

## Primer análisis de la variabilidad del ADN mitocondrial de *Cochliomyia hominivorax* en animales domésticos del Uruguay

Fresia P.<sup>1</sup>; Lanzzeri, S.<sup>1</sup>; Martínez, E.<sup>1</sup>; Carballo, M.<sup>3</sup>; Goñi, B.<sup>2</sup>; Cristina, J.<sup>1</sup> y Gama, S.<sup>1</sup>

### RESUMEN

La mosca de la bichera, *Cochliomyia hominivorax*, es un ectoparásito obligado de los vertebrados de sangre caliente en la región Neotropical y una de las principales plagas que ocasiona importantes pérdidas económicas en la producción pecuaria. Un programa de control de esta plaga incluye estrategias que contemplen la variabilidad genética y la estructura las poblaciones blanco. *C. hominivorax* fue identificada como la causante de las miasis en todas las muestras de animales domésticos colectadas en las cuatro localidades del Uruguay, indicando una alta incidencia de la mosca de la bichera en esta muestra. Se presenta por primera vez, datos preliminares de la variabilidad del ADN mitocondrial (ADNmt) de las muestras de *C. hominivorax* colectadas en el Uruguay utilizando marcadores PCR-RFLP del genoma mitocondrial. La región control (A+T/12S) y las subunidades 1 y 2 del gen de la citocromo oxidasa (*cox1/cox2*) del ADNmt fueron amplificadas y digeridas con enzimas de restricción. Se detectó polimorfismo en la región *cox1/cox2*, lo que indica la presencia de diferentes linajes maternos en las poblaciones locales. Los resultados de este trabajo indican que la técnica de PCR-RFLP del ADNmt es un método sensitivo para el estudio de la variación genética en poblaciones de *C. hominivorax*.

**Palabras clave:** *Cochliomyia hominivorax*, miasis, ADNmt, PCR-RFLP, Uruguay.

### SUMMARY

The New World Screw-worm (NWS) fly, *Cochliomyia hominivorax*, is an obligate ecto-parasite of warm-blooded vertebrates in the Neotropical region and one of the main insect pest that causes important economic losses in the livestock production. A control program of this pest includes a strategy that contemplates the genetic variability and the structure of the target populations. *C. hominivorax* was identified as the myiasis causing specie in all the samples of the domestic animals collected in the four localities of Uruguay, indicating a high incidence of the screw-worm fly in this sample. Are presented for the first time, preliminary data of the mitochondrial DNA (mtDNA) variability of the samples of *C. hominivorax* collected in Uruguay utilizing PCR-RFLP markers of the mitochondrial genome. The control region (A+T/12S) and the sub-units 1 and 2 of the cytochrome oxidase gene (*cox1/cox2*) of the mtDNA were amplified and digested with restriction enzymes. Polymorphism was detected in the *cox1/cox2* region, indicating the presence of different maternal strains in the local populations. The results of this work indicate that the PCR-RFLP technique of the mtDNA is a sensitive method for the study of the genetic variation in the *C. hominivorax* populations.

**Key words:** *Cochliomyia hominivorax*, mtDNA, myiasis, PCR-RFLP, Uruguay.

### INTRODUCCIÓN

La mosca de la bichera, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, Diptera: Calliphoridae), es un ectoparásito del ganado que ocasiona importantes pérdidas económicas en la producción pecuaria en la región Neotropical. El empleo de la Técnica de Insectos Estériles (TIE) en el periodo de 1957 a 2000 (21) ha permitido erradicar este plaga en Norte y Centro América (3). La distribución actual de *C. hominivorax* se extiende en parte del Caribe y América de Sur hasta Argentina, excepto Chile (6, 20).

Todos los vertebrados de sangre caliente, incluido el hombre, pueden ser infes-

tados por larvas de la mosca de la bichera. Las hembras grávidas ponen sus masas de huevos en el borde de heridas o en las mucosas asociadas a las aberturas naturales de los hospederos, donde las larvas se nutren de tejidos vivos y fluidos corporales (4). Este proceso, denominado miasis cutánea, exhala un olor característico que atrae, a su vez, a otras hembras a oviponer en las heridas, causando así una significativa morbilidad y mortalidad de los animales infectados (13).

En Uruguay, como en el resto de Sudamérica, *C. hominivorax* es el agente principal de las miasis cutáneas primarias, representando un grave problema sani-

tario que ocasiona considerables pérdidas económicas (2, 6). Debido a ello y a su interferencia en el comercio de animales en pie, el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) ha convocado al diseño de un programa para el control de sus poblaciones usando TIE.

Un componente fundamental de una estrategia que contemple el manejo de plagas en áreas extensas, como la utilizada en *C. hominivorax* en Norte y Centro América, es la caracterización de la variabilidad genética de las poblaciones blanco (3). Aplicando la teoría de genética de poblaciones pueden ser estimados el número de inmigrantes entre las po-

<sup>1</sup>Laboratorio de Veterinaria, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias (UdelaR). Matajojo 2055, Montevideo, Uruguay.  
E-mail: pfresia@fcien.edu.uy

<sup>2</sup>Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias (UdelaR).

<sup>3</sup>Ejercicio liberal de la profesión.

Recibido: 21/8/06 Aprobado: 12/3/07

blaciones (flujo génico), las distancias genéticas pareadas, así como el tamaño efectivo y los eventos históricos de la población (Ej. «cuellos de botella», expansiones rápidas del tamaño poblacional). Brevemente, el análisis de la variabilidad genética y la estructura poblacional permite estimar el grado de aislamiento genético entre las poblaciones blanco y entre poblaciones no alcanzadas por el programa de control. Además, el relacionamiento entre las cepas criadas en las plantas de irradiación y las poblaciones blanco puede ser estimado en términos de composición alelica y frecuencias génicas. La información sobre la variabilidad genética de una especie plaga puede ser, también, muy importante para estipular las condiciones de monitoreo de las poblaciones después de las campañas de supresión o erradicación (Ej. determinación del origen de nuevos brotes de la plaga), así como para estudiar las posibles vías de dispersión y evaluar el riesgo de invasiones a un área determinada (11).

En este sentido, las técnicas de biología molecular han mostrado ser herramientas genéticas de gran utilidad en estudios poblacionales, generando datos confia-

bles con relativa facilidad y rapidez. En poblaciones de *C. hominivorax*, el uso de la técnica de RFLP (polimorfismos de fragmentos de restricción) del ADN mitocondrial (ADN<sub>mt</sub>) ha sido una de las herramientas preferidas para estudiar la estructura poblacional, flujo génico y relacionamiento filogenético (1, 7, 14, 15). Otra metodología usada para el estudio de la variación del ADN<sub>mt</sub> es la técnica de PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa - polimorfismos de largos fragmentos de restricción) (19). Según Simon y col. (18), esta metodología es más barata, rápida y permite una alta resolución, inclusive de muestras mal conservadas.

El ADN<sub>mt</sub> presenta algunas características genéticas relevantes que lo hacen un marcador evolutivo informativo en estudios a nivel intraespecífico, como la predominancia de herencia maternal, la ausencia de recombinación y la alta tasa de evolución molecular.

Aquí se presentan los datos de la incidencia de larvas de *C. hominivorax* en miasis de animales domésticos infestadas de forma natural en el Uruguay las cuales son utilizadas para investigar, por primera vez, la variabilidad genética del ADN<sub>mt</sub> de *C. hominivorax* en nuestro país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Se colectaron un total de 240 larvas de segundo y tercer estadio, y tres adultos en miasis de ovinos, bovinos y caninos en cuatro localidades de Uruguay de marzo a mayo de 2002, según se detalla en Cuadro 1 y Figura 1. Los 3 individuos adultos colectados fueron hembras capturadas sobre miasis de ovinos en el momento de la oviposición en la localidad de Daymán. Las larvas fueron mantenidas vivas en un medio de carne, sangre y agua (12:2:1) hasta su clasificación y luego se fijaron en alcohol etílico absoluto para su posterior análisis molecular (7). Las larvas fueron identificadas al nivel de especie utilizando los caracteres morfológicos, según la clave entomológica de FAO (12).

### Extracción del ADN

Se aisló el ADN de larvas y adultos utilizando el método de fenol: cloroformo y se precipitó con alcohol etílico absoluto siguiendo el protocolo descrito en Infante Vargas & Azeredo-Espin (7). Todas las extracciones de ADN se almacenaron a -20°C.

Cuadro 1.

Localidad	Fecha	Nº de larvas/ heridas	Nº de heridas	Hospedero
La Estanzuela, Colonia	15 abril	5, 7, 10 y 14	7	Ovino
	7 mayo	3, 52 y 69		
<b>Total</b>		<b>160</b>		
Joaquín Suárez, Canelones	19 marzo	14	2	Cánido
	28 marzo	13		
<b>Total</b>		<b>27</b>		
Daymán, Paysandú	22 mayo	13	1	Ovino
<b>Total</b>		<b>13</b>		
San Antonio, Salto	23 mayo	3, 3	4	Bovino
		15, 19		Ovino
<b>Total</b>		<b>40</b>	<b>14</b>	

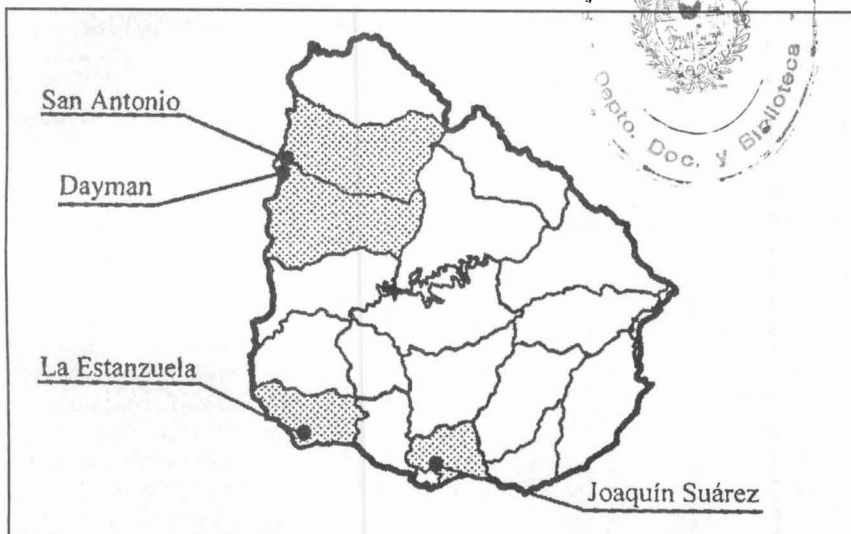


Figura 1. Mapa de Uruguay.

### Amplificación del ADNmt

Se amplificó la región control (A+T/12S) y la secuencia completa de las subunidades 1 y 2 del gen de la citocromo oxidasa (*cox1/cox2*) del ADNmt de *C. hominivorax* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar la región control se usaron los cebadores SR-J14233 (5' aagagcgacggcgatgtgt 3') y TM-N-193 (5' tggggtatgaaccagtagc 3'), este fragmento amplificado tiene un tamaño de 2100pb e incluye al gen 12S del ARN ribosomal. La región *cox1/cox2* tiene un tamaño de 2300pb y fue amplificada utilizando los cebadores TK-N-3785 (5' gttaagagaccagcttg 3') y TY-J-1460 (5' tacaattatgcctaaactcagcc 3'). Los cuatro cebadores usados pertenecen al conjunto de oligonucleótidos mitocondriales universales para insectos descrito por Simon y col. (17). Las reacciones de amplificación se realizaron en las condiciones descritas en Lessinger & Azeredo-Espin (8) y Litjens y col. (10) usando termocicladores programables Perkin-Elmer (Norwalk, CT) o PT-200 (MJ Research). En todas las reacciones se corrieron controles negativos. Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1,0% en buffer TAE 1x (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) junto a un marcador de peso molecular.

### Análisis de restricción del ADN mitocondrial

Se analizó el ADNmt de *C. hominivorax* de tres individuos de cada localidad estudiada y, como control, de tres individuos de las localidades de Caraguatuba, Estado de São Paulo; Goiania, Estado de Goiania y Manaus, Estado de Amazonas en Brasil. El ADNmt de los individuos de Brasil fue obtenido de extracciones realizadas por Infante Vargas y Azeredo-Espin (7). Alícuotas (3 $\mu$ l) de las reacciones de amplificación fueron digeridas en las condiciones especificadas por el fabricante de las enzimas (Gibco-BRL y Pharmacia, Peapack, NJ). La región control fue digerida con las enzimas de restricción *DraI*, *EcoRV*, *HindIII* y *SspI*, y la región *cox1/cox2* con *AseI*, *EcoRV*, *MspI*, *SspI*, *SstI* y *XhoI*. Las enzimas usadas fueron seleccionadas de acuerdo a resultados de PCR-RFLP y RFLP previamente descritos por varios autores (7, 10, 19), así como mediante el análisis de las regiones A+T/12S y *cox1/cox2* con el programa WebCutter (5) sobre la secuencia del ADNmt de *C. hominivorax* reportada (9). Las digestiones se pararon con bromofenol, luego del tiempo de reacción especificado por el fabricante para cada enzima (Gibco-BRL y Pharmacia, Peapack, NJ). Los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en geles horizontales de agarosa (concentración 1,5%; 1,7% y 2,0%)

en buffer TAE 1x (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV. Las fotografías de los geles se obtuvieron con el paquete EDAS 290 de Kodak. Para estimar los tamaños de los fragmentos se usó el marcador de peso molecular DNA Ladder Plus 1Kb (Gibco-BRL). Los diferentes patrones de restricción obtenidos al digerir cada una de las regiones analizadas se designan con letras mayúsculas (Cuadro 2).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las larvas y adultos colectados (Cuadro 1) pertenecieron a la especie *C. hominivorax* no habiéndose detectado larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) ó *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), especies de califóridos asociadas a los procesos de miasis secundarias. La incidencia de miasis relacionadas a cualquiera de estas dos últimas especies en el Uruguay es baja (2). Según los datos de Carballo y col. (2), alrededor del 88% de las larvas encontradas en miasis de rumiantes en el Uruguay fueron de *C. hominivorax*, y el resto (12%) a larvas de *C. macellaria* (~5,6%) y *C. albiceps* (~6,4%). Nuestros resultados también sostienen que *C. hominivorax* es la especie mas frecuente en los procesos miásicos en el Uruguay.

El análisis del ADNmt de muestras de *C. hominivorax* reveló que el tamaño de los fragmentos de las dos regiones amplificadas fue el esperado de acuerdo a la secuencia del genoma mitocondrial de *C. hominivorax* reportado por Lessinger y col. (9). La amplificación de la región control (A+T/12S) reveló un fragmento de 2100pb y, en la región *cox1/cox2*, un fragmento de 2300pb.

La búsqueda inicial de sitios de restricción mediante la técnica de PCR-RFLP del ADNmt de *C. hominivorax* mostró que dos de las ocho enzimas usadas presentaron polimorfismo en las muestras analizadas. Las enzimas *AseI* y *MspI* revelaron variación genética en la región *cox1/cox2*, detectándose dos y tres patrones de restricción, respectivamente. No se detectó polimorfismo en la región control (A+T/12S) con las enzimas usadas, este resultado puede deberse a las enzimas usadas ya que es una de las re-

**Cuadro 2.** Patrones de restricción y tamaño de los fragmentos de la región *cox1/cox2* del ADN<sub>mt</sub> de las poblaciones uruguayas de *C. hominivorax*.

Enzima de restricción	Patrón	Tamaño de los fragmentos (en pb)				Total (en pb)
AseI	A	1100	460	350	220	2130
	B	1100	680	350		2130
MspI	A	1500	480			1980
	B	1400	480			1880
	C	1500	300			1800

giones más variables del ADN<sub>mt</sub> en vertebrados e invertebrados (16). El Cuadro 2 presenta los tamaños de los fragmentos correspondientes a los distintos patrones de restricción obtenidos en la región *cox1/cox2*. Las diferencias entre el tamaño total de las regiones amplificadas y la suma de los fragmentos obtenidos al digerir las muestras pueden explicarse por la existencia de un número desconocido de fragmentos pequeños, menores a 200pb, los cuáles no pueden ser visualizados en los geles.

Las Figuras 2 y 3 presentan los patrones de restricción de los individuos analizados. Si bien estos resultados son preliminares, podemos observar algunas di-

ferencias en la distribución de los patrones de restricción entre los individuos de la muestra de Uruguay (columnas 1-6 y 16-18 de la Figura 2; 1-10 de la Figura 3), así como entre los individuos de las muestras de Uruguay y Brasil.

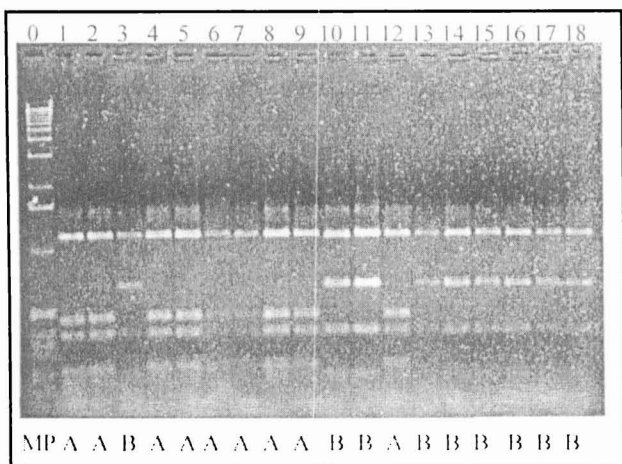
Las técnicas de PCR-RFLP y RFLP han sido usadas exitosamente para investigar la variabilidad genética del ADN<sub>mt</sub> en poblaciones de *C. hominivorax* de América del Norte, Centro y Sur. Estos estudios revelaron altos índices de variabilidad en las muestras analizadas (7, 9, 17, 19).

El polimorfismo del ADN<sub>mt</sub> detectado en las muestras de *C. hominivorax* en este trabajo concuerda, en parte, con los resultados obtenidos en otras poblacio-

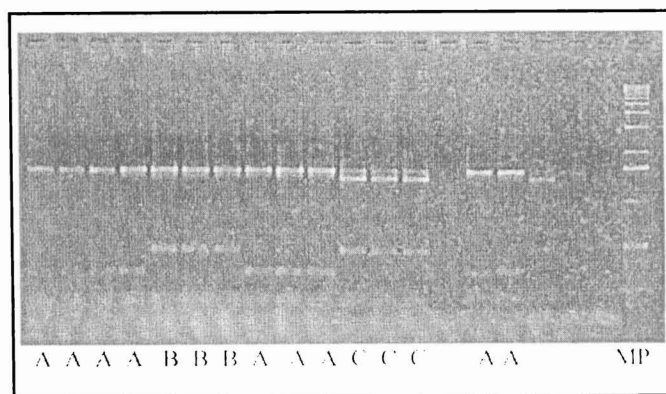
nes, indicando la presencia de diferentes linajes maternos coexistiendo en las poblaciones uruguayas. Los datos aquí reportados revelan cierto grado de variabilidad genética, sin embargo, es importante destacar que son insuficientes para conocer los patrones de distribución de los linajes maternos, la estructura genética y la existencia o no de flujo de individuos entre las poblaciones que habitan nuestro país. Para ello es necesario el empleo un mayor número de enzimas de restricción y ampliar el número de muestras (y localidades), sería importante también incluir muestras de localidades de regiones cercanas a nuestro país para obtener una mejor información que permita evaluar la composición genética de las poblaciones de *C. hominivorax* que habitan esta región.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración académica con el grupo liderado por la Dra. Ana Maria L. Azere-do-Espin, Laboratorio de Genética Animal, Centro de Biología Molecular e Ingeniería Genética, Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil. Los autores agradecen a la Lic. M. L. Lyra y R. A. Rodrigues por su valiosa asistencia en el análisis molecular de las muestras, y a M. S. Couto (UNICAMP) por el cultivo de los linajes de *C. hominivorax*. Las muestras fueron colectadas gracias al apoyo del Sr. A. Maggi, los dueños y trabajadores de los establecimientos pecuarios visitados. Este trabajo fue parcialmente financiado por el OIEA, Research Contract URU-11769.



**Figura 2.** Patrones de digestión del ADN<sub>mt</sub> con AseI.



**Figura 3.** Patrones de digestión del ADN<sub>mt</sub> con MspI.

## Referencias bibliográficas

1. **Azeredo Espin, A.M.L. (1993).** Mitochondrial DNA variability in geographic populations of screwworm fly from Brazil. *International Atomic Energy Agency (IAEA-SM-327/17)*, Vienna, Austria, 327 (17):161-165.
2. **Carballo, M.; Colombo, A. & Heinzen, T. (1990).** Presencia de especies de dípteros califóridos causantes de miasis cutáneas en Uruguay. Relevamiento de larvas parasitarias (instar III) en rumiantes. *Veterinaria* 26(110): 4-6.
3. **Graham, O.H. (1985).** Symposium on Eradication of the Screwworm from the United States and México. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 62. 68p.
4. **Guimarães, J.H.; Papavero, N. & Prado, A.P. (1983).** As Miíases na Região Neotropical (Identificação, Biologia, Bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1(4): 239-416.
5. **Heiman, M. (1997).** Software Webcutter 2.0. <http://www.firstmarket.com/cutter>.
6. **International Atomic Energy Agency/ Food and Agriculture Organization (IAEA/FAO). (2000).** Genetic sexing and population genetics of screwworms. *International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.*
7. **Infante Vargas, M.E. & Azeredo-Espin, A.M.L. (1995).** Genetic Variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochem. Genet.* 33 (7-8):237-256.
8. **Lessinger, A.C., and A.M.L. Azeredo-Espin. (2000).** Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 14 (1): 71-80.
9. **Lessinger, A.C.; Martins Junqueira, A.C.; Lemos, T.A.; Kemper, E.L.; da Silva, F.R.; Vettore, A.L.; Arruda, P. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2000).** The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Insect. Mol. Biol.* 9(5):521-529.
10. **Litjens, P.; Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. (2001).** Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Mol. Vet. Entomol.* 15 (2):183-188.
11. **McPheron, B. A. (2000).** Population genetics and cryptic species. In: Area-wide control of fruit flies and other insect pests. K. H. Tan, ed. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang. pp. 483-490.
12. **Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1992).** Manual para el control de la mosca del gusano barrenador del ganado *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). Roma.
13. **Reichard, R.E. (2002).** Area-wide biological control of disease vectors and agents affecting wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 21 (1): 179-185.
14. **Roehrdanz, R.L. (1989).** Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem. Genet.* 27 (9-10): 551-569.
15. **Roehrdanz, R.L. & Johnson, D.A. (1988).** Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* 25 (2): 136-141.
16. **Simon, C. (1991).** Molecular systematics at the species boundary: exploiting conserved and variable regions of mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA. In: Hewitt, G.M. Johnston, A.W.B. & J.P.W. Young (Eds.) *NATO ASI Series*, vol. 57. *Molecular techniques in taxonomy.* Springer-Verlag pp. 33-71.
17. **Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H. & Flook, P. (1994).** Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ent. Soc. Am.* 87 (6): 651-701.
18. **Simon, C.; McIntosh, C. & Deniega, J. (1993).** Standard restriction fragment length analysis of the mitochondrial genome is not sensitive enough for phylogenetic analysis or identification of 17-year periodical cicada broods (Hemiptera: Cicadidae): the potencial for a new technique. *Ent. Soc. Am.* 86 (3): 229-238.
19. **Taylor, D.B.; Szalanski, A.L. & Peterson II, R.D. (1996).** Mitochondrial DNA variation in screwworm. *Med. Vet. Entomol.* 10 (2): 161-169.
20. **Wyss, J.H. & Galvin, T.J. (1996).** Central America regional screwworm eradication program (benefit/cost study). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 791 (23):241-247.
21. **Wyss, J.H. (2000).** Screw-worm eradication in the Americas – overview. In: Area-wide control of fruit flies and other insect pests. K. H. Tan, ed. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang. pp. 79-86.

