

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL PIOJO *HAEMATOPINUS SUI*, EN POBLACIONES DE *SUS SCROFA DOMESTICA* DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 13 de diciembre 2017

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL PIOJO *HAEMATOPINUS SUI*, EN POBLACIONES DE *SUS SCROFA DOMESTICA* DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Trabajo Final de Grado de la alumna

RUIZ MELANIE

Aprobada por el Tribunal Evaluador

María Inés Catalano
Evaluador

Andrés E. Lavore
Evaluador

Susana M. Pistorale
Evaluador

Dra. Juliana Sánchez
(CITNOBA-UNNOBA)
Directora

Dra. Gabriela Fernández
(CITNOBA-UNNOBA)
Co-Directora

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 13 de diciembre 2017

Paciencia, del latín *pati*, capacidad para tolerar, atravesar o soportar una determinada situación sin perder la calma.

Agradecimientos

A mis *padres* y mis *hermanos*, mi pilar fundamental, por acompañarme y apoyarme en este camino. A *toda* mi *familia*. Sin ellos, nada hubiese sido posible.

A mis *dos estrellas*, las que más brillan y me guían.

A *Juani*, mi gran compañero, por su apoyo incondicional en esta última y difícil etapa, por festejar conmigo cada uno de mis pequeños logros.

A mis *compañeras* y *futuras colegas*, “el equipo lab”, regalo que me dio la universidad para que sea más fácil transitar todos estos años. Mención especial a *Mica* y *Fer*, mis concubinas durante toda la carrera y a *Majo*, que me apoyó, ayudó y alojó en todo el tiempo de desarrollo de mi tesis.

A *mis amigas de la vida*, que me acompañaron siempre, ayudándome a despejarme cuando más lo necesitaba.

A *Juliana*, mi directora, por confiar en mí, brindarme su enseñanza y libertad para trabajar.

A *Gabi*, mi codirectora, por su ayuda y apoyo en este camino.

A mis *compañeros e investigadores del CeBIO*, por el apoyo diario y por ayudarme a resolver los inconvenientes que me iban surgiendo.

A *Diana*, quien me guió durante toda la tesis, por ayudarme a manejarme dentro del laboratorio, transmitirme sus conocimientos y alentarme siempre a seguir para adelante.

A *Charly, Mariano Merino* y *Bruno Carpinetti* por su colaboración en algunos de los muestreos de esta tesis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Domesticación del cerdo y primeras poblaciones en Argentina.....	2
1.2 Principales factores de riesgo sanitario en los sistemas de producción porcina.....	4
1.3 Ectoparasitosis.....	5
1.4 Generalidades de los piojos.....	6
1.5 <i>Haematopinus suis</i> , piojo del ganado porcino.....	7
1.6 Estudios moleculares de piojos.....	10
1.7 ADN mitocondrial y gen COI como marcador molecular.....	10
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 Tareas de Campo.....	17
4.1.1 Área de estudio.....	17
4.1.2 Obtención de muestras.....	18
4.2 Tareas de Gabinete.....	19
4.2.1 Tratamiento e identificación taxonómica de los piojos.....	19
4.2.2 Técnicas moleculares.....	19
4.2.2.1 Extracción de ADN.....	19
4.2.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el marcador molecular citocromo oxidasa I y secuenciación.....	19

4.2.3 Análisis de datos.....	20
5. RESULTADOS.....	23
5.1 Descripción morfológica de <i>Haematopinus suis</i>	23
5.2 Análisis de la variabilidad genética.....	28
5.3 Análisis filogenético.....	29
5.4 Relaciones haplotípicas.....	30
6. DISCUSIÓN.....	33
7. CONCLUSIONES.....	37
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39
9. RESUMEN.....	48

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Domesticación del cerdo y primeras poblaciones en Argentina

La domesticación del cerdo se originó en Europa entre el 7000 y 3000 a.C., no obstante, algunos investigadores reivindican el origen chino del cerdo doméstico actual, iniciándose en la región sur del país en el año 10000 a.C. La domesticación se realizó de manera lenta y progresiva, a partir de pequeños grupos de cerdos, con un tamaño corporal menor al que conocemos en la actualidad (Benítez Ortiz y Sánchez, 2001).

Los cerdos actuales pertenecen al género *Sus* y comprenden los cerdos asiáticos (*Sus vittatus*) de pequeño tamaño, cerdos célticos (*Sus scrofa*) provenientes del jabalí europeo y los cerdos ibéricos (*Sus mediterraneus*) de origen africano, de mayor tamaño e introducidos en todas las regiones del sur de Europa (Benítez Ortiz y Sánchez, 2001).

El primer contacto con América fue durante el segundo viaje de Colón, quien los introduce en la Isla de Santo Domingo en 1493. Posteriormente, la conquista del continente los dispersó por Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador. En 1532 llegan al puerto de San Vicente, en el litoral del actual estado de San Pablo en Brasil, introducidos por Alfonso de Souza. Posteriormente Gonzalo de Mendoza introduce al cerdo en Buenos Aires entre los años 1556 y 1558 desde Santa Catalina, sur de Brasil (Rothschild *et al.*, 1998).

Los primeros ejemplares pertenecieron a las denominadas razas Ibéricas, que habitaron la península Ibérica durante siglos y representaban una gran variedad de cerdos como la estirpe “Lampiña”, “Mamellado”, “Torbiscal” o “Manchado de Jabugo” (Pinheiro Machado, 1973). Por consiguiente, los cerdos ibéricos y los americanos se encuentran históricamente vinculados entre sí, siendo sus diferencias, tanto fenotípicas como genotípicas, producto de más de 500 años de selección y cruce con otras razas provenientes de Europa y Estados Unidos (Campagna, 2005).

En la Argentina la cría de cerdos comenzó a fines del siglo XIX y se localizó

principalmente en la región pampeana, coincidentemente con la distribución geográfica de los cereales de cosecha gruesa (maíz y sorgo). En los últimos años esta actividad ganadera ha aumentado cerca del 80% en todo el país, convirtiéndose en una alternativa de diversificación especialmente eficaz para pequeños y medianos productores (Campagna, 2005) (Figura 1).

En Argentina existen también poblaciones silvestres de *Sus scrofa domestica*, que descienden de las razas de cerdos domésticos liberados durante la colonización, denominados chanchos cimarrones o ferales. Particularmente, en Bahía Samborombón (Buenos Aires) se encuentra una de las poblaciones más grandes de cerdos ferales, la cual tiene la particularidad de estar próxima a producciones porcinas de traspatio, donde tienen como “cultura local” la toma de ejemplares asilvestrados para su utilización ya sea como fuente de carne o como reproductores (Merino y Carpinetti, 2003).

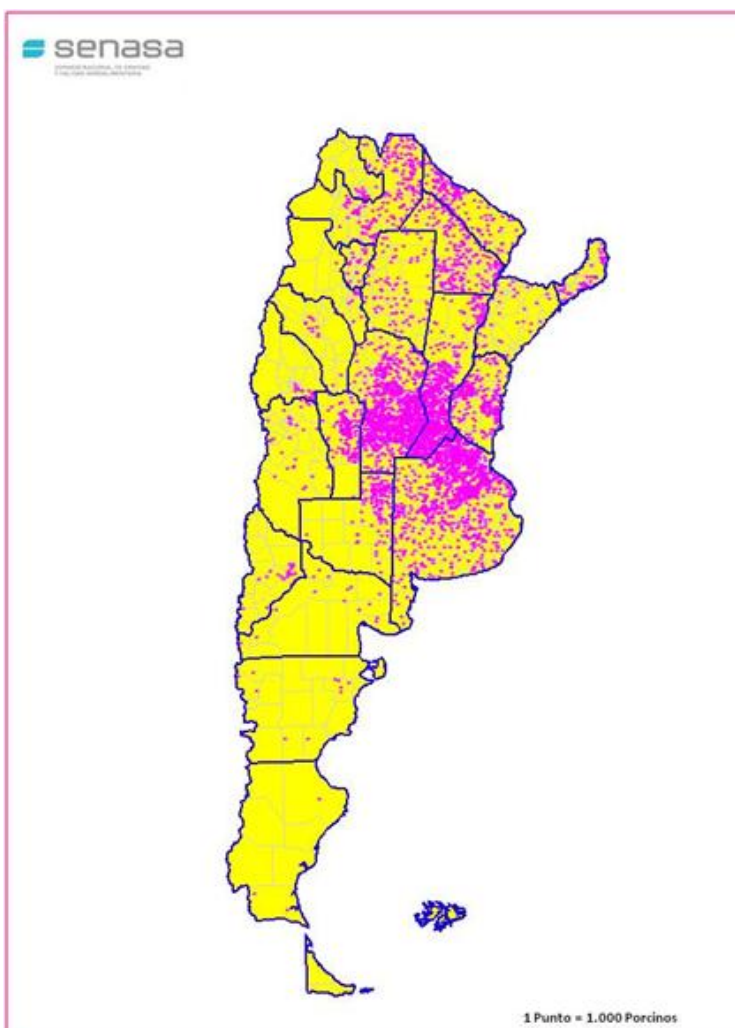


Figura 1. Distribución de la actividad ganadera porcina en la República Argentina. Se indican los criaderos con puntos rosas.

1.2 Principales factores de riesgo sanitario en los sistemas de producción porcina

Los sistemas de producción porcina se pueden clasificar en dos tipos, uno altamente intensificado que tiene todas las etapas de producción bajo galpón con dietas balanceadas según los requerimientos de cada categoría porcina; y otro que tiene una o más etapas de producción a campo, representado por más del 80% de las producciones en Argentina. Dentro de este último existe una gran variabilidad, con diferentes grados de adaptación de infraestructura a cada sistema (Kabululu *et al.*, 2015).

En los sistemas con menor nivel de intensificación, la producción se realiza a campo con instalaciones de bajo costo, en las que los animales se encuentran expuestos a varios factores de riesgo sanitario, incluyendo una alimentación pobre en nutrientes, infraestructura precaria y falta de higiene en los corrales. Debido al tratamiento antiparasitario poco frecuente, las ectoparasitosis constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes (Kabululu *et al.*, 2015) (Figura 2).



Figura 2. Infraestructura precaria de los corrales en criaderos familiares o de traspatio.

(A) Criadero de cerdos domésticos. (B) Criadero de cerdos ferales.

1.3 Ectoparasitosis

Los ectoparásitos (como ácaros, garrapatas, piojos y pulgas) son artrópodos

parásitos de vertebrados, incluido el hombre. Estos parásitos se sitúan sobre la superficie exterior del cuerpo (piel y pelo) de sus hospedadores y componen un grupo sumamente heterogéneo en cuanto a su taxonomía, ecología y biología. Varias especies de ectoparásitos cumplen su ciclo de vida tanto en el hospedador como fuera de éste, por ejemplo en el suelo. En ese sentido, la supervivencia y desarrollo de estos ectoparásitos dependen de las características intrínsecas de sus hospedadores (taxonomía, edad, sexo) pero también de características de los ambientes donde ellos viven (humedad, temperatura, cobertura vegetal) (Marshall, 1981).

Respecto de las relaciones que establecen los ectoparásitos con sus hospedadores, la especificidad o preferencia hospedatoria varía desde especies generalistas a especialistas. Las primeras (como por ejemplo las pulgas), son aquellas que puede parasitar un amplio rango de hospedadores de distintos grupos taxonómicos, incluyendo aves, roedores, animales domésticos, silvestres y humanos (Poulin y Mouillot, 2005; Poulin *et al.*, 2006). De este modo, dichas especies generalistas prefieren un determinado hábitat y parasitan a las especies hospedadoras que encuentran a su disposición. Mientras que las segundas (por ejemplo los piojos), contrariamente, son aquellas que prefieren un determinado género o especie de hospedador, y acompañan a su hospedador a lo largo de todo su rango de distribución geográfica (Marshall, 1981).

La importancia en relación al riesgo sanitario de los ectoparásitos radica en la capacidad de generar lesiones y, en aquellos que son hematófagos, pueden también transmitir diversos patógenos a sus hospedadores. Dentro de las ectoparasitosis en la producción porcina, la pediculosis provocada por el piojo *Haematopinus suis* continúa siendo una importante causa de pérdidas económicas que deriva de las pérdidas del rendimiento del ganado (Benítez Ortiz y Sánchez, 2001). Esto es debido a que la energía que destina el animal hacia las funciones inmunológicas, por la presencia del ectoparásito, reduce la energía disponible para otros procesos biológicos (Derting y

Compton, 2003; Degen, 2006). Asimismo, la picadura del piojo puede provocar dermatitis, con inflamaciones tegumentarias y laceraciones superficiales propensas a infecciones oportunistas (Guimarães *et al.*, 2001; Palomo Yagüe, 2008).

Al igual que otros ectoparásitos, los piojos, impactan considerablemente sobre las poblaciones y comunidades de sus hospedadores, son importantes como parásitos propiamente dichos, como hospedadores intermediarios y como vectores, pudiendo provocar problemas sanitarios a sus hospedadores y participar en el mantenimiento de patógenos entre animales que actúan como reservorios.

1.4 Generalidades de los piojos

Los piojos son insectos ápteros del Orden Phthiraptera y parásitos obligados de aves y mamíferos. Se han identificado cerca de 5.000 especies, distribuidas en todos los continentes y en los hábitats que sus hospedadores ocupan. Este orden de insectos comprende cuatro subórdenes: Anoplura (piojos chupadores), Rhyncophthirina, Ischnocera y Amblycera (piojos masticadores). En particular, los piojos Anoplura son hematófagos y por lo general pasan la totalidad de su ciclo de vida en un solo individuo hospedador (Durden y Musser, 1994).

En particular, el género *Haematopinus* es el único representante de la familia Haematopinidae del suborden Anoplura, conocido como piojos chupadores de sangre (Durden y Musser, 1994; Barker, 1994). Existen 21 especies citadas para el género *Haematopinus*, de las cuales 19 parasitan a ungulados del orden Artiodactyla (como cerdos, vacas, búfalos, antílopes, camellos y ciervos) y Perissodactyla (como caballos, burros y cebras) (Durden y Musser, 1994; Scofield *et al.*, 2012). Hay que destacar que *Haematopinus suis* solo parasita a los cerdos domésticos (*Sus scrofa domestica*), mientras que los jabalíes (*Sus scrofa scrofa*) son parasitados por *Haematopinus apri* (Durden y Musser, 1994).

1.5. *Haematopinus suis*, piojo del ganado porcino

Haematopinus suis es una especie hematófaga que infesta a los cerdos. Es el piojo de mayor tamaño que afecta a los animales domésticos, y exhibe alta especificidad al huésped, siendo el cerdo su único hospedador (Florence, 1921) (Figura 3).

Los piojos *H. suis* tienen una metamorfosis hemimetábola de 3 fases: huevo, ninfa y adulto, donde todas se desarrollan en el hospedador. Luego de la etapa de huevo, se observan tres instancias ninfales, y de la última emerge el adulto. La etapa de huevo dura entre 13 y 15 días, cada instancia ninfal de 4 a 6 días y los adultos llegan a vivir hasta 35 días. Bajo condiciones óptimas los piojos pueden completar hasta 6-15 generaciones por año, pero esto raramente es alcanzado en la naturaleza debido al acicalado del huésped, la resistencia, las mudas, las pérdidas de pelaje (Durdin y Musser, 1994).

Haematopinus suis es un problema común en las producciones porcinas, donde los animales se crían a altas densidades (Girisgin *et al.*, 2008) y vive en los cerdos domésticos de cualquier edad y condición. Existe una gran cantidad de referencias en la literatura que muestra la presencia de este parásito en toda la distribución del cerdo (Earle y Stevenon, 1905; George *et al.*, 1992; Gipson *et al.*, 1999; Permin *et al.*, 1999; Damriyasa *et al.*, 2004; Kagira *et al.*, 2013). Estos ectoparásitos son una amenaza a la salud del ganado y del ser humano, no sólo por sus hábitos hematófagos, sino por su capacidad de transmitir patógenos. Entre éstos, se registran bacterias y virus responsables de varias enfermedades infecciosas graves en zonas rurales, como la peste porcina africana (Penrith y Vosloo, 2009), la viruela porcina (Thibault *et al.*, 1998), el cólera porcino, la anemia hemolítica “Hemoplasmosis porcina” provocada por la bacteria *Mycoplasma suis* (Agbede, 1981; Portiansky *et al.*, 2004; Pintos *et al.*, 2011), y la anaplasmosis (Da Silva *et al.*, 2013).

En condiciones de alta abundancia de piojos, los cerdos muestran incomodidad, pruritos o picazón, anemia, incrustaciones y cáscaras en la piel, dermatitis, daños en el

cuero y pelaje, interfiriendo con la salud general y el crecimiento de los mismos. Se sabe que los efectos perjudiciales pueden causar la muerte en cerdos jóvenes (Earle y Stevenson, 1905).



Figura 3. *Haematopinus suis*, alimentándose sobre la piel de *Sus scrofa doméstica*.

Sobre el cuerpo del animal, el piojo frecuenta los pliegues de la piel de la cabeza, especialmente cerca de las orejas, el cuello, la papada y los hombros, así como también en las patas, los flancos, y en menor cantidad sobre el lomo (Florence, 1921). Como es un parásito permanente, *H. suis* abandona a su hospedador sólo para trasladarse a otro. Por lo tanto, el contagio más común de piojos entre los cerdos es a través del contacto directo; esto incluye el contacto sexual, siendo favorecido por el hacinamiento, condición habitual en las producciones porcinas (Vaidya, 2003).

Si bien comúnmente los agricultores y ganaderos están familiarizados con la frecuencia y distribución del piojo de cerdo, no siempre le atribuyen importancia sanitaria

o económica. Cuando una manada de cerdos no está prosperando adecuadamente, la costumbre más común es considerarlos fuera de condición, o simplemente fuera de alimentación, y se les administra un alimento de reserva, pero si se realiza un examen cuidadoso de los animales, la causa de esta condición suele ser directamente atribuible a la presencia en la piel de un gran número de piojos (Damriyasa *et al.*, 2004).

Si bien el control y eliminación de ésta parasitosis es una práctica sencilla y durante las últimas décadas se han mejorado los insecticidas, es notable el desarrollo paulatino de resistencia parasitaria a nivel mundial (Nari *et al.*, 2003). Diversas estrategias, como el uso de medicamentos, vacunas, entre otras, se han aplicado con el fin de controlar de manera efectiva dicha problemática (Benítez Ortiz y Sánchez, 2001). Para el éxito en este tipo de estrategias, se requiere del conocimiento completo de la biología, sistemática y epidemiología de la especie ectoparásita en cuestión. Por lo tanto, la correcta identificación de los piojos y el conocimiento de su distribución geográfica y rango de hospedadores, son fundamentales para el desarrollo de buenas estrategias de control y prevención de las pediculosis.

En nuestro país, son escasos los estudios que contemplan aspectos sistemáticos y genéticos de las especies de ectoparásitos que afectan al ganado porcino. De este modo, se desconoce la diversidad real de estas especies así como la variabilidad genética y morfológica entre poblaciones de piojos asociados a distintos ambientes y razas hospedadoras. En este sentido, cobra relevante importancia estudiar las características morfológicas y genéticas de *H. suis*, piojo que afecta negativamente a las poblaciones de cerdos argentinas.

1.6 Estudios moleculares en piojos

En Argentina han sido reportados varios estudios que contemplan al piojo de la cabeza humana, *Pediculus humanus capitis*, pero todos ellos tratan sobre taxonomía,

índices de infestación o estrategias de control y/o eliminación (González, 2005; Ullio-Gamboa, 2017), no siendo reportados trabajos de índole molecular.

Por su parte para el piojo del cerdo *Haematopinus suis*, aún no se han desarrollado estudios moleculares en nuestro país. A nivel mundial se ha llevado a cabo la secuenciación del genoma mitocondrial de *H. suis* para comprender el proceso de la fragmentación de este genoma en los piojos de mamíferos. El genoma mitocondrial de *H. suis* está compuesto por 37 genes mitocondriales, agrupados en nueve minicromosomas. Cada minicromosoma tiene un tamaño de 3-4 kb, con regiones codificantes variando entre 0,9-2,7 kb y un promedio de 4 genes cada uno (Jiang *et al.*, 2013).

1.7 ADN mitocondrial y gen COI como marcador molecular

La clasificación de los seres vivos requiere de criterios de medida para ser realizada de forma objetiva. Se hace necesario, por tanto, comparar características comunes entre los organismos para determinar cuáles son más parecidos. La observación de los caracteres morfológicos externos fue históricamente la base conceptual de la taxonomía, por ser de observación inmediata (Castro, 2012).

A mediados del siglo XX, con la formulación de la sistemática filogenética, propuesta por Hennig en 1966, se estableció una distinción clara entre semejanza fenotípica y parentesco. Por otro lado, al mismo tiempo estaban teniendo lugar una serie de importantes descubrimientos que sentaban las bases de la biología molecular moderna, como los experimentos de Hershey-Chase, que confirmaron la naturaleza del ADN como material hereditario (Hershey y Chase, 1952) o la caracterización de la estructura de doble hélice del ADN de Watson y Crick (Watson y Crick, 1953). Todo esto impulsó la creación de una nueva corriente, encabezada por los bioquímicos Pauling y Zuckerkandl, que abogaba por el uso de los marcadores moleculares para realizar clasificaciones de los seres vivos. Según esta línea de pensamiento, los caracteres moleculares eran una

evidencia del proceso evolutivo más clara o directa que los morfológicos y eran compartidos por todos los seres vivos (Castro, 2012).

Los marcadores moleculares proporcionan, en definitiva, un instrumento de comparación más estandarizado y cuantificable, siendo una herramienta muy útil para el análisis directo e indirecto del DNA, permitiendo visualizar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de cambio en la molécula de DNA en las poblaciones a través del tiempo evolutivo (Castro, 2012).

Los marcadores moleculares utilizados para estudios filogenéticos deben ser abundantes y estar distribuidos por todo el genoma (Sunnucks, 2000; Avise, 2000); y su modo de evolución debe estar bien caracterizado, de forma que se pueda modelar e incorporar al análisis (Castro, 2012).

Los tipos de marcadores moleculares más utilizados incluyen alozimas, RFLPs, microsatélites, AFLPs y ADN mitocondrial, siendo este último una molécula adecuada para el estudio de las relaciones filogenéticas entre los organismos, en particular los estrechamente relacionados (Núñez Domingo, 2011).

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula doble cadena circular, que se encuentra en el interior de las mitocondrias. El genoma mitocondrial está compuesto por 16.569 pb con diferente distribución de purinas y pirimidinas, siendo la cadena pesada rica en purinas, mientras que la cadena ligera es rica en pirimidinas. Al igual que el ADN nuclear, el ADNmt presenta dos regiones, una región codificante y una no codificante, también llamada región control o *D-loop* (Núñez Domingo, 2011).

Varias características convierten al ADNmt en una herramienta especialmente útil en la reconstrucción de relaciones filogenéticas:

- La poliplasmia, es decir el elevado número de copias de ADNmt que existe en cada mitocondria y, por ende, en la célula.

- Su herencia materna, ya que el ADNmt se transmite de forma no mendeliana por línea materna.
- Su elevada tasa de cambio molecular. A pesar del importante papel que desempeña el genoma mitocondrial en la producción de energía celular, su tasa de evolución es mucho más rápida –hasta 10 veces más– que la del genoma nuclear (Brown, 1980). Esto se ha relacionado con las características de este material genético y con el entorno que lo rodea. El ADNmt no está protegido por proteínas histonas y se ve continuamente expuesto a la acción de los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo. Además, se ha demostrado que los sistemas genéticos de reparación del ADNmt son menos eficientes que los nucleares (Wallace, 1994).
- El genoma mitocondrial se hereda como un único bloque porque no tiene recombinación, siendo de gran utilidad ya que la mayoría de los métodos de reconstrucción filogenética parten de la asunción de ausencia de recombinación (Castro, 2012).

De los 13 genes mitocondriales que codifican proteínas, el de la citocromo oxidasa I (COI) presenta algunas ventajas para su utilización en estudios filogenéticos. En primer lugar, los *primers* universales para este gen son muy robustos, lo que permite la amplificación a partir del extremo 5' en la mayoría de los Phyla (Folmer *et al.*, 1994; Zhang y Hewitt, 1997). En segundo lugar, COI parece tener un mayor rango de señal filogenética que cualquier otro gen mitocondrial, como por ejemplo citocromo b, porque los cambios en su secuencia de aminoácidos ocurren más lentamente (Lynch y Jarrell, 1993). Por último, al igual que otros genes, sus nucleótidos de tercera posición muestran una alta incidencia de sustituciones de bases, lo que lleva a una tasa de evolución molecular que es aproximadamente tres veces mayor que la del ADNr 12S o 16S (Knowlton y Weigt,

1998). Incluso, la evolución de este gen es lo suficientemente rápida como para permitir la discriminación, no solo de especies estrechamente relacionadas, sino también de grupos filogeográficos dentro de una sola especie (Cox y Hebert, 2001; Wares y Cunningham, 2001).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS

Existe variabilidad morfológica, así como variación genética para el fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), en el piojo *Haematopinus suis*, en poblaciones hospedadoras de *Sus scrofa domestica* de la provincia de Buenos Aires.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo general

Ampliar el conocimiento sobre el piojo *Haematopinus suis* parásito de *Sus scrofa domestica*, mediante la caracterización morfológica y molecular de especímenes asociados a poblaciones de cerdos domésticos y ferales de la provincia de Buenos Aires.

3.2 Objetivos específicos

- Recopilar información bibliográfica sobre el piojo *Haematopinus suis* y su asociación con *Sus scrofa domestica*.
- Recolectar muestras de *Haematopinus suis* incluyendo la mayor amplitud geográfica posible dentro de la provincia de Buenos Aires, generando una base de información útil para estudios sistemáticos y epidemiológicos.
- Hallar características morfológicas distintivas de *Haematopinus suis* con el fin de ampliar su descripción original.
- Caracterizar genéticamente a las poblaciones de *Haematopinus suis* a partir del marcador mitocondrial citocromo oxidasa I.
- Recuperar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *H. suis* con la finalidad de establecer sus relaciones con otras especies y origen.
- Comparar la variabilidad genética estimada en poblaciones de *Haematopinus suis* en relación a su distribución geográfica y hospedatoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

El proyecto presenta dos tipos básicos de tareas, en campo y en gabinete (incluyendo tareas de laboratorio).

4.1 Tareas de Campo

4.1.1 Área de estudio

El área de estudio abarcó distintas localidades de Buenos Aires. Se muestrearon poblaciones de *Sus scrofa domestica* en criaderos de Acevedo ($33^{\circ}43'00''\text{S}$ $60^{\circ}25'00''\text{O}$), General Viamonte ($34^{\circ}56'00''\text{S}$; $61^{\circ}10'00''\text{O}$), y Junín ($34^{\circ}34'10''\text{S}$ $60^{\circ}57'35''\text{O}$); y en poblaciones ferales de Bahía Samborombón ($36^{\circ}00'\text{S}$ $57^{\circ}12'\text{O}$) (Figura 4).

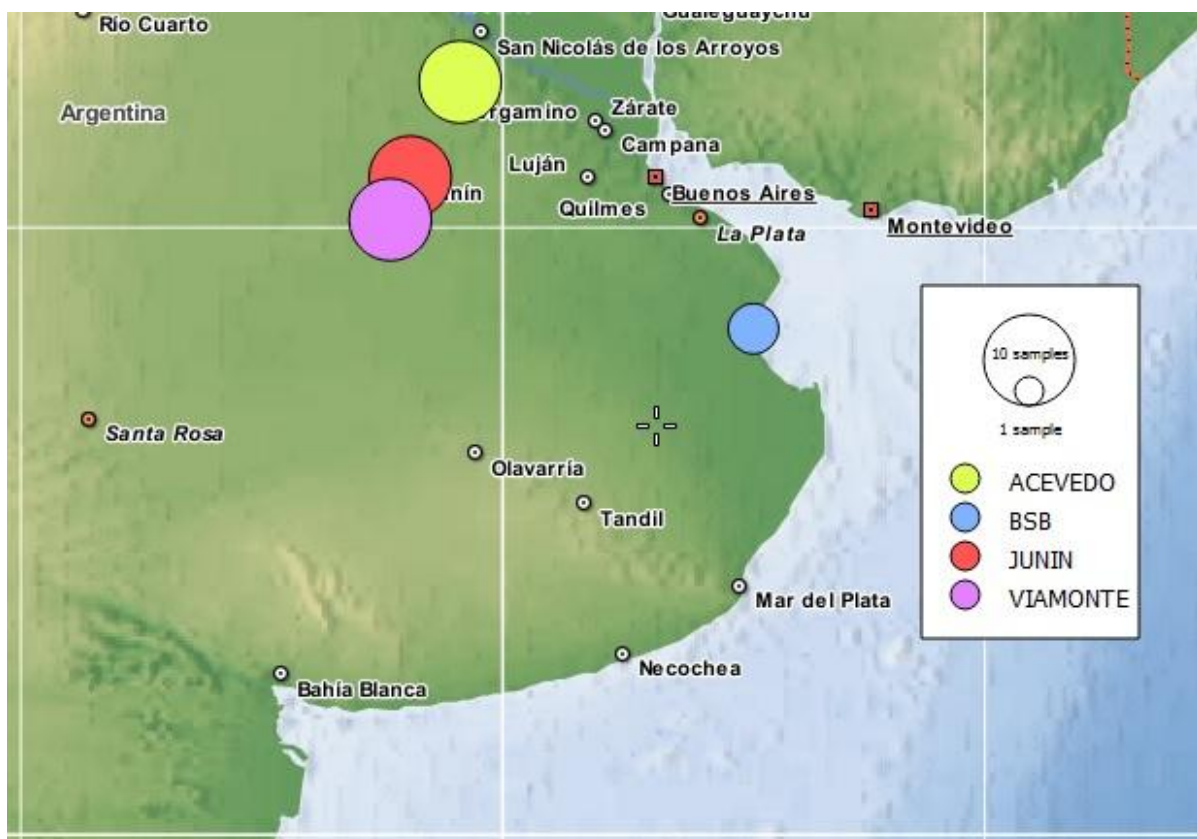


Figura 4. Región geográfica de los sitios de muestreo en la provincia de Buenos Aires, donde el tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras analizadas en los análisis moleculares.

4.1.2 Obtención de muestras

De cada plantel porcino seleccionado se tomaron muestras de piojos para 10 cerdos (machos y/o hembras). Durante el muestreo los animales se mantuvieron inmobilizados con un lazo sujetador para permitir su rápida prospección y la toma de muestras. Los piojos fueron colectados utilizando peines, fórceps y pinzas, examinando la piel del cerdo en las zonas del cuerpo que más frecuentan (pliegues de la cabeza, orejas, cuello, papada, hombros, patas, flancos y lomo), según la metodología descrita por Leonardi (2014) (Figura 5).

La técnica utilizada tuvo el fin de minimizar el tiempo de manipulación de los animales, extrayendo la mayor cantidad de piojos posibles y en las mejores condiciones para garantizar su posterior estudio. Estos procedimientos se llevaron a cabo con la colaboración de un grupo de profesionales integrado por genetistas y biólogos.



Figura 5. Muestreo de los animales. (A) Toma de muestras en un cerdo feral. (B) Toma de muestras en un cerdo doméstico.

Las muestras de las poblaciones ferales de *Sus scrofa domestica* distribuidas en la Bahía Samborombón, se obtuvieron a partir de animales que fueron cazados en el marco de programas de control del SENASA.

Los piojos colectados fueron colocados en tubos *ependorf* durante aproximadamente 36 horas (tiempo estimado para que la digestión de sangre dentro del

ectoparásito finalice) y fijados en alcohol 96% para su conservación e identificación taxonómica.

4.2 Tareas de Gabinete

4.2.1 Tratamiento e identificación taxonómica de los piojos

Los piojos colectados fueron preparados para su estudio del siguiente modo: se aclararon en hidróxido de potasio (KOH) diluido al 10%, se deshidrataron en una serie creciente de etanol (80°, 90° y alcohol absoluto), fueron diafanizados en Eugenol (un derivado del clavo de olor) y montados en un portaobjetos con bálsamo de Canadá para obtener un preparado permanente. Para la identificación de los piojos se estudió su morfología, utilizando microscopio óptico (*Primo Star ZEISS Axio*) y estereoscópico (*Bestscope, Bs-3040*), siguiendo las claves y descripciones originales de Linnaeus (1758), Johnson (1972) y Durden y Musser (1994).

4.2.2 Técnicas moleculares

4.2.2.1 Extracción de ADN

A partir de 27 muestras, se extrajo el ADN mediante protocolo con CTAB (Doyle y Doyle 1987). La eficiencia en la concentración de la extracción de ADN se verificó mediante gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta en un transiluminador con cámara acoplada (*InGenius, Syngene*).

4.2.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el marcador molecular citocromo oxidasa I y secuenciación

De 27 muestras de diferentes localidades se amplificó mediante PCR *touchdown* un fragmento de 379 pares de bases correspondiente al gen mitocondrial citocromo oxidasa I mediante los *primers* L6625 (5'-COGGATCCTTYTGRTTYTTYGGNCAAYCC-3') y H7005 (5'-CCGGATCCACNACRTARTANGTRTCRTG-3 ') (Hafner *et al.*, 1994).

Las amplificaciones por PCR doble cadena se realizaron en un volumen final de 25µl, conteniendo entre 25 y 100 ng de ADN molde, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de *primer*

forward; 0,5 µM de *primer reverse*; 0,5 mM de dNTPs; *buffer* de reacción 1X; 0,5U de Taq T-Plus DNA polimerasa (INBIO) y agua estéril ultrapura para llevar a volumen final. El programa de PCR contó con un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 10 ciclos a 95° (1 minuto), 45°C (1 minuto) y 74°C (1 minuto), luego 30 ciclos a 94°C (40 segundos), 45°C (40 segundos), con una rampa de 0,2°C/segundo y 74° (40 segundos) y una extensión final a 74°C por 5 minutos. Una vez finalizado se conservó a 4°C.

El resultado de la amplificación se verificó en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta. Como parámetro del tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de 100 pares de bases (PB-L). Las muestras se sembraron junto con el buffer de siembra DNA Dye (*EZ-VisionThree, Amresco*) con la finalidad de poder divisar el frente de corrida.

Posteriormente se cuantificó el ADN amplificado, tomando fotografías de alta resolución de los geles obtenidos a través del *software GeneSys V1.4.6.0 (Syngene)*, para ser analizados posteriormente con el programa informático *ImageJ (Abràmoff, 2004)*.

Se tomó 10ul del producto amplificado, y se lo purificó utilizando 2ul de Exonucleasa I (*ThermoScientific*) y 1ul de fosfatasa alcalina termosensible *FastAP (ThermoScientific)*. Las muestras se incubaron a 37°C durante 15 minutos y luego a 85°C por otros 15 minutos para detener la reacción enzimática.

Posteriormente se realizó la secuenciación directa de los productos de PCR obtenidos a través del secuenciador automático ABIPrism 3100 (*Applied Biosystems*) por la empresa MACROGEN (Corea).

4.2.3 Análisis de datos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas para el fragmento génico de interés fueron visualizadas y corregidas mediante el programa BioEdit (Hall, 2004). Luego fueron alineadas utilizando la herramienta ClustalW disponible en el programa MEGA 7.0 (Kumar,

2016).

A partir del alineamiento obtenido se generaron árboles filogenéticos de Máxima Verosimilitud (MV) y *Neighbor Joining* (NJ) a través del programa MEGA versión 7. Además de las 27 secuencias obtenidas, se utilizaron 5 secuencias más del fragmento del gen citocromo oxidasa I obtenidas del banco de datos genéticos *GenBank*. Una de ellas corresponde a la misma especie en estudio, *Haematopinus suis* (Acceso en *GenBank* GenInfo Identifier GI: 170296072), tres de especies del mismo género, *Haematopinus eurysterunus* piojo del ganado bovino (GI: 309099590), *Haematopinus pacochoeri* piojo del jabalí (GI: 26006366) y *Haematopinus tuberculatus* piojo del búfalo (GI: 170296074) y la última correspondiente al piojo de la cabeza humana, *Pediculus humanus capitis* (GI: 37719278), usada como *outgroup*.

A las mismas, se les calculó los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica, así como el número de sitios polimórficos, utilizando el programa informático DNASP5 (Librado y Rozas, 2009).

Para determinar las relaciones haplotípicas se utilizó el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) a través del programa *PopArt* (Leigh y Bryant, 2015).

RESULTADOS

5. RESULTADOS:

5.1 Redescripción morfológica de *Haematopinus suis*

Se examinaron los caracteres morfológicos del estado adulto de 33 piojos *Haematopinus suis*, 14 hembras y 19 machos, para realizar su redescripción.

Los piojos *H. suis* son insectos ápteros (carecen de alas), y su cuerpo es aplanado dorso-ventralmente. Su longitud total en la etapa adulta alcanza los 4 mm en machos y 10 mm en hembras (Figura 6).



Figura 6. Ejemplares hembra (izquierda) y macho (derecha) de *H. suis*.

La **cabeza** (Figura 7 A) es más angosta que el tórax (alcanza la mitad del ancho del tórax). Presenta forma subtriangular, tamaño pequeño, tres veces más ancha que larga, y con el borde superior redondeado. Carece de ojos pigmentados. Los bordes laterales presentan esclerotización bien marcada sobre las antenas y por debajo de éstas, en el sitio de inserción. El resto de la cabeza es débilmente quitinizada. Presenta setas en toda la superficie de la cabeza. Las antenas (Figura 7 B) son relativamente largas, tres cuartas

partes de la longitud total de la cabeza, tienen cinco segmentos de igual tamaño, los cuales tienen todos al menos una seta. El aparato bucal es “chupador”, y está adaptado a la función de succionar sangre. Las maxilas están opuestas entre sí y forman una curva que permite formar un canal mediante el cual fluye la sangre succionada del hospedador. En descanso, las partes bucales se retraen en la cabeza y están protegidas por una proyección llamada *haustellum*.

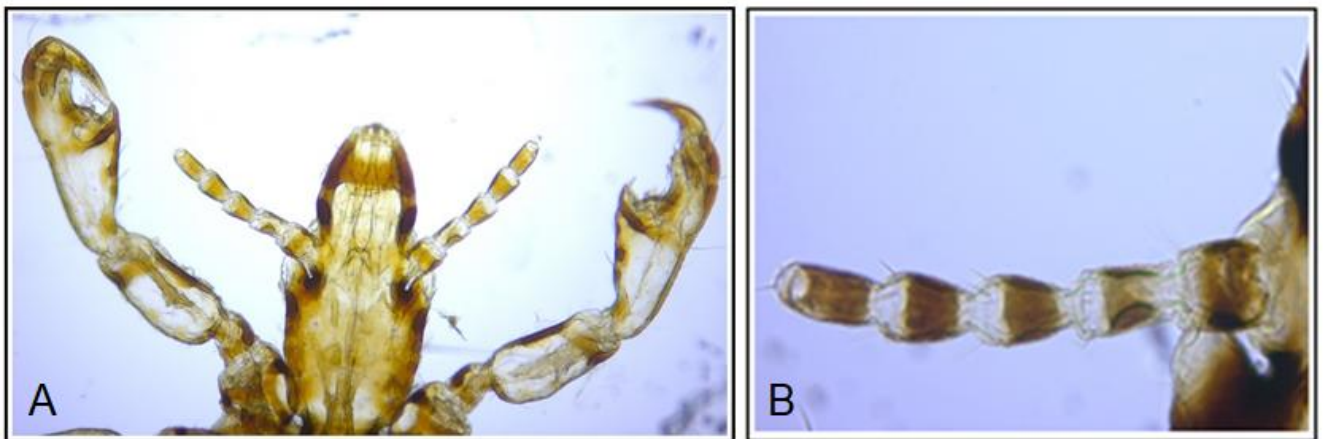


Figura 7. (A) Cabeza de *H. suis*. (B) Detalle de la antena.

El **tórax** (Figura 8) es dos veces más ancho que largo. El de la hembra es más corto y más amplio que el del macho. En ambos, el borde superior es recto, y el posterior convexo. La superficie dorsal está fuertemente quitinizada y los tres segmentos torácicos están fusionados. Presenta una línea de esclerotización horizontal de lado a lado, casi al finalizar el tórax. En la región central de la superficie ventral se observa una esclerotización en forma de escudo formando la placa esternal. En el ángulo anterior de la placa, en línea con el segundo par de patas, se encuentra un par de espiráculos de forma ovalada. Se puede observar setación en todo el tórax.

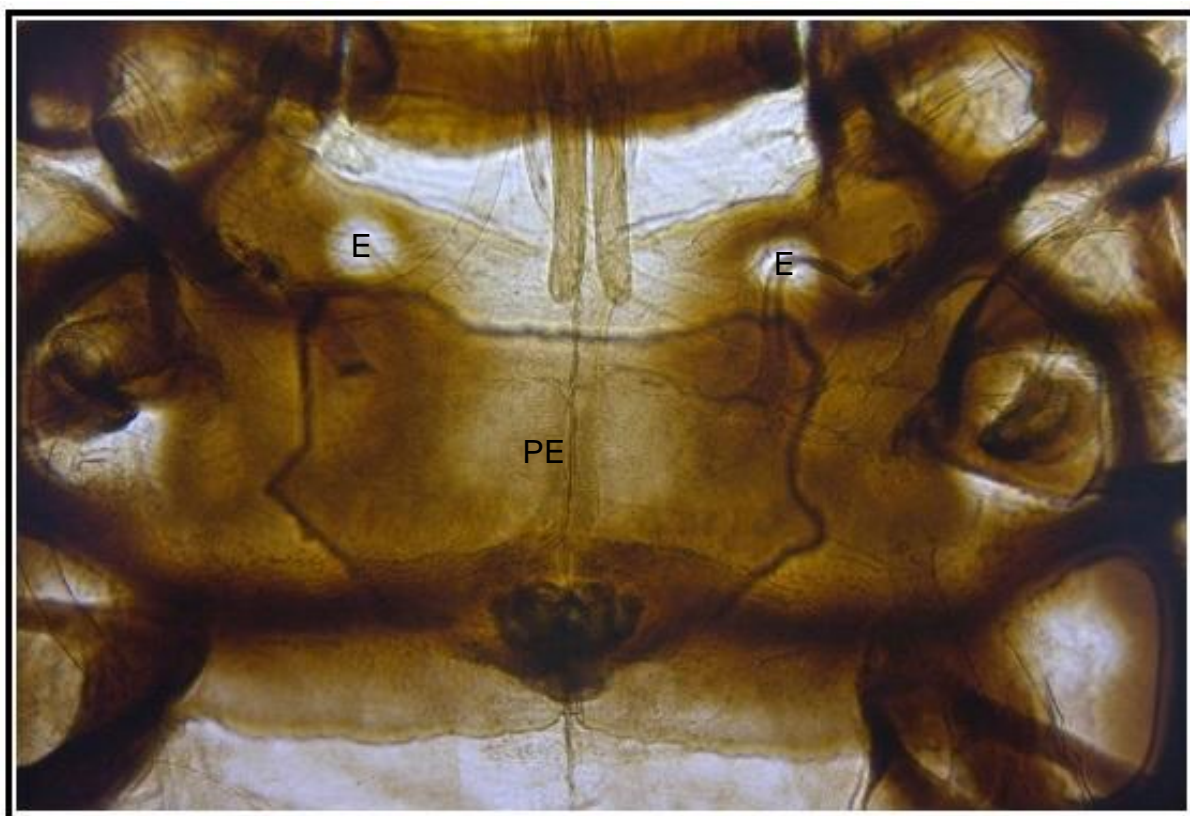


Figura 8. Tórax de *H. suis* macho. Detalle de placa esternal (PE) y espiráculos (E).

Presentan 3 pares de **patas** (Figura 9 A), que son largas, de longitud similar al largo de tórax, cada una presenta cuatro segmentos de diferente tamaño y longitud, con setas en toda la superficie. El segundo segmento es siempre más angosto y más corto que el resto, alcanzando la cuarta parte de los segmentos tres y cuatro, que son los de mayor tamaño. El primer segmento tiene un tamaño intermedio, alcanzando la mitad de los dos segmentos mayores. Las tres patas tienen una uña (Figura 9 B) o garra filosa en su extremo, fuerte, alargada, de un tamaño similar a los segmentos tres y cuatro, con una superficie interior ligeramente aserrada. Las uñas están altamente especializadas para sujetarse del pelaje del hospedador, y consisten de un elemento tarsal curvo para encerrar un espacio que típicamente corresponde al grueso del un pelo del hospedador.



Figura 9. (A) Patas de *H. suis*. Se observan los cuatro segmentos y sus setas. (B) Detalle de una uña.

El **abdomen** es alargado, de forma globular, en la hembra es más largo que en el macho por lo que parece más delgado. En el adulto, el abdomen consta de 9 segmentos, esta segmentación es más clara en la superficie dorsal que en la ventral. Los segmentos 1 y 2 son más pequeños que el resto. Los segmentos 3 al 8 tienen placas fuertemente quitinizadas en los pleuritos (lateralmente), y moderada en los terguitos (dorsalmente), los esternitos (ventralmente) son casi incoloros. Se pueden observar setas en todos los segmentos. Cada uno de estos segmentos presenta un par de espiráculos, de forma circular, rodeados de una banda quitinosa fuerte.

El extremo inferior del abdomen, que corresponde al noveno segmento, presenta dimorfismo sexual, siendo romo en el macho y bilobulado en las hembras (Figura 10). Los últimos segmentos del abdomen están modificados formando la genitalia en ambos sexos:

Hembras (Figura 10 A y B): la placa genital tiene forma trapezoide, siendo el doble más ancha que larga. Presenta un apodema pronunciado, ausencia de espermateca y bursacopulatrix. Los gonópodos son planos y triangulares en la superficie ventral del octavo segmento abdominal, desde donde salen proyecciones (aproximadamente 30 de

cada lado) que sirven para guiar, manipular y pegar los huevos al huésped. La superficie dorsal del noveno segmento forma dos placas triangulares quitinosas.

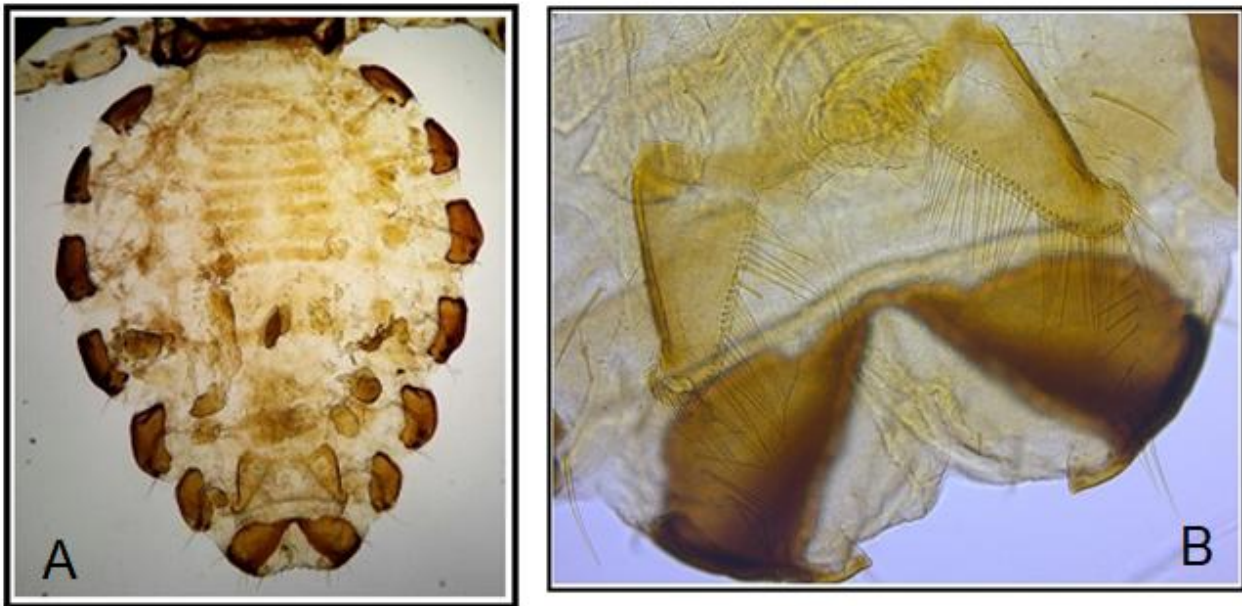


Figura 10. (A) Abdomen de una hembra de *H. suis*. (B) Detalle de la genitalia.

Machos (Figura 11 A, B y C): La genitalia es proporcionalmente de gran tamaño, ocupando casi la mitad del largo del abdomen. En la superficie ventral el apodema basal, que es ancho y alargado, de forma espatulada y fuertemente quitinizada, comienza a la altura del quinto segmento y ya en el sexto está su base que se une a la placa subgenital, que presenta forma espejular. Dentro de la placa se visualiza el tejido endomérico como una zona punteada. El *aedeagus* es terminal, esclerotizado, y se apoya anteriormente en el *apodema basal*, presenta forma de “Y”, y comienza en la mitad del sexto segmento. Lateralmente está delimitado por un par de *parámetros*, que son piezas delgadas, fuertemente quitinizadas, que se extienden hasta el octavo segmento sin fusionarse.

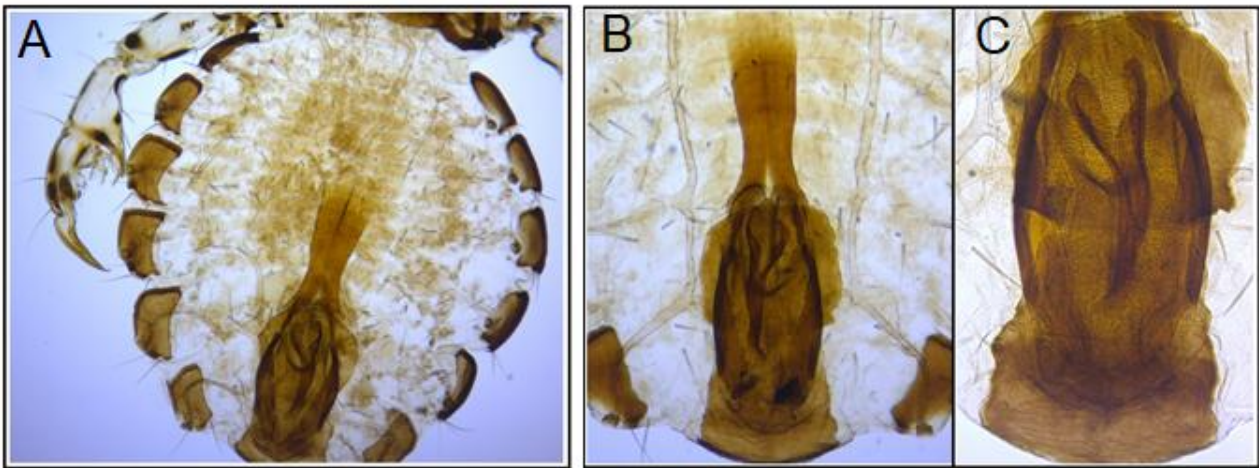


Figura 11. (A) Abdomen de un macho de *H. suis*. (B) (C) Detalle de la genitalia.

5.2 Análisis de la variabilidad genética

El análisis realizado a partir del programa bioinformático MEGA7 para un fragmento de 359 pb del gen COI para las 27 secuencias obtenidas, para los especímenes de *Haematopinus suis* de Acevedo (n=8), Viamonte (n=8), Junín (n=8) y Bahía Samborombón (n=3), indica la ausencia de polimorfismos para el fragmento amplificado, detectándose un único haplotipo. El análisis realizado incorporando la única secuencia disponible en *GenBank* para la especie, arrojó un resultado de 49 sitios variables (Smith *et al.*, 2008).

A su vez, incorporando en el análisis las especies *Haematopinus eurysterunus*, *Haematopinus pacochoeri*, *Haematopinus tuberculatus* y *Pediculus humanus capitis*, se observaron 226 sitios variables, donde 145, corresponden a sitios de mutación única (*singleton*).

El programa DNASP5 agrupó a las 32 secuencias en 6 haplotipos (Tabla 1), donde las 27 muestras obtenidas fueron todas agrupadas en el mismo haplotipo (Hapl 6).

Tabla 1. Haplotipos obtenidos a partir del fragmento de 359 pb citocromo oxidasa I analizado para las secuencias de *Haematopinus suis* (Hs) de Buenos Aires y Perú, *Haematopinus eurysterunus*, *Haematopinus pacochoeri*, *Haematopinus tuberculatus* y *Pediculus humanus capitis*; J: Junín, A: Acevedo, V: Viamonte, BSB: Bahía Samborombón.

Haplotipos	Frecuencia	Identificación de las secuencias
Hapl 1	1	<i>Haematopinus eurysterunus</i>
Hapl 2	1	<i>Haematopinus pacochoeri</i>
Hapl 3	1	<i>Haematopinus suis</i> PERÚ
Hapl 4	1	<i>Haematopinus tuberculatus</i>
Hapl 5	1	<i>Pediculus humanus capitis</i>
Hapl6	27	Hs3J, Hs5J, Hs6J, Hs10A, Hs11A, Hs12A, Hs13A, Hs14A, Hs18BSB, Hs21V, Hs22V, Hs23V, Hs24V, Hs25V, Hs27V, Hs28V, Hs29V, Hs31A, Hs38J, Hs40J, Hs41A, Hs43A, Hs44BSB, Hs46BSB, Hs60J, Hs61J, Hs63J

5.3 Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos obtenidos por las metodologías *Neighbor Joining* (NJ) y Máxima Verosimilitud (MV) fueron de idéntica topología, obteniéndose el mismo valor de *bootstrap* en ambos análisis, por lo que se muestran únicamente los resultados obtenidos con NJ (Figura 12). Como puede observarse en la imagen, las secuencias fueron divididas en 2 clados, uno de ellos comprende a las muestras de la especie *Haematopinus*, mientras que el otro grupo incluye solo a *Pediculus humanus capitis*.

Dentro del primer grupo se observaron a su vez 2 subclados, uno correspondiente al haplotipo 6, que agrupa a las 27 muestras estudiadas; y otro correspondiente al haplotipo 3 de la secuencia de *Haematopinus suis* tomada de *GenBank* junto con los haplotipos 1,2 y 4 de las secuencias de *Haematopinus eurysterunus*, *Haematopinus pacochoeri* y *Haematopinus tuberculatus*, respectivamente.

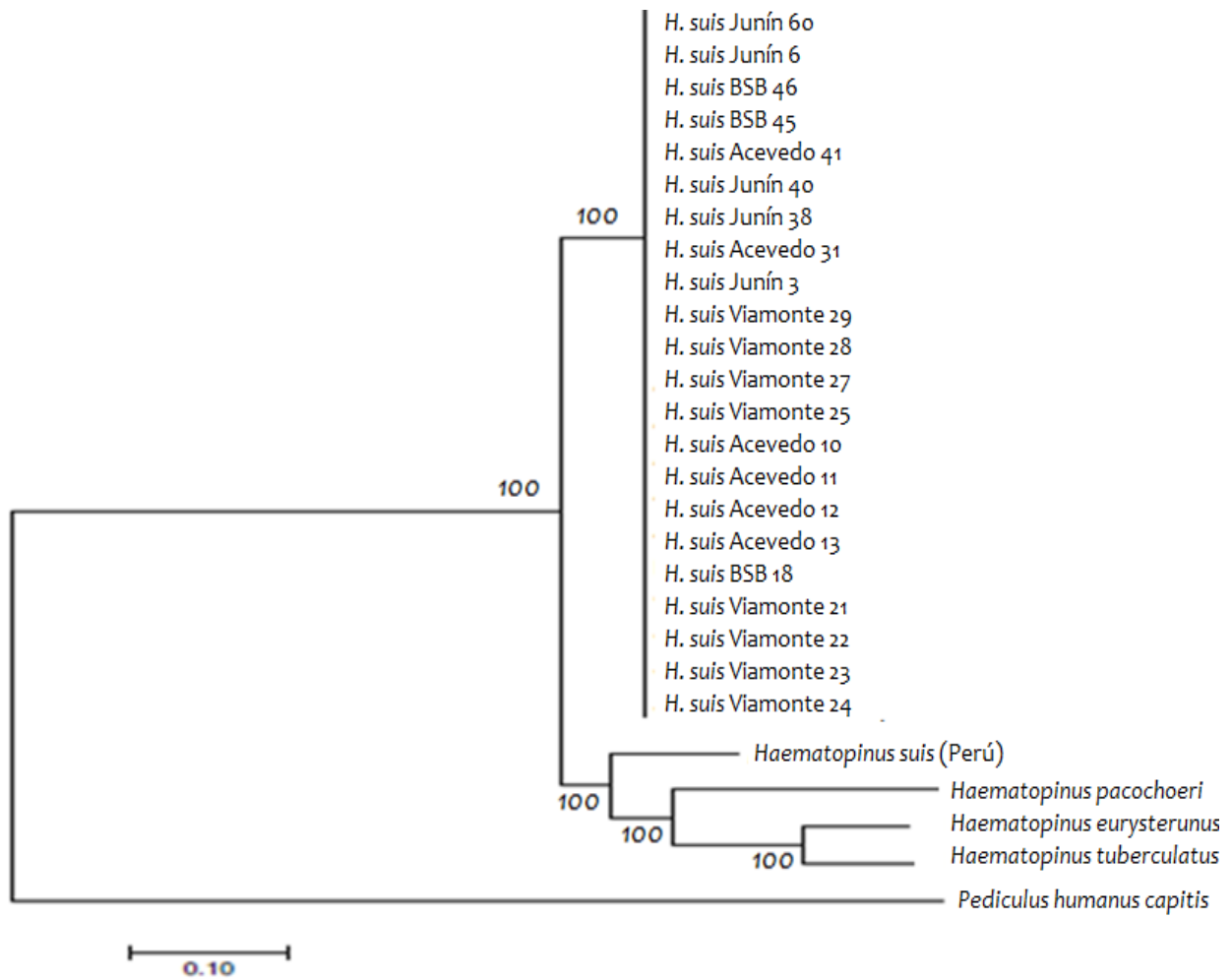


Figura 12. Árbol filogenético mediante la metodología NJ obtenido a partir del fragmento de 359pb del gen Citocromo Oxidasa I analizado para las especies *Haematopinus suis* de Buenos Aires y Perú, *Haematopinus eurysterunus*, *Haematopinus pacochoeri*, *Haematopinus tuberculatus* y *Pediculus humanus capitis*.

5.4 Relaciones haplotípicas

En la red de haplotipos (Figura 13) puede observarse un bajo número de haplotipos

para el marcador mitocondrial citocromo oxidasa I entre los ejemplares analizados, pero a pesar de ello, la diferenciación genética entre *H. suis* de Argentina y *H. suis* de Perú es alta (49 mutaciones de diferencia).

En relación a las especies del mismo género, también puede observarse un alto número de sitios polimórficos, siendo 78 pasos mutacionales entre *Haematopinus suis* de Buenos Aires y *Haematopinus pacochoeri*. Como era de esperarse debido a que se trata de especies de géneros diferentes, la mayor diferencia (173 mutaciones) se observó entre la especie estudiada y *Pediculus humanus capitis*, utilizada como *outgroup*.

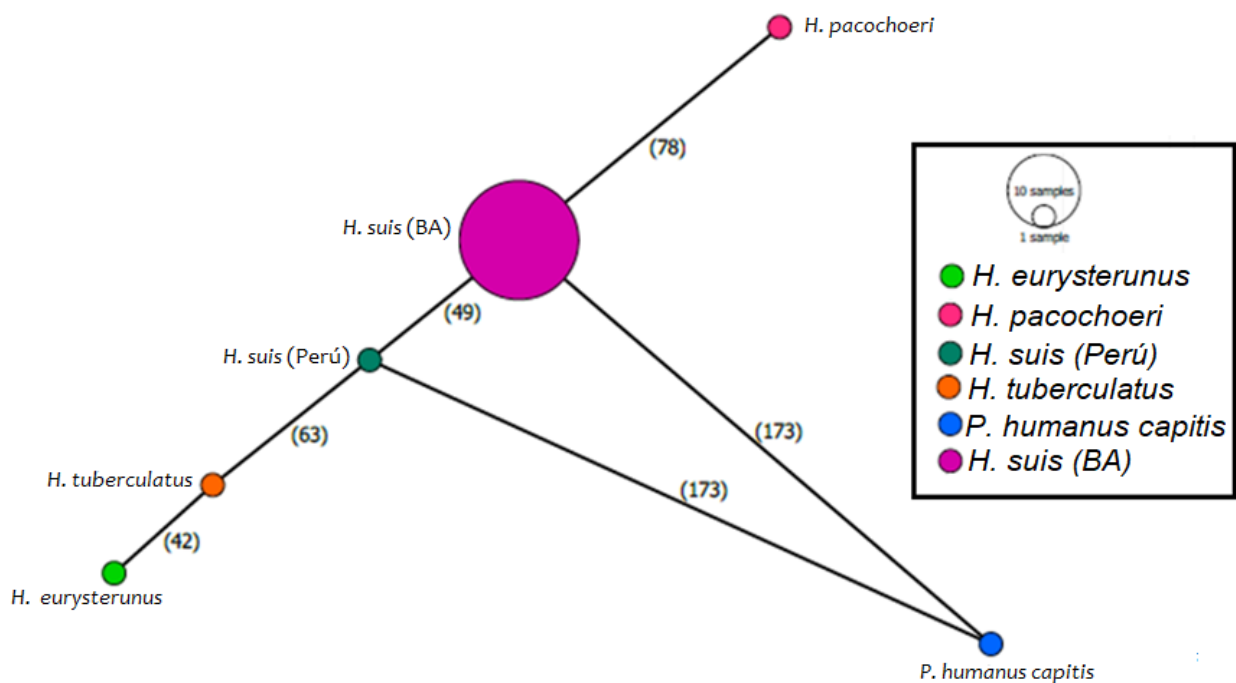


Figura 13. Red haplotípica obtenida mediante el análisis de *median joining* a partir de un fragmento del gen citocromo oxidasa I analizado para las especies *Haematopinus suis* de Buenos Aires y Perú, *Haematopinus eurysterunus*, *Haematopinus pacochoeri*, *Haematopinus tuberculatus* y *Pediculus humanus capitis*. El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras analizadas de cada especie. Los números indican el número de sitios polimórficos.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN:

Clásicamente, la taxonomía de los ectoparásitos se ha definido mediante estudios morfológicos; sin embargo, en las últimas décadas las herramientas moleculares han tenido un gran impacto en la taxonomía de este grupo de artrópodos. Entre los ejemplos más notables de ajustes taxonómicos en los que los análisis genéticos han sido determinantes, puede mencionarse la descripción de las familias Ixodidae y Argasidae y de nuevas especies de garrapatas (Paternina *et al.*, 2016). Por otra parte, la secuenciación completa del genoma mitocondrial del piojo del cerdo doméstico (*H. suis*), y del piojo del cerdo silvestre (*H. apri*) ha permitido interpretar el proceso de la fragmentación del genoma mitocondrial de los piojos de los mamíferos (Jiang *et al.*, 2013). Debido a las peculiaridades biológicas y ecológicas que presentan las diferentes especies ectoparásitas, los estudios genéticos se han convertido en una herramienta importante para explorar las relaciones poblacionales, delimitar especies, llevar a cabo análisis filogenéticos e, incluso, identificar potenciales zonas de riesgo de transmisión de enfermedades (Paternina *et al.*, 2016).

El trabajo realizado brinda la primera caracterización de *H. suis* en Argentina, sentando las bases para futuros estudios sobre su variabilidad morfológica y genética en distintas regiones del país, lo que es de gran interés debido a la falta de información y a la importancia patológica y económica de este ectoparásito (Drummond *et al.*, 1981).

El análisis morfológico de 33 piojos adultos mostró que no se encuentran diferencias entre los mismos, lo que sumado a los resultados obtenidos en los análisis genéticos de 27 muestras nos da una primera perspectiva acerca de la variabilidad presente en poblaciones de *H. suis* de cuatro localidades de la provincia de Buenos Aires. Se sugiere que la ausencia de variabilidad observada en las poblaciones de *H. suis* estudiadas podría corresponderse con la cercanía de las localidades de las cuales proceden las muestras, tratándose de sitios que se encuentran dentro de un radio de 370

kilómetros.

En este sentido, surge la necesidad de ampliar esta primera perspectiva siendo un desafío a futuro obtener material de otras zonas de la provincia y del país para poder llevar a cabo un análisis más exhaustivo de la morfología y genética de este ectoparásito y así contribuir al desarrollo de buenas estrategias de control y prevención de las pediculosis.

En base a la redescrición morfológica de *H. suis* aportada en este estudio, el macho de esta especie de piojo se caracteriza por poseer una placa basal espatulada fuertemente quitinizada; aedeagus con dos semitubos unidos formando una "Y" y placa esternal en forma de escudo. Las hembras presentan una placa genital trapezoidal, apodema pronunciado; ausencia de espermateca y bursacopulatrix; gonópodos planos y triangulares en la superficie ventral del octavo segmento abdominal; superficie dorsal del noveno segmento formando dos placas triangulares quitinosas.

En las poblaciones de *H. suis* examinadas no se encontraron diferencias significativas en dichas características diagnósticas para ambos sexos. No obstante, la línea de esclerotización del margen inferior de la cabeza se presentó como una banda ancha, excepto en los ejemplares de la localidad de Viamonte donde se observó una delgada línea. Si bien esta característica actualmente no se define como de importancia diagnóstica entre las especies del género *Haematopinus* (Florence, 1921; Meleney y Kim, 1974), futuros estudios más rigurosos podrían llegar a incorporarla como tal. Por otro lado, también se observaron diferencias a nivel del abdomen, en la mayoría de los ejemplares los paraterguitos se encuentran bien definidos, mientras que solo en algunos estos se observan fusionados, sin suficiente definición entre segmentos. Esta última característica es común en estadios ninfales, sin embargo, en los ejemplares donde se observó corresponden al estadio adulto, es decir con genitalia definida. Esto sugiere que para obtener una caracterización morfológica que mejor defina a la especie *H. suis* se

necesitan estudios completos que incluyan el análisis de la morfología en todos los estadios del desarrollo de este piojo.

Respecto a los análisis moleculares realizados, un punto a destacar es que al comparar las secuencias del fragmento mitocondrial citocromo oxidasa I obtenidas, con la única secuencia disponible en *GenBank* para la especie, se observaron 49 sitios variables en un fragmento de tan solo 359 pb. Esta gran diferenciación genética intraespecífica observada entre los individuos de las poblaciones de la provincia de Buenos Aires y los de Perú, nos hace dudar sobre si es correcta la entrada ingresada en *GenBank* como una secuencia perteneciente a la especie *Haematopinus suis* y no a una especie relacionada, ya que en el trabajo original no se detallan los caracteres morfológicos analizados para clasificar al espécimen como tal. Además se debe considerar que podría tratarse de especies crípticas (morfológicamente similares, pero genéticamente distintas), ya que éstas se han documentado dentro de una amplia gama de grupos de parásitos (Nadler y de León, 2011; Perkins *et al.*, 2011), principalmente debido a las limitantes para encontrar caracteres morfológicos que permitan la diferenciación entre especies estrechamente relacionadas.

Si bien COI es uno de los genes mitocondriales más comúnmente utilizados en piojos, así como en estudios filogenéticos de insectos, dado que es un marcador de evolución rápida ha sido especialmente útil para filogenias a nivel de especie (Light y Reed, 2008), se ha encontrado baja variabilidad para este marcador en las poblaciones de *H. suis* estudiadas. Por este motivo es de interés llevar a cabo la caracterización genética de la especie utilizando marcadores moleculares más variables, tales como la región control mitocondrial o los microsátélites, para comprobar si existe diferenciación genética entre los especímenes *H. suis*.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron ausencia de variabilidad entre los especímenes de *H. suis* estudiados de la provincia de Buenos Aires, ya que no se encontraron diferencias morfológicas, ni genéticas a partir del fragmento del marcador mitocondrial citocromo oxidasa I.

Este estudio preliminar sienta las bases para futuros estudios sobre la variabilidad morfológica y molecular en distintas poblaciones de *H. suis* distribuidas en Argentina con el fin de generar información útil para una correcta identificación de las especies y así desarrollar medidas de control y prevención de una de las parasitosis más relevantes en la producción ganadera de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA:

Abràmoff M. D., Magalhaes P. J., Ram S. J. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11(7):36-42.

Agbede R. I. S. 1981. A Survey of Ectoparasites and Parasitic conditions of animals in Zaria. *Nigerian Journal of Animal Production Research* 1:179-180.

Bandelt H. J., Foster P., Rohl A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48.

Barker S. C. 1994. Phylogeny and classification, origins, and evolution of host associations of lice. *Int J Parasitol.* 1994 Dec;24(8):1285-91.

Benítez Ortiz W., Sánchez M. 2001. Los cerdos locales en los sistemas tradicionales de producción. *Estudio FAO producción y sanidad animal* 148. 36p.

Brown W. M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3605-3609

Campagna D. 2005. Caracterización de los principales componentes de los sistemas de producción de cerdos a campo en Argentina. IIIº Encuentro Latinoamericano de Especialistas en Sistemas de Producción Porcina a Campo.

Castro J. I. 2012. Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos. Universidad de Barcelona. Facultad de biología. Departamento de genética. 1-178.

Cox A. J., Heber P. D. N. 2001 Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.* 10, 371–386.

Damriyasa I. M., Fallando K., Volmer R., Zahner H., Bauer C. 2004. Prevalence, risk factors and economic importance of infestations with *Sarcoptes scabiei* and *Haematopinus suis* in sows of pig breeding farms in Hesse, Germany. *Med Vet Entomol.* 2004 Dec; 18 (4):361-7.

Da Silva A. S., Lopes L. S., Díaz J. D., Tonin A. A., Stefani L. M., Araújo D. N. 2013. Lice outbreak in buffaloes: evidence of *Anaplasma marginale* transmission by sucking lice *Haematopinus tuberculatus*. *J Parasitol.* 2013 Jun;99(3):546-7. doi: 10.1645/GE-3260.1. Epub 2012 Oct 10.

Degen A. A. 2006. Effect of macroparasites on the energy budget of small mammals. In: Morand S., Krasnov B., Poulin R. eds. *Micromammals and Macroparasites. From Evolutionary Ecology to Management*, Tokyo, JP, Springer. , p. 371-401.

Derting T., Compton S. 2003. Immune response, not immune maintenance, is energetically costly in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Physiol. Biochem. Zool.*, 76:744-752.

Doyle J. J., Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.

Drummond R. O., Lambert, G., Smalley, H.E., Terrill, C.E. 1981. Estimated losses of livestock to pests. In *CRC Handbook of pest management*, 1: 111–127. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press Inc.

Durden L. A., Musser G. G. 1994. The sucking lice (Insecta, Anoplura) of the world: a taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographical distributions. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 218:1-90.

Earle C., Stevenson B. 1905. The external parasites of hogs, being articles on the hog louse (*Haematopinus suis*) and mange, or scabies, of hogs. Zoological Laboratory, Bureau of Animal Industry. Boletin N° 69.

Florence L. 1921. The hog louse, *Haematopinus suis* Linné: Its biology, anatomy and histology. Cornell University Agricultural experiment station.

Folmer O., Black M., Hoeh, W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994 DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 294–299.

George J. B., Otobo S., Ogunleye J., Adediminyi B. 1992. Louse and mite infestation in domestic animals in northern Nigeria. Trop Anim Health Prod. 1992 May;24(2):121-4.

Gipson P. S., Veatch J. K., Matlack R. S., Jones D. P. 1999. Health Status of a Recently Discovered Population of Feral Swine in Kansas. J Wildl Dis. 1999 Jul;35(3):624-7.

Girisgin O., Girisgin A. O., Sonmez F., Akyol V. 2008. Occurrence of *Haematopinus suis* Linnaeus, 1758 (Insecta, Anopluridae) on a wild boar (*Sus scrofa*). Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2009; 33(6): 529-530.

González A. P., Barrios S., Vassena C., Mougabure C. G., Zerba E., Picollo M. I. 2005. Aumento de la actividad monooxigenasa asociada a la resistencia a la permetrina en *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) de Argentina. J Med Entomol. 2005 de mayo; 42 (3): 342-5.

Guimarães J. H., Tucci E. D., Barros Batesti D. M. 2001. Ectoparásitos de importancia veterinaria. Pleiade-FAPESP, Sao Paulo. 218p.

Hafner M. S., Sudman P. D., Villablanca F. X., Spradling T. A., Demastes J.

W., Nadler S. A. 1994. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science*. 1994 Aug 19;265(5175):1087-90.

Hall T. 2004. BioEdit 6.0.7. Department of Microbiology, North Carolina State University. From <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Hennig W. 1966. *Phylogenetic systematic*. University of Illinois Press, Urbana.

Hershey A. D., Chase M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 36, 39-56.

Jiang H., Barker S. C., Shao R. 2013. Substantial Variation in the Extent of Mitochondrial Genome Fragmentation among Blood-Sucking Lice of Mammals. *Genome Biol. Evol.* 5(7):1298–1308.

Johnson P. T. 1972. Sucking lice of Venezuelan Rodents with remarks on related species (Anoplura). *Brig. Y. U. Sci. Bull. Biol. Series* 17:1-61.

Kabululu M. L., Ngowi H. A., Kimera S. I., Lekule F. P., Kimbi E. C., Johansen, M. V. 2015. Risk factors for prevalence of pig parasitoses in Mbeya Region, Tanzania. Vol. 212, No 3-4, 460–464.

Kagira J. M., Kanyari P. N., Maingi N., Githigia S. M., Ng'ang'a C., Gachohi J. 2013. Relationship between the Prevalence of Ectoparasites and Associated Risk Factors in Free-Range Pigs in Kenya. *ISRN Vet Sci.* 2013 Jul 24;2013:650890.

Knowlton N., Weigt L. A. 1998 New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 2257–2263.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016 Jul;33(7):1870-4.

Leigh J. W., Bryant D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9): 1110–1116.

Leonardi S. 2014. Faster the better: a reliable technique to sample anopluran lice in large hosts. *Parasitol. Res.*, 113:2015–2018.

Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451-1452.

Light J. E., Reed D. L. 2008. Multigene analysis of phylogenetic relationships and divergence times of primate sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *Mol Phylogenet Evol.* 2009 Feb;50(2):376-90. doi: 10.1016/j.ympev.2008.10.023. Epub 2008 Nov 6.

Lynch M., Jarrell P. E. 1993. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics*. 1993 Dec;135(4):1197-208.

Marshall A.G. 1981. The ecology of ectoparasitic insects. New York, Academic. 459pp.

Meleney W. P., Kim K. C. 1974. A comparative study of cattle-infesting *Haematopinus*, with redescription of *H. quadripertusus* Fahrenholz, 1916 (Anoplura: Haematopinidae). *J Parasitol.* 1974 Jun; 60(3):507-22.

Merino L. M., Carpinetti B. N. 2003. Feral pig *Sus scrofa* populations estimates in Bahía Samborombón Conservation Area, Buenos Aires province, Argentina. *Mastozool. Neot.*, 10:269-275.

Nadler S. A., De León G. P. P. 2011. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology* 138, 1688–1709.

Nari A., Eddi C., Ricardo Martins J., Benavides E. 2003. Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal. In: Nari A., Eddi C., Ricardo Martins J., & Benavides E. eds. Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 157-159.

Núñez Domingo C. 2011. Análisis de ADN mitocondrial y de polimorfismos genéticos de los cromosomas autosómicos y sexuales de la población mestiza de Nicaragua. Universidad de Zaragoza. Departamento de anatomía patológica, medicina legal y forense y toxicológica. 1-210.

Palomo Yagüe A. 2008. La sarna en porcinos. Universo porcino. Consultado 9 jun. 2016. Disponible en <http://www.produccion-animal.com.ar>. Enfermedades parasitarias de los porcinos.

Paternina L. E., Verbel-Vergara D., Bejarano E. E. 2016. Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes *16S* y *COX1* para los análisis genéticos en garrapatas (Acari: Ixodidae). *Biomédica* 2016;36: 295-302

Penrith M. L., Vosloo W. 2009. Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J S Afr Vet Assoc.* 2009 Jun;80(2):58-62.

Permin A., Yelifari L., Bloch P., Steenhard N., Hansen N. P., Nansen P. 1999. Parasites in cross-bred pigs in the Upper East region of Ghana. *Vet Parasitol.* 1999 Nov; 87(1):63-71

Perkins L., Martinsen E. S., Falk, B. G. 2011. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology* 138, 1664–1674.

Pinheiro Machado. 1973. Los cerdos. Ed. Hemisferio Sur. 528 pp.

Pintos M. E., Scodellaro C. F., Perfumo C. J., Posik D., Arauz M. S. 2011. Infección

por mycoplasma suis en el cerdo. una revisión bibliográfica. *Analecta Veterinaria*, 31 (1): 40-46.

Portiansky E. L., Quiroga M. A, Machuca M. A, Perfumo C. J. 2004. *Mycoplasma suis* in naturally infected pigs: an ultrastructural and morphometric study. *Pesq. Vet. Bras.* 24(1):1-5, jan./mar. 2004.

Poulin R., Mouillot D. 2005. Combining phylogenetic and ecological information into a new index of host specificity. *J Parasitol.* 2005 Jun;91(3):511-4.

Poulin R., Krasnov B. R., Shenbrot G. I., Mouillot D., Khokhlova I. S. 2006. Evolution of host specificity in fleas: is it directional and irreversible. *Int J Parasitol* 2006 Feb;36(2):185-91.

Rothschild M. F., Ruvinsky A. 1998. *Genetics of the Pig*. Primera edición. Department of Animal Science, Center for Integrated Animal Genomics, Iowa State University, Ames, IA 50011-3150, USA.

Scofield A., Campos K. F., Da Silva A. M., Oliveira C.H., Barbosa J. D., Góes-Cavalcante G. 2012. Infestation by *Haematopinus quadripertusus* on cattle in São Domingos do Capim, state of Pará, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012 Jul-Sep;21(3):315-8.

Smith V. S., Light J. E., Durden L. A. 2008. Rodent louse diversity, phylogeny, and cospeciation in the Manu Biosphere Reserve, Peru. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2008, 95, 598–610.

Thibault S., Drolet R., Alain R., Dea S. 1998. Congenital swine pox: A sporadic skin disorder in nursing piglets. *Swine Health and Production.* 1998;6(6):276–278.

Ullio-Gamboa G., Palma S., Benoit J. P., Allemandi D., Picollo M. I., Toloza, A. C.

2017. Ivermectin lipid-based nanocarriers as novel formulations against head lice. *Parasitol Res.* 2017 Aug;116(8):2111-2117. Epub 2017 May 18.

Vaidya R. 2003. "Haematopinus suis" (en línea), Animal Diversity Web. Consultado el 27 de octubre de 2017 en http://animaldiversity.org/accounts/Haematopinus_suis/

Wallace D. C. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(19): 8739-8746.

Wares J. P., Cunningham C. W. 2001 Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 12, 2455–2469.

Watson J. D., Crick F. H. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.

Zhang D. X., Hewitt G. M. 1997 Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. *Insect Mol. Biol.* 6, 143–150.

RESUMEN

9. RESUMEN:

Los sistemas de producción porcina se pueden clasificar en dos tipos, uno altamente intensificado que tiene todas las etapas de producción bajo galpón con dietas balanceadas según los requerimientos de cada categoría porcina; y otro que tiene una o más etapas de producción a campo, representado por más del 80% de las producciones en Argentina.

En los sistemas con menor nivel de intensificación, la producción se realiza a campo con instalaciones de bajo costo, donde se encuentran expuestos a varios factores de riesgo sanitario, los que incluyen una alimentación pobre en nutrientes, la infraestructura precaria y la falta de higiene de los corrales y además el tratamiento antiparasitario poco frecuente, siendo las ectoparasitosis uno de los problemas sanitarios más comunes.

Dentro de las ectoparasitosis, la pediculosis provocada por el piojo *Haematopinus suis* es una importante causa de pérdidas económicas que deriva de las pérdidas del rendimiento del ganado. Actualmente diversas estrategias, como el uso de medicamentos y vacunas, se han previsto a fin de controlar de manera efectiva dicha problemática. Sin embargo, para el éxito en este tipo de estrategias, se requiere del conocimiento completo de la biología, sistemática y epidemiología de la especie ectoparásita en cuestión. Por lo tanto, la correcta identificación de los piojos y el conocimiento de su distribución geográfica y hospedatoria, son fundamentales para el desarrollo de buenas estrategias de control y prevención de las pediculosis.

En nuestro país, son escasos los estudios que contemplan aspectos sistemáticos y genéticos de las especies de ectoparásitos que afectan al ganado porcino, por este motivo el objetivo general del presente trabajo es ampliar el conocimiento sobre el piojo *Haematopinus suis*, parásito de *Sus scrofa domestica*, mediante la caracterización morfológica y molecular de especímenes asociados a poblaciones de cerdos domésticos y ferales de la provincia de Buenos Aires.

Para ello se analizaron especímenes provenientes de poblaciones de *Sus scrofa domestica* de criaderos de Acevedo, General Viamonte y Junín, y de poblaciones ferales de Bahía Samborombón. El estudio morfológico de 33 piojos adultos *Haematopinus suis* no mostró diferencias entre los individuos analizados de cada localidad. El macho de *H. suis* se caracteriza por poseer una placa basal espatulada fuertemente quitinizada; aedeagus con dos semitubos unidos formando una “Y”, delimitados lateralmente por delgados parámetros que se extienden sin fusionarse hasta el octavo segmento abdominal. Las hembras presentan una placa genital trapezoidal, apodema pronunciado; ausencia de espermateca y bursacopulatrix; gonópodos planos y triangulares en la superficie ventral del octavo segmento abdominal; superficie dorsal del noveno segmento formando dos placas triangulares quitinosas. Para los estudios moleculares se analizó el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (365pb), los resultados no arrojaron diferencias significativas dentro y entre poblaciones, obteniéndose un único haplotipo, que difiere en 49 sitios de la única secuencia disponible para la especie en *GenBank*, procedente de Perú.

Los resultados obtenidos dan una primera perspectiva acerca de la variabilidad presente en las poblaciones de *H. suis* de la provincia de Buenos Aires, observando que las muestras estudiadas no presentan diferenciación morfológica ni genética para el fragmento COI analizado y sientan las bases para futuros estudios en distintas regiones del país.