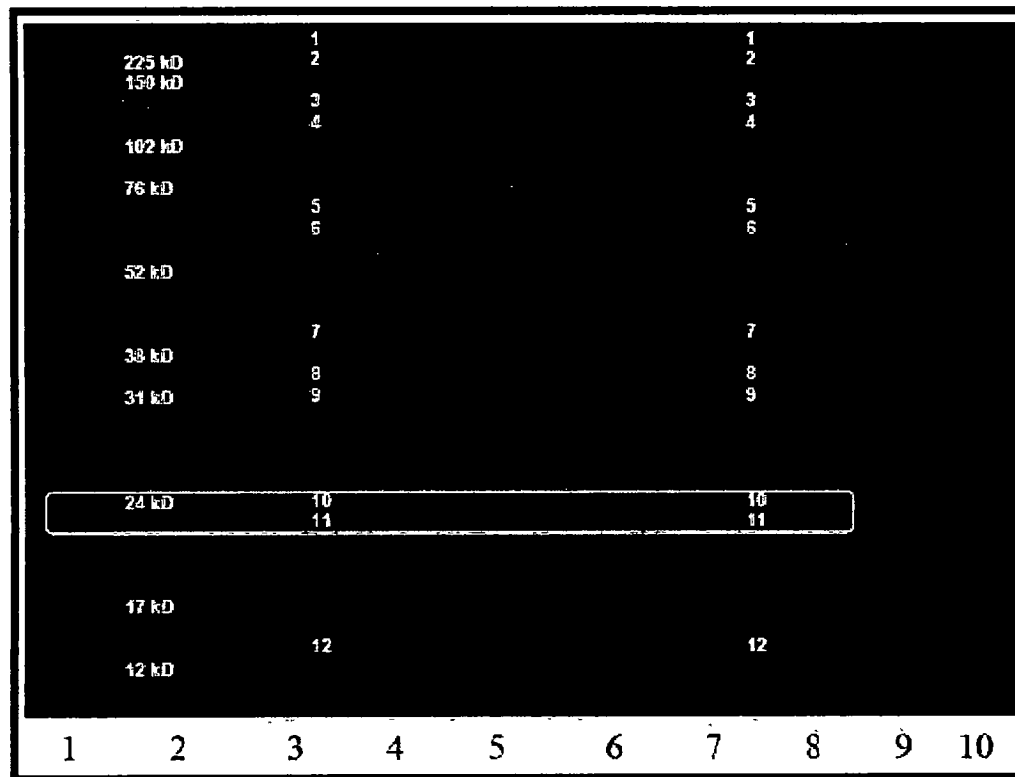
Fuente: Eskildsen y Cedeño, 2011.

Carril 1: homogenado de L3 sin diluir, **carril 2:** homogenado de L3 diluido 1:2, **carril 3:** **marcador de peso molecular,** **carril 4:** homogenado de L3 diluido 1:2, **carril 5:** **marcador de peso molecular,** **carril 6:** homogenado de L2 sin diluir, **carril 7:** homogenado de L2 diluido 1:2.

En el carril 2, 4 y 7 se observan los homogenados diluidos 1:2, con una mejor separación de las bandas. En el carril 4 se observa la numeración asignada a las bandas (P1-P11) seleccionadas para el análisis por espectrofotometría de masas. Debido a que inicialmente

no contábamos con el anticuerpo secundario anti-vaca, esta selección se hizo en base a las bandas más representativas presentes en los diferentes estadios larvales. Posteriormente se realizó otro análisis por espectrofotometría de masas en base a los resultados del western blot una vez se contó con el anti-vaca (www.abcam.com (anticuerpo policlonal de cabra anti vaca IgG HRP)).

Figura 18. Western blot de las proteínas de *Dermatobia hominis*.



Fuente: Eskildsen y Cedeño, 2011.

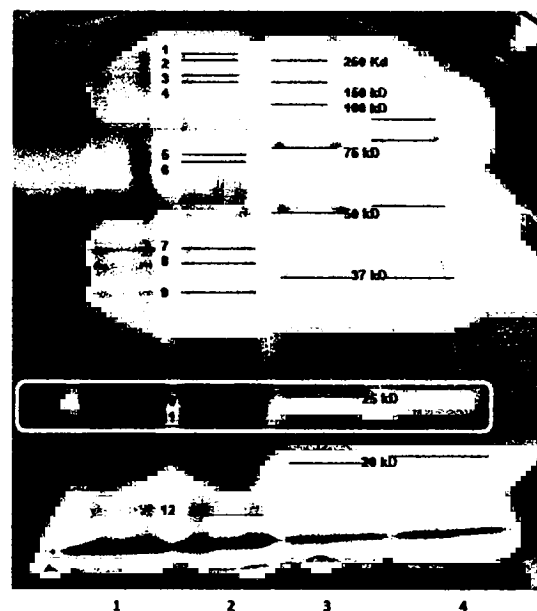
Carril 1: marcador de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers. GE Healthcare. Code: RPN800E), **carril 2 - 6:** homogenado de L2, **carril 7 - 10:** homogenado de L3.

En el resultado del western blot (Figura 18) se puede observar que casi todas las bandas de proteínas presentes en L2 , están presentes también en la larva de tercer estadio, con la diferencia de que algunas bandas pertenecientes a larvas de segundo estadio se observan con menor intensidad comparadas con L3 que muestran mayor reactividad hacia los sueros positivos. Las bandas más reactivas en la larva de segundo estadio fueron las de: 14 kDa, 25 kDa, 40 kDa y 140 kDa. Para L3 las bandas más reactivas fueron: 25 kDa, 36 kDa, 38 kDa y 50 kDa. En el carril 3 y 8 se muestra la numeración asignada (1-12) a cada una de las bandas seleccionadas para estudio por espectrofotometría de masas en base a inmunogenicidad de las proteínas al suero de animales infestados y a su presencia en los diferentes estadios larvales. Estas bandas se ubicaron y cortaron en el gel teñido con azul de Coomassie para su estudio por espectrofotometría.

Figura 19. SDS-PAGE 12% de homogenado de Larvas L2 y L3

Fuente: Eskildsen y Cedeño, 2011.

Carril 1: homogenado de L2, carril 2: homogenado de L3, carril 3: marcador de peso molecular (Precision plus proteína standards catálogo # 161-0363 Bio-rad)



Se comparó el patrón de bandas obtenidos en el inmunoblot con el patrón en SDS-PAGE y se identificaron las bandas que fueron reconocidas por el pool de sueros de bovinos infestados por *D. hominis*.

5.4 PRIMER ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS:

- Se obtuvieron las secuencias de huellas peptídicas y espectros (Figura 20) de diferentes proteínas presentes en las 11 bandas analizadas por espectrometría de masas. Logrando en ocasiones de cada banda un pool de péptidos pertenecientes a una gran cantidad de posibles proteínas identificadas por el MASCOT (Cuadro V). En total se logró relacionar los resultados de los péptidos identificados con más de 400 proteínas encontradas en las bases de datos, en su gran mayoría proteínas estructurales.

5.5 ANALISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS HUELLAS PEPTÍDICAS. HOMOLOGIA

- El análisis de las huellas peptídicas obtenidas identificó en la banda de aproximadamente 25 kDa (Cuadro V) una proteína de interés la cual según los resultados del MASCOT está presente en tres isoformas, dicha proteína es identificada como Arginina quinasa (ArK), Identificamos un total de 16 péptidos correspondientes a Arginina quinasa que representan el 57% de la secuencia

peptídica completa de la proteína. Se realizó un alineamiento múltiple de las tres formas de la proteína utilizando Clustal W, obteniéndose puntuaciones de 85 a 98 de identidad comparándose entre ellas (Cuadro VI). La secuencia de esta proteína no había sido descrita parcial o completamente en la literatura, ni en las bases de datos actuales en esta especie. Sin embargo ha sido identificada parcial o completamente en especies como: *Tesserocerus dewalquei*, *Schistocerca americana*, *Glossina morsitans* y *Drosophila melanogaster*, estas dos últimas con una alta homología taxonómica con la *D. hominis*.

Cuadro V. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR EL MASCOT, BANDA 9

(25 kDa)

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 157887504	41826	107	actin II [Plasmodiophora brassicae]
2. gi 156555799	42094	107	PREDICTED: actin-3-like isoform 1 [Nasonia vitripennis]
3. gi 1666228	41870	106	actin [Pisum sativum]
4. gi 325182101	42399	105	PREDICTED: similar to Actin putative [Albugo laibachii Nc14]
5. gi 112280267	32425	104	actin [Aegiceras corniculatum]
6. gi 350418628	33679	101	PREDICTED: actin, clone 403-like [Bombus impatiens]
7. gi 1703107	42121	100	RecName: Full=Actin-1
8. gi 319998245	41931	100	actin [Ananas comosus]
9. gi 217069854	23577	99	unknown [Medicago truncatula]
10. gi 66547471	42169	99	PREDICTED: actin, clone 403-like [Apis mellifera]
11. gi 307195447	42319	98	Actin, clone 403 [Harpegnathos saltator]
12. gi 187682686	41800	98	actin [Phyllostachys bambusoides]
13. gi 3183060	40333	96	RecName: Full=Arginine kinase; Short=AK
14. gi 328679756	27528	95	arginine kinase [Tesserocerus dewalquei]
15. gi 328679754	30411	94	arginine kinase [Tesserocerus ericius]
16. gi 226493810	41981	93	actin-2 [Zea mays]
17. gi 242039123	41897	93	hypothetical protein SORBIDRAFT_01q017380 [Sorghum bicolor]
18. gi 255635153	41898	93	unknown [Glycine max]
19. gi 93139007	29987	93	beta-actin [Crassostrea ariakensis]
20. gi 217072384	41866	93	unknown [Medicago truncatula]
21. gi 255115691	41867	93	actin 1 [Boehmeria nivea]
22. gi 115454971	42014	93	Os03g0718100 [Oryza sativa Japonica Group]
23. gi 226492795	41999	93	LOC100284092 [Zea mays]
24. gi 224532368	41983	93	actin [Carica papaya]
25. gi 315613886	41960	93	actin 2 [Morus alba]
26. gi 346683577	41863	93	actin 1 [Mangifera indica]
27. gi 1168324	41836	92	RecName: Full=Actin-3
28. gi 32186894	41899	92	actin [Gossypium hirsutum]
29. gi 6683504	41931	92	actin isoform B [Mimosa pudica]
30. gi 34541966	41885	92	actin [Trifolium pratense]
31. gi 301131212	41983	92	actin [Cicer arietinum]
32. gi 157887507	41876	92	actin I [Plasmodiophora brassicae]
33. gi 37694465	41992	92	actin [Lingulodinium polyedrum]
34. gi 166582	42022	92	actin-1 [Arabidopsis thaliana]
35. gi 328869097	42060	92	actin [Dictyostelium fasciculatum]
36. gi 326671940	316661	91	PREDICTED: dynein heavy chain 1, axonemal [Danio rerio]
37. gi 326488133	41849	91	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
38. gi 323450901	42677	91	actin A [Aureococcus anophagefferens]
39. gi 323452389	42663	91	actin A [Aureococcus anophagefferens]
40. gi 290997442	527294	91	hypothetical protein NAEGRDRAFT_55628 [Naegleria gruberi]
41. gi 318083438	15305	90	actin [Corylus heterophylla]


```

gi|3183060          AGKFNLQVRGSGTGEHTEAEGGVYDISNKRRMGLTEYDAVKEMNDGILELIKIEGSL 356
* * * * *
gi|328679756       57% de cobertura.
gi|328679754       52% de cobertura.
gi|3183060         40% de cobertura.

```

Cuadro VI. ANALISIS DEL CLUSTAL TRES FORMAS DE ArK.

ArK Secuencia 1: gi|3183060 **356 aa** *Schistocerca americana*

ArK Secuencia 2: gi|328679756 **242 aa** *Tesserocherus dewalquei*

ArK Secuencia 3: gi|328679754 **267 aa** *Tesserocherus dewalquei*

Análisis de las alineaciones por pares:

Secuencia (1:2) alineada. Puntuación: 85

Secuencia (1:3) alineada. Puntuación: 86

Secuencia (2:3) alineada. Puntuación: 98

5.6 RESULTADOS DEL SEGUNDO ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

DE MASAS:

- Las masas identificadas en cada una de las 12 bandas inmunogénicas (seleccionadas a partir del resultado de inmunoblot) se correspondieron con un sin número de proteínas presentes en las distintas bases de datos de proteínas.

- En la banda W 11 de aproximadamente 25 kDa presente en los diferentes estadios larvales, se identificaron secuencias peptídicas correspondientes a la proteína Arginina quinasa de *Drosophila melanogaster*.
- Se realizó un alineamiento múltiple de esta forma de arginina quinasa con las tres formas identificadas anteriormente del primer análisis de masas. (Figura 21), en rojo se muestra la secuencia exacta de los péptidos identificados, obteniéndose valores de 85 a 98 de identidad cuando se comparan entre sí. (Cuadro VII).

Figura 22. Alineamiento múltiple de cuatro secuencias consenso de ArK.

```

gi | 328679756 -----
gi | 328679754 -----
gi | 24661336 MFALWYLTFVAVDEIRKRLAWLFSSNKPAAPALDNKPANPAPAKESAPAPAPAPTPKPAVV 60
gi | 3183060 -----

gi | 328679756 -----
gi | 328679754 -----
gi | 24661336 PPAPKPDPPKPAPAVAKPTPVVVPATAPAPPKEEPAPKPKPEPVVPSVVAPPKTPPPAK 120
gi | 3183060 -----

gi | 328679756 -----
gi | 328679754 -----
gi | 24661336 PSSPPKQADKMPIPLPKSLTEANTNGQNGNAANGNVDELVFGGQQAQEKVLPAAKEASND 180
gi | 3183060 -----

gi | 328679756 -----
gi | 328679754 -----
gi | 24661336 FIKGETNAFIQSIKEAQQLGGERKQDTMVDAAVLAKLEEGYAKLAASDSKSLKKYLTREV 240
gi | 3183060 -----MVDAAVLEKLEAGFKKLEASDSKSLKKYLTREV 34

gi | 328679756 -----KGLA 4
gi | 328679754 -----DAESYSVFAALFDPIIEDYHKGFG 24
gi | 24661336 FDNLKNKVTPTFKSTLLDVIQSGLENHDSGVGIYAPDAEAYTVFADLFDPIIEDYHGGFK 300
gi | 3183060 FDKLTKKTPSFGSTLLDCIQSGLENHDSGVGIYAPDAEAYTVFADLFDPIIEDYHGGFK 94
* ;

gi | 328679756 RXDKHPAKNWGDVSVFGNLDPNGEFVVSTRVRCGRSLEGYPFNPCLTEAQYKEMEQQVSS 64
gi | 328679754 KNDKHPAKNWGDVSVFGNLDPNGEFVVSTRVRCGRSLEGYPFNPCLTEAQYKEMEQQVSS 84
gi | 24661336 KTDKHPASNFGDVSTFGNVDPTNEYVISTRVRCGRSMQGYPFNPCLTEAQYKEMESKQVSS 360

```


Se realizó un BLAST de la secuencia de arginina quinasa con mayor puntaje (gi|328679756) versus las proteínas del *B. taurus* disponibles en el NCBI (Figura 24), con el objetivo de seleccionar regiones no idénticas a alguna proteína del *B. taurus*. Se encontró a la creatina quinasa (gi: 60097925) como la proteína con mayor homología; seguidamente se realizó un alineamiento múltiple de estas dos proteínas (Cuadro VII) obteniéndose un valor del 41%.

Figura 23. Alineamiento múltiple de Creatinina del *Bos taurus* (gi: 60097925) vs Arginina kinasa de *Tesseroerus ericius* (gi|328679756).

```

creatine      MPFGNTHNKHKLNFKAEEYDLSKHNHMAKALTLEIYKKLRDKETPSGFTLDDVIQTG 60
arginine      -----

creatine      VDNPGHPFIMTVGCVAGDEESYTVFKDLFDPIIQDRHGGFKPTDKHKTDLNHENLKGDD 120
arginine      -----KGLARXDKHP-AKNWGDVSVFGN 22
                * :   * * *   *   : : . . :

creatine      LDPN--YVLSSRVRTGRSISKGYALPPHCSRGERRAVEKLSVEALNSLTGEFKGKYYPLKS 178
arginine      LDPNGEFVVS TRVRCGRSLEGYPFNPCLTEAQYKEME QKVSSTLSGLEGELKGT FYPLTG 82
                ****  :*:*:***  ***:*. : *  :. : : :*:  : : : * * : * : * : * :

creatine      MTEQEQQLIDDHFLFDKPVSPLLASGMARDWPDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVI 238
arginine      MSKD VQQKLI DDHFLFKE -GDRFLQAANACRFWPSGRGIYHNENKTFLVWCNEEDHLRII 141
                * : : : * * : * * * * * : . . : * * : . * * * . * * : * * : * * : * * : * * : *

creatine      SMEKGGNMKEVFRRFCVGLQKIEEIFKKAGHPFMWNEHLGYVLTCP SNLGTGLRGGVHVK 298
arginine      SMQKGGDLGEVYRRLVTAVNEIEKR-----IPFSHHDLRGFLTFCPTNLGTTVRASVHIA 196
                * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *

creatine      LAHLSK-HPKFEEILTRLRLQKRGTTGGVDTAAVGSVFDVSNADR LGSSEVEVQQLVVDGV 357
arginine      VPKLAANKAKLEEVA AKYNLQVRGTRGEHTEAEGGIYDISNKRRMG----- 242
                : . : : :  : . : * * : : : . * * * * * . * * * * : * : * * * * *

creatine      KLMVEMEKKLEKQSIDDMIPAQK 381
arginine      -----

```

Cuadro VIII. ANALISIS DEL CLUSTAL DE CREATINA DEL *Bos taurus* (gi: 60097925) VS ARGININA (gi|328679756)

Secuencia 1: gi: 60097925 381 aa

Secuencia 2: gi|328679756 242 aa

Análisis de las alineaciones por parejas

Secuencia (1:2) alineada. Puntuación: 41

5.7 PRODUCTOS DEL ANALISIS BIOINFORMATICO.

REGIONES ANTIGENICAS

Con base a los resultados de análisis bioinformáticos con la herramienta ANTIGENIC sumado al análisis los alineamientos múltiples se seleccionaron dos secuencias peptídicas (Cuadro IX).

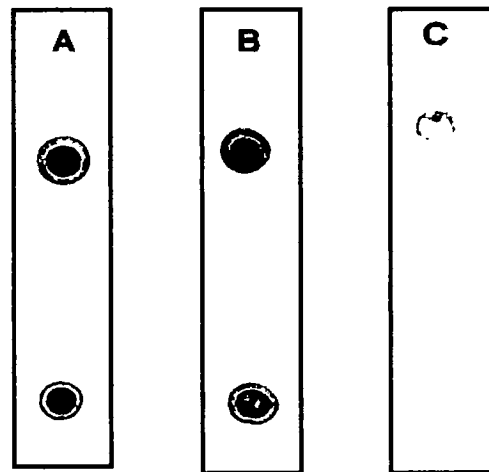
CUADRO IX. SECUENCIAS PEPTIDICAS SELECCIONADOS

Péptido	Secuencia de a.a	Longitud
Péptido 1	LGFLTFCPTNLGT	Péptido de 13 a.a
Péptido 2	NEIEKRVPFSHDDRLG	Péptido de 16 a.a

5.8 DOT BLOT

Se obtuvo un péptido sintético con la secuencia LGFLTFCPTNLGT. Se realizó un dot blot utilizando sueros de animales infestados y suero de animales sin previo contacto con *D. hominis*. Los resultados mostraron la presencia de anticuerpos presentes en los sueros de animales infestados (Figura 24 A y B) hacia el péptido sintético, resultados estos contrarios a los observados con los sueros de animales no infestados (Figura 24 C)

Figura 24. Inmuno detección del péptido sintético (dot blot)



Tirilla A y B: Péptidos sintético expuesto a pooles de sueros de bovinos infestados con *D. hominis*. **Tirilla C:** Péptidos sintético expuesto a pooles de sueros de bovinos no infestados con *D. hominis*

VI. DISCUSION

En la actualidad el control de las miasis se ha logrado principalmente por estrategias como el uso de insectos estériles (gusano barrenador) y con el uso de agentes químicos como es el caso del tórsalo, acarreando problemas de seguridad alimentaria y potenciales casos de resistencia a estos químicos.

Los avances científicos en las áreas de la biotecnología y la inmunología han estimulado la proliferación de estudios sobre el control de las enfermedades parasitarias a través de estrategias vacunación (Smith, 2006; Crapton, 2007; Fernandes et al., 2012)

En nuestro estudio los resultados obtenidos del análisis electroforético (SDS-PAGE) de los homogenados de L2 y L3 revelaron la presencia de al menos 18 fracciones proteicas con patrones distintos en el tamaño e intensidad de las fracciones, que sugieren diferencias en su composición.

En nuestros resultados de la inmunodetección las fracciones proteicas más reactivas en L2 fueron las de: 14 kDa, 25 kDa, 40 kDa y 140 kDa. En L3 las bandas más reactivas fueron las de 25 kDa, 36 kDa, 38-40 kDa y 50 kDa. La banda de 50 kDa, no mostró

reactividad en la búsqueda de anticuerpos anti-L2, pero en cambio sí ante la banda de 25 kDa.

Las diferencias de reactividad en las fracciones proteicas según el estadio larval podrían estar directamente relacionados con los títulos de anticuerpos más bajos ante antígenos de L2 dirigido a esas fracciones.

Estas observaciones pueden sugerir un posible aumento o disminución de la expresión de ciertos genes durante el crecimiento larvario, relacionados con componentes antigénicos que se liberan durante el crecimiento y metamorfosis, resultados similares fueron encontrados por Fernández et al. (2012).

La intensidad del reconocimiento de cada fracción puede estar asociado a una mayor producción de anticuerpos en el huésped, como se ha demostrado por pruebas de ELISA en animales inmunizados, De igual manera puede ser el resultado de una mayor actividad metabólica de L3, lo cual está relacionada con la intensidad del crecimiento de las larvas, información ya sugerida anteriormente por Tabouret et al. (2003).

La banda antigénica descrita de 25 kDa se observó marcadamente en los estadios larvales estudiados. En dos ocasiones los análisis por espectrometría de masas (MS) coincidieron en detectar una proteína conocida como arginina quinasa (ArK).

Del análisis de los resultados de MS se identificaron cuatro (4) posibles secuencias de esta proteína; la cual no había sido descrita anteriormente en *D. hominis* y por lo tanto no se encontraba en los bancos de datos para esta especie.

La comparación de estas secuencias peptídicas (BLAST) con las bases de datos encontró una alta homología con la ArK presente en organismos como: *Tesserocerus dewalquei*, *Schistocerca americana*, *Drosophila melanogaster* *Glossina morsitans* y otras especies filogenéticamente relacionadas.

En nuestro estudio el alineamiento múltiple de las secuencias peptídicas de ArK detectadas por el análisis de masas muestran homologías entre las cuatro formas de la enzima de hasta de 98 %. A partir de estos resultados podemos deducir que *D. hominis* presenta varias formas de la proteína, posiblemente codificados por un solo gen, como se ha reportado en *D. melanogaster*.

Arginina quinasa (ArK) es la única fosfágeno quinasa de la mosca de la fruta, *D. melanogaster*, está presente en todo el ciclo de vida de la mosca. La mayor parte de la actividad de ArK se encontró en los músculos del tracto digestivo, del cerebro, los ganglios y los órganos reproductores, la enzima se presenta seis transcritos producidos de un solo gen (Ghosh, 2010).

El péptido sintético de 13 aminoácidos (LGFLTFCPTNLGT) seleccionado por el resultado de estudios bioinformáticos en la búsqueda de epítopes antigénicos, fue probado mediante un dot blot frente a grupos de sueros de animales infestados naturalmente.

Los resultados de la inmunodetección (dot blot) mostraron una fuerte reacción antígeno-anticuerpo, lo que sugiere que el antígeno seleccionado puede presentar buenas características antigénicas ya que fue reconocido por animales expuestos a la infestación natural.

Fernandes et al., (2012) describieron la secuencia de una proteína de 50 kDa (nombrada Dh50). Esta proteína fue seleccionada, purificada, y administrada a los animales anteriormente libres de ectoparásitos. Después de la inmunización, expusieron el ganado a infestación de campo, obteniendo resultados con 91% de protección, lo que indica que el control del tórsalo puede lograrse a través de la vacunación. El extracto crudo de L3 también produjo inmunidad similar a la observada en el grupo que recibió la proteína Dh50.

El uso de este tipo de inmunizaciones basadas en extractos totales tiene amplias desventajas desde el punto de vista comercial, ya que requiere la obtención de grandes cantidades de larvas para la inmunización de animales. (Gingrich, 1982).

Taboured (2001) reportó que una proteína clonada de *Hypoderma* spp dio un 90% de protección contra infestaciones posteriores, dato que sugiere la posibilidad de utilizar una estrategia similar para el control del tórsalo ya que *D. hominis* e *Hypoderma* spp pertenecen a la misma familia y tienen características similares.

Nuestros resultados y el análisis de publicaciones relacionadas nos permiten sugerir la realización de una segunda fase de inmunización con este péptido sintético. El objetivo sería demostrar experimentalmente la eficacia del mismo como una posible estrategia inmunológica para el control del tórsalo.

VII. CONCLUSIONES

- A pesar del control químico, la infestación por *D. hominis* continua siendo un problema importante en Panamá; afectando en su mayoría a pequeños ganaderos de todas las provincias.
- La metodología con las modificaciones empleadas para la obtención de adultos y larvas de primer estadio de *D. hominis* fue exitosa.
- De acuerdo al análisis electroforético (SDS-PAGE) en los homogenados proteicos de las larvas L2 y L3 existen al menos 18 fracciones principales de patrones distintos en tamaño e intensidad.
- Existen diferencias antigénicas en la composición y concentración de las fracciones proteicas de las larvas en sus diferentes estadios.
- Las fracciones antigénicas presentes en las larvas de tercer estadio son reconocidas con mayor reactividad por los sueros de bovinos naturalmente infectados. Esta mayor reactividad puede estar asociado a altos títulos de anticuerpos específicos, producto de la liberación temprana de estos antígenos.

- Las fracciones más reactivas en la larva de segundo estadio son las fracciones de: 14 kDa, 25 kDa, 40 kDa y 140 kDa. En las larvas de tercer estadio son las de: 25 kDa, 36 kDa, 38-40 kDa y 50 kDa.
- Se identificaron secuencias peptídicas homologas a la arginina quinasa (ArK). Los análisis bioinformáticos demuestran que *D. hominis* presenta al menos cuatro (4) formas de la proteína.
- El péptido sintético de 13 aminoácidos (LGFLTFCPTNLGT) seleccionado por el resultado de estudios bioinformáticos en búsqueda de epitopes antigénicos, mostró mediante un dot blot ante grupos de sueros de animales infestados naturalmente, una fuerte reacción antígeno-anticuerpo

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos para probar la efectividad del péptido sintético por pruebas de inmunización en animales para conocer la eficacia del péptido como posible estrategia inmunológica para el control del tórsalo.
- Probar otras secuencias peptídicas como posibles dianas para la formulación de una vacuna basada en polipéptidos.
- Se sugiere como tercera fase la extracción de ARNm de las larvas de *D. hominis* para la construcción de una biblioteca de ADNc con miras a realizar un inmunocribado y detectar así nuevas dianas para la producción de proteínas recombinantes capaces de inducir algún tipo de respuesta inmune protectora, útil en el control o prevención de la infestación con tórsalo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AIELLO, S., MAYS, A., 1998. Parasitic Skin Diseases. In: Aiello, S. (Ed.), The Merck veterinary manual, National Publishing, Philadelphia, pp. 631-632.

ALKORTA GURRUTXAGA, M., BERISTAIN REMENTERIA, X., CILLA EGUILUZ, G., TUNEU VALLS, A., ZUBIZARRETA SALVADOR, J., 2001. *Cordylobia anthropophaga* cutaneous myiasis. Rev Esp Salud Publica 75, 23-29.

ANGULO-VALADEZ, C.E., CEPEDA-PALACIOS, R., JACQUIET, P., DORCHIES, P., PRÉVOT, F., ASCENCIO-VALLE, F., RAMIREZ-ORDUÑA, J.M., TORRES, F., 2007. Effects of immunization of Pelibuey lambs with *Oestrus ovis* digestive tract protein extracts on larval establishment and development. Veterinary Parasitology 143, 140-146.

ARDILA, C. 2006. Tesis: Comparación de los Tratamientos para el Control de “*Dermatobia hominis*” en la Finca de la Cañada en el Municipio de Teruel Huila. Fundación Instituto Colombiano de Homeopatía “Luis G. Páez” Departamento de Medicina Veterinaria. Bogota Colombia.

BARSALLO A., GONZÁLEZ A., LEÓN C., VÁSQUEZ E., MORENO H., MENDIETA R., 2005. Tesis: Impacto Económico y Social del Tórsalo. Facultad de Economía. Universidad de Panamá

BENAVIDES, E., 1996. Introducción al desarrollo de estudios epidemiológicos sobre las enfermedades hemoparasitarias de los bovinos en Colombia. In, Memorias Primer Curso Nacional sobre Metodologías de Investigación en Parasitología Bovina, Colombia, pp. 26-33.

BENAVIDES, E., 1998. El uso de trampas para estimar la densidad poblacional de moscas del ganado. In: CORPOICA-CEISA (Ed). pp. 5.

BETANCOURT, A., 1995. Situación actual de las garrapatas en Colombia. In, Foro Regional del Magdalena Medio sobre La situación actual de las garrapatas y las moscas en la ganadería, Aprovet, Puerto Salgar (Cundinamarca).

BRANT, M.P.R., GUIMARÃES, S., SOUZA-NETO, J.A., RIBOLLA, P.E.M., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., 2010. Characterization of the excretory/secretory products of *Dermatobia hominis* larvae, the human bot fly. *Veterinary Parasitology* 168, 304-311.

BOURDEAU, P. 2000. Myiasis a *Dermatobia hominis*. Philadelphia. 901-906p.

COGLEY, T.P. & M.C. COGLEY. 1989. Morphology of the eggs of the human bot fly, *Dermatobia hominis* (L. Jr.) (Diptera, Cuterebridae) and their adherence to the transport carrier. *Int'l. Insect Morphol. & Embryol.* 18(5/6): 239-248.

CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO, F. A.; MARTÍNEZ, A. R.; SÁNCHEZ, M. C.; HERNÁNDEZ, S.; NAVARRETE, I.; DIEZ, P.; QUIROZ, H.; CARVAHLO, M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. Mc Graw Hill Interamericana de España, S. A. U.

CRAMPTON, A., VANNIASINKAM, T., 2007. Parasites Vaccines: The new generation. *Infection, Genetics and Evolution* 7, 664-673.

DE ROMÁN, M., QUIJADA, E., GRACÍA, J., SIMONES, M., HERMOSO, D., NYNLHE, K., 2004. Miasis Furuncular Produced by *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae) Larvae in Humans: A Report of Three Cases Córdoba. *Kasmera* 32.

ELKIN, F., CORTÉS, V. 2008. The Problem of Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), In Colombia. *Rev.MVZ*.

FERNANDES, N.M., ZANATA, S., RONNAU, M., SOCCOL, C., PANDEY, A., THOMAZ-SOCCOL, V., 2012. Production of Potential Vaccine Against *Dermatobia hominis* for Cattle. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 412-424.

FORERO, E., CORTÉS, J., VILLAMIL, L., 2008. The problem of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), in Colombia. Revista MVZ Córdoba 13, 1400-1414.

GARCIA, I. 2006. TESIS: Determinar la efectividad del nosodes homeopático en el control del *Dermatobia hominis* (tórsalo) en la unidad de producción Balcar en el departamento de Estelí. Ismael Efrén García Herrera. Universidad Nacional Agraria Una, Facultad de Ciencia Animal.

GINGRICH, R.E., 1982. Acquired resistance to *Hypoderma lineatum*: comparative immune response of resistant and susceptible cattle. Vet Parasitol 9, 233-242.

GRISI, L., ET AL, 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A Hora Veterinária 21, 8-10.

HARUKI, K., HAYASHI, T., KOBAYASHI, M., KATAGIRI, T., SAKURAI, Y., KITAJIMA, T., 2005. Myiasis with *Dermatobia hominis* in a Traveler Returning from Costa Rica: Review of 33 Cases Imported from South America to Japan. Journal of Travel Medicine 12, 285-288.

HERRERA, I., 2006. Determinar la efectividad del nosodes homeopático en el control del *Dermatobia hominis* (tórsalo) en la unidad de producción Balcar en el departamento de Estelí. Universidad nacional Agraria, Managua.

JOHN, D., HENDERSON, D., 2006. Features of a *Dermatobia hominis* Third Stage Larva Recovered from a Patient in Tulsa, Oklahoma. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science 86, 85-86.

JIMÉNEZ, J. 2000. Manejo integrado de moscas comunes. En Foro Regional del Magdalena Medio sobre " La Situación de las Garrapatas y Moscas en la Ganadería". Puerto Salgar, mayo 19-2000. 147-163p.

LELLO, E., PERACOLI, M.T.S., 1993. Cell-mediated and humoral immune responses in immunized and/or *Dermatobia hominis* infested rabbits. Veterinary Parasitology 47, 129-138.

MADRIGALL, A., VERGARA, R., 1995. El manejo integrado de moscas en explotaciones pecuarias. In, Foro Regional del Magdalena. Mediosobre " La Situación de las Garrapatas y Moscas en la Ganadería, APROVET, Puerto Salgar, pp. 170-182.

MATEUS VALLES, J., 1997. El nucho y su ciclo de vida. Revista ICA (Colombia) 2, 3-19.

MERINO, F.J., CAMPOS, A., NEBRED, T., CANOVAS, C., CUEZVA, F., 2000. Cutaneous myiasis by *Sarcophaga* sp. Enferm Infecc Microbiol Clin 18, 19-21.

MOIRE, N., 1998. Hypodermin A and Inhibition of Lymphocyte Proliferation. Parasitology Today 14, 455-457.

MOISSANT ET AL., 2004. Miasis Furuncular *Produced by Dermatobia hominis (Diptera: Oestridae) Larvae in Humans: A Report of Three Cases* Córdoba. Kasmera 32(1): 7 – 11.

MOLANO, F. Y YING, A., 2005. Tesis: Ecoepidemiología de las miasis humanas en Panamá. Programa Centroamericano de Maestría en Entomología. Universidad de Panamá.

MORIENA, R., RACIOPPI, O., ALVAREZ, J., 2009. Efecto curativo y preventivo de una Ivermectina Larga Acción contra la URA (*Dermatobia hominis*) en bovinos naturalmente infestados, en la provincia de Corrientes: Argentina. Universidad Nacional del Nordeste.

MOURIER, H., BANEGAS, A.D., 1970. Observations on the oviposition and the ecology of the eggs of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorik Forening 133, 59-68.

MUHARSINI, S., SUKARSIH, RIDING, G., PARTOUTOMO, S., HAMILTON, S., WILLADSEN, P., WIJFFELS, G., 2000. Identification and characterisation of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*. International Journal for Parasitology 30, 705-714.

NEEL, W.W., URBINA, O., VIALE, E., DE ALBA, J., 1955. Ciclo biológico del tórsalo *Dermatobia hominis*, L. Jr en Turrialba, Costa Rica. Turrialba 5, 91-104.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C., SEQUEIRA, J.L., SCHMITT, F.L., DE LELLO, E., 1996. Histological and immunological reaction of cattle skin to first-instar larvae of *Dermatobia hominis*. Med Vet Entomol 10, 323-330.

OTRANTO, D., 2001. The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies. Trends in Parasitology 17, 176-182.

OTRANTO, D., STEVENS, J.R., 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. International Journal for Parasitology 32, 1345-1360.

PÉREZ, E., 2002. Valoración económica y social del efecto del tórsalo en América Central. In: (IICA), I.I.d.C.p.l.A. (Ed). Mimeo.

PEÑA ET AL., 1980. Enfermedades de los animales domésticos en Colombia. Situación por regiones naturales. Documento de Trabajo Número 20. ICA. División de Ciencias Veterinarias.

RIBEIRO, L. 2009. Tesis: Susceptibilidad de Camundongo e Antigenicidad dos Productos de Secrecao excrecao de larvas. Universidade Federal de Minas Gerais. Brasil
Sandeman, R.M., Feehan, J.P., Chandler, R.A., Bowles, V.M., 1990. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. International Journal for Parasitology 20, 1019-1023.

SMITH, W.D., ZARLENGA, D.S., 2006. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. Veterinary Parasitology 139, 347-359.

SHELL, A. 2002. Diagnóstico, epidemiología y control de enfermedades parasitarias. Colombia. Acribia. 2002. 49-53p.

SANDEMAN ET AL., 1990. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. Int. J. Parasitol. 20, 1019-1023.

TABOURET, G., JACQUIET, P., SCHOLL, P., DORCHIES, P., 2001. *Oestrus ovis* in sheep: relative third-instar populations, risks of infection and parasitic control. *Vet. Res.* 32, 525-531.

TABOURET, G., BRET-BENNIS, L., DORCHIES, P., JACQUIET, P., 2003. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Veterinary Parasitology* 114, 305-314.

TELLAM, R.L., EISEMANN, C.H., PEARSON, R.D., 1994. Vaccination of sheep with purified serine proteases from the secretory and excretory material of *Lucilia cuprina* larvae. *International Journal for Parasitology* 24, 757-764.

THANAPATCHAROEN, A., PREATIVATANYOU, K., PHUMEE, A., ET AL, 2012. Cutaneous myiasis caused by *Dermatobia hominis* in Thai travelers: first report in Thailand. *Asian Biomedicine* 6, 487-494.

VERGARA, R. 2000. Control biológico en programas de manejo integrado de moscas en la producción animal. En: *Memorias I curso-taller internacional de control biológico. CORPOICA.* pp. 273 – 285

VIJAY, K., KALAIPOS, P., MAKKAR, A., ENGBRECHT, B., AGARWAL, A., 2012. HUMAN botfly (*Dermatobia hominis*) larva in a child`s scalp mimicking osteomyelitis. *Emergency Radiology*, 1-3.

X. ANEXOS

10.1 TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA.

- Solución fijadora 10 minutos en agitación.
- Retirar la solución fijadora.
- Solución de nitrato de plata 10 minutos
- Retirar solución de nitrato de plata.
- Lavar con H₂O destilada.
- Solución reveladora en agitación hasta que aparezcan las bandas.
- Retirar la solución reveladora.
- Calcular los pesos moleculares.

10.2 PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA.

Gel separador:

Reactivo	7.5%	10%	12%	15%
Acrilamida 30%	2.5 ml	3.25 ml	3.9 ml	4.875 ml
H ₂ O d	5 ml	4.05 ml	3.45 ml	2.475 ml
Tris 1.5 M ph 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
10% APS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Gel Concentrador:

Reactivo	Volumen
Acrilamida 30%	0.435 ml
H ₂ O d	1.8 ml
Tris 1.5 M ph 8.8	0.313 ml
10% SDS	0.025 ml
10% APS	0.025 ml
TEMED	10 µl

10.3 PREPARACIÓN DE BUFER DE MUESTRA (SAMPLE BUFFER REDUCTOR)

Reactivo	Volumen
DTT	0.125 mg
H2O d	3.6 ml
Tris 0.5 M ph 6.8	1 ml
10% SDS	1.6 ml
Glicerol	0.8 ml
BPB	Unos granitos

Gel no reductor no lleva DTT

10.4 SOLUCIONES. TINCIÓN DE AZUL DE COOMASSIE:

Azul de Comassie 0.025g

40 ml Metanol

10 ml Ácido acético

50 ml H2O destilada

Solución para desteñir:

10 ml de Propanol

10 ml de Ácido Acético

80 ml de H2O

Colocar el gel con el tinte en rotación, mas o menos por una hora.

Descartar el tinte

Desteñir en agitación por 5 minutos. (Repetir hasta que sea necesario)

Agregar H2O.

10.5 BUFFER DE CORRIDA.

	5 X	5 X	1 X
TRIS base	3.02 g	15.1 g	3.03 g
Glicina	14.4 g	72. g	14.4 g
SDS	1 g	5 g	1 g
Vol. Final	200 ml	1000 ml	1000 ml

10.6 EXTRACCION DE ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit: DNeasy Blood & Tissue

Todos los pasos de centrifugación fueron realizados a temperatura ambiente (15-25 °C)

En los pasos de vortex se realizaron por 5-10 segundos.

Procedimiento.

- Se pesó 15 mg del tejido de la larva conservada en RNA later.
- Se agregó el tejido en un tubo de 1.5 ml
- Se añadió 180 µl de buffer ATL
- Se añadió 20 µl de proteinasa K y se mezcló con el vortex.
- Se incubó por 56° overnight. hasta que el tejido quedo totalmente lisado. Se le dio vortex durante la incubación ocasionalmente.
- Se dio vortex por 15 segundos

- Se añadió 200 μ l de búfer AL.
- Se mezcló y se dio vortex.
- Se añadió 200 μ l de etanol (96-100%)
- Se mezcló y dio vortex por 10-20 segundos mínimo.
- Se pipeteó 2 ml de la mezcla incluyendo cualquier precipitado y se colocó dentro de la columna.
- Se centrifugó a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto.
- Se descartó todo el filtrado del tubo
- Se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 ml.
- Se agregó 500 μ l de buffer AW1.
- Se centrifugó por 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm)
- Se descartó el filtrado.

- Se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 ml.
- Se agregó 200 μ l de buffer AW2.
- Se centrifugo por 3 minutos a 20,000 x g (14000 rpm).
- Se descartó el filtrado.
- Con el objetivo de eliminar el etanol se volvió a centrifugar la columna por 1 minuto a 20,000 x g (8000 rpm) el eluido.
- Se agregó 100 μ l de buffer AE y se incubo a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm.
- Se agregó 100 μ l de buffer AE y se incubo a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm.
- El ADN se conservó a menos 20°C

10.7 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.

Para la extracción de ARN total se utilizó el kit RNeasy.

Procedimiento:

- Se inició el proceso con la muestra congelada, se colocó la misma a temperatura ambiente para descongelarla y luego se extrajo con unas pinzas limpias el tejido sumergido en RNA later y se removió cualquier cristal que se halla formado.
- Se cortó el tejido con un bisturí en una superficie limpia.
- Se pesó 15 mg de tejido.
- Debido a que el RNA later estabiliza el tejido durante el corte del mismo, se puede realizar a temperatura ambiente. El tejido restante se puede conservar nuevamente en el RNA later.
- Se añadió 600 μ l del búfer RLT.
- Se homogenizo por 20-40 segundos en un rotador o con la ayuda de una pipeta.

- Se centrifugo el lisado por 3 minutos a máxima velocidad.
- Se separó el sobrenadante cuidadosamente con una micropipeta y se transfirió a un nuevo tubo para microcentrifuga.
- En los siguientes pasos solo se utilizó el sobrenadante.
- Se añadió etanol al 70%, un volumen igual al del sobrenadante separado en el paso anterior (350-600 μ l). Se mezcló inmediatamente utilizando una pipeta. No centrifugar.
- Se transfirió 700 μ l de la muestra, incluyendo cualquier precipitado que se formó en una columna RNeasy en un tubo de 2 ml. Se cerró la tapa suavemente.
- Se centrifugo por 15 seg. a unas 10,000 rpm (8000 x g). en caso de que el volumen excediera los 700 μ l, se centrifugo la columna sucesivamente y se alicuoto en varios tubos.
- Se añadió 350 μ l de búfer RW1 a la columna. Se tapó suavemente y se centrifugo por 15 seg. \geq 10,000 rpm para lavar la columna.

- Se añadió 10 μ l de DNase de la solución stock a 70 μ l de búfer RDD (4°C). Se mezcló suavemente invirtiendo el tubo. Se centrifugo rápidamente solo para recoger líquido de las paredes del tubo. Se mezcló suavemente invirtiendo el tubo, sin dar vortex ya que la DNase I es sumamente sensitiva a sufrir desnaturalización física.
- Se añadió 80 μ l a la mezcla anterior directamente a la membrana de la columna e incubar 20-30 ° C durante 15 minutos.
- Se añadió 350 μ l de búfer RW1 a la columna. Se tapó suavemente y centrifugo por 15 seg. \geq 10,000 rpm. Se descartó el centrifugado.
- Se añadió 700 μ l de búfer RW1 a la columna, se tapó suavemente y se centrifugo por 15 seg. \geq 10,000 rpm. se descartó el centrifugado.
- Se añadió 500 μ l de búfer RPE, tapar suavemente y se centrifugo por 15 seg. \geq 10,000 rpm.
- Se añadió 500 μ l de búfer RPE, se tapo suavemente y se centrifugo por 15 seg. \geq 10,000 rpm.

- Se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml. Se añadió de 35 μ l H₂O libre de RNase, Tapar suavemente y centrifugar por 1 minuto. \geq 10,000 rpm. (opcional repetir el paso anterior)
- Se midió la concentración de RNA total.
- Se conservó a – 80 °C.

10.8 AISLAMIENTO DE mRNA POLY A PARTIR DE RNA TOTAL

Se utilizó el kit: Oligotex mRNA Spin-Column.

Precauciones que se tomaron en cuenta: usar siempre guantes y cambiarlos constantemente, mantener los tubos en lo posible cerrados, mantener una técnica aséptica, limpiar todo el material a utilizar para que esté libre de RNasas, usar tubos de polipropileno.

Procedimiento:

- Se calentó la suspensión de **Oligotex a 37 °C** en un baño de agua o bloque caliente y se mezcló por vortex, colocándose luego a temperatura ambiente.

- Se transfirió la small spin column a un nuevo tubo de 1.5 ml y se agregó 400 μ l de buffer OW2 a la columna. Se centrifugo por 1 minuto a máxima velocidad y se descartó el centrifugado.
- Se transfirió la small spin column en un nuevo tubo de 1.5 ml. Se agregó de 20 a 70 μ l de buffer OEB (caliente a 70°C) dentro de la columna, se pipeteo tres a cuatro veces para re-suspender la resina y se centrifugo por 1 minuto a máxima velocidad.
- Posteriormente se pipeteo otros 20 μ l de Buffer OEB dentro de la columna, de tres a cuatro veces para re suspender la resina y se centrifugo por 1 minuto a máxima velocidad.
- Se conservar a -80° C.