



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DEL VECTOR DE *HEPATOZOON SPP.*,
HEMOPARÁSITO DEL MONITO DEL MONTE (*DROMICIOPS GLIROIDES*)**

LETICIA GUTIÉRREZ JIMÉNEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: DR. RODRIGO VÁSQUEZ SALFATE

**SANTIAGO, CHILE
2008**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DEL VECTOR DE *HEPATOZOON SPP.*, HEMOPARÁSITO DEL MONITO DEL MONTE (*DROMICIOPS GLIROIDES*)

LETICIA GUTIÉRREZ JIMÉNEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. RODRIGO VÁSQUEZ SALFATE
PROFESOR CONSEJERO: DRA. PEDRO CATTAN AYALA
PROFESOR CONSEJERO: DRA. FERNANDO FREDES MARTÍNEZ

SANTIAGO, CHILE
2008

MEMORIA DE TÍTULO

“DETERMINACIÓN DEL VECTOR DE *Hepatozoon* spp., HEMOPARÁSITO DEL MONITO DEL MONTE (*Dromiciops gliroides*)”.

Leticia Gutiérrez Jiménez*

*Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

El Monito del Monte (*Dromiciops gliroides*), marsupial endémico del bosque templado lluvioso de Sudamérica, es una de las especies de mamíferos menos conocidas de estos bosques australes. La marcada incertidumbre acerca de la sobrevivencia de este marsupial en los bosques chilenos, como la escasa información existente sobre su ciclo de vida, conducta, y sus parásitos y patógenos, hace aún más difícil establecer planes y políticas de conservación de esta especie. Es por ello que en esta Memoria de Título se recabó información sobre la infestación por parte del hemoparásito *Hepatozoon* spp. en *D. gliroides*, y se determinó si los parásitos externos de *D. gliroides* (*Ixodes neuquenensis*, *Chiliopsylla allophyla*, *Plocopsylla diana*) son los vectores biológicos de este hemoparásito. Se identificó *Hepatozoon* spp. asociado de forma exclusiva a *D. gliroides*. Se encontraron *I. neuquenensis*, *C. allophyla* y *P. diana* positivos a *Hepatozoon* spp. a través de PCR. Se obtuvo que la abundancia de *I. neuquenensis* está altamente relacionada con la presencia de *Hepatozoon* spp. en *D. gliroides*, sugiriendo que éste sería su vector biológico. Además se ha encontrado una relación inversamente proporcional en la presencia de *I. neuquenensis* respecto a *C. allophyla*. Se estableció la interacción entre la carga de ectoparásitos y la prevalencia de *Hepatozoon* spp. en *D. gliroides* según grupos etarios y sexo. Los grupos más sensibles frente al aumento de la carga parasitaria fueron los machos juveniles y las hembras adultas.

Palabras claves: *Dromiciops gliroides*, *Hepatozoon* spp., *Ixodes neuquenensis*, *Chiliopsylla allophyla*, *Plocopsylla diana*, vectores biológicos, PCR.

Monito del Monte (*Dromiciops gliroides*), an endemic marsupial from South American temperate rainforests, it's one of the least known species from the austral forests. Currently, there is scant information about this marsupial life history, ecology, behaviour and pathogens and parasites, making difficult the proposal and/or establishment of conservation plans and policies for this species. For this reason in this Theses it was obtained information about the infestation from the hemoparasite *Hepatozoon* spp. infecting *D. gliroides* and it was determined if *D. gliroides*'s parasites (*Ixodes neuquenensis*, *Chiliopsylla allophyla*, *Plocopsylla diana*) are the biological vectors of the hemoparasite. *Hepatozoon* spp. was associated exclusively to *D. gliroides*. Have been found the ectoparasites *I. neuquenensis*, *C. allophyla* and *P.diana* positive to *Hepatozoon* spp. through PCR. It was obtained that *I. neuquenensis* abundance is highly related to *Hepatozoon* spp. presence, suggesting that it would be its biological vector. Furthermore, have been found an inversely proportional relation between the presence of *I. neuquenensis* and *C. allophyla*. It also established the relation between ectoparasite load and *Hepatozoon* spp. prevalence in *D. gliroides* in relation to age and sex. The most sensitive groups to increments in parasite loads were juvenile males and adult females.

Key word: *Dromiciops gliroides*, *Hepatozoon* spp., *Ixodes neuquenensis*, *Chiliopsylla allophyla*, *Plocopsylla diana*, biological vectors, PCR.

INTRODUCCIÓN

El Monito del Monte (*Dromiciops gliroides*), marsupial endémico del bosque templado lluvioso de Sudamérica, es una de las especies de mamíferos menos conocidas de estos bosques australes. Debido a su singularidad biológica y su origen gondwánico es considerado un fósil viviente por ser el único representante vivo del Orden Microbiotheria (Palma y Spotorno, 1999). Su actual distribución, abarca desde el bosque Maulino (VII Región del Maule; ca. 35° 30') (Saavedra y Simonetti, 2001) hasta Chiloé continental, incluyendo la Isla de Chiloé (X Región de Los Lagos; ca. 44° 00') y la provincia de Río Negro en Argentina (Hershkovitz 1999; Lobos *et al.*, 2005). Debido a las actuales tasas de deforestación y fragmentación de los bosques, su hábitat se encuentra amenazado, razón por la cual, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), lo ha categorizado como especie vulnerable, detectando una declinación de sus poblaciones en los últimos diez años (Nowak, 1999).

La marcada incertidumbre acerca de la sobrevivencia de este marsupial en los bosques chilenos, como la escasa información existente sobre su ciclo de vida, comportamiento y otros aspectos ecológicos, hace aún más difícil establecer planes y políticas de

conservación de esta especie. Tanto así, que el “estatus” de sanidad animal, es decir, las parasitosis e interacciones biológicas con otras especies como hospedero intermediario, hospedero definitivo ó vectores biológicos que lo afectan, no han sido estudiadas a cabalidad y es aún desconocida la magnitud de ellas. Es por ello que en esta Memoria de Título se recopiló información sobre la infestación por parte del hemoparásito *Hepatozoon* spp. en *D. gliroides* y se identificó a sus posibles vectores biológicos.

Descripciones de la biología y ecología de *D. gliroides* son aún incipientes. Algunos aspectos de su historia natural han sido descritos por Mann (1955), Jiménez y Rageot (1979) y Hershkovitz (1999), entre otros. Morfológicamente han sido descritas dos subespecies, una continental (*D. gliroides australis*) y una insular en la Isla Grande de Chiloé (*D. gliroides gliroides*) la cual se diferencia de la primera por ser menos robusta, más oscura y con la cola más corta que la subespecie continental (Mann, 1955).

Dromiciops gliroides es una especie de actividad nocturna, de hábitos arborícolas, que realiza sopor durante períodos invernales y cuyas poblaciones se asocian a bosques nativos dominados por especies del género *Nothofagus* (Fagaceae) y con abundante sotobosque dominado por *Chusquea* spp. (Gramineae) y elementos epífitos, los

cuales utiliza como sitios de alimentación, refugio y material de construcción de sus nidos (Mann, 1955; Jiménez y Rageot, 1979; Hershkovitz, 1999).

Entre sus ectoparásitos, recientemente se han comunicado dos especies de siphonápteros, *Chiliopsylla allophyla* (Rothschild, 1908) y *Plocopsylla diana* (Beaucournu, 1986) y una especie del suborden Metastigmata perteneciente a la familia Ixodidae, *Ixodes neuquenensis* (Guglielmone *et al.*, 2004), tanto en poblaciones continentales como insulares (Marín-Vial *et al.*, 2007). Entre sus endoparásitos han sido descritos algunos asociados al tracto digestivo como el nemátodo de la familia Ricturalidae, *Pterigodermatites*

spinicaudatis y recientemente un hemoparásito protozoario, *Hepatozoon* spp.⁽¹⁾ (Fig. 1), perteneciente a la Familia Haemogregarinidae (Neveu-Lemaire, 1901).

Las infestaciones parasíticas pueden verse agudizadas al reducir cada vez más el hábitat de *D. gliroides*.

Por otra parte, la vulnerabilidad y consecuente disminución de la densidad de *D. gliroides* podría afectar las especies con las que interactúa, entre ellas las poblaciones de ectoparásitos y endoparásitos, elementos todos componentes de la biodiversidad (Guglielmone *et al.*, 2004).

⁽¹⁾ Merino *et al.* Datos sin publicar, comunicación personal. Departamento de Ecología Evolutiva. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC.

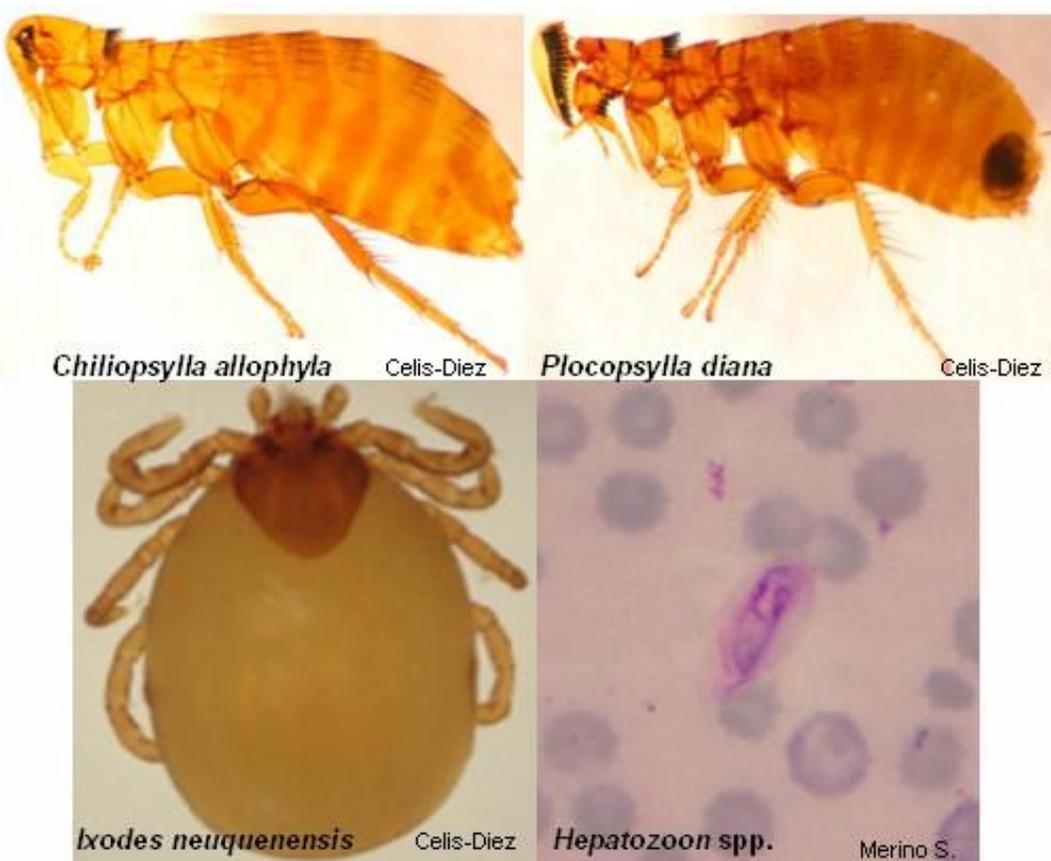


Fig. 1: Ectoparásitos y hemoparásito de *Dromiciops gliroides*.

En el caso del hemoparasitismo, para entender la interacción es necesario conocer el ciclo biológico de éste, ya que no sólo interviene una especie en el sistema trófico, sino que por lo general, se trata de una interacción mediada por vectores los que están asociados a la transmisión del hemoparásito final.

La succión de sangre contaminada con gametocitos de *Hepatozoon* spp. por parte de un artrópodo hematófago, es el evento más relevante del ciclo para la diseminación de la infección (Craig, 2000). El ciclo culmina cuando los esporozoitos contenidos en la cavidad corporal de los artrópodos son consumidos por *D. gliroides* durante el acicalamiento (Alencar *et al.*, 1997). Se ha documentado el desarrollo de gametocitos circulantes del hemoparásito al interior de los leucocitos y algunas veces libres en el plasma, luego de la ruptura de las células hospederas, además de la infección sistémica, generando atelectasia y congestión pulmonar (Davidson y Calpin, 1976). En otros casos se ha descrito la infección eritrocitaria del hospedero produciendo una macrocitos, generando el aumento del tamaño de los eritrocitos hasta en un trescientos por ciento (Anderson, 1990). La patogenia de *Hepatozoon* spp. en *D. gliroides* y en vertebrados silvestres de distintas familias no ha sido estudiada en profundidad (Dubey y Bwangamoi, 1994). Una de las características del

parasitismo es la especificidad de asociación. La actividad trófica es fundamental para la transmisión del agente patógeno y el desarrollo del parásito. La sobrevivencia del parásito dependerá de su capacidad para invadir nuevos hospederos. El conocimiento de su sobrevivencia complementada con aspectos de su biología, como epidemiología, genética y ecología, permitirían definir estrategias más adecuadas de prevención y conservación del Monito del Monte, particularmente considerando las características únicas que presenta esta especie de marsupial.

Por esta razón, es fundamental el conocimiento preciso de los vectores de *Hepatozoon* spp. en *D. gliroides* y la definición de la ó las especies de hemoparásitos en este sistema trófico.

Es por esto que se ha planteado como objetivo general de esta investigación determinar si los ectoparásitos hematófagos de *D. gliroides* (*I. neuquenensis*, *C. allophyla*, *P. diana*) actúan como el ó los vectores biológicos de *Hepatozoon* spp. En tanto, como objetivo específico se propuso establecer la relación entre la carga de ectoparásitos y la prevalencia de *Hepatozoon* spp. en *D. gliroides* según grupos etarios y sexo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio:

El estudio se realizó en fragmentos de bosque nativo ubicados en la zona rural de la Comuna de Ancud y en la Estación Biológica Senda Darwin (45° 53' S, 73° 40' O), emplazados al norte de la Isla Grande de Chiloé, X Región de Los Lagos, Chile (Fig. 2). El clima descrito está clasificado como templado marítimo lluvioso con una fuerte influencia oceánica, las precipitaciones ocurren durante todo el año con una media de 2.090 mm y una temperatura anual media de 12°C (Di Castri y Hajek, 1976).

El impacto humano en la zona se ha concentrado a partir del siglo XX. El bosque ha sido usado para extraer madera y para potenciar la actividad agropecuaria, incrementando los

fragmentos aislados de bosques (Willson y Armesto, 1996). Según Aravena *et al.* (2002) la capacidad del bosque para recuperar su estructura y biodiversidad original debería disminuir si el impacto humano continúa. En particular, la densidad de la población local de *D. gliroides* sería afectada al verse disminuida la abundancia de cavidades arbóreas en el bosque nativo.

Captura de *D. gliroides*:

Se utilizaron 160 individuos de *D. gliroides* identificados individualmente mediante el uso de crotal numerado en la oreja derecha, estos fueron capturados como parte de la tesis doctoral de Juan Luis Celis (PhDc), utilizando trampas de captura en vivo, dispuestas en ramas sobre el suelo a 1 y 3 m de altura, dada la conducta arborícola del marsupial. Como cebo se utilizó un trozo de plátano de 1 cm de espesor.



Fig. 2: Fotografía satelital, zona norte de la Isla Grande de Chiloé.

La captura se realizó durante el período de máxima actividad de la especie, comprendida entre los meses de Octubre a Marzo y durante los meses invernales, Junio a Agosto, donde fue posible encontrar al marsupial en sopor, facilitando así su captura y manejo. Cada individuo fue sexado y pesado mediante una balanza marca Pesola® de un gramo de precisión. Se clasificó a cada Monito del Monte en individuos juveniles de la temporada ó en adultos. Este parámetro dependió directamente del peso y de los registros entre temporadas de un mismo individuo, facilitando así el seguimiento de los datos a través del tiempo. Luego se procedió a realizar el protocolo de colección de ectoparásitos.

Colección de Ectoparásitos:

Cada individuo de *D. gliroides* capturado fue cepillado con Alcohol 70% para la colección de ectoparásitos con pinza fina anatómica (Fig. 3). Los ectoparásitos hallados por inspección visual directa se preservaron en tubos Eppendorf durante 24 horas, esperando



Fig. 3: Extracción de ectoparásitos con pinza fina anatómica.

la digestión total de la sangre ingerida previo a su captura (Shall y Smith, 2006). Luego se agregó 1 ml de alcohol 70% para su conservación (Beveridge *et al.*, 1985) y con posterioridad se liofilizaron las muestras. De esta forma se logró preservar el ADN hasta su procesamiento y análisis molecular en el Departamento de Parasitología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá de Henares (Madrid-España).

Identificación de Hemoparásitos:

De cada individuo de *D. gliroides* se extrajo una muestra de sangre por punción retro-orbital con un capilar. Este método de extracción sanguínea es el menos invasivo y no presenta diferencias significativas frente a los otros descritos para pequeños mamíferos (Van Herck *et al.*, 2001) (Anexo 1), dado el bajo volumen sanguíneo de la especie estudiada.

Se preservaron 40 µl de sangre de cada individuo, obtenidos de la punción retro-orbital descrita anteriormente, en tarjetas FTA. Posteriormente se extrajo el ADN de las tarjetas FTA para la identificación molecular de *Hepatozoon* spp. a través de la "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR).

Análisis de Laboratorio:

Con el fin de identificar la presencia del hemoparásito en la cavidad corporal de los ectoparásitos de *D.*

gliroides, se realizó el análisis molecular de los ectoparásitos utilizando la técnica de laboratorio PCR, buscando amplificar la secuencia 18S rDNA purificado a través del Kit UltraClean™ Tissue DNA de MO BIO. El rendimiento de cada muestra del material genético fue determinado mediante espectrofotometría. Las concentraciones obtenidas fluctuaron entre 14 a 268 µg/µL. La amplificación del ADN se llevó a cabo en el termociclador 2720 de Applied Biosystems utilizando Taq Gold, buffer 10X de Applied Biosystems, dNTPs de Biotools y partidores genéticos de Isogen, los adecuados en este caso son HEP 1-2 y HPF 1-2 (Tabla 1).

El partidor HEP 1-2 amplifica la zona central del rDNA, aproximadamente 200pb. La PCR tuvo una duración de 40 ciclos, se realizó a una temperatura de 60°C, 20 seg de extensión y 5 min de extensión final a 72°C.

El partidor HPF 1-2 amplifica la zona terminal del rDNA, aproximadamente 700pb. La PCR tuvo una duración de 40 ciclos, se realizó a

una temperatura de 54°C, 1 min de extensión y 10 min de extensión final a 72°C.

La PCR se reveló por medio del equipo de electroforesis vertical Mini Protean III de Bio Rad a 200 voltios durante 30 minutos (Fig. 4).

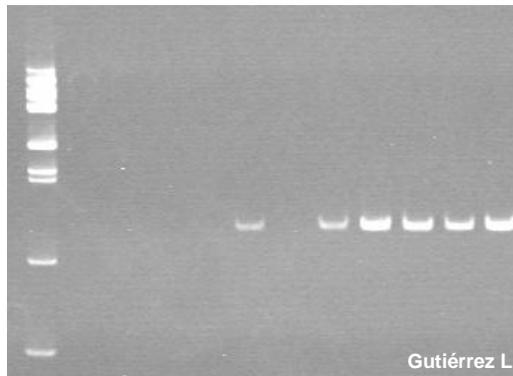


Fig. 4: Electroforesis de PCR con partidores HEP 1-2.

Luego se secuenciaron las muestras positivas, asegurando de esta forma la identificación certera del hemoparásito. La técnica de PCR se eligió por ser el análisis con mayor sensibilidad y especificidad que hoy en día permite definir con certeza el ó los vectores biológicos del hemoparásito en cuestión (Merino *et al.*, 2008).

NOMBRE	LONGITUD	CONCENTRACIÓN	SECUENCIA 5' € 3'
HEP-1	18	0.01µmol.	CGC GCA AAT TAC CCA ATT
HEP-2	21	0.01µmol.	CAG ACC GGT TAC TTT YAGCAG Donde Y=C,T.
HPF-1	19	0.01µmol.	CTA TGC CGA CTA GAG ATT G
HPF-2	19	0.01µmol.	GAC TTC TCC TTC GTC TAA G

Tabla 1: Partidores HEP 1-2 y HPF 1-2.

El ADN obtenido desde las tarjetas FTA fue utilizado bajo las mismas condiciones que el ADN de los ectoparásitos, es decir, a cada una de las muestras se les realizó la PCR con los partidores HEP 1-2 y HPF 1-2. Posteriormente se reveló la PCR y se secuenciaron las muestras positivas a *Hepatozoon*spp.

Análisis de Datos:

Los datos obtenidos posteriormente a los análisis moleculares de las tarjetas FTA y ectoparásitos fueron analizados utilizando el programa computacional estadístico SPSS 13.0 para Windows. Se calculó la prevalencia de individuos de *D. gliroides* positivos a *Hepatozoon* spp. La prueba estadística elegida para establecer al vector biológico de *Hepatozoon* spp. fue la de regresión logística, dadas las interrogantes a dilucidar y la característica discontinua de la variable dependiente; siendo $Y = 0$ ó 1 , donde $0 = (-)$ *Hepatozoon* spp. y $1 = (+)$ *Hepatozoon* spp.

RESULTADOS:

Se identificó *Hepatozoon* spp. asociado de forma exclusiva a *D. gliroides* a través de PCR. Se asevera lo anterior puesto que también se realizó el mismo protocolo de análisis molecular PCR a muestras de sangre tomadas

desde roedores nativos (*Abrotrix olivaceus*, *Abrotrix sanborni* y *Oligoryzomys longicaudatus*) del lugar de muestreo común a *D. gliroides*. Dado el bajo número de individuos capturados aleatoriamente, sólo se pudo concluir que efectivamente *Abrotrix olivaceus* es positivo a una especie de *Hepatozoon* spp., que es distinto de la especie de *Hepatozoon* identificado en Monito del Monte. Esta especie de *Hepatozoon* spp. difiere a la encontrada en *D. gliroides* puesto que, su secuencia de rDNA se ubica en el árbol filogenético del género a una distancia de siete diferencias puntuales de la especie hallada en *D. gliroides*, lo cual quiere decir que corresponden a dos especies disímiles y alejadas evolutivamente una de la otra (Merino *et al.*, datos sin publicar).

Se encontraron ectoparásitos (*Ixodes neuquenensis*, *Chiliopsylla allophyla*, *Plocopsylla diana*) positivos a *Hepatozoon* spp. a través de PCR, sugiriendo a *I. neuquenensis* como el vector biológico.

Los análisis descriptivos de las frecuencias de infestación de los ectoparásitos de *D. gliroides*, arrojaron en el caso de *I. neuquenensis* un número medio por individuo de 0,49 (desviación estándar (d.t.) = 1,197), en *C. allophyla* de 1,63 (d.t. = 2,267) y en *P. diana* de 0,46 (d.t. = 1,030).

La prevalencia de *D. gliroides* positivos a *Hepatozoon* spp. fue de un

16,9%, con 27 individuos infectados de un total de 160.

Se encontró una correlación negativa significativa entre el número de *C. allophyla* y el número de *I. neuquenensis* (Tabla 2) (Fig. 5).

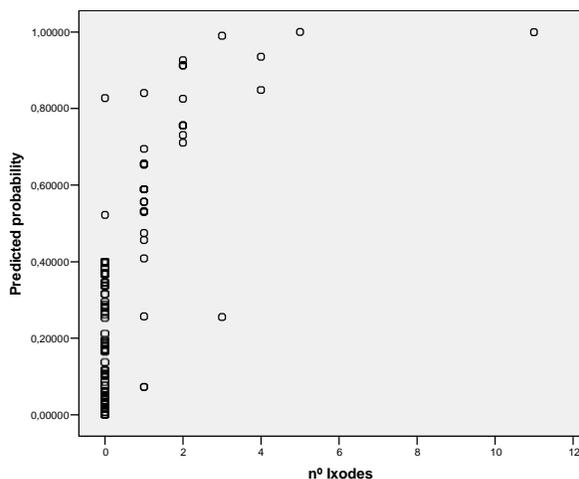


Fig. 5: n° *C. allophyla* v/s n° *I. neuquenensis*.

El análisis de regresión logística arrojó que a mayor número de *I. neuquenensis* existe un aumento significativo de la probabilidad en *D. gliroides* de ser positivo a *Hepatozoon* spp. (B=2,228, gl=1, p=0,01) (Tabla 3; Fig. 6).

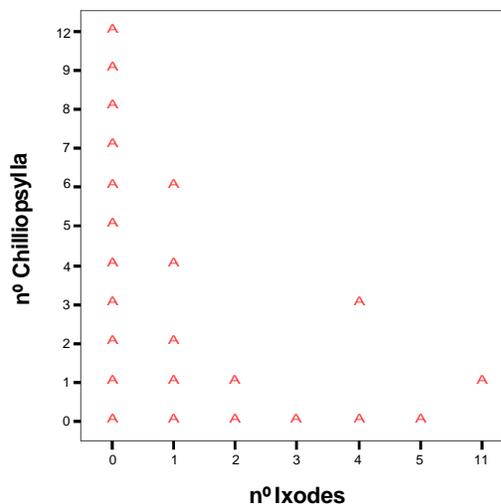


Fig. 6: *Hepatozoon* spp. v/s *I. neuquenensis*.

Se encontró una interacción significativa entre las variables sexo y edad (B=5,368, gl=1, p=0,14) (Tabla 3) frente a la presencia de *Ixodes neuquenensis*, por lo tanto, existen diferencias entre los grupos de individuos de *D. gliroides*: macho-juvenil, macho-adulto, hembra-juvenil y hembra-adulta.

Los grupos más sensibles al cambio en el número de *I. neuquenensis* por individuo de *D. gliroides* fueron el de macho-juvenil y hembra-adulta.

Correlations

			n° Ixodes	n° Chilliopsylla	n° Plocopsylla
Spearman's rho	n° Ixodes	Correlation Coefficient	1,000	-,367**	-,076
		Sig. (2-tailed)	.	,000	,341
		N	160	160	159
	n° Chilliopsylla	Correlation Coefficient	-,367**	1,000	,013
		Sig. (2-tailed)	,000	.	,873
		N	160	160	159
	n° Plocopsylla	Correlation Coefficient	-,076	,013	1,000
		Sig. (2-tailed)	,341	,873	.
		N	159	159	159

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabla 2: Correlación entre *I. neuquenensis*, *C. allophyla* y *P. diana*.

Sus curvas en la gráfica (Fig. 7) son muy similares, mostrando una pendiente mucho más pronunciada y fuerte; lo cual sugiere que un individuo perteneciente a estos grupos es más propenso a infectarse con

Hepatozoon spp. por la acción de *I. neuquenensis*. Es decir, para un número igual de *I. neuquenensis* su probabilidad de infestación por *Hepatozoon* spp. es mayor que para machos adultos y hembras juveniles.

VARIABLES	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
SEXO(1)	1,699	1,050	2,616	1	0,106	5,467
EDAD(1)	-1,170	1,474	0,630	1	0,427	0,310
nº <i>Ixodes neuquenensis</i>	2,228	0,870	6,556	1	0,010	9,285
nº <i>Chiliopsylla</i>	0,525	0,395	1,771	1	0,183	1,691
nº <i>Plocopsylla diana</i>	-1,318	1,838	0,514	1	0,473	0,268
EDAD(1) por SEXO(1)	-2,430	2,332	1,086	1	0,297	0,088
SEXO(1) por nº <i>Ixodes</i>	-1,459	0,959	2,312	1	0,128	0,233
SEXO(1) por nº <i>Chiliopsylla allophyla</i>	-0,659	0,414	2,536	1	0,111	0,518
SEXO(1) por nº <i>Plocopsylla diana</i>	1,087	1,853	0,344	1	0,557	2,967
EDAD(1) por nº <i>Ixodes</i>	-1,493	1,029	2,104	1	0,147	0,225
EDAD(1) por nº <i>Chiliopsylla allophyla</i>	0,036	0,502	0,005	1	0,943	1,036
EDAD(1) por nº <i>Plocopsylla diana</i>	1,693	1,943	0,759	1	0,384	5,436
EDAD(1) por SEXO(1) por nº <i>I. neuquenensis</i>	5,368	2,180	6,063	1	0,014	214,508
EDAD(1) por SEXO(1) por nº <i>C. allophyla</i>	0,610	0,629	0,942	1	0,332	1,841
EDAD(1) por SEXO(1) por nº <i>Plocopsylla diana</i>	-4,218	3,569	1,396	1	0,237	0,015
Constante	-2,108	0,973	4,696	1	0,030	0,122

Tabla 3: Regresión logística.

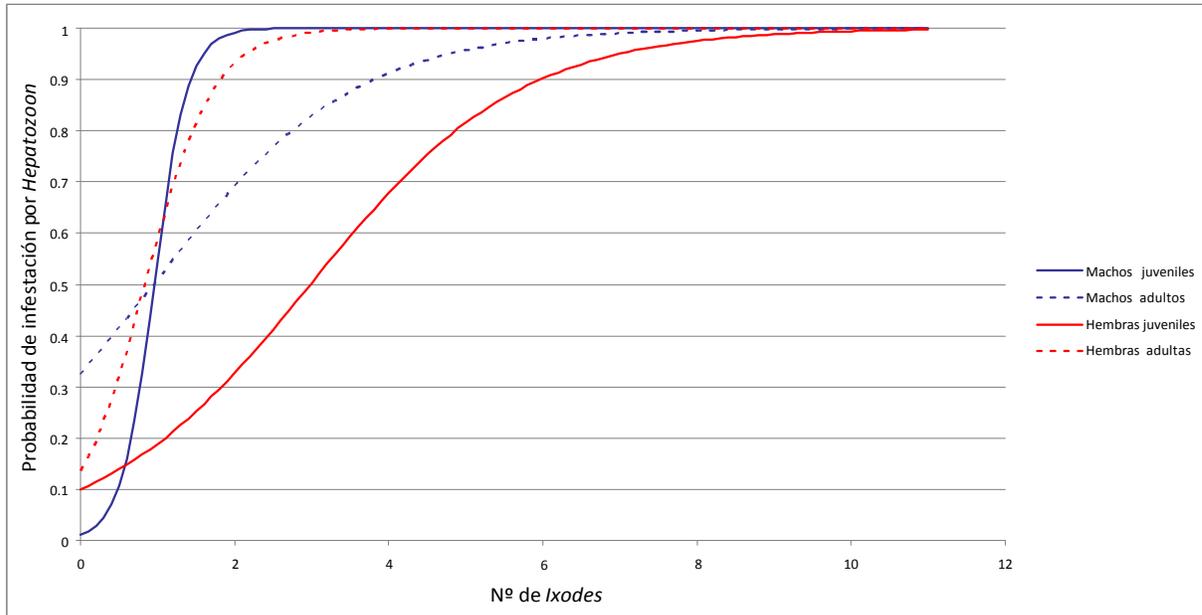


Fig. 7: Probabilidad de infestación por *Hepatozoon* spp. según grupos (sexo y edad) v/s nº de *Ixodes neuquenensis* por individuo de *Dromiciops gliroides*.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

Las muestras colectadas de ectoparásitos de Monito del Monte han sido tratadas según los protocolos vigentes a la fecha. De hecho, el propósito de este estudio fue hacer un rápido descarte ó confirmación de los ectoparásitos de *Dromiciops gliroides* como posible vector biológico. Aunque la fase de transmisión experimental está aún pendiente.

Por lo mismo se dejó a *Ixodes neuquenensis*, *Chiliopsylla allophyla* y *Plocopsylla diana* digiriendo la sangre succionada desde *D. gliroides* durante al menos 24 hrs. De esta forma se asegura la destrucción enzimática de los posibles esporozoitos en el hemocele de los ectoparásitos ó bien que estos se

integren al hospedero y sean infectivos. Para el caso particular de los ectoparásitos siphonápteros, se postula que el tracto digestivo de los mismos debería ser un ambiente hostil para *Hepatozoon* spp., considerando la presencia de enzimas líticas y concentraciones de oxígeno poco apropiadas (Shall y Smith., 2006). Sin embargo, los esporozoitos de *Hepatozoon* spp. sobrevivirían al intestino de *I. neuquenensis* después del consumo por parte de *D. gliroides* (Shall y Smith., 2006). Se sugiere de esta forma, luego de analizar estadísticamente los datos colectados, que el vector biológico de *Hepatozoon* spp. sería el ectoparásito de *D. gliroides*, *I. neuquenensis*.

Por otra parte, se determinaron las posibles interacciones entre los ectoparásitos, hemoparásito y el hospedero definitivo, arrojando que existe una interacción entre las variables sexo y edad. Por lo tanto, hay una variación entre grupos de individuos según la carga parasitaria de *I. neuquenensis*. Las diferencias hormonales entre los cuatro grupos considerados y la inversión en esfuerzo reproductivo de las hembras adultas podrían estar detrás de esta interacción, por una alteración del funcionamiento del sistema inmunitario del marsupial (Deviche *et al.*, 2001; Sheldon y Verhulst., 1996). En cualquier caso, la mayor sensibilidad de machos juveniles y hembras adultas a la infestación por *Hepatozoon spp.* producida por el parasitismo de *I. neuquenensis* merece mayor atención y deberá ser examinada específicamente en futuros trabajos.

De igual forma, se habrán de llevar a cabo trabajos observacionales y experimentales para entender el origen y las consecuencias de la inesperada correlación negativa entre el número de *I. neuquenensis* y el número de *C. allophyla*.

Despejadas ya las interrogantes planteadas en el proyecto, aún es necesario mantener vigente y continuar este trabajo, dejando abierta la opción de seguir investigando a *D. gliroides*, sus ectoparásitos y enfermedades, tratando esta vez de profundizar y conectar más

variables a la ecuación que logren entregar un entendimiento más profundo sobre esta especie.

AGRADECIMIENTOS:

La asistencia y apoyo constante de Juan Luis Celis (PhDc) durante todo el proceso de realización de mi Proyecto de Tesis, sobretodo en la colección de muestras y trabajo de terreno. Jennifer Hetz (M.V.) y Paula Marín (M.V.), gracias a quienes obtuve la mayoría de las muestras de sangre y de ectoparásitos de *Dromiciops gliroides*. Fundación Senda Darwin, por las facilidades otorgadas durante el trabajo de campo. Los conocimientos entregados desinteresadamente por los Drs. Rodrigo Vásquez (PhD), Santiago Merino (PhD) y destacando a F. Javier Martínez (PhD), quien confió plenamente en mi y me apoyó durante la realización de los análisis de laboratorio en la Universidad de Alcalá de Henares. Asier Rodríguez Larrinaga (PhD), quién siempre tuvo la disposición, paciencia y amabilidad para asesorarme en los análisis estadísticos de mi Memoria de Título. Los consejos invaluable, orientación y amistad del Dr. Pedro Cattán (PhD). Al Director de Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, Dr. Luis Alberto Raggi (PhD), por creer en mi, en mis proyectos y siempre estar pronto a escuchar y orientarme. Finalmente agradezco a mis amigos, especialmente a mi padre y hermano mayor la confianza y apoyo que me otorgaron, además de la altura de miras que me han inculcado desde siempre.

Financiamiento: ICM-P05-002, FONDECYT 1060186, CONICYT-PFB-23, FONDAP 1501-0001, CONICYT AT-24050068, CSIC 2004CL0033 y Fundación BBVA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, N.X., KOHAYAGAWA A., SANTAREM V.A.** 1997. Hepatozoon canis infection of wild carnivores in Brazil. *Veterinary Parasitology* 70:279-282.
- ANDERSON, T.J.C.** 1990. Blood Parasites of Mammals from Papua New Guinea. *Journal of Wildlife Diseases* 26(2):219-294.
- ARAVENA, J., CARMONA, M., PÉREZ., C., ARMESTO., J.** 2002. Changes in tree species richness, stand structure and soil properties in a successional chronosequence in northern Chiloé Island, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 339-360.
- BEVERIDGE, I., PRESIDENTE, P.J.A., SPEARE, R.** 1985. Parasites and associated pathology of the swamp wallaby, *Wallabia bicolor* (Marsupialia). *Journal of Wildlife Diseases* 21(4): 377-385.
- CRAIG, T.,** 2000. "Hepatozoonosis". Greene, Craig E., *Enfermedades Infecciosas en perros y gatos*, 2^{da} edición, McGraw-Hill Interamericana, México, 504-511 p.
- DAVIDSON, W., CALPIN, J.** 1976. *Hepatozoon griseisciuri* Infection en gray squirrels of the Southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases* 12:72-76.
- DEVICHE. P., GREINER. E.C., MANTECA. X.** 2001. Seasonal and age-related changes in blood parasite prevalence in Dark-eyed Juncos (*Junco hyemalis*, Aves, Passeriformes). *Journal of Experimental Zoology* 289: 456-4666.
- DI CASTRI, F., HAJEK, E.R.** 1976. Bioclimatología de Chile. Vicerrectoría de Comunicaciones, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 129 pp.
- DUBEY, J.P., BWANGAMOI, O.** 1994. *Microbesnoitia leoni* Bwangamoi 1989, from the African lion (*Panthera leo*) redetermined as a junior synonym of *Hepatozoon canis* (James 1905) Wenyon 1926. *Journal Parasitology* 80:333-334.
- GUGLIELMONE, A., VENZAL, J., AMICO, G., MANGOLD, A., KEIRANS, J.** 2004. Description of the nymph and larva and redescription of the female of *Ixodes neuquenensis* Ringuélet, 1947 (Acari: Ixodidae), a parasite of the endangered Neotropical marsupial *Dromiciops gliroides* Thomas (Microbiotheria: Microbiotheriidae). *Systematic Parasitology* 57:211-219.
- HERSHKOWITZ, P.** 1999. *Dromiciops gliroides* Thomas, 1894. Last of the Microbiotheria (Marsupialia), with a review of the Family Microbiotheriidae. *Fieldiana Zoology* 93: 1-60.
- JIMÉNEZ, J., RAGEOT, R.** 1979. Notas sobre la biología del monito del monte (*Dromiciops australis* Philippi, 1893). *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso* (Chile) 12: 83-88.
- LOBOS, G., CHARRIER, A., CARRASCO, G., PALMA, R. E.** 2005. Presence of *Dromiciops gliroides* (Microbiotheria:Microbiotheriidae) in the deciduous forests of central Chile. *Mammalian Biology* 70(6):376-380.
- MANN, G.** 1955. Monito del monte, *Dromiciops australis*. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 2(9-10): 159-166.

- MARÍN-VIAL, P., GONZÁLEZ-ACUÑA, D., CELIS-DIEZ, J.L., CATTAN, P.E., GUGLIELMONE, A.** 2007. Presence of *Ixodes neuquenensis* Ringuelet, 1947 (Acari: Ixodidae) on the endangered Neotropical marsupial *Monito del monte* (*Dromiciops gliroides* Thomas, 1894, Microbiotheria: Microbiotheriidae) at Chiloé Island, Chile. *European Journal of Wildlife Research* 53(1): 73-75.
- MERINO, S., VÁSQUEZ, R.A., MARTÍNEZ, J., CELIS-DIEZ, J.L., MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J., MARÍN-VIAL, P., SÁNCHEZ-MONSALVEZ, I., PEIRCE, M.A.** 2008. A sarcocystid misidentified as *Hepatozoon didelphys*: molecular data from a parasitic infection in the blood of the southern mouse-opossum (*Thylamys elegans*) from Chile. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. En prensa.
- NOWAK, R.M.** 1999. Walker's Mammals of the World. Sixth edition. Vol. I and II. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London. 1936 p.
- PALMA, R.E., SPOTORNO, A.E.** 1999. Molecular systematics of marsupials based on the rRNA 12s mitochondrial gene: the phylogeny of didelphimorphia and of the living fossil microbiotheriid *Dromiciops gliroides* Thomas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 525-535.
- SAAVEDRA, B., SIMONETTI, J.A.** 2001. New records of *Dromiciops gliroides* (Microbiotheria: Microbiotheriidae) and *Geoxus valdivianus* (Rodentia: Muridae) in central Chile: their implications for biogeography and conservation. *Mammalia* 65: 96-100.
- SCHALL, J., SMITH, T.** 2006. Detection of a Malaria Parasite (*Plasmodium mexicanum*) in Ectoparasites (Mites and Ticks), and Possible Significance of Transmission. *Journal Parasitology* 92(2):413-415.
- SHELDON, B.C., VERHULST, S.** 1996. Ecological immunity: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 11:317-321.
- VAN HERCK, H., BAUMANS, V., BRANDT, C.J.W., BOERE, H.A.G., HESP, A.P.M., LITH, H.A., SCHURINK, M., BEYNEN, A.C.** 2001. Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenus vein and the tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Laboratory Animals* 35, 131-139.
- WILLSON, M. F., ARMESTO, J.J.** 1996. The natural history of Chiloé: on Darwin's trail. *Revista Chilena de Historia Natural* 69: 149-161.

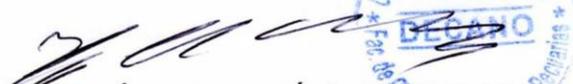
Anexo 1: Certificado de Bioética otorgado por la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

CERTIFICADO N° 010

Con relación a los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales en la evaluación del proyecto de memoria de título de la Srta. **LETICIA GUTIÉRREZ JIMÉNEZ**, titulado “Determinación del vector de *Hepatozoon spp.*, hemoparásito de Monito del Monte (*Dromiciops gliroides*)” cuyo Investigador Responsable es el Dr. Rodrigo Vásquez S. (PhD), el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que este satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigaciones Biomédicas, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité.




Dr. HÉCTOR ALCAÍNO CONTADOR

Decano

Presidente

Comité de Bioética Animal