

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**ESPERANZA, SANTA FE, ARGENTINA**



Tesis presentada para acceder al grado académico de Doctor en Ciencias Veterinarias

**Aspectos ecológicos de *Amblyomma tonelliae* Nava, Beati y  
Labruna, 2014 y *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Acari: Ixodidae) y  
rol potencial como vectores de microorganismos rickettsiales en  
Argentina.**

**MV. Evelina Luisa Tarragona**

Director: Dr. Santiago Nava

Co-Director: Dr. Pablo M Beldoménico

Laboratorio de Parasitología e Inmunología

Estación Experimental Rafaela

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

**2017**

*“La ciencia no tiene patria, pero el hombre de ciencia sí la tiene”*

**(Bernardo Alberto Houssay)**

## Agradecimientos

Los resultados obtenidos de este trabajo de tesis doctoral sin duda no son logro de una persona, sino más bien, de un grupo de personas que han sumado dedicación para lograrlo y de instituciones dispuestas a solventar los gastos que la realización del trabajo demandó. Es por ello que quisiera expresar mi agradecimiento a cada uno de los que en mayor o menor medida contribuyeron.

En primer lugar, quiero expresar mi mayor agradecimiento al Dr. Santiago Nava por su apoyo y acompañamiento como director de esta tesis doctoral y sobre todo por el extraordinario talento y dedicación por el trabajo que ha sabido transmitir. En segundo lugar, al Dr. Alberto Alejandro Guglielmone por haberme aceptado como becario de posgrado bajo su dirección. Su visión crítica y su humildad científica han enriquecido mi formación.

Un profundo agradecimiento al Dr. Pablo Martín Beldoménico por haber aceptado ser el co-director de esta tesis doctoral y por haberme introducido, siendo estudiante de grado, en el fascinante mundo de la ciencia.

A Mariano Mastropaolo por incentivar me a trabajar en ecología de garrapatas y enfermedades transmitidas por garrapatas en mis comienzos como pasante. A mis compañeros María Noelia Saracho Bottero y Patrick Sebastian por haber sido parte de este trabajo de tesis y por los aportes que han realizado.

Agradecer al Dr. Atilio José Mangold por su compromiso con este trabajo de tesis siendo un factor indispensable en la realización no solo de los trabajos de campo en el marco de esta tesis sino también en trabajos adicionales relacionados al tema.

Al Dr. Agustín Estrada-Peña de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, España por su colaboración en el estudio de modelado de nicho.

La colaboración de los técnicos Oscar (Cacho) Warnke y Mario Wuattier fue fundamental para la realización de los trabajos de campo, así como la colaboración de la Dra. Carolina Soledad Thompson en la puesta a punto de técnicas moleculares y la contribución de Paola Amherdt en el trabajo de laboratorio. Agradezco también la colaboración del resto de los integrantes del grupo de Parasitología e Inmunología del INTA EEA Rafaela, Ignacio Echaide, Susana Torioni de Echaide, Victor Vanzini, Beatriz (Trichi) Valentini, Evangelina Primo, Nerina Aguirre, Paula Ramírez, Estefanía Ugarte,

Fernando Seguro, Pablo Salusso, Ramón Mansilla, Liliana Aguirre, Belén Novoa, Macarena Sarli y Ana Schmidt.

Agradecer a Marta Erlinda Sánchez bibliotecaria de la EEA INTA Rafaela por su valiosa colaboración en la búsqueda de material bibliográfico.

Mi especial agradecimiento al Dr. Marcelo Bahia Labruna, de la Universidad de São Paulo, Brasil, a la Dra. Lorenza Beati de la Universidad de Georgia, Estados Unidos y al M.V. Gabriel Cicuttin del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, CABA por haberme permitido realizar pasantías en sus laboratorios durante mi formación de posgrado. Estas experiencias han enriquecido mi formación profesional y han dado como resultado publicaciones conjuntas.

A Valeria Debárbora e Irina Martínez por haber aportado material de relevancia para este trabajo de tesis.

Agradezco a Silvia Stelkov, Carlos Cuñado y Carlos hijo, dueños de la Reserva Privada Eco-Portal de Piedra, Jujuy por permitirnos gentilmente realizar el muestreo de distribución estacional en su hermosa reserva y hogar.

A Joaquín Tillous de Estancia El Bagual y Alejandro DiGiacomo de la Reserva Natural Privada El Bagual, Alparamis S.A. por permitirnos colectar garrapatas de la vegetación además de la cordial atención que recibimos.

El material colectado de áreas protegidas fue posible gracias a los permisos otorgados durante los años de doctorado por la Administración de Parques Nacionales Argentina (APN).

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) el otorgamiento de una beca de postgrado tipo I para realizar este doctorado, y a las autoridades de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Rafaela por haberme permitido desarrollar el trabajo correspondiente a mi tesis doctoral en dicha institución.

La realización de los estudios de campo y de laboratorio fue posible gracias al apoyo económico de INTA, de la Asociación Cooperadora INTA Rafaela, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 0676, 1298 y 526) y de CONICET. Mi sincero reconocimiento para estas entidades.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral por haberme permitido realizar mi tesis de doctorado en la misma institución que me formó en mi carrera de grado. Al comité académico de esta institución por sus aportes a lo largo de esta tesis doctoral.

Al comité de avance de tesis, Dr. Jaime J. Polop, Dra. Analía G. Autino y Dra. María Andrea Previtali, por sus aportes a este trabajo de tesis.

Finalmente, quiero agradecerles a mis padres Inés y Rodolfo y a mi hermano Martín por el cariño, el apoyo y la confianza que me han dado, no solo durante mi formación de posgrado sino también durante mi formación de grado. A Leti, Ana, Patan y Cande por el acompañamiento y apoyo durante estos años.

Mi entero agradecimiento a Nicolás por su amor, acompañamiento, comprensión, estímulo y protección durante estos años luminosos de mi vida.

## INDICE

Resumen .....	8
Abstract .....	9
Introducción General.....	10
Parte I .....	19
Distribución y diversidad genética de <i>Amblyomma tonelliae</i> y <i>Amblyomma sculptum</i> presentes en la Argentina. .....	19
Capitulo 1.....	20
Distribución geográfica y hospedadores de <i>Amblyomma sculptum</i> y <i>Amblyomma tonelliae</i> en Argentina, con un modelo de nicho ecológico para inferir la distribución potencial de ambas especies en Sudamérica. ....	20
Introducción .....	21
Materiales y métodos.....	24
Resultados .....	28
Discusión.....	49
Capitulo 2.....	54
Distribución estacional de <i>Amblyomma sculptum</i> y <i>Amblyomma tonelliae</i> en Argentina. ....	54
Introducción .....	55
Materiales y métodos.....	57
Resultados .....	60
Discusión.....	68
Capitulo 3.....	70
Diversidad genética y filogeografía de <i>Amblyomma tonelliae</i> y <i>Amblyomma sculptum</i> en Argentina por comparación de secuencias del gen mitocondrial 16S. ....	70
Introducción .....	71
Materiales y métodos.....	75
Resultados .....	77
Discusión.....	93

Parte II .....	98
Rol potencial de <i>Amblyomma sculptum</i> y <i>Amblyomma tonelliae</i> como vectores de microorganismos rickettsiales en Argentina.....	98
Introducción .....	99
Materiales y métodos.....	102
Resultados .....	105
Discusión.....	115
Conclusión general .....	118
Bibliografía.....	123

# Resumen

El objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue generar conocimientos sobre aspectos ecológicos de las dos especies de garrapatas del complejo *Amblyomma cajennense* presentes en Argentina, *Amblyomma tonelliae* y *Amblyomma sculptum*, y también evaluar el rol potencial como vectores de microorganismos rickettsiales.

La distribución geográfica de *A. tonelliae* en Argentina está restringida a la eco-región del Chaco Seco, y *A. sculptum* a la Selva Pedemontana de las Yungas, a la eco-región del Chaco húmedo y a zonas aledañas a los humedales del Chaco Seco. Estas dos especies presentan áreas de parapatria caracterizadas por temperaturas intermedias y mayor desarrollo de vegetación que en las áreas de alopatria. Ambas especies mostraron tener especificidad por hábitat y no por hospedador. El análisis de las secuencias del gen mitocondrial 16S, mostró diferencias intraespecífica inferiores a 0,5% y una baja diversidad genética tanto en *A. sculptum* como en *A. tonelliae*.

Las dos especies presentaron estructuración genética entre poblaciones, atribuyéndose el limitado flujo de genes entre poblaciones a características ecológicas microambientales. Tanto *A. tonelliae* como *A. sculptum* tienen un ciclo de vida con una generación anual, con larvas presentes de otoño a invierno, ninfas de invierno a primavera y adultos todo el año, pero con el pico de abundancia en primavera y verano. Finalmente, se amplificó ADN rickettsial de tres garrapatas, *Rickettsia amblyommatis* sp. nov y *Rickettsia* sp. cepa “El tunal” de *A. tonelliae* y *Rickettsia bellii* de *A. sculptum*.

# Abstract

The aim of this thesis was to generate knowledge on ecological aspects of the two species from the *Amblyomma cajennense* complex present in Argentina, *Amblyomma tonelliae* and *Amblyomma sculptum*. Additionally, the potential role of these two-tick species as vectors of rickettsial microorganisms was also evaluated.

The geographical distribution of *A. tonelliae* in Argentina is restricted to the Chaco Seco eco-region, and *A. sculptum* to the Yungas Piedmont, to the Humid Chaco eco-region and areas near the Chaco wetlands. These two species are parapatric in areas characterized by intermediate temperatures and greater vegetation development than in the allopatric areas. Both species showed habitat specificity but not host specificity. Analyses of 16S mitochondrial gene sequences have shown intra-specific differences lesser than 0.5% and low genetic diversity for both *A. sculptum* and *A. tonelliae*.

The two-species presented genetic structure attributed to low level gene flow among populations, probably related to isolation due to difference in micro-environmental characteristics. Both *A. tonelliae* and *A. sculptum* have a life cycle with one generation per year. Larvae are present from autumn to winter, nymphs from winter to spring, and adults all year round, but with abundance peak in spring and summer. Finally, rickettsial DNA was amplified in three ticks, *Rickettsia amblyommatis* sp. nov and *Rickettsia* sp. strain "El tunal" of *A. tonelliae* and *Rickettsia bellii* of *A. sculptum*.

# Introducción General

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de relevancia sanitaria, por su rol como vectores de microorganismos patógenos que afectan a los animales domésticos, silvestres y al hombre, además de su potencial para provocar anemia, toxicosis, parálisis, irritación y alergia a sus hospedadores (Jongejan y Uilenberg 2004; Parola y col., 2013; Remondegui 2012). Son consideradas, junto con los mosquitos, como los más importantes vectores de agentes patógenos (Sonenshine y col., 2002). Las garrapatas pertenecen al Phylum Arthropoda, Clase Arachnida, Subclase Acari, Orden Parasitiformes, Suborden Ixodida. En la actualidad se conocen aproximadamente 933 especies de garrapatas en el mundo (Labruna y col., 2016; Ash col., 2017; Nava y col., 2017). Existen tres familias de garrapatas, Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae. Esta última incluye una única especie, *Nuttalliella namaqua*. La familia Ixodidae agrupa las especies de mayor importancia económica, ya que producen pérdidas a nivel productivo y tienen impacto sobre la salud pública (Jongejan y Uilenberg, 2004). Esta familia se divide en dos grupos, Prostriata y Metastrata. El primer grupo está compuesto únicamente por el género *Ixodes*, el resto de los géneros pertenecientes a esta familia están caracterizados taxonómicamente como Metastrata. Este último dividido en 4 subfamilias, Amblyomminae, Haemaphysalinae, Hyalomminae y Rhipicephalinae.

Las especies de la familia Ixodidae desarrollan en su ciclo de vida la hematofagia, que dura varios días y está dividido en dos fases. Una primera fase, de crecimiento, donde la ingesta de sangre es mínima y los órganos van desarrollándose y una segunda fase donde la ingesta es mayor, conocida como fase de expansión (Balashov, 1967). Esta constitución anatómica de los ixódidos ha sido biológicamente configurada para desarrollar su hábito hematófago continuo y es precisamente este hábito el que permite el desarrollo de su ciclo de vida (Boero, 1957).

El ciclo de vida de la familia Ixodidae es de tres hospedadores, exceptuando algunas especies del género *Hyalomma* Koch, 1844 y de la subfamilia Rhipicephalinae. En este tipo de ciclo, todos los estadios evolutivos se alimentan de diferentes hospedadores que pueden o no ser de la misma especie. El ciclo comprende huevo, larva, ninfa y adulto. Larvas y ninfas se alimentan por algunos días y luego se desprenden para mudar al próximo estadio. Las ninfas desarrollan un único estadio y los adultos copulan generalmente sobre su hospedador. Las hembras desarrollan un período de alimentación largo, una vez pletóricas, se desprenden del hospedador, oviponen miles de huevos que darán origen a larvas y mueren (Sonenshine, 1991).

La familia Argasidae está compuesta por los géneros *Antricola* Cooley y Kohls, 1942, *Nothoaspis* Keirans y Clifford, 1975, *Argas* Latreille, 1795, *Ornithodoros* Koch, 1844 y *Otobius* Banks, 1912 (Nava y col., 2017). El ciclo de vida de las especies de Argasidae comprende huevo, larva, dos o más estadios ninfales y adultos (machos y hembras). Ninfas de algunas especies mudan 5, 6, 7 y hasta 8 (Hoogstraal, 1985) veces antes de evolucionar a adultos. Los estadios inmaduros deben alimentarse antes de mudar al próximo estadio, pero en algunas especies las larvas no alimentadas mudan a ninfas y, en otras, ninfas del primer estadio sin alimentar mudan al segundo estadio ninfal. Los adultos son longevos y desarrollan un período de alimentación corto (horas) pudiendo volver a alimentarse tantas veces como disponibilidad de hospedador tengan. A diferencia de esto, las larvas permanecen días prendidas a sus hospedadores. En cuanto al ciclo de vida, muchas de las especies que componen esta familia tienen hábitos nidícolas. Los adultos presentan escaso dimorfismo sexual (Sonenshine, 1991). En Argentina han sido registradas 51 especies de garrapatas de las familias Ixodidae y Argasidae, siendo *Amblyomma* el género con la mayor riqueza específica, compuesto por 23 especies (Nava y col., 2017).

El desplazamiento de los animales silvestres por la introducción de animales domésticos, puede eventualmente obliterar la relación de una especie de garrapata con su hospedador silvestre original (Hoogstraal y Aeschilmann, 1982; Oliver, 1989), creando las condiciones para el desarrollo de ciclos sustitutos. Esto es reconocido en la Argentina, donde los artiodáctilos nativos (Cervidae, Camelidae y Tayassuidae) fueron desplazados con la introducción de los bovinos y, en la actualidad, garrapatas nativas como *Amblyomma neumanni* (Ribaga 1902) completan su ciclo parasítico sobre los bovinos (Guglielmone y col., 1990; Nava y col., 2006). Otra garrapata establecida en la Argentina que desarrolló un ciclo sustituto parasitando a los bovinos y otros animales domésticos fue *Amblyomma cajennense* sensu lato (Fabricius, 1787) (Guglielmone y col., 1990; Mangold y col., 1990). Este taxón es originario de la región neotropical y neártica. El taxón *A. cajennense* s.l ha sido considerado por tener una distribución desde el sur de los Estados Unidos hasta norte de Argentina (Estrada-Peña y col., 2004), donde se reportó establecida en las provincias de Chaco, Formosa, Jujuy, Salta, Santiago del Estero y Tucumán (Guglielmone y Nava, 2006). *Amblyomma cajennense* s.l ha sido considerada una garrapata con relevancia sanitaria por su capacidad de parasitar al hombre (Guglielmone y col., 1991) e infestar masivamente a los vacunos, otros animales domésticos y silvestres (Guglielmone y col., 1990; Mangold y col., 1990). *Amblyomma cajennense* s.l fue involucrado como el vector de *Rickettsia rickettsii*, el agente causal de fiebre manchada en seres humanos (Labruna y col., 2011).

Particularmente en Argentina se detectaron casos letales de fiebre manchada en humanos en la

provincia de Jujuy (Ripoll y col., 1999; Paddock y col., 2008), siendo *A. cajennense* s.l. sindicada como potencial vector. Además, estudios realizados en otros países incriminan a *cajennense* s.l. como potencial vector de arbovirus (Linthicum y col., 1991), *Ehrlichia* sp. (Widmer y col., 2011) y en casos de parálisis en animales domésticos.

En el pasado, el estatus taxonómico de *A. cajennense* s.l. ha sido objeto de debate. Aragão y Fonseca (1953), y más tarde Kohls (1958), concluyeron que un número de especies descritas y revalidadas por Koch (1844) y Tonelli-Rondelli (1937) (*Amblyomma mixtum* Koch 1844, *Amblyomma tenellum* Koch 1844, *Amblyomma finitimum* Tonelli-Rondelli 1937, *Amblyomma tapiri* Tonelli-Rondelli 1937 y *Amblyomma sculptum* Berlese 1888) eran sinónimos de *A. cajennense*. Las propuestas de Aragão y Fonseca (1953) y Kohls (1958) fueron corroboradas además, tiempo después, por un análisis de los hidrocarburos cuticulares de especímenes de *A. cajennense* s.l. de distintos orígenes geográficos, en los que no se reveló ninguna diferencia significativa (Estrada-Peña y col., 1993). Sin embargo, trabajos de cruzamientos realizados en Argentina (Mastropaolo y col., 2011) y Brasil (Labruna y col., 2011), sugirieron que posiblemente el taxón *A. cajennense* estaba conformado por un complejo de especies. Posteriormente, un análisis filogenético de *A. cajennense* s.l. basado en la comparación de secuencias de ADN de genes mitocondriales y espaciadores intergénicos nucleares de garrapatas colectadas en todo el rango de distribución del taxón mostró seis clados con una marcada divergencia en estructura genética y delimitaciones geográficas (Beati y col., 2013).

Según Beati y col. (2013), todos los clados corresponden a localidades alo y parapátricas caracterizadas por rasgos ecológicos diferentes. El primer clado se relacionó con el Valle interandino del Perú, el segundo clado se asoció con la parte seca de la región Chaqueña de Argentina y Paraguay, el tercer clado con áreas boscosas y húmedas del norte argentino y la costa sur de Brasil, el cuarto clado con la región amazónica, el quinto clado con zonas montañosas de la cordillera oriental de Colombia y el sexto clado abarca desde la costa del Pacífico de Ecuador, a través de América Central, hasta Texas (EE. UU).

El estado taxonómico de *A. cajennense* y de las especies relacionadas sinonimizadas fue nuevamente evaluado por Nava y col. (2014), estos autores examinaron la morfología de las muestras representativas de cada clado con el propósito de verificar si la subdivisión genética observada por Beati y col. (2013) podría estar asociada con rasgos fenotípicos distintivos, comparando morfológicamente el material tipo y especímenes de diferentes colecciones del mundo. Es así que,

Nava y col. (2014) redescubrieron y validaron a *A. cajennense* s.s, *A. mixtum*, y *A. sculptum*, y describieron por primera vez *Amblyomma tonelliae* Nava, Beati, y Labruna, 2014; *Amblyomma patinoi* Labruna, Nava y Beati, 2014; y *Amblyomma interandinum* Beati, Nava, y Cáceres, 2014. En el caso particular de la República Argentina, se demostró la presencia de dos especies del complejo en el norte del país: *A. tonelliae* asociada a zonas áridas de la provincia fitogeográfica del Chaco y *A. sculptum* distribuida en áreas más húmedas del norte argentino, principalmente en la provincia fitogeográfica de Las Yungas (Nava y col., 2014).

En Argentina, se ha producido un notable desplazamiento de la ganadería hacia el norte debido a la expansión de la frontera agrícola en las regiones centrales del país (Rossanigo y col., 2010). Esta situación ha conllevado a un aumento del número de bovinos en las zonas de distribución de *A. tonelliae* y *A. sculptum*. Sin embargo, la capacidad de cada una de estas especies para transmitir enfermedades a los bovinos no ha sido estudiada en el país. Del mismo modo, con la excepción de estudios focales realizados en la provincia de Jujuy, citados con anterioridad, tampoco se conoce con precisión el rol de estas especies de garrapatas como vectores de agentes potencialmente patógenos para otros animales domésticos o para humanos a lo largo de su distribución en el país.

De esta nueva situación surge la necesidad de enfocar nuevos estudios sobre ecología y potencial capacidad vectorial de las especies que forman este complejo, para valorar su potencial impacto sobre la salud pública y de los animales domésticos. Para ello se debe tener en cuenta que, para conocer la epidemiología de una enfermedad transmitida por vectores es necesario conocer la ecología, fisiología, inmunología y genética del patógeno, del vector y del hospedador vertebrado y como estos interactúan en el ambiente (Reisen, 2002).

En relación a lo expresado anteriormente, el objetivo general de esta tesis fue obtener información sobre aspectos ecológicos relacionados a distribución geográfica real y potencial, estacionalidad y diversidad genética, y analizar el rol como potencial vector para transmitir bacterias de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Rickettsia*, de las dos especies del complejo *Amblyomma cajennense* presentes en la Argentina, *A. sculptum* y *A. tonelliae*. La información proporcionada por el estudio eco-epidemiológico de las dos especies de garrapatas, es fundamental para diseñar estrategias de control y realizar inferencias epidemiológicas acerca de las enfermedades que pueden transmitir estas garrapatas. Se considera entonces, que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis tienen relevancia científica

con impacto en la parasitología y la medicina veterinaria en particular, y la salud pública y la acarología en general.

En la parte I de la presente tesis se aborda la distribución y diversidad genética de *A. tonelliae* y *A. sculptum* en la Argentina. Dividida, esta primera parte, en tres capítulos. En el capítulo 1 se estudia la distribución geográfica y hospedadores de *A. sculptum* y *A. tonelliae* en Argentina y se aplica un modelo de nicho ecológico para inferir la distribución potencial de ambas especies en Sudamérica. En el capítulo 2 se describe la distribución estacional de *A. sculptum* y *A. tonelliae* en Argentina y en el capítulo 3 se estudia la diversidad genética y filogeografía de *A. tonelliae* y *A. sculptum* en Argentina por comparación de secuencias del gen mitocondrial 16S.

Finalmente, en la parte II de esta tesis se evalúa el rol potencial de *A. sculptum* y *A. tonelliae* como vectores de microorganismos rickettsiales en Argentina.

Figura 1: Distribución del taxón *Amblyomma cajennense* s.l. según Estrada-Peña y col. (2004).



Figura 2: Vista dorsal de machos de: (A) *Amblyomma cajennense* s.s.; (B) *Amblyomma tonelliae* n. sp.; (C) *Amblyomma interandinum* n. sp.; (D) *Amblyomma patinoi* n. sp.; (E) *Amblyomma mixtum*; (F) *Amblyomma sculptum* (Nava y col., 2014).

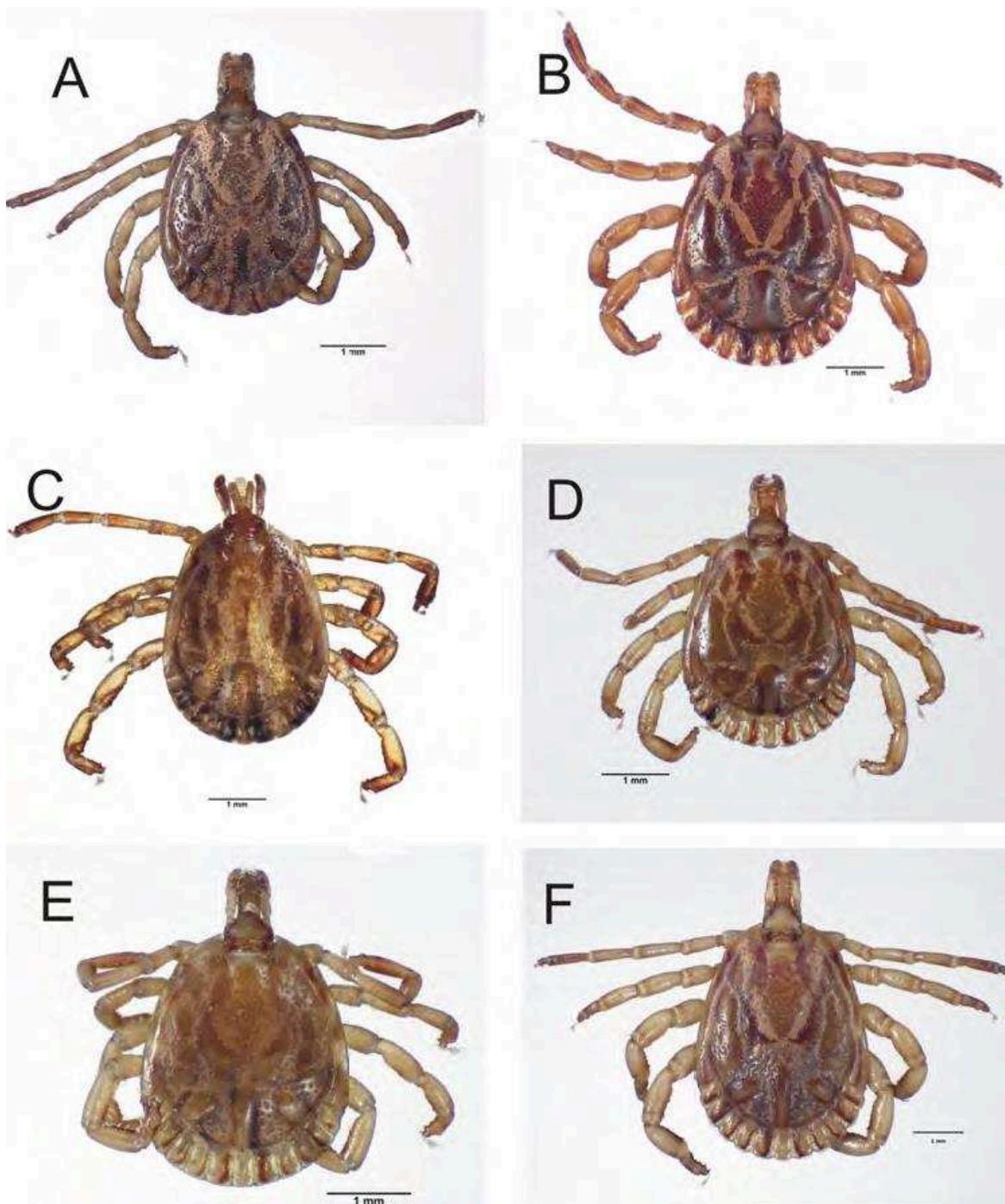


Figura 3: Vista dorsal de hembras de: (A) *Amblyomma cajennense* s.s.; (B) *Amblyomma tonelliae* n. sp.; (C) *Amblyomma interandinum* n. sp.; (D) *Amblyomma patinoi* n. sp.; (E) *Amblyomma mixtum*; (F) *Amblyomma sculptum*. (Nava y col., 2014)

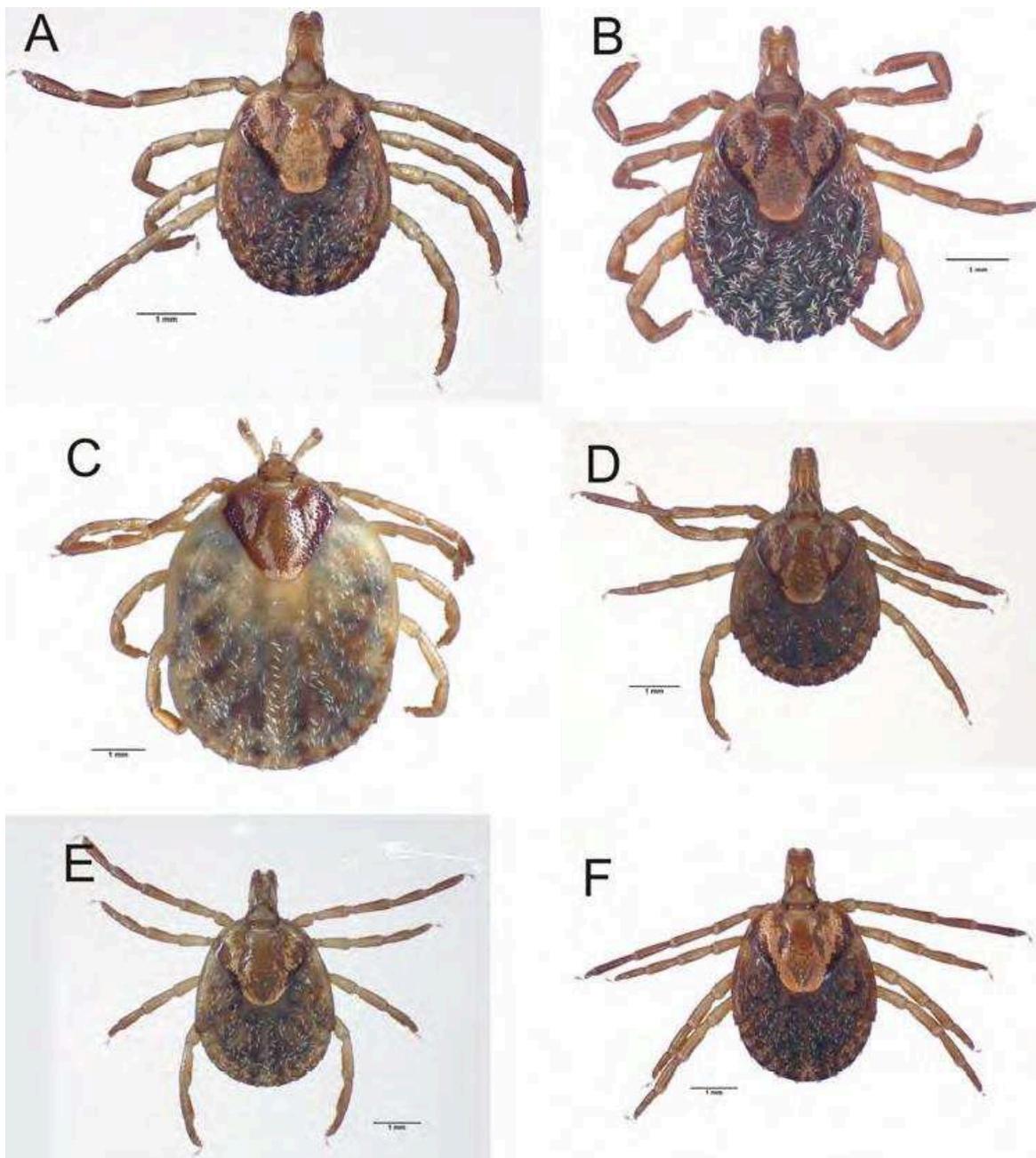


Figura 4: Distribución de las 6 especies del complejo *Amblyomma cajennense* \**Amblyomma cajennense* s.s.; † *Amblyomma tonelliae* n. sp.; ¥ *Amblyomma interandinum* n. sp.; # *Amblyomma patinoi* n. sp.; ■ *Amblyomma mixtum*; ○ *Amblyomma sculptum*; X registro de *A. sculptum* en departamento de Beni Bolivia (localidad desconocida) (Nava y col., 2014).



# Parte I

## **Distribución y diversidad genética de *Amblyomma tonelliae* y *Amblyomma sculptum* en la Argentina.**

# Capítulo 1

**Distribución geográfica y hospedadores de  
*Amblyomma sculptum* y *Amblyomma tonelliae* en  
Argentina, con un modelo de nicho ecológico para  
inferir la distribución potencial de ambas especies en  
Sudamérica.**

## Introducción

El concepto de distribución de una especie se refiere al área habitada por ésta o la superficie que encierra el conjunto de localidades donde las poblaciones de una especie han sido observadas y registradas. Puede caracterizarse en términos de su tamaño, ubicación geográfica y continuidad. La distribución actual de una especie es el resultado de su evolución biológica y dispersión, de la evolución climática global y regional y de la evolución de la distribución de tierras y mares (Cox y Moore, 2000). La distribución geográfica de una especie está directamente condicionada por los requerimientos ecológicos de esa especie para persistir en determinadas áreas biogeográficas.

Asimismo, ciertos cambios en el paisaje, vegetación y clima ocurridos en tiempos evolutivos recientes se relacionan a una causalidad antrópica (Walker y Steffen, 1999; Fayer, 2000; Sutherst, 2001; Biello, 2011). Por ejemplo, se ha reportado un aumento de las temperaturas medias mundiales de 0,10- 0,16°C por decenio, y se espera que aumente significativamente en los próximos 100 años (IPCC 2007). Estas temperaturas tendrán repercusión a largo plazo en los ecosistemas y, por consiguiente, en las especies que habitan dichos ecosistemas (Thuiller y col., 2006; Fries y Mayer, 2009). Frente al cambio ambiental los organismos pueden adaptarse a las nuevas condiciones, pasar a ocupar un hábitat más apropiado, o bien extinguirse debido a la ausencia de plasticidad ecológica para adaptarse a las nuevas condiciones (Cox y Moore, 2000).

Como en otros parásitos, la distribución de las garrapatas no sólo está estrechamente relacionada a las características climáticas de una región, sino también a la distribución espacial de sus hospedadores y a características propias de la vegetación que afectan el desarrollo de la fase no parasítica (Sonenshine y Mather, 1994; Randolph, 2008). Y en el caso particular de los artrópodos vectores, los cambios ambientales no sólo modifican el patrón de distribución de garrapatas sino también el de los agentes infecciosos que estas transmiten. Esto es de especial interés para desarrollar modelos epidemiológicos con capacidad predictiva con el fin de definir cómo los cambios ambientales modulan la distribución y abundancia no sólo de un vector determinado, sino también de sus hospedadores (Tagliapietra y col., 2011).

Un parásito interactúa con su hospedador, pero también con el medio ambiente, pudiendo este último afectar la fuerza y evolución de la interacción parásito-hospedador (Krasnov y col., 2008). La especificidad de un parásito puede definirse como la medida en que el mismo está restringido, en alguna etapa de su ciclo de vida, a un determinado número de especies hospedadoras (Poulin, 2007). La

especificidad estricta por hospedador no es común en la mayoría de las garrapatas duras del Neotrópico, ya que una gran proporción de las especies neotropicales se asocian a hospedadores pertenecientes a distintas familias u órdenes (Nava y Guglielmone, 2013). En este sentido, los trabajos de Klompen y col. (1996), Cumming (2002) y Nava y Guglielmone (2013) concluyen que, en líneas generales, las garrapatas son hábitat-especialistas, y se asocian a los hospedadores competentes disponibles que se encuentren en sus hábitats preferidos. Un meta-análisis de especificidad de hospedador en garrapatas duras demostró que las especies que conforman el complejo *A. cajennense* no presentan una especificidad marcada por un grupo particular de hospedadores, lo cual indica que los mismos no constituyen un factor determinante en su distribución espacial. Las garrapatas del complejo *A. cajennense* presentan plasticidad fisiológica para alimentarse con éxito cuando se exponen a un nuevo hospedador no relacionado con los hospedadores primigenios (Nava y Guglielmone, 2013). Sin embargo, luego del reordenamiento taxonómico del complejo *A. cajennense* llevado a cabo por Nava y col. (2014), no se han realizado análisis para conocer con precisión el uso de hospedadores de las dos especies de este complejo presentes en Argentina, *A. tonelliae* y *A. sculptum*.

El área de distribución potencial de una especie es la superficie en la que un taxón determinado tiene la mayor probabilidad de establecerse (Espinosa y col., 2001). El concepto básico que subyace al modelado de la ocurrencia de especies es la definición del nicho ecológico. Hutchinson (1957) define el nicho ecológico como un conjunto de variables ambientales en una región determinada con valores límites dentro de los cuales una especie sobrevive. Fuera de este nicho, una población no puede mantener una tasa neta positiva de aumento de la población, debido por ejemplo, a temperaturas mínimas excesivamente bajas en invierno, insuficiente crecimiento en la estación lluviosa, entre otras causas. Diferentes tipos de interacciones entre las especies y su entorno pueden conducir a la co-ocurrencia de taxones relacionados. Si los factores ambientales son los principales impulsores de los rangos de especies, entonces las especies deben coexistir donde las condiciones se encuentren dentro del nicho fundamental de ambas especies. Por ejemplo, si una especie requiere temperaturas más frías y la otra requiere temperaturas más cálidas, entonces la coexistencia ocurriría a temperaturas intermedias, y sólo una de las dos ocurriría a temperaturas más extremas (Chunco y col., 2012).

En la literatura específica suelen ser utilizados indistintamente los nombres “modelos de nicho ecológico” y “modelos de distribución”, que conceptualmente pueden ser muy semejantes. Los modelos de nicho ecológico son modelos usados para desarrollar relaciones entre los valores ambientales y los datos de presencia, presencia-ausencia y/o abundancia conocida de las especies

(Graham y col., 2004). Para modelar los requisitos ambientales de una especie (nicho) existen tres principios fundamentales a la hora de escoger la variable predictiva (Anderson, 2013). El primero, es usar solamente variables cuyos valores no son afectados por la especie que se está modelando. Dichas variables se califican como “escenopoyéticas”. El uso de una variable no escenopoyética requiere tener en cuenta la retroalimentación entre la variable predictiva y la abundancia de la especie que está siendo modelada mediante relaciones matemáticas más complejas que los algoritmos utilizados para el modelado de nicho. El segundo, es evitar el uso de variables puramente espaciales (como latitud y longitud), que se relacionan con distribución de una especie, pero no con sus requerimientos ecológicos. Y tercero, es preferible usar variables a las cuales la especie responde, es decir variables causales. En un modelado de nicho cada registro de la especie en cuestión debe constituir una muestra representativa de las condiciones ambientales requeridas por la especie (Peterson y col., 2011). Según Estrada-Peña (2008) comprender el nicho ecológico de una garrapata es un ejercicio complejo debido a la diversidad de variables, aparte de las variables climáticas, que operan en las diferentes etapas del ciclo de vida de estos parásitos, como la abundancia de garrapatas y hospedadores, la competencia con otras especies de parásitos y la vegetación.

El objetivo de este capítulo es describir y analizar la distribución geográfica de *A. tonelliae* y *A. sculptum* en relación a las distintas eco-regiones de la Argentina, generando mapas de distribución, definir el gradiente de variabilidad en los nichos ecológicos en los que se ha registrado cada especie, cuantificar los solapamientos de nichos y deducir áreas probables de alopatría o simpatría / parapatría y recopilar registros de hospedadores, tanto silvestres como domésticos.

## Materiales y métodos

### Distribución geográfica y hospedadores naturales de *A. tonelliae* y *A. sculptum*.

Para determinar la distribución espacial de los dos taxones se utilizaron registros de adultos de *A. tonelliae* y *A. sculptum* de 92 y 48 localidades, respectivamente. Para el caso de los hospedadores naturales de preimagos y adultos de las dos especies, se utilizaron registros de 82 y 44 localidades para *A. tonelliae* y *A. sculptum*, respectivamente. Los registros se basaron en colectas realizadas por la tesista, en información publicada en la literatura específica y en registros de material depositado en la Colección de Garrapatas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Rafaela, Santa Fe, Argentina) y la Colección de Ixodidos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Las colectas de garrapatas realizadas por la tesista se efectuaron por el método de arrastre de bandera (método de *dragging*, ver capítulo 2) sobre vegetación (Sonenshine, 1993) y por examen de animales domésticos y de carcasas de animales silvestres a lo largo de sitios dispuestos en transectas que atravesaron distintas unidades ambientales de las provincias de Chaco, Formosa, Salta, Santiago del Estero y Jujuy. Los especímenes de garrapatas fueron identificados morfológicamente siguiendo Nava y col. (2014) y Martins y col. (2014).

Para cada dato de presencia se registró la localidad, provincia política, coordenadas geográficas y hospedadores. Cada localidad de hallazgo fue representada en un esquema de mapa de las Eco-regiones de Argentina descritas por Burkart y col. (1999) para el caso de *A. tonelliae*. En el caso de *A. sculptum* se decidió representar los hallazgos en dos esquemas de mapas; el primero, diseñado por la tesista corresponde a una combinación del esquema de Eco-regiones de Burkart y col. (1999) y del esquema de provincias Fitogeográfica de Argentina de Cabrera (1976). Se decidió utilizar este esquema porque en el caso de la provincia de Corrientes la subdivisión de Cabrera (1976) ofrece una mayor resolución para analizar las preferencias ecológicas de *A. sculptum*. El segundo, corresponde al esquema de humedales del Chaco de Ginzburg y col. (2005), este esquema permite una explicación más precisa de las preferencias ecológicas del taxón para los hallazgos en la Eco-región del Chaco Seco. Los mapas de distribución de los taxones se confeccionaron utilizando el programa DIVA-GIS 7.5 (Sistema de Información Geográfica para el Análisis de Especies Datos de Distribución). Las eco-regiones sensu Burkart y col. (1999) involucradas en este estudio fueron las siguientes:

1. **Yungas:** El clima es cálido y húmedo a sub-húmedo, las condiciones de temperatura y humedad varían según la altitud, latitud, posición en relieve y exposición de las laderas. Estas sierras

condensan las corrientes húmedas que provienen del anticiclón del atlántico sur. Las altitudes varían entre 400 y 3.000 msnm y la precipitación anual ronda entre 900 y 1.000 mm. A medida que aumenta la altitud se reconocen cuatro diferentes subregiones: Selva Pedemontana, Selva Montana, Bosque montano o nublado y Pastizales de altura.

2. **Chaco Seco:** Comprende una vasta planicie con una suave pendiente hacia el este. Ocurren importantes procesos de origen aluvial y fluvial, vinculados al aporte de materiales del sector montañoso andino. Aquí nacen las cuencas hidrográficas de los ríos Pilcomayo, Bermejo, Juramento y Dulce. El clima es cálido subtropical, con áreas que presentan las máximas temperaturas del continente y las precipitaciones, marcadamente estivales, varían entre 500 y 700 mm anuales. En razón de las variaciones climáticas y geomorfológicas se reconocen cinco subregiones: Chaco de derrame fluvial, Chaco Semiárido, Chaco Árido, Chaco Subhúmedo y Chaco Serrano.
3. **Chaco Húmedo:** Esta región presenta una suave pendiente hacia el este, en la que predominan ambientes deprimidos. La temperatura media anual disminuye de norte a sur, desde 23°C a 18°C. Las lluvias anuales rondan entre 1.300 mm anuales en el borde oriental disminuyendo hacia el oeste hasta 750 mm. Predominan modelados de tipo fluvial y fluvio-lacustres organizándose una red de drenaje paralela a los cauces de los ríos Pilcomayo y Bermejo con desagüe en el río Paraguay y Paraná. El paisaje es un mosaico de franjas de tierras altas, bien drenadas, con bosques acompañando el curso de los ríos y alternando con interfluvios bajos de esteros y cañadas con fisonomía de pastizal, sabana y pajonal.

### **Modelado de nicho ecológico.**

Se construyó un modelo de nicho ecológico para *A. sculptum* y *A. tonelliae* usando el software MaxEnt versión 3.0 (Phillips y col., 2004). MaxEnt crea modelos de distribución de especies mediante la combinación de datos de presencia en un punto geográfico dado con distintos niveles de variables ambientales explicativas, utilizando un método estadístico conocido como máxima entropía, que estima la distribución más uniforme a lo largo del área de estudio con la restricción de que el valor esperado para cada variable ambiental en una distribución concuerda con su promedio empírico (Phillips y col., 2004). Es así que, la complejidad del modelo se limita por medio de una penalización que en inglés se llama *regularization*, y que se aplica a cada variable incluida en el modelo (Phillips y Dudík, 2008; Merow y col., 2013). Entre más alto sea el valor de penalización, más sencillo tenderá a ser el modelo

(por ejemplo, tenderá a ser menor el número de variables incluidas en el modelo). Varios estudios recientes han mostrado que modelos con diferentes niveles de complejidad pueden variar tremendamente en sus predicciones de las áreas adecuadas para la especie (Elith y col., 2010; Anderson y Gonzalez, 2011) Este software fue corrido utilizando puntos de colectas que se definieron como datos de presencia (256 registros de *A. sculptum* y 103 registros de *A. tonelliae*), variables asociadas a temperatura (mínimas, máximas y medias) y el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI). La distribución potencial de *A. sculptum* y *A. tonelliae* fue calculada a través de un algoritmo basado en los coeficientes de una regresión armónica de los valores mensuales de las temperaturas y el NDVI.

Las variables climáticas utilizadas, obtenidas de WorldClim (Hijmans y col., 2005), fueron datos de temperatura de superficie (TS) biológicamente relevantes a una resolución de aproximadamente 1 km, relevadas por un período de 30 años desde 1960 a 1990 (Hijmans y col., 2005). El NDVI es un parámetro calculado a partir de los valores de la reflectancia a distintas longitudes de onda, y es particularmente sensible a la cubierta vegetal, permite identificar la presencia de vegetación en la superficie y caracterizar su distribución espacial. Su rango de valores va de 0 a 1, lo que equivale a superficies descubiertas o de cuerpos de agua hasta suelos con vegetación densa, húmeda y bien desarrollada.

Las variables utilizadas para el análisis derivan de regresiones armónicas de datos de temperatura y NDVI de imágenes de satélite con las fechas. El resultado es una serie de coeficientes de la ecuación, cuatro para la temperatura y cuatro para el NDVI. Las variables relacionadas a las temperaturas son: T1 explica la media de temperatura dentro de un periodo dado de tiempo, T2 y T3 explican la amplitud y la pendiente de las temperaturas de los seis primeros meses del año, T4 explica la amplitud y la pendiente de las temperaturas del segundo semestre del año. En el caso de la vegetación, V1 explica la media del NDVI del periodo considerado, V2 y V3 explican la amplitud y la pendiente del NDVI de los seis primeros meses del año, V4 explica la amplitud y la pendiente del NDVI del segundo semestre del año. La ventaja de utilizar estos coeficientes es que se suprimen problemas de correlación entre las variables, y que tienen la capacidad de explicar toda la variabilidad de las temperaturas y de NDVI a lo largo del período de tiempo que se está estudiando.

Los factores que se analizaron para los distintos coeficientes fueron marginalidad y especialización. La marginalidad se define como el cuadrado de la distancia desde la media del espacio disponible hasta la media del espacio utilizado. Ésta mide una posición y expresa la magnitud de la desviación del nicho

en relación con el espacio disponible. Cuanto mayor sea la marginalidad, más el nicho se desvía de las condiciones medias del área de estudio. Cuando es alta, la especie está presente en áreas que muestran características muy diferentes del hábitat en comparación con la de su nicho promedio. La especialización mide la amplitud del nicho. Una alta especialización, positiva o negativa, corresponde a un nicho estrecho o limitado.

## Resultados

### *Amblyomma tonelliae*

Los hallazgos de *A. tonelliae* fueron realizados en las provincias de Chaco (7 localidades), Formosa (7 localidades), Jujuy (5 localidades), Salta (59 localidades) y Santiago del Estero (3 localidades). Los registros de *A. tonelliae* plasmados en el mapa de Eco-regiones forman dos grupos, uno con distribución este (11% de los registros) y otro con distribución oeste (89% de los registros). La distribución oeste de *A. tonelliae* se encuentra representada por poblaciones de garrapatas distribuidas a lo largo de la porción noroeste de la subregión del Chaco Serrano y Chaco semiárido (provincias de Jujuy y Salta) y el ecotono o zona de transición entre Chaco serrano y Selva Pedemontana de La Yunga. La distribución este de *A. tonelliae* está representada por poblaciones de garrapatas distribuidas a lo largo del extremo este de la subregión Chaco Semiárido (provincias de Formosa, Chaco y Santiago del estero) (Figura 5). Los dos grandes grupos de poblaciones (este y oeste) se encuentran separados; al norte por aproximadamente 200 km entre la localidad de Morillo, Salta y la localidad de Puesto Campo del Cielo, Formosa y al sur por aproximadamente 300 km entre la localidad de Talayato, Salta y PN Copo, Santiago del estero (Ver coordenadas en Tabla 1).

Las proyecciones espaciales de distribución potencial para *A. tonelliae* obtenidas con el modelado de nicho se visualizan en la Figura 6. Este análisis no es una evaluación explícita del rango probable de colonización de las garrapatas, sino una proyección de las áreas con las condiciones climáticas adecuadas para la persistencia de la especie. De acuerdo a los resultados del análisis, *A. tonelliae* tiene un nicho ecológico reducido, en comparación con *A. sculptum*, extendiéndose por el Chaco Seco de Paraguay, Bolivia y Norte de Argentina y zonas de ecotono entre Chaco Seco y Selva Pedemontana y montana de la Yunga. Se predijo que *A. tonelliae* puede estar presente en sitios con temperaturas elevadas (35°C) y con un período sostenido de baja temperatura media (semanas 11-26), así como en sitios con fuerte estacionalidad de NDVI, con un mínimo profundo alrededor de la semana 41 (Figuras 11 y 12).

Los principales hospedadores silvestres naturales de adultos e inmaduros de *A. tonelliae* para Argentina registrados en este estudio fueron especies de mamíferos de las familias Cervidae, Tayassuidae, Myrmecophagidae y Canidae. Además, adultos y ninfas de *A. tonelliae* se registraron parasitando una amplia variedad de hospedadores domésticos y al humano (Tabla 1).

Figura 5: Distribución de *Amblyomma tonelliae* en relación a las Eco- regiones de Argentina de acuerdo con Burkart y col. (1999): 1, Altos Andes; 2, Puna; 3, Selva de las Yungas; 4, Chaco Seco; 5, Chaco Húmedo; 6, Selva Paranaense; 7, Campos y Malezales; 8, Esteros del Iberá; 9, Espinal; 10, Delta e Islas del Paraná; 11, Pampa. Los puntos negros indican localidades de hallazgos de *Amblyomma tonelliae*.

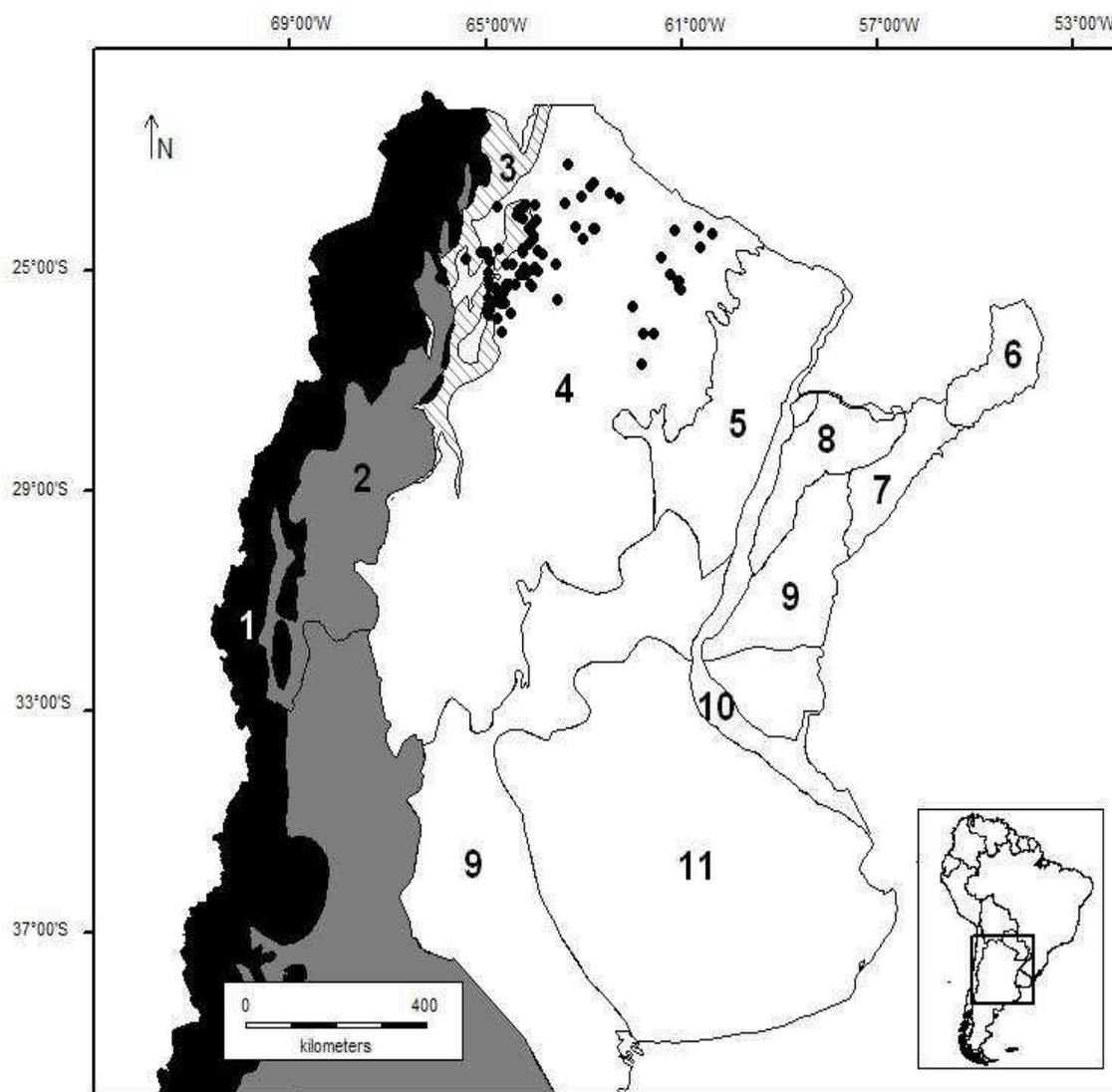


Figura 6: Proyección del nicho ecológico de preferencia para *Amblyomma tonelliae* obtenido usando las mejores variables discriminadoras. Puntos negros representan los registros de ocurrencia para la especie; Áreas grises representan las áreas de proyección del modelo en las áreas ambientalmente adecuadas.

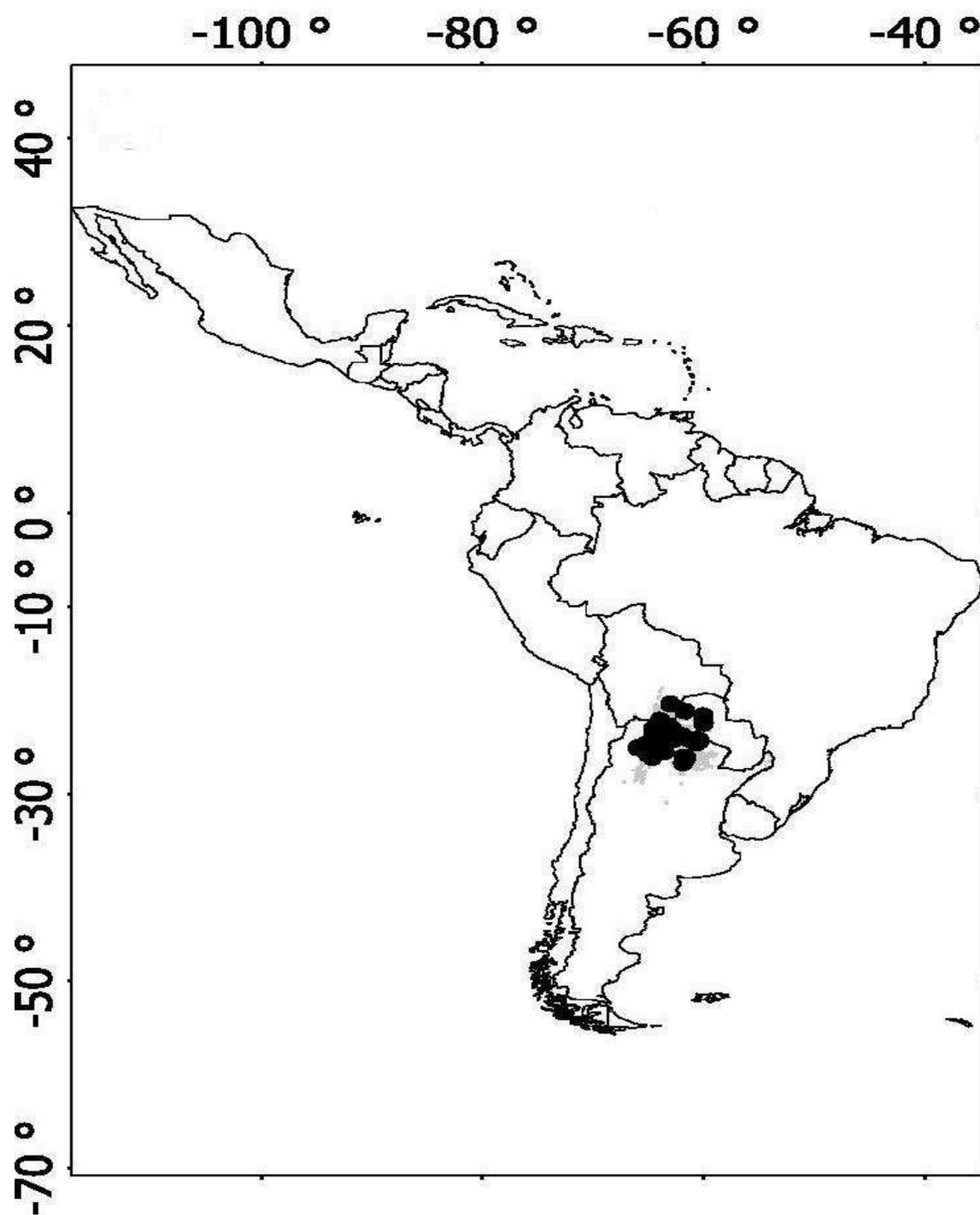


Tabla 1: Localidades de colecta y hospedadores de *Amblyomma tonelliae* en Argentina. Las coordenadas geográficas se muestran en grados sexagesimales.

M=macho; H=hembra; N=ninfa; L=larva

INTA= Colección de garrapatas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Rafaela, Santa Fe, Argentina); FCV-UNL=Colección de Ixodidos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina)

	Localidad	Coordenadas	Hospedadores	Estadío	Referencia
<b>Chaco</b>	Toba Muerto	25°04'S 61°15'O	Equino	H	INTA/2323
	PN El Impenetrable	25°10'S 61°3'O	Equino	M	En este estudio
	12 km al NO de Las Hacheras	25°18'S 61°03'O	Equino	M	INTA/2342
	7 km al S de comunidad Wichi El Pintado	24°45'S 61°26'O	Equino	M	INTA/2344
	La Armonía	25°10'S 61°05'O	Equino	HM	INTA/2345
	Mira Flores	25°38'S 60°55'O	Humano	N	En este estudio
	20 km N Río Muerto	26°08'S 61°34'O	vida libre	N	En este estudio
<b>Formosa</b>	RN. Formosa	24°17'S 61°48'O	Equino	M	INTA/2266
	RN. Formosa	24°17'S 61°48'O	Humano	M	En este estudio
	El Simbolar	24°16'S 61°08'O	Burro	HM	INTA/2346
	El Simbolar	24°16'S 61°08'O	Humano	HM	FCV-UNL/FO 00003 <sup>a</sup>
	El Simbolar	24°16'S 61°08'O	vida libre	M	FCV-UNL/FO 00014
	Laguna Yema	24°13'S 61°17'O	Equino	HM	INTA/2347
	Puesto Campo del Cielo	24°20'S 60°22'O	Equino	HM	INTA/2348
	Ingeniero Juárez	23°55'S 61°52'O	Equino	HM	INTA/2349
	Las Lomitas 30 km al NO de	24°31'S 60°52'O	Equino	M	INTA/2350
	La Linea	24°12'S 60°39'O	Humano	M	FCV-UNL/FO 00005
<b>Jujuy</b>	Saladillo	24°02'S 64°15'O	vida libre	HM	INTA/2352
	Ingenio Ledesma	23°49'S 64°46'O	Equino	HM	En este estudio
	La Ronda	24°3'S 64°14'O	vida libre	HM	En este estudio
	Palma Sola	24° 1'S 64°19'O	vida libre	HM	En este estudio
	15km al NE de Palma Sola	23°52'S 64°15'O	vida libre	HM	En este estudio

País/Provincia	Localidad	Coordenadas	Hospedadores	Estadío	Referencia
Salta	25 de junio	24°55'S 63°59'O	Humano	M	Nava y col., 2014
	Agua Muerta	24°11'S 62°41'O	<i>Catagonus wagneri</i>	M	INTA/2005
	Aguas Calientes	25°25'S 64°45'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
	Apolinario Saravia	24°25'S 64°02'O	Equino	HM	Nava y col., 2014
	Apolinario Saravia	24°25'S 64°02'O	Humano	M	INTA/853
	Campo Alegre	23°24'S 62°48'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
	Campo Redondo	25°01'S 64°33'O	vida libre	N	INTA/708
	Campos del Norte	25°01'S 63°56'O	Bovino	H	Nava y col., 2014
	Cañada Honda	23°47'S 63°23'O	Humano	H	Nava y col., 2014
	Ceibalito	25°05'S 64°19'O	Humano	M	Nava y col., 2014
	Ceibalito	25°05'S 64°19'O	<i>Mazama sp</i>	N	INTA/842
	Coronel Juan Solá Morillo	23°28'S 62°52'O	Equino	M	INTA/2351
	Coronel Olleros	25°05'S 64°15'O	Humano	HM	Nava y col., 2014
	Coronel Olleros	25°05'S 64°15'O	Equino	H	INTA/599
	Coronel Vidt	24°56'S 64°13'O	Canino domestico	M	Nava y col., 2014
	Cruz Quemada	25°02'S 64°58'O	Bovino	HMN	Nava y col., 2014
	Cruz Quemada	25°02'S 64°58'O	vida libre	HMN	INTA/1147
	Cruz Quemada	25°02'S 64°58'O	Equino	HMN	INTA/469
	Cruz Quemada	25°02'S 64°58'O	Cabra	N	INTA/1071
	Cruz Quemada	25°02'S 64°58'O	Cerdo domestico	N	INTA/1068
	Cruz Quemada	25°02'S 64°58'O	Canino domestico	HMN	INTA/1065
	Divisadero	25°20'S 64°48'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
Dragones	23°16'S 63°21'O	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	HM	Nava y col., 2014	
Dragones 20 km N	23°04'S 63°20'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014	

País/Provincia	Localidad	Coordenadas	Hospedadores	Estadío	Referencia
Salta	Finca La Rubia	24°33'S 63°25'O	vida libre	HM	INTA/813
	Finca Yatasto	25°35'S 64°56'O	Humano	M	Nava y col., 2014
	Guayacán	25°34'S 64°48'O	Bovino	H	Nava y col., 2014
	Güemes	24°41'S 65°02'O	Humano	H	INTA/299
	Güemes	24°41'S 65°02'O	Bovino	H	INA/916
	Horcones	25°43'S 64°55'O	Humano	H	Nava y col., 2014
	Horcones	25°43'S 64°55'O	Bovino	HMN	INTA/1110
	Joaquín V. González	25°05'S 64°11'O	Bovino	N	INTA/760
	Juramento	25°10'S 64°58'O	Humano	MN	Nava y col., 2014
	Juramento	25°10'S 64°58'O	Bovino	HMN	INTA/1143
	Juramento	25°10'S 64°58'O	vida libre	H	INTA/1785
	La Estrella	23°49'S 64°05'O	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	N	Nava y col., 2014
	La Estrella	23°49'S 64°05'O	vida libre	HM	INTA/2068
	La Población	25°20'S 64°37'O	Bovino	HN	INTA/789
	La Población	25°20'S 64°37'O	Canino domestico	H	INTA/847
	La Salada	25°46'S 64°30'O	Bovino	HMN	Nava y col., 2014
	La Salada	25°46'S 64°30'O	Humano	N	INTA/1049
	Las Lajitas	24°41'S 64°15'O	<i>Tamandua tetradactyla</i>	H	Nava y col., 2014
	Las Lajitas	24°41'S 64°15'O	Bovino	HM	INTA/961
	Las Lajitas	24°41'S 64°15'O	Humano	HMN	INTA/1154
	Luis Burela	24°22'S 64°02'O	Humano	N	INTA/396
Maravilla	25°36'S 64°38'O	Bovino	H	Nava y col., 2014	
Maravilla	25°36'S 64°38'O	vida libre	N	INTA/1086	

País/Provincia	Localidad	Coordenadas	Hospedadores	Estadío	Referencia
Salta	Metán	25°30'S 64°58'O	Bovino	HM	INTA/618
	Metán	25°30'S 64°58'O	vida libre	N	INTA/1092
	Morillo	23°28'S 62°53'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
	Moromuerto	25°24'S 64°40'O	Bovino	M	Nava y col., 2014
	Palma Horqueta	24°12'S 63°11'O	<i>Catagonus wagneri</i>	HM	Nava y col., 2014
	Palma Horqueta	24°12'S 63°11'O	<i>Pecari tajacu</i>	MN	INTA/1991
	Palma Horqueta	24°12'S 63°11'O	<i>Tayassu pecari</i>	M	INTA/1992
	Palomitas	24°54'S 64°57'O	Bovino	HM	INTA/1160
	Palomitas	24°54'S 64°57'O	Humano	HM	INTA/1526
	Palomitas	24°54'S 64°57'O	vida libre	HM	INTA/1587
	Puesto Buen Lugar	24°42'S 63°51'O	Equino	HMN	Nava y col., 2014
	Puesto Buen Lugar	24°42'S 63°51'O	Humano	M	INTA/898
	Puesto Buen Lugar	24°42'S 63°51'O	Bovino	HM	INTA/893
	Puesto Cabeza de Toro	24°58'S 64°01'O	Bovino	M	INTA/886
	Puesto Lloran los Toros	24°57'S 64°01'O	Bovino	HM	INTA/812
	Puesto Lloran los Toros	24°57'S 64°01'O	Canino doméstico	M	INTA/885
	Puesto Picaflor	25°03'S 64°10'O	Equino	HM	Nava y col., 2014
	Puesto San Joaquín	24°14'S 62°48'O	<i>Tayassu pecari</i>	HM	Nava y col., 2014
	Puesto San Vicente	24°39'S 63°57'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
	Río Medina	25°16'S 64°32'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
	Río Piedras	25°17'S 64°55'O	Bovino	N	Nava y col., 2014
	Río Piedras	25°17'S 64°55'O	Humano	HM	INTA/62
	Rivadavia Banda Sur	24°11'S 62°53'O	<i>Catagonus wagneri</i>	M	INTA/2000
	Rivadavia Banda Sur	24°11'S 62°53'O	<i>Tayassu pecari</i>	HM	Nava y col., 2014
	Rivadavia Banda Sur	24°11'S 62°53'O	vida libre	N	INTA/2003

<b>País/Provincia</b>	<b>Localidad</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Hospedadores</b>	<b>Estadío</b>	<b>Referencia</b>
<b>Salta</b>	Rodeadero	25°19'S 64°48'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
	Rosario de la Frontera	25°48'S 64°58'O	Bovino	H	Nava y col., 2014
	Saladillo	24°50'S 64°55'O	Bovino	HN	INTA/1597
	Saladillo	24°50'S 64°55'O	Humano	M	INTA/1704
	Saladillo	24°50'S 64°55'O	Equino	HM	INTA/1693
	Saladillo	24°50'S 64°55'O	vida libre	N	INTA/1568
	San Lorenzo-Rosario de la Frontera	26°06'S 64°40'O	Equino	HM	Nava y col., 2014
	San Luis-Metán	25°35'S 64°42'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
	San Luis-Metán	25°35'S 64°42'O	Humano	N	INTA/1083
	Santa Rita	24°40'S 64°59'O	Equino	H	INTA/1765
	Tala Yaco	25°52'S 64°47'O	Equino	N	Nava y col., 2014
	Talamuyo	25°05'S 64°15'O	Equino	HMN	Nava y col., 2014
	Tolloche	25°31'S 63°33'O	Bovino	N	INTA/155
	Yaquiásmé-Desmonte	24°36'S 64°45'O	Bovino	H	Nava y col., 2014
	Yaquiásmé-Monte	24°41'S 64°46'O	Bovino	HM	INTA/308
	Las tortugas	24°14'S 64°7'O	vida libre	HM	En este estudio
	9km NO Gral. Pizarro	24°10'S 64°3'O	vida libre	HM	En este estudio
	Villa Aurelia	24°36'S 64°15'O	Bovino	HM	En este estudio
	Oran	23°8'S 64°19'O	vida libre	HM	En este estudio
Virgilio Tedin	25°3'S 64°58'O	vida libre	HM	En este estudio	
<b>Santiago del Estero</b>	Sachayoj	26°41'S 61°50'O	Bovino	HM	Nava y col., 2014
	Pampa de Los Guanacos 14 Km al N de	26°08'S 61°48'O	vida libre	HM	INTA/2146
	PN. Copo	25°55'S 61°43'O	vida libre	HM	Nava y col., 2014

### ***Amblyomma sculptum***

Los hallazgos de *A. sculptum* fueron realizados en las provincias de Chaco (5 localidades), Corrientes (1 localidad), Formosa (12 localidades), Jujuy (8 localidades) y Salta (18 localidades). La distribución de *A. sculptum* en Argentina se enmarca en tres grandes áreas, una distribución oeste, que abarca la Selva Pedemontana y selva montana de la Yunga y la transición entre estas últimas y el Chaco serrano, una distribución a lo largo de los bosques de albardones a la vera de los ríos Bermejo, Teuco y Pilcomayo y sus afluentes en la subregión de Chaco semiárido y subhúmedo del Chaco Seco, y una distribución este que abarca el Chaco Húmedo (Figuras 7 y 8).

*A. sculptum* tuvo un amplio nicho ecológico en comparación con *A. tonelliae*. Su distribución potencial abarca desde los biomas de la Selva Mata Atlántica, Yunga y Chaco Húmedo en áreas de Brasil, Paraguay y norte de Argentina (donde existen datos de presencia), hasta la Selva Paranaense, Catinga de Brasil, Bosque Chiquitano de Bolivia, Valle interandino de Colombia, Bosque pacifico del Ecuador y Valle interandino de Perú, como áreas de distribución potencial (Figura 9). *A. sculptum* se registró en áreas con temperaturas medias relativamente calientes ( $>27^{\circ}\text{C}$ ) durante las semanas 21-41 (semana 1 a partir del 01 de enero) y la temperatura más baja ( $<21^{\circ}\text{C}$ ) para las semanas 24-36. Al igual que *A. tonelliae*, *A. sculptum* mostró una fuerte estacionalidad en NDVI, con un mínimo profundo alrededor de la semana 41 (Figuras 11 y 12).

Los principales hospedadores silvestres naturales de adultos y preimagos de *A. sculptum* para Argentina registrados en este estudio fueron especies de mamíferos de las familias Cervidae, Tayassuidae, Canidae, Caviidae, Tapiridae y Chinchillidae. Además *A. sculptum* se registró parasitando una amplia variedad de hospedadores domésticos y al humano (Tabla 2).

Figura 7: Distribución de *Amblyomma sculptum* en relación a compilación del esquema de Eco-regiones de Burkart y col. (1999) y del esquema de provincias Fitogeográfica de Argentina de Cabrera (1976). Se decidió utilizar este esquema porque en el caso de la provincia de Corrientes la subdivisión de Cabrera (1976) ofrece una mayor resolución para analizar las preferencias ecológicas de la especie. 1, Altos Andes; 2, Puna; 3, Selva de las Yungas; 4, Chaco Seco; 5, Chaco Húmedo; 6, Selva Paranaense; 7, Campos y Malezales; 8, Espinal; 9, Delta e Islas del Paraná; 10, Pampa. Puntos negros indican sitios de colecta de *A. sculptum*.

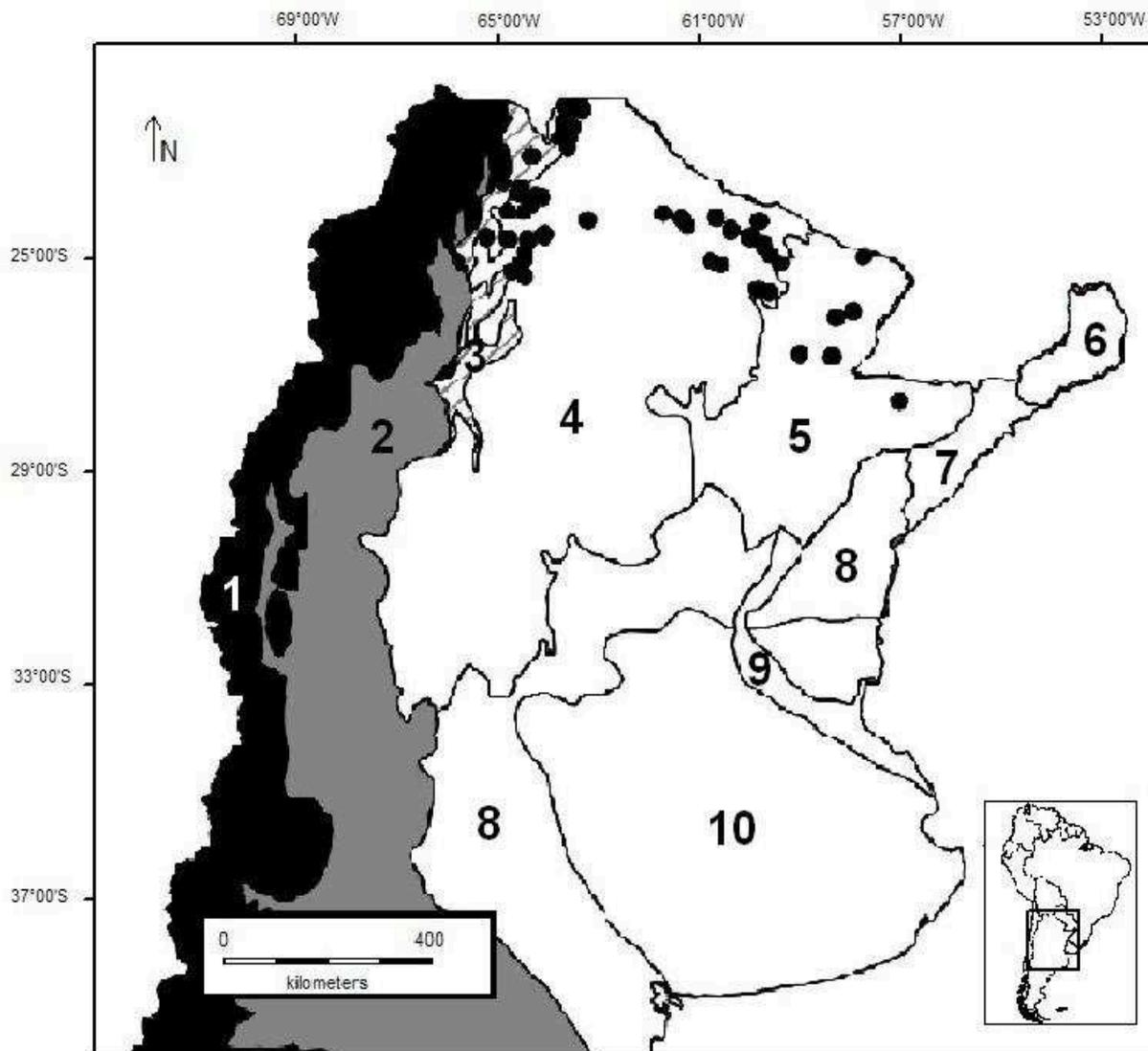


Figura 8: Distribución de *Amblyomma sculptum* en relación a esquema de humedales del Chaco de Ginzburg y col. (2005). Se decidió utilizar este esquema porque explica mejor las preferencias ecológicas del taxón para los hallazgos en la Eco-región del Chaco Seco. Puntos negros representan registros de localidades de *A. sculptum* en Argentina.

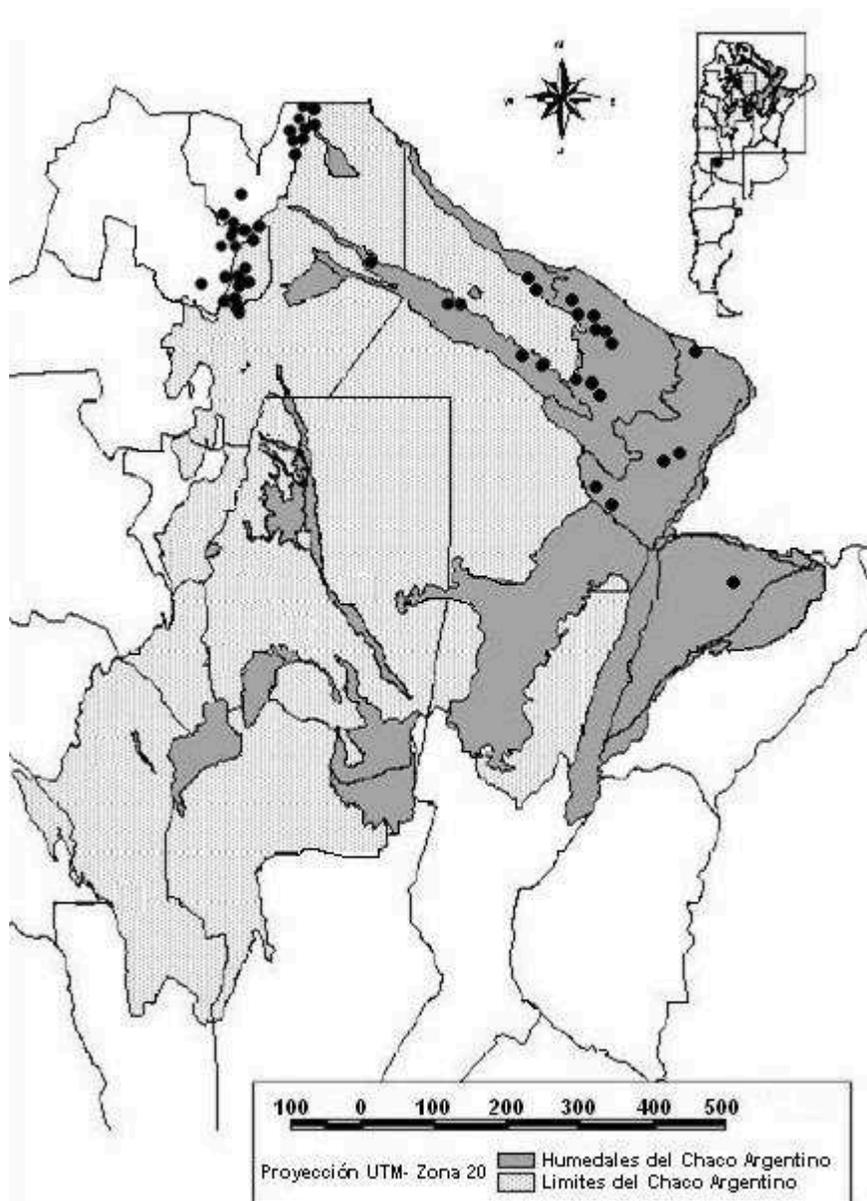


Figura 9: Proyección del nicho ecológico de preferencia para *Amblyomma sculptum* obtenido usando las mejores variables discriminadoras. Puntos negros representan los registros de ocurrencia para *A. sculptum*; áreas grises representan las áreas de proyección del modelo en las áreas ambientalmente adecuadas.

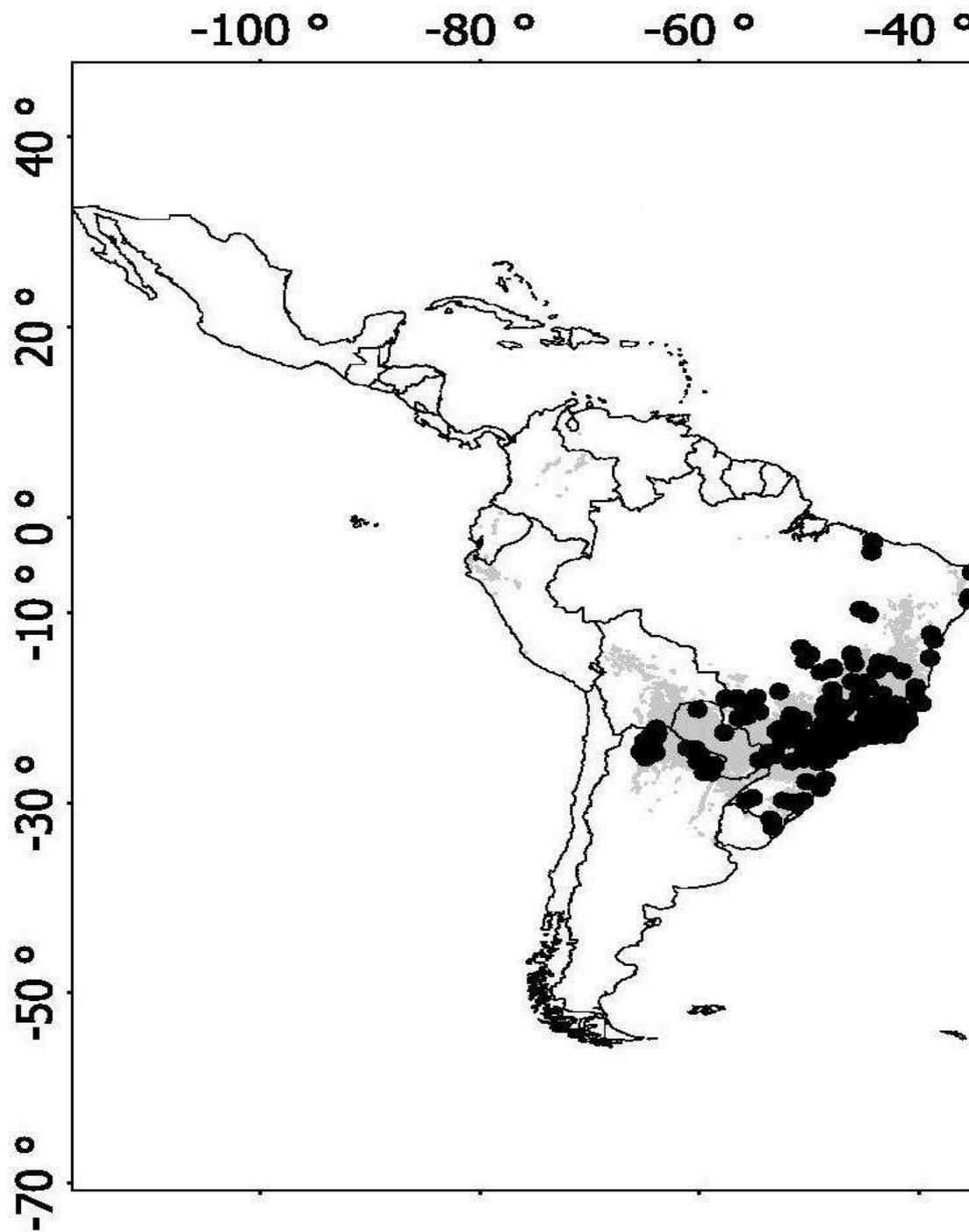


Tabla 2. Localidades de colecta y hospedadores de *Amblyomma sculptum* en Argentina. Las coordenadas geográficas se muestran en grados sexagesimales.

M=macho; H=hembra; N=ninfa; L=larva

INTA= Colección de Garrapatas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Rafaela, Santa Fe, Argentina); FCV-UNL=Colección de Ixodidos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina).

País/Provincia	Localidad	Coordenadas	Hospedadores	Estadío	Referencia
<b>Argentina</b>					
<b>Chaco</b>	La Eduvigis	26°54'S 59°00'O	Humano	M	FCV-UNL/CH 00001
	PN. El Impenetrable	25°10'S 61°3'O	Equino	MH	INTA/2307
	El Sauzalito	24°25'S 61°41'O	Equino	M	INTA/2308
	Toba Muerto	25°04'S 61°15'O	Equino	MH	INTA/2309
	Villa Río Bermejito	25°37'S 60°23'O	Equino	MH	INTA/2310
<b>Corrientes</b>	Paso Florentín	27°45'S 57°46'O	vida libre	H	INTA/2282
	Paso Florentín	27°45'S 57°46'O	Humano	H	INTA/2356
<b>Formosa</b>	San Hilario	26°03'S 58°38'O	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	MH	Nava y col., 2014
	Pozo del Tigre	24°58'S 60°10'O	Equino	MH	INTA/2311
	Puesto Campo del Cielo	24°20'S 60°22'O	Equino	M	INTA/2312
	Apeadero Bruchard	25°08'S 59°58'O	Equino	M	INTA/2313
	Ingeniero Juárez	24°12'S 62°07'O	Cerdo domestico	MH	Ortiz y col., 2011
	RN. Formosa	24°17'S 61°48'O	Equino	MH	INTA/2265
	RN. Formosa	24°17'S 61°48'O	vida libre	MH	En este estudio
	ruta 95 km 1267, Pozo del tigre	24°47'S 60°17'O	Equino	M	En este estudio
	Las Lomitas 30 km NO	24°31'S 60°52'O	Equino	MH	INTA/2314
	Las lomitas 10 km N	24°37'S 60°31'O	vida libre	N	En este estudio
	RP. El Bagual	26°10'S 58°56'O	Humano	M	INTA/2148
	RP. El Bagual	26°10'S 58°56'O	vida libre	M	En este estudio

País/Provincia	Localidad	Coordenadas	Hospedadores	Estadío	Referencia
<b>Formosa</b>	Campo La Elisa	25°08'S 58°06'O	<i>Mazama gouazoubira</i>	H	INTA/2155
	Campo La Elisa	25°08'S 58°06'O	<i>Tapirus terrestris</i>	MH	INTA/2158
	El Simbolar	24°16'S 61°08'O	vida libre	M	En este estudio
	PN. Rio Pilcomayo	25°03'S 58°08'O	vida libre	HMN	INTA/2359
<b>Salta</b>	Coronel Cornejo	22°45'S 63°51'O	Bovino	MH	Nava y col.,2014
	El Oculito	23°06'S 64°32'O	Canino doméstico	H	Nava y col.,2014
	Estancia González	24°54'S 64°39'O	Bovino	MH	Nava y col.,2014
	La Caldera	24°37'S 65°23'O	Humano	MH	Nava y col.,2014
	PN. El Rey	24°41'S 64°36'O	<i>Tapirus terrestris</i>	MH	Nava y col.,2014
	PN. El Rey	24°41'S 64°36'O	Cerdo domestico	MH	Nava y col.,2014
	PN. El Rey	24°41'S 64°36'O	Bovino	MH	Nava y col.,2014
	PN. El Rey	24°41'S 64°36'O	Humano	MHN	Nava y col.,2014
	PN. El Rey	24°41'S 64°36'O	Equino	MH	Nava y col.,2014
	PN. El Rey	24°41'S 64°36'O	Mula	MH	Nava y col.,2014
	PN. El Rey	24°41'S 64°36'O	vida libre	MH	INTA/2057
	PN. El Rey	24°41'S 64°36'O	<i>Mazama gouazoubira</i>	N	INTA/2358
	Santa Rita	24°40'S 64°59'O	Equino	MH	Nava y col.,2014
	Santa Rita	24°40'S 64°59'O	Mula	MH	INTA/297
	Villa Aurelia	24°36'S 64°17'O	Bovino	H	Nava y col.,2014
	40 km O Las Lajitas	25°03'S 64°39'O	Equino	MHN	Nava y col.,2014
El Galpón	25°24'S 64°39'O	Cerdo doméstico	M	INTA/985	

País/Provincia	Localidad	Coordenadas	Hospedadores	Estadio	Referencia
Salta	Río Piedras	25°17'S 64°55'O	Bovino	H	INTA/1039
	Pocoy	22°45'S 64°01'O	Humano	N	INTA/1015
	30 km E Lumbreras	25°07'S 64°43'O	<i>Lagostomus maximus</i>	N	INTA/1368
	Tobantirenda	22°08'S 63°42'O	Equino	MH	INTA/2315
	Campo Duran	22°12'S 63°39'O	Equino	MH	INTA/2317
	Tartagal 10 km N	22°26'S 63°48'O	Equino	MH	INTA/2316
	49 km NE Apolinario Saravia	24°19'S 63°31'O	vida libre	HN	En este estudio
	General Ballivián	22°56'S 63°53'O	vida libre	M	En este estudio
	Laguna del Cielo	22°26'S 63°57'O	vida libre	M	INTA/1330
Jujuy	Ingenio Ledesma	23°50'S 64°47'O	Equino	MH	Nava y col.,2014
	Santa Bárbara	23°36'S 65°01'O	<i>Tapirus terrestris</i>	MH	Nava y col.,2014
	Santa Bárbara	23°36'S 64°44'O	<i>Tayassu pecari</i>	M	INTA/1440
	Santa Bárbara	23°36'S 64°44'O	Humano	M	INTA/1441
	San Pedro 60 km N	24°00'S 64°59'O	Humano	N	INTA/1361
	Palma Sola 26 km O	24°03'S 64°34'O	Equino	MH	INTA/2318
	El Piquete	24°13'S 64°39'O	<i>Cerdocyon thous</i>	L*	INTA/2258
	Villamonte zona baja	24°07'S 64°24'O	Bovino	MHN	INTA/2298
	Puesto La Quinta	23° 52'S 64° 27'O	vida libre	N	INTA/1988

\*Larvas colectadas en *Cerdocyon thous* mudaron a ninfas en laboratorio, se confirmó el diagnóstico morfológico y fueron depositadas como ninfas en la Colección de garrapatas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

### **Distribución parapátrica de *Amblyomma sculptum* y *Amblyomma tonelliae***

La coincidencia de nicho ambiental entre *A. tonelliae* y *A. sculptum* fue de 73,5%. Se abordó la distribución parapátrica de *A. sculptum* y *A. tonelliae* en el norte de Argentina evaluando la estacionalidad ambiental a una resolución de 5,8 km y comparando sitios asociados de alopatría y parapatría (Figura 10). Los sitios donde se colectaron juntamente ambas especies tuvieron una fenología diferente de TS que los sitios en los que las dos especies estaban en alopatría. En los sitios de parapatría, la TS fue menor durante la mayor parte del año (hasta aproximadamente la semana 41), y las temperaturas mínimas promedio estaban por debajo de la TS mínima registrada para los sitios de alopatría. Ambas especies compartieron el hábitat sólo donde los valores NDVI estuvieron muy por encima de los valores registrados para los sitios de alopatría. Por lo tanto, el hábitat parapátrico no es intermedio a las condiciones preferidas para ambas especies en alopatría, sino que existen en el extremo de estas condiciones. Los valores NDVI en áreas de parapatría fueron de 15-20% más altos que los valores medios de NDVI en las áreas alopatría. Es decir que, la parapatría se presenta en regiones con TS inferiores y un alto NDVI relativo en comparación a las regiones alopátricas. Las Figuras 11 y 12 muestran que la superposición de nichos máxima entre *A. tonelliae* y *A. sculptum* se mostraron para los coeficientes T1 y V4.

Figura 10: Reconstrucción comparativa de la fenología de las variables ambientales en las zonas de alopatría y parapatría de *Amblyomma tonelliae* y *Amblyomma sculptum* en términos de (A) índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) y (B) Temperatura de superficie terrestre (TS). Los coeficientes de la regresión armónica de las variables ambientales se utilizaron para reconstruir la serie promediada de valores ambientales en la cual *A. tonelliae* y *A. sculptum* están en alopatría (A) o parapatría (S). La semana 1 comienza el 01 de enero.

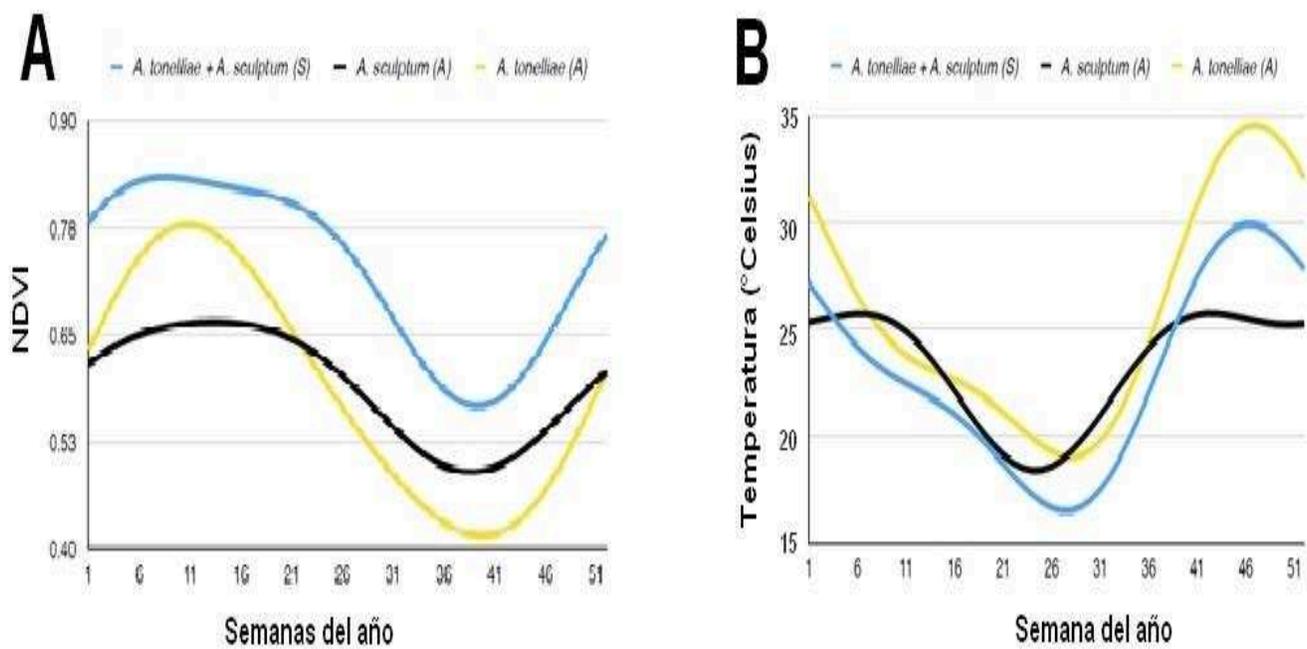


Figura 11: Ocupación de nicho por *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma sculptum* y *Amblyomma tonelliae* basado en temperatura de superficie (TS). Los cuatro coeficientes de la regresión armónica de TS (T1-T4 de la A a la D, respectivamente) se representan como el porcentaje de ocupación en los rangos de cada variable. T1 se expresa en grados Kelvin, pero las cifras restantes son sin unidades.

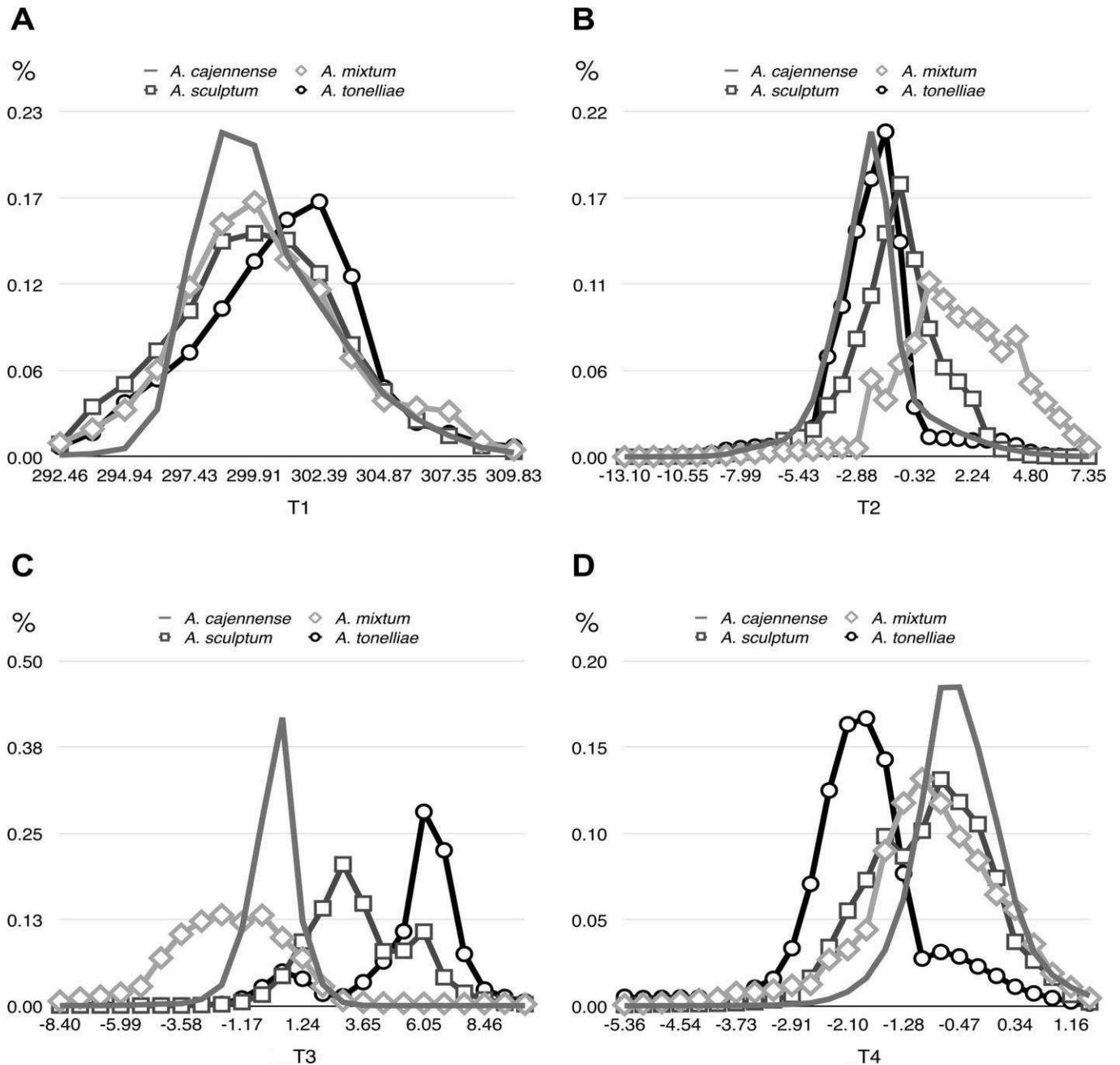
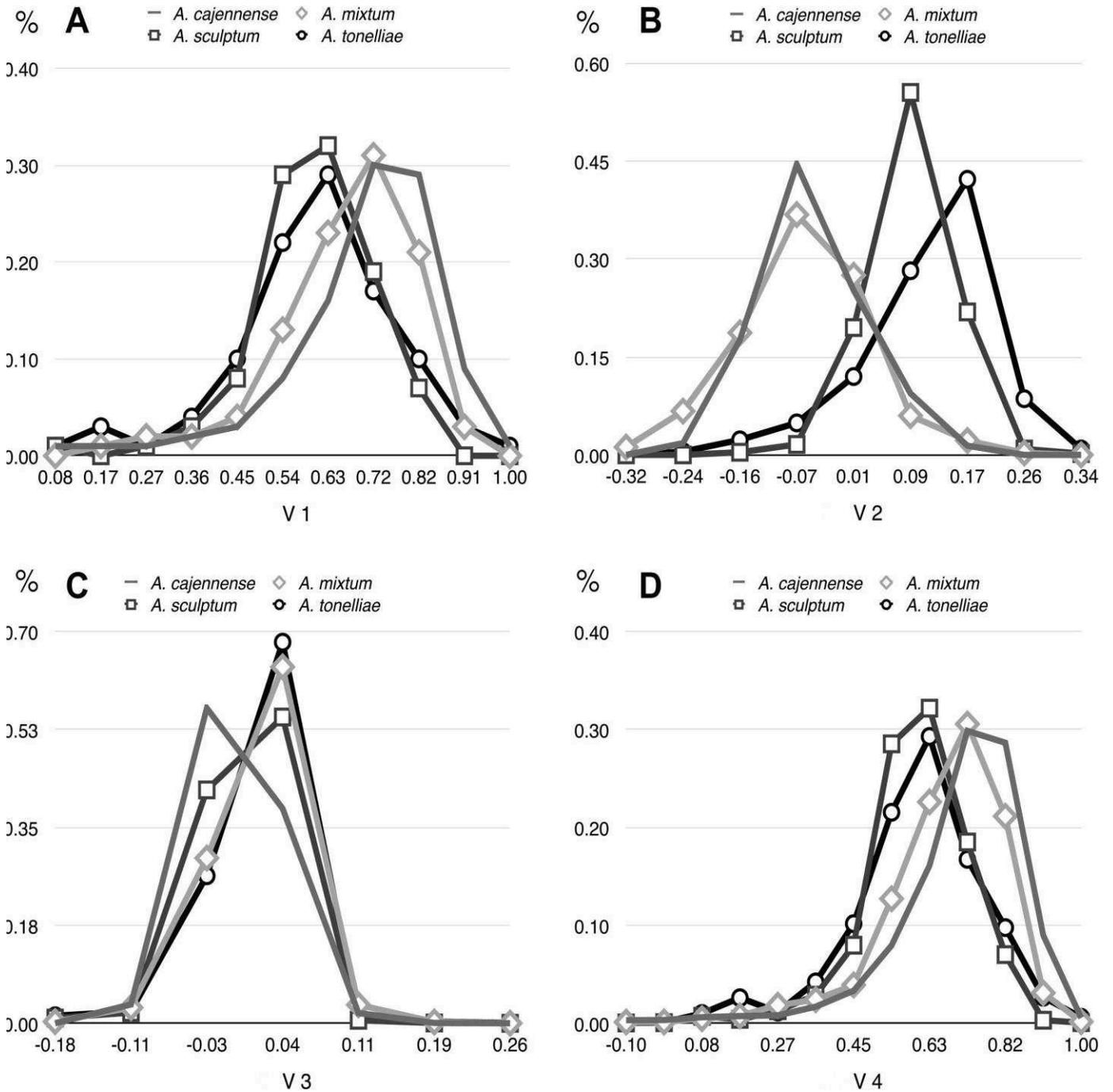


Figura 12: Ocupación de nicho por *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma sculptum* y *Amblyomma tonelliae* basado en el índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI). Los cuatro coeficientes de regresión armónico de NDVI (V1-V4 de la A a la D, respectivamente) se representan como el porcentaje de ocupación en los intervalos de la variable. Los valores son sin unidades.



## Discusión

Del análisis de los registros obtenidos por la tesista, de los registros en la literatura y de aquellos disponibles en las colecciones de garrapatas revisadas, se refuerzan los enunciados previos de Beati y col. (2013) y Nava y col. (2014) acerca de la distribución de *A. tonelliae* en Argentina, la cual se restringe principalmente a la Eco-región del Chaco Seco. Los dos grandes grupos de poblaciones (este y oeste) se vieron delimitados por un área de ausencia en el centro de la subregión del Chaco semiárido, zona conocida coloquialmente como “El Impenetrable”. Además de no encontrarse registros fehacientes de *A. tonelliae* en esta área, y a pesar de encontrarse dentro de la Eco-región del Chaco Seco, tampoco fue incluida en el área de proyección potencial para esta especie obtenida con el modelo de nicho ecológico. Dos hipótesis podrían explicar estos resultados. La primera se relaciona directamente con una conjunción de causas ecológicas que dificultan el establecimiento de poblaciones de *A. tonelliae*. Esto puede estar asociado a que las condiciones del balance hídrico de esta zona son negativas en relación a otras áreas del Chaco Seco (Ledesma, 1992), a las características de la fisonomía vegetal de tipo pastizal pirógeno (Torrella y Adámoli, 2006), y al hecho que la zona del Impenetrable es la menos poblada del Chaco en relación a su superficie, existiendo una débil comunicación terrestre entre localidades limitando el movimiento de hospedadores domésticos (Alfonso, 2007). La segunda hipótesis que se plantea es que la ausencia de *A. tonelliae* en El Impenetrable está vinculada a un sesgo de muestro y no a una ausencia real. Por lo antes expuesto, son necesarios estudios adicionales en dicha zona para comprobar estas hipótesis.

*Amblyomma sculptum* mostró una distribución real para Argentina restringida principalmente a la región del Chaco Húmedo, Selva Pedemontana y selva montana de la Eco- región de La Yunga y bosques ribereños o de albardones que recorren la vera de los grandes ríos que componen los humedales del Chaco Seco (Ginzburg y col., 2005) y una distribución potencial amplia para Sudamérica. El hallazgo de *A. sculptum* en la provincia de Corrientes corresponde al registro más oriental de distribución para esta especie en el país. Si bien la presencia de *A. sculptum* en esta provincia ha sido previamente mencionada por Sarmiento y col. (2015), estos autores no especificaron la ubicación geográfica de los registros. La localidad de este nuevo registro para Corrientes se encuentra en el departamento de General Paz donde los especímenes hallados, en vegetación y parasitando humanos, fueron colectados en “islas” (o terrazas) con bosque característico del Chaco Húmedo cercadas por bañados que constantemente contienen agua y en donde los bovinos y bubalinos suelen pernoctar. Estas “islas” actúan como refugios ecológicos de Chaco Húmedo (Carnevali, 1994).

Dos hipótesis se proponen para explicar este nuevo hallazgo: La primera se relaciona con propagación de la especie en un nuevo territorio asociado a movimiento de animales domésticos. Se constató, en el sistema productivo donde fueron realizadas las colectas, el ingreso de ganado bubalino hace más de diez años procedente de la provincia de Formosa, donde ya había sido informada la presencia de *A. sculptum* con anterioridad (Ivancovich y Luciani, 1992, mencionado como *A. cajennense*; Nava y col., 2014). Es posible que los animales procedentes de Formosa hayan vehiculizado garrapatas de una provincia a la otra y al encontrar en este nuevo sistema un área ecológicamente apta para su desarrollo no solo se mantuvo esa población, sino que además se perpetuó. Un ejemplo de propagación de especie foránea asociado a movimiento de animales domésticos es la presencia de *Rhipicephalus microplus* (garrapata común del bovino) en África occidental. Algunos autores vinculan la presencia de *R. microplus* con introducción de ganado bovino a la región desde Sudáfrica y Brasil. Sumando a esto último, que las cepas de *R. microplus* introducidas eran resistentes a acaricidas, las poblaciones foráneas se adaptaron a la situación ambiental del área colonizada desplazando a especies nativas como *Rhipicephalus decoloratus* (Madder y col., 2011). La segunda hipótesis que se propone para explicar este nuevo hallazgo de *A. sculptum* es de carácter azaroso con sustento en un error por omisión, es decir, tomar como ausencia un área donde en la especie estaba presente pero no fue previamente registrada.

En cuanto a la distribución de *A. sculptum* en la Eco-región del Chaco Seco, resulta pertinente mencionar que, si bien los sitios de presencia se sitúan dentro de esta Eco-región, las colectas se registraron en ambientes aledaños a los grandes cursos de agua de la región, conocidos como bosques de albardones. Estos bosques que bordean ríos como el Teuco y Bermejo presentan vegetación no característica del Chaco Seco. Según Biani y col. (2006), el río Bermejo sería la principal ruta de reclutamiento de las especies selváticas, ya que dicho río transporta semillas, frutos y plantas jóvenes desde los bosques montanos de las Sierras Subandinas, ubicados en la parte superior de la Cuenca del Bermejo. Es así que, la vegetación de los bosques de albardones del Chaco Seco presenta más similitud con la vegetación de la selva Pedemontana que con el resto del bosque típicamente Chaqueño. Tanto la Selva Pedemontana, los bosques de albardones del Chaco Seco y el Chaco Húmedo comparten características micro climáticas que permiten el establecimiento de poblaciones de *A. sculptum*. Martins y col. (2016) afirmaron que la distribución de *A. sculptum* en Brasil abarca los biomas del Cerrado, Pantanal y gran parte de Selva Mata Atlántica, coincidiendo esa distribución con el clima tropical. Dada la ausencia de *A. sculptum* en el sur de Brasil, donde el clima es subtropical, los autores infieren que las temperaturas más bajas durante el otoño e invierno en esta región podría ser el factor

limitante para el establecimiento de *A. sculptum*. A raíz de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, puede inferirse que, a diferencia de lo planteado por Martins y col. (2016), el principal factor que modula el establecimiento de *A. sculptum* en el sur de Brasil son en realidad las condiciones de microclima regional. En el presente trabajo de tesis no sólo se registran puntos de presencia en el sur de Brasil, sino que además la distribución potencial para la especie muestra un área de ausencia real y potencial que abarca el área fronteriza del estado de Rio Grande do Sul y suroeste del estado de Santa Catarina, a la vez que se muestra la provincia de Misiones de Argentina dentro del área potencial de distribución sin presencia real. Una hipótesis que puede ayudar a comprender la causa de ausencia real y potencial en el sur de Brasil puede construirse en base a factores históricos socio-económicos acaecidos en la frontera entre ambos países en la cuenca del alto Paraná- Uruguay. La llegada de inmigrantes a finales del siglo XIX en la zona fue acompañada no solo de urbanización sino también de quema y desmantelamiento de la selva para la implementación de prácticas agrícolas, sufriendo una intensa sobre explotación de la tierra acrecentándose los procesos erosivos del suelo por la implantación de monocultivos y disminuyendo notoriamente el porcentaje de remanente selvático (Reboratti, 1979). La situación de Misiones fue diferente, los colonos locales se adaptaron a la vegetación selvática explotando tierras con cultivos poco invasivos en coexistencia con la Selva típica Paranaense. Esto último sumado a la creación de corredores biológicos en la provincia con un 92,82% de cobertura selvática hacen que, a diferencia del área brasilera donde la remanencia de Selva Mata atlántica es ínfima, Misiones si constituya un área de distribución potencial de *A. sculptum*. El área de ausencia en el noroeste de Rio Grande do Sul y suroeste de Santa Catarina actúa como parche que fragmenta la selva impidiendo la distribución de hospedadores silvestres de *A. sculptum* (Reboratti, 1979; Laclau, 1994). Es interesante destacar que, aunque en el presente trabajo se muestra la provincia de Misiones como área de distribución potencial de *A. sculptum*, relevamientos de distribución y hospedadores de garrapatas duras en el norte de dicha provincia no han constatado la presencia ésta especie (Lamattina y col., 2014). Esto último se relaciona con los principios básicos de la biogeografía histórica que sugiere que las especies no habitarán todas las áreas que satisfacen sus requisitos de nicho, sino que las barreras a la dispersión a menudo restringen a las especies a un subconjunto de estas áreas (Peterson, 2003; Peterson y col., 1999).

Martins y col. (2016) hipotetizan que la principal causa de expansión en la distribución de *A. sculptum* en Brasil se encuentra relacionada a la degradación de las Selvas Mata atlántica y Amazónica. Los autores sustentan lo antes expuesto con el reporte de especímenes adultos de *A. sculptum* parasitando un equino en el estado de Rondônia, perteneciente al bioma Amazónico y vinculándolo de manera

directa a que el estado de Rondônia ha sido uno de los estados de Brasil con mayor deforestación y degradación forestal en las últimas décadas. Inferir expansión poblacional a partir de un solo hallazgo en hospedador doméstico puede ser algo apresurado debido a que *A. sculptum* es una garrapata de tres hospedadores, que no fueron colectados especímenes de vegetación y que la principal limitante en el desarrollo de su ciclo biológico se encuentra justamente en la etapa no parasítica, es decir que, el hospedador puede movilizar el parásito, pero sin necesidad que esos especímenes puedan perpetuarse en el hábitat introducido. A lo último expuesto se suma que los resultados obtenidos en la presente tesis de distribución potencial para *A. sculptum* en Sudamérica no muestran al estado de Rondônia como área con características ambientales compatibles a la presencia de esta especie, pero sí para otra especie del mismo complejo, *A. cajennense* s.s. que, además, está establecida en este estado brasileiro (Nava y col., 2014; Martins y col., 2016)

El principio de exclusión competitiva establece que las especies pueden coexistir de manera estable sólo si difieren en el uso de recursos (Hardin, 1960; Arthur, 1982; Pianka, 2000). Por lo tanto, las especies que interactúan experimentan una fuerte presión de selección para evolucionar hacia formas con un uso diferencial de recursos (Schluter, 1994; Pfennig y Pfennig, 2005). En el caso de la distribución parapátrica de las dos especies, se deduce que la temperatura no es estadísticamente significativa para los sitios en los que *A. tonelliae* y *A. sculptum* se encuentran en parapatría, con excepción de un período aproximado de 12 semanas en primavera y verano, cuando la temperatura era intermedia en parapatría en relación con los sitios de alopatría. Esta observación sugiere que esas 12 semanas son críticas en el ciclo de vida de *A. sculptum* y *A. tonelliae* y que por lo tanto sólo coexistirán en sitios con las condiciones apropiadas. Sin embargo, en términos de NDVI, los sitios en los que se pronosticó coexistencia de *A. sculptum* y *A. tonelliae* no eran intermedios en relación con sitios en los que se predijo que las especies estarían en alopatría. El NDVI para áreas de parapatría fue de 15-20% más alto que en las áreas de alopatría en todo el año. Se hipotetiza que las relaciones complejas (no lineales) entre las variables abióticas pueden ser los factores primarios que modulan la co-ocurrencia entre las dos especies. No se debe ignorar que la resolución de este análisis (5,8 km), es suficiente para revelar patrones generales en áreas de alopatría y parapatría pero demasiado grosera para definir rigurosamente las distribuciones espaciales de estas dos especies. Estudios adicionales son necesarios para aclarar esta cuestión centrándose en imágenes satelitales de alta resolución y datos de dispositivos que registren parámetros cruciales para la supervivencia y reproducción de garrapatas, relacionados a temperatura y humedad a nivel de microambientes.

Tanto *A. tonelliae* como *A. sculptum* demostraron una cierta coincidencia en el uso de hospedadores silvestres y domésticos. Además, ambas especies se encontraron parasitando a humanos en todos sus estadíos. Los hospedadores silvestres no compartidos por las dos especies fueron: *Catagonus wagneri* y *Myrmecophaga tridactyla* para *A. tonelliae* e *Hydrochoerus hydrochaeris* y *Tapirus terrestris* para *A. sculptum*. Si bien en este estudio no se ha reportado *A. sculptum* parasitando *M. tridactyla*, Martins y col. (2016) han registrado el parasitismo en este hospedador en áreas de parapatría entre *A. sculptum* y *A. cajennense* s.s. El resto de los hospedadores no compartidos se relacionan estrechamente con el hábitat donde estos se distribuyen. Por ejemplo, es esperable que *C. wagneri* solo sea parasitado por *A. tonelliae* ya que este hospedador tiene una distribución restringida a las zonas más secas de la subregión del Chaco semiárido en concordancia con la distribución de *A. tonelliae* (Torres y Jayat, 2010). Una situación similar ocurre con *H. hydrochaeris* y *T. terrestris* ambas especies relacionadas con hábitat de extrema humedad en la interface acuático-terrestre, como ser Chaco Húmedo, riberas de los grandes ríos del Chaco y Yungas, compatible con la distribución de *A. sculptum* (Chebez, 2008; Moreira y col., 2013)

A partir de los registros de hospedadores reportados en este trabajo de tesis y en trabajos que lo anteceden (Nava y col., 2014; Martins y col., 2016) se refuerza la hipótesis planteada por Nava y Guglielmone (2013), de que tanto *A. sculptum* como *A. tonelliae* no presentan especificidad por hospedador. Además, las dos especies demostraron una eficiente capacidad para adaptarse a hospedadores domésticos introducidos, si se tiene en cuenta que el ganado bovino ingresó a las Américas alrededor de 400 años atrás, y que estas dos especies de garrapatas ya estaban diferenciadas en Sudamérica desde hace aproximadamente 5 millones de años (Beati y col., 2013).

## Capítulo 2

**Distribución estacional de *Amblyomma sculptum* y  
*Amblyomma tonelliae* en Argentina.**

## Introducción

Los ciclos biológicos de garrapatas están compuestos por dos fases: una fase parasitaria, que es el período de tiempo que la garrapata transcurre parasitando a un hospedador vertebrado, y una fase de vida libre o no parasitaria que constituye aproximadamente el 90% en la vida de una garrapata (Sonenshine y Roe, 2014). Las garrapatas, sobre todo aquellas que habitan climas templados o regiones subpolares, tienen un período estacional marcado que varía según el estadio evolutivo y se ve directamente influenciado por las condiciones micro-ambientales (Sonenshine y Roe, 2014). Durante la fase no parasitaria, transcurren la muda de un estadio al próximo, la oviposición de las hembras, la incubación de los huevos, y la búsqueda de hospedador.

Los ritmos estacionales o actividad estacional de las garrapatas se caracterizan por la alternación de periodos de picos de actividad (búsqueda de hospedador, alimentación y comportamiento post-alimentación) y periodos de inactividad (quiescencia y diapausa) en sincronía con las temporadas del año. La diapausa es un estado dinámico mediado neurohormonalmente para reducir la actividad metabólica y así el gasto energético (Gray, 1991). Belozarov (1982) describe dos tipos de diapausa, comportamental y morfogenética. La primera, caracterizada por supresión de la actividad de búsqueda de hospedador por garrapatas no alimentadas, y la segunda por retraso en la embriogénesis, en la metamorfosis de larva a ninfa o en la ovogénesis por parte de hembras ingurgitadas. El mecanismo de diapausa no solo sincroniza los ciclos de vida con las estaciones favorables del año, sino que también es una forma de resistencia a condiciones ambientales desfavorables (Belozarov, 1982).

La temperatura y la humedad son dos factores que condicionan las tasas de desarrollo interstadial y el comportamiento de las garrapatas en su fase no parasitaria, y a su vez modificaciones en la fisonomía vegetal provocan cambios en la temperatura y humedad en el microhábitat condicionando los procesos fisiológicos de las garrapatas (Adler y col., 1992; Schulze y Jordan, 1996). Además, el efecto de predadores naturales de garrapatas, incluyendo otros artrópodos, insectos y aves (Wilson y col., 1993), condicionan la abundancia.

En el caso puntual de las especies que componen el complejo *A. cajennense*, estudios realizados en Brasil sugieren que *A. cajennense* s.l (posiblemente *A. sculptum*) posee un ciclo de vida con una generación anual, donde las larvas predominan en otoño y comienzos del invierno, las ninfas en invierno y comienzo de la primavera, y los adultos en primavera y verano (Oliveira y col., 2000,2003; Labruna y col., 2002). Este ciclo aparenta estar regulado por una diapausa comportamental de las larvas

(Labruna et al. 2003; Cabrera y Labruna 2009). De esta manera, las larvas originadas por las hembras a fines de la primavera y durante el verano recién se activan en el otoño, previniendo de esa manera la exposición a las altas temperaturas del verano. Esto cobra sentido si se tiene en cuenta que las larvas son sensibles a la desecación. En Brasil, esta distribución estacional es relevante, porque el pico de transmisión, en áreas endémicas de fiebre manchada, por esta especie de garrapata se produce cuando predominan las ninfas (Pinter y col., 2011). Estudios realizados por Guglielmo y col., (1990) reportan que poblaciones de *A. cajennense* s.l del noroeste de Argentina (posiblemente *A. tonelliae*) presentan actividad estacional similar a *A. cajennense* s.l de Brasil.

El conocimiento de los patrones de actividad estacional de una especie de garrapata es esencial para determinar los períodos en los que las personas o los animales domésticos están en riesgo de adquirir la infección por patógenos transmitidos por estas (Sonenshine y Mather, 1994). Es decir que, conocer las dinámicas de distribución estacional de garrapatas de importancia por su aptitud como vectores de organismos patógenos, es indispensable para comprender los ciclos eco-epidemiológicos de enfermedades transmitidas por garrapatas y para desarrollar métodos de control de las mismas. De esta manera, el objetivo de este capítulo es describir y analizar la distribución estacional de *A. tonelliae* y *A. sculptum* en sus fases de vida libre y parasitaria.

## Materiales y métodos

### Aéreas de estudio

El estudio de distribución estacional de preimagos y adultos de *A. tonelliae* y *A. sculptum* se realizó en dos grandes áreas: la subregión de Selva montana dentro de la Eco-región de la Yunga sensu Burkart y col. (1999), para *A. sculptum* y la subregión Chaco semiárido de la Eco-región del Chaco Seco sensu Torrella y Adámoli (2006) para *A. tonelliae*.

En el caso de *A. sculptum* el estudio se llevó a cabo en la Reserva privada "Eco- Portal de Piedra", (REPP) en la localidad de El Fuerte de la provincia de Jujuy, Argentina (24 ° 05'39.6 "S 64 ° 23'54.0" O). Esta reserva cuenta con diferentes estratos altitudinales, que oscilan entre los 400 y 3.000 metros sobre el nivel del mar (msnm) y pertenece a la Eco-región de La Yunga y zonas de transición entre esta última y la eco-región del Chaco Seco. Las condiciones de temperatura y humedad varían a causa de la altitud, latitud, relieve y pendiente de las laderas. Esta área presenta una condición climática marcadamente estacional, con precipitaciones concentradas en verano (Burkart y col., 1999). Morales y col. (1995) reconocen tres subregiones en la Yunga: a) Selva Pedemontana representada en la parte inferior de 400 hasta 600 msnm, las especies dominantes son *Tipuana tipu*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Tabebuia avellanadae*, *Patagonula americana*. Según Cabrera (1976) corresponde al distrito de Selvas de transición y comparte algunas especies de vegetación con el distrito chaqueño. Según Prado y Gibbs (1993) esta región muestra afinidades florísticas con otros bosques secos estacionales del trópico de llanuras; b) Selva Montana es el piso altitudinal con mayores precipitaciones de las Yungas, entre 1.500 y 3.000 mm anuales y el más diverso, desarrollándose entre los 600 y 1.500 msnm. Las especies dominantes forestales son *Blepharocalyx gigantea*, *Pogonopus tubulosus*, *Juglans australis*, *Cinnamomom porphyrium*, varias especies de *Cedrela*, entre otras; c) Bosques de Monte templado o Montano se encuentra entre 1500 hasta 1700 msnm pero se entremezcla con los pastizales y arbustos a casi 3000 msnm. Las especies dominantes son *Almus acuminados*, *Podocarpus parlatorei*, *Cedrella lilloi* y *Juglans australis*.

En el caso de *A. tonelliae* el estudio se llevó a cabo en un establecimiento situado en la localidad de El Tunal (ET) ubicado en el departamento Metán de la provincia de Salta (25°15'S 64°25'O). El mismo pertenece a la Eco-región del Chaco Seco. Torrella y Adámoli (2006) reconocen tres subregiones del Chaco Seco: a) Chaco semiárido es aquí donde el bosque chaqueño encuentra su mayor expresión por la continuidad y la extensión de la masa boscosa. Caracterizado por bosque xerófilo y semicaducifolio,

las especies de vegetación características son, *Schinopsis lorentzii*, *Aspidosperma quebracho-blanco*, *Schinopsis balansae*, *Bulnesia sarmientoi*; b) Chaco serrano forma la mayor parte del límite oeste de la región. Está formado por elementos de Sierras pampeanas y las partes más bajas de Sierras subandinas, estas sierras constituyen una barrera orográfica para los vientos húmedos del este. La vegetación está dominada por especies como *Schinopsis hanckeana* y *Lithrea molleoides* al sur y por gran cantidad de cactáceas y leguminosas al norte; c) Chaco Árido ocupa el sudoeste de la región. Está rodeado por sierras actuando como barreras y restringiendo las precipitaciones en esta subregión, lo que hace que la evapotranspiración sea mayor al aporte de agua, creando salinas. Esa salinidad hace que se encuentren arbustos de los géneros *Suaeda sp.* y *Allenrolfea sp.*

El sitio ET para *A. tonelliae* contó con presencia de bovinos durante los dos años de muestreo. El sitio REPP para *A. sculptum* solo tuvo presencia de ganado bovino durante el primer año de estudio, el segundo año se clausuró el ingreso de bovinos al sitio.

### **Método de muestreo**

Para determinar la variación estacional de todos los estadios de *A. sculptum* y *A. tonelliae* en su fase de vida libre se realizaron durante dos años 24 muestreos con frecuencia mensual. Ambos sitios se recorrieron arrastrando por la vegetación, un paño de tela de 1m x1m (técnica denominada *dragging*) por un tiempo de 30 minutos por sitio y ejecutados siempre a la misma hora por tres operarios, con el fin de colectar garrapatas que se encontraran sobre la vegetación. En el caso de *A. tonelliae*, además, se determinó la distribución estacional de las formas parasitarias colectando garrapatas de bovinos en el mismo sitio donde se realizó la colecta de garrapatas de vegetación y en simultáneo con este último. Para el caso de *A. sculptum*, por cuestiones logísticas, solo se registró la infestación con garrapatas en equinos de REPP mensualmente en simultáneo con el primer año del muestreo en vegetación para este sitio.

Las garrapatas en su fase de vida libre colectadas de la vegetación fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología e Inmunología de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, EEA Rafaela) sede en la ciudad de Rafaela, donde fueron identificadas utilizando una lupa estereoscópica binocular (Nikon SMZ800) de acuerdo con Nava y col. (2014) y Martins y col. (2014), y por comparación con material de referencia depositado en la colección de garrapatas de la EEA- Rafaela. Las garrapatas ingurgitadas colectadas sobre hospedadores fueron colocadas en incubadoras a 25°C y 83-85% de humedad relativa hasta su muda al próximo estadio (larvas y ninfas) o para oviposición (hembras). Cabe mencionar que parte de las garrapatas colectadas de vegetación para este estudio se utilizaron, además, para el resto de los estudios

de la presente tesis. En el caso de *A. tonelliae* se determinó correlación entre las garrapatas mensualmente colectadas de la vegetación y sobre bovinos aplicando la correlación de rango de Spearman. En el caso de *A. sculptum* no se aplicó correlación por contar con registros de fase parasitaria en hospedadores domésticos solo para el primer año de estudio.

### **Datos climáticos**

En cada área de muestreo se registró diariamente la temperatura y humedad relativa. Para obtener dichos registros se colocó a cinco centímetros del suelo, en cada sitio (ET y REPP) un dispositivo con sensores externos de temperatura y humedad (Data Logger, Hobo ® Modelo U23-002 Pro v2). Estos dispositivos tomaron registros de las dos variables cada una hora durante 730 días. Adicionalmente, a partir de los registros de temperatura (T) y humedad relativa (HR) se calculó el déficit de saturación (DS) para cada hora aplicando la formula  $DS = (1 - HR/100) \times 4.9463 \times e^{(0.0621T)}$  descrita por Randolph y Storey, (1999). A partir de los registros por hora de T, HR y DS se calcularon las medias semanales.

## Resultados

### *Amblyomma tonelliae* y *Amblyomma sculptum*

Las larvas de *A. tonelliae* se colectaron sobre los bovinos de abril a junio, con el pico de abundancia observado en mayo y junio (otoño), las ninfas se colectaron de junio a diciembre, con pico de infestación de septiembre a noviembre (primavera), y los adultos se colectaron sobre los bovinos a lo largo de todo el año, con el pico de abundancia de diciembre a febrero (finales de primavera y principios de verano) (Figura 13). Larvas de vida libre se detectaron en la vegetación de abril a julio y alcanzaron su pico máximo de abundancia entre finales de junio y principios de julio (fin otoño y principios de invierno), las ninfas de julio a diciembre con el pico entre agosto y septiembre (fin invierno), y los adultos de octubre a mayo con el pico de abundancia en enero (verano) (Figura 14). Inmaduros y adultos de *A. tonelliae* colectados en las dos fases, parasitaria y no parasitaria, mostraron un patrón similar de estacionalidad (véase Figuras 13 y 14). El rango de correlación de Spearman entre la abundancia mensual de las garrapatas colectadas sobre el ganado y en la vegetación fue significativamente positivo para todos los estadios (larvas:  $r_s = 0,74$  y  $P < 0,0001$ ; ninfas:  $r_s = 0,67$  y  $P = 0,002$ ; hembras:  $r_s = 0,65$  y  $P < 0,002$ ). Además, se encontraron co-parasitando a los bovinos examinados en ET durante el periodo de estudio, ejemplares de *R. microplus* (inmaduros y adultos), *A. neumanni* (inmaduros y adultos) y *A. parvum* (adultos).

Las larvas de *A. sculptum* se colectaron en su fase de vida libre sobre la vegetación desde marzo a septiembre durante el primer año de muestreo y de julio a agosto en el segundo año de muestreo, con el pico de abundancia detectado a finales de julio (invierno). Las ninfas se colectaron de la vegetación de junio a febrero, con el pico máximo de abundancia a finales de octubre (primavera). Finalmente, los adultos se colectaron de la vegetación desde agosto a abril durante los dos años de muestreo, con pico máximo en diciembre para el primer año de muestreo y fines de febrero en el segundo año de muestreo (verano) (Figura 16). Las larvas de *A. sculptum* se colectaron sobre los equinos desde marzo a septiembre con el pico de infestación en mayo (otoño). Las ninfas se registraron de junio a diciembre con el pico de infestación en septiembre (primavera) y los adultos se encontraron infestando equinos todo el año con un pico de infestación en octubre (primavera) (Figura 18). Además, se encontraron co-parasitando a los equinos examinados en REPP durante el primer año de estudio ejemplares de *A. neumanni* (inmaduros y adultos)

En las Figuras 15 y 17 se muestra como fueron las fluctuaciones de T y DS en las dos áreas de estudio. Para el caso de REPP se observaron dos baches sin registros de variables ambientales, el primero desde 22/01/2014 hasta 27/02/2014 y el segundo desde 27/07/2014 hasta 03/09/2014, debido a fallas técnicas de los sensores.

Figura 13: Distribución estacional de larvas, ninfas y adultos de *Amblyomma tonelliae* colectados sobre bovinos en El Tunal, Salta, desde enero de 2010 a diciembre de 2011.

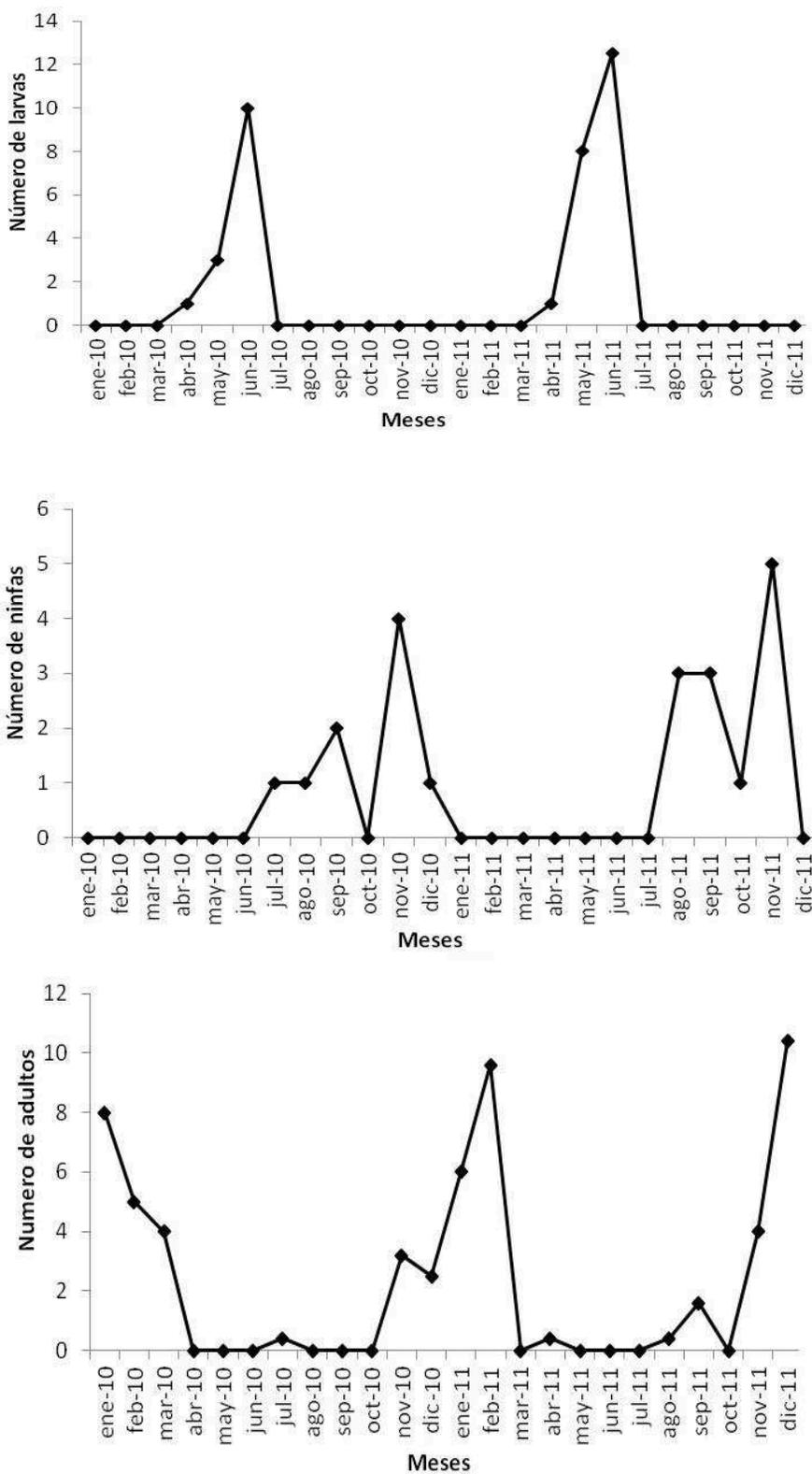


Figura 14: Distribución estacional de larvas, ninfas y adultos de *Amblyomma tonelliae* colectados de la vegetación en El Tunal, Salta desde enero de 2010 a diciembre de 2011.

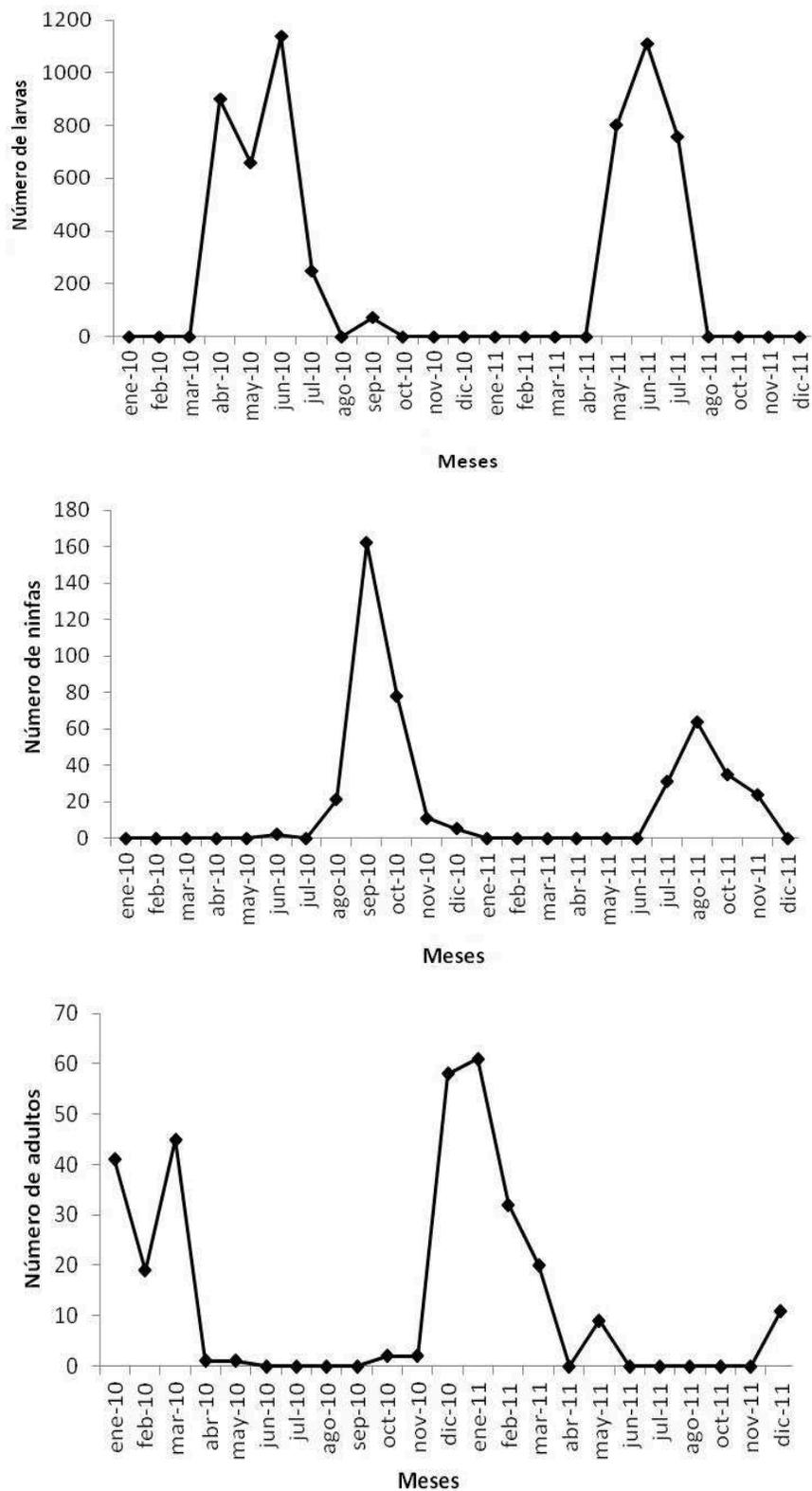


Figura 15: Medias semanales de temperatura en grados Celsius (Temp °C) y déficit de saturación (DS) en El Tunal, Salta (ET) durante el periodo del 1° de octubre del 2010 hasta el 1° de agosto del 2012.

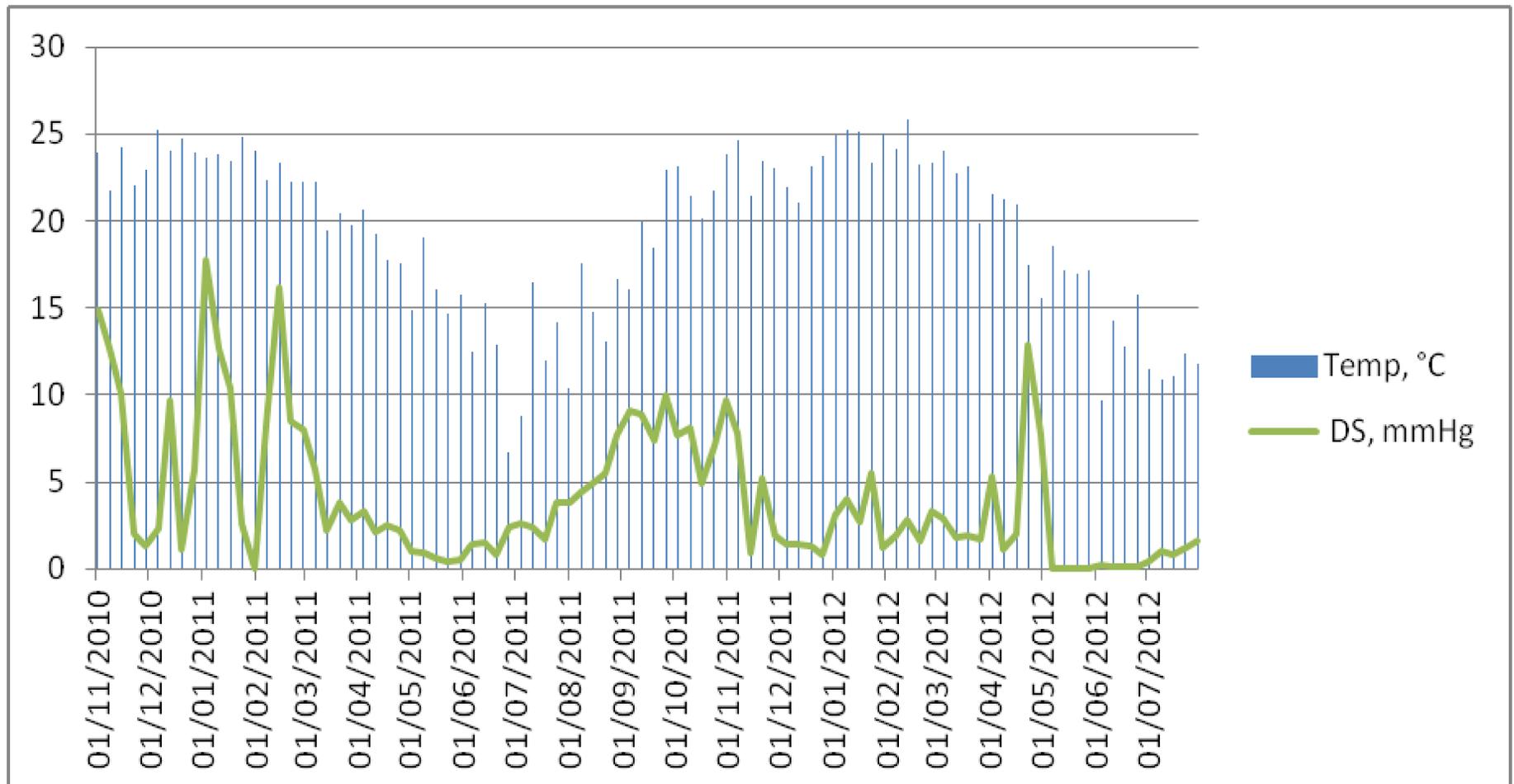


Figura 16: Distribución estacional de larvas, ninfas y adultos de *Amblyomma sculptum* colectados de la vegetación en la Reserva Eco-Portal de Piedra, Jujuy, desde octubre 2013 a octubre de 2015.

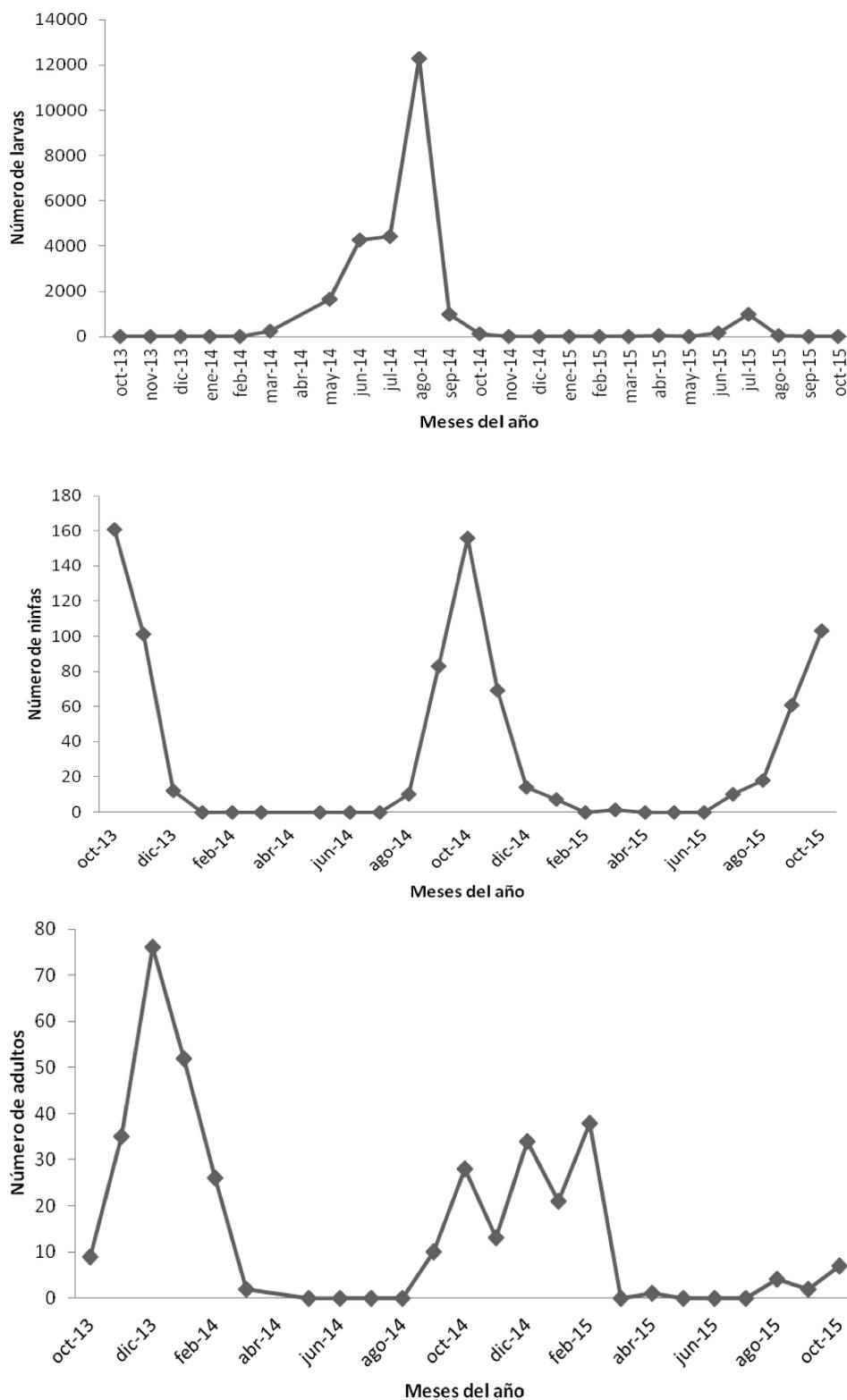


Figura 17: Medias semanales de temperatura en grados Celsius (Temp °C) y déficit de saturación (DS mmHg) en la Reserva Eco-portal de Piedra, Jujuy (REPP) desde octubre de 2013 hasta octubre de 2015. Con flechas negras se indican los baches sin registros de variables ambientales.

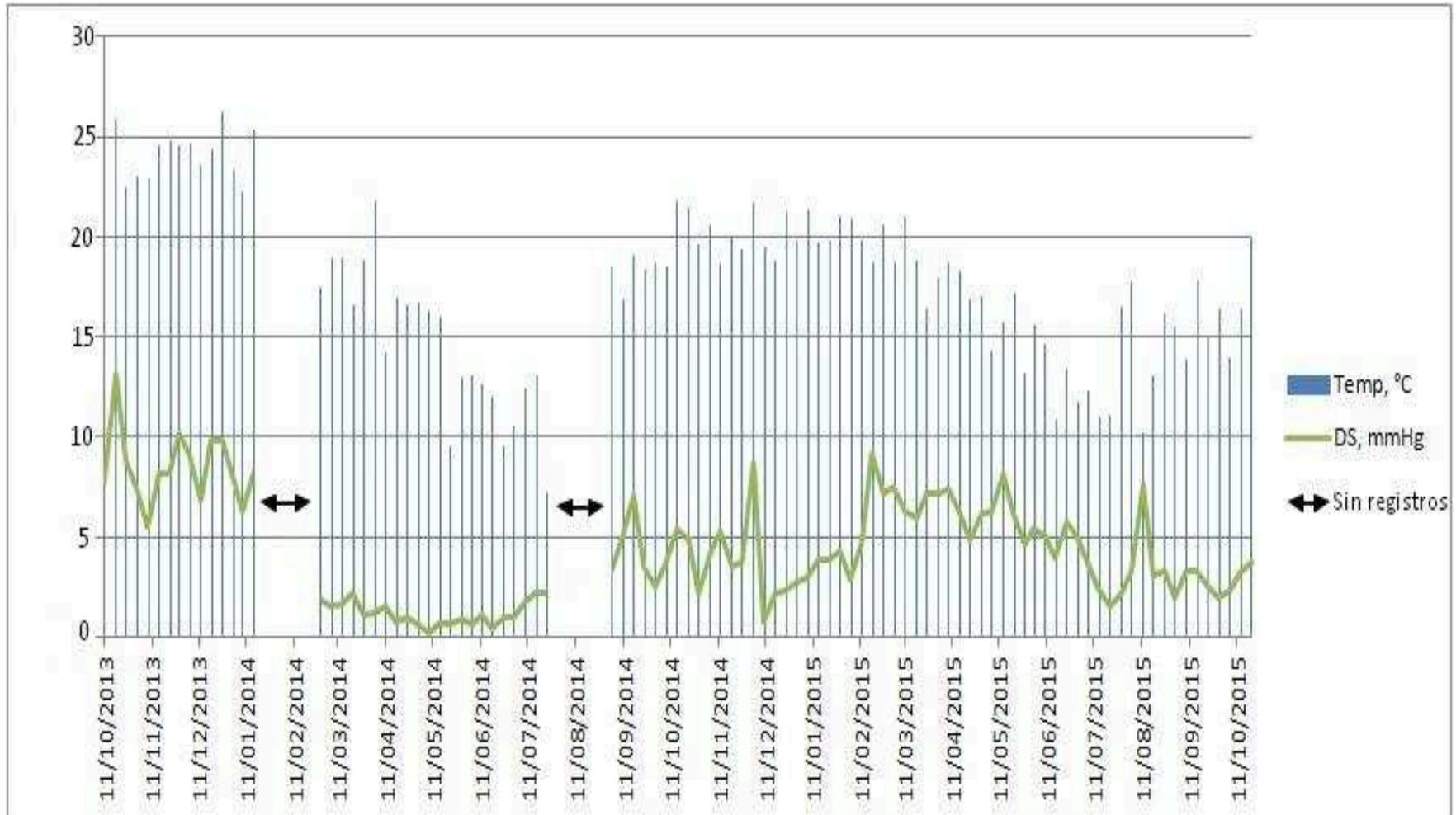
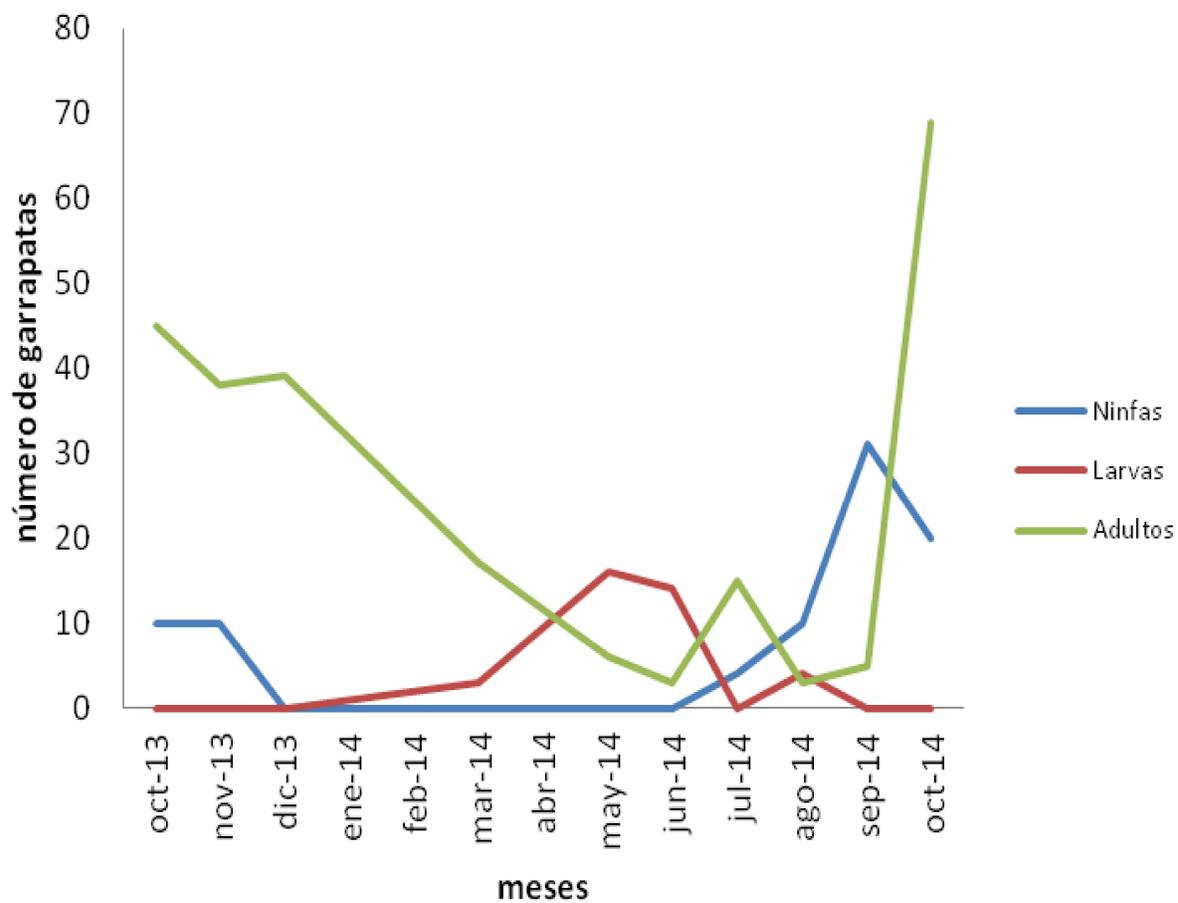


Figura 18: Número de larvas, ninfas y adultos de *Amblyomma sculptum* colectados sobre equinos en la Reserva Eco-Portal de Piedra, Jujuy, desde octubre 2013 a octubre de 2014.



## Discusión

Los resultados de este estudio sugieren que tanto *A. tonelliae* como *A. sculptum* tienen un ciclo de vida con una generación por año, en coincidencia con lo descrito para las especies del complejo *A. cajennense* presentes en Brasil (Oliveira y col., 2000, 2003; Labruna y col., 2002). Las larvas de las dos especies están activas desde el otoño hasta mediados del invierno, con el pico de abundancia a finales de otoño y mediados de invierno, para *A. tonelliae* y *A. sculptum* respectivamente. Las ninfas se encuentran activas desde principios del invierno hasta finales de la primavera con el pico de abundancia en el comienzo de la primavera en ambas especies. Las hembras de las dos especies se encuentran en la vegetación durante todo el año, pero el pico de abundancia se da a principios y mediados del verano. Es así que las garrapatas adultas predominan durante la estación lluviosa y las etapas inmaduras lo hacen en las temporadas más secas. En consecuencia, la oviposición de las hembras ocurre en temporadas de lluvias, permitiendo probablemente, que durante los períodos de incubación los huevos no sean expuestos a un estrés por desecación. Dado que tanto en ET como en REPP, en general, los valores del DS durante mediados de verano y otoño fueron bajos, con alto porcentaje de HR y T medias por encima de los 17°C. Este hallazgo tiene significación biológica ya que se ha demostrado que porcentajes bajos de HR, T medias bajas y DS altos resultan perjudiciales durante el período de incubación de huevos de garrapatas, (Randolph, 1999; Sutherst y Bourne, 2006, Nava y col., 2013; Canevari y col., 2017). Este comportamiento tanto de *A. tonelliae* como de *A. sculptum* puede impedir la oviposición bajo condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo de los huevos.

En estudios previos realizados en Argentina sobre ecología de garrapatas del complejo *A. cajennense* en el noroeste del país, posiblemente *A. tonelliae*, Guglielmone y col. (1990) encontraron que, las larvas se concentraban entre junio y agosto, ninfas de agosto a noviembre, y adultos con el pico de abundancia entre noviembre y enero. Con algunas variaciones, los resultados sobre la estacionalidad de *A. cajennense* s.l. (probablemente *A. sculptum*) obtenidos en el sur de Brasil fueron similares a lo descrito en Argentina. Labruna y col. (2002) encontraron larvas concentradas entre abril y junio, ninfas entre junio y octubre y adultos entre octubre y marzo. Oliveira y col. (2000, 2003) encontraron alta abundancia de larvas entre abril y julio, ninfas concentradas entre junio y octubre, y los adultos entre septiembre y marzo. El mismo patrón de distribución estacional fue descrito por Szabó y col. (2007) también en Brasil. Por otro lado, en la región Neártica (Texas, EE. UU) el patrón general de estacionalidad registrado para otra especie del complejo *A. cajennense*, *A. mixtum* (mencionado como

*A. cajennense*) (Beck y col., 2011), fue similar a los patrones descritos en Argentina y Brasil. La única diferencia observada se vincula a una prolongada actividad de larvas y ninfas a lo largo del año en el caso de *A. mixtum* (Beck y col., 2011). Todos los resultados de estos estudios sobre especies del complejo *A. cajennense* realizados previamente en otras regiones coinciden en rasgos generales con el patrón de estacionalidad descrito en el presente trabajo tanto para *A. tonelliae* como para *A. sculptum*. Lo antes expuesto refuerza la hipótesis de que las diferentes especies del complejo *A. cajennense* se comportan bajo patrones de estacionalidad similares.

Como era esperable, los resultados de este trabajo también muestran una marcada correlación entre la abundancia de *A. tonelliae* en su fase de vida libre y en su fase parasitaria. Por otro lado, los resultados obtenidos mensualmente durante el primer año de colecta de garrapatas en equinos de REPP, concuerdan con resultados previos de prevalencia estacional de *A. sculptum* infestando cerdos y equinos domésticos en los biomas del Cerrado y Mata Atlántica de Brasil (Osava y col., 2016; Labruna y col., 2002).

Si bien se desconoce cuáles son los factores que modulan la actividad estacional de *A. tonelliae* y *A. sculptum*, un trabajo realizado por Tarragona y col. (2015) sugiere la ausencia de diapausa morfo genética en todos los estadios; pero, considerando que Labruna y col., (2003) y Cabrera y Labruna, (2009) registraron el desarrollo de diapausa de comportamiento en larvas de *A. cajennense* s.l. (probablemente *A. sculptum*), se considera necesario evaluar si este proceso biológico también modula el ciclo de vida de *A. tonelliae* y *A. sculptum* en la Argentina.

Debido a que tanto las fases inmaduras como adultas de las dos especies parasitan a los seres humanos y animales domésticos como bovinos, equinos y cerdos, entre otros (ver capítulo 1), y a que tanto *A. tonelliae* como *A. sculptum* son vectores competentes del microorganismo patógeno de humanos *R. rickettsii* (Soares y col., 2012; Tarragona y col., 2016), se puede inferir de acuerdo a la información sobre distribución estacional de ambas garrapatas obtenida durante este estudio, que el riesgo de transmisión de *R. rickettsii* está presente durante prácticamente todo el año. Finalmente, el conocimiento sobre la distribución estacional generado en este trabajo puede ser de utilidad para diseñar un esquema de aplicación de acaricidas químicos para controlar la infestación de *A. sculptum* y *A. tonelliae* en bovinos.

## Capítulo 3

**Diversidad genética y filogeografía de *Amblyomma tonelliae* y *Amblyomma sculptum* en Argentina por comparación de secuencias del gen mitocondrial 16S.**

## Introducción

La diversidad genética es un concepto central de la biología evolutiva que se ha relacionado con la complejidad de los organismos. Todas las especies de reproducción sexual, comprenden una o más poblaciones de individuos que se cruzan entre sí, formando una comunidad de intercambio genético denominada población mendeliana (Dobzhansky, 1950). Dentro de esa población algunos individuos dejan más descendientes que otros, esto implica que sus variantes génicas (alelos) estarán más representadas en la siguiente generación. De este modo, las frecuencias de los distintos alelos cambiarán de una generación a otra. La proporción a la cual esa frecuencia ocurre se denomina índice de fijación (Lemey y col., 2009). Existen distintos factores que modulan la genética poblacional, como por ejemplo la selección natural, la deriva génica, el flujo génico y las mutaciones (Awise, 2000). Es decir que, la diversidad genética es un prerrequisito para la evolución ya que esta última requiere cambios. Una de las principales fuentes de estos cambios son las mutaciones. Las mutaciones en un gen que se transmiten a la descendencia y que coexisten con el gen original dan lugar a polimorfismos (Lemey y col., 2009). Un haplotipo es una combinación única de marcadores genéticos presentes en un cromosoma (Hartl y Clark, 1997). Existen varias formas de mutación, como ser la sustitución nucleotídica, inserciones, deleciones, inversiones y transposiciones que originan sitios polimórficos (Templeton, 2006). Es así que el grado de variación genética puede ser estimado a partir de dos parámetros, el nivel de polimorfismo en la secuencia de nucleótidos (proporción de sitios nucleotídicos que son polimórficos en el muestreo de una porción del genoma) y la diversidad nucleotídica, la cual es definida como la proporción media de las diferencias nucleotídicas entre todos los pares de secuencias (Hartl, 2000). En el caso de las garrapatas, debido a la incapacidad de dispersión independiente, el flujo génico se define en gran parte por la vagilidad de sus hospedadores. Sin embargo, el comportamiento y estrategias del ciclo de vida pueden limitar su dispersión incluso en el caso de hospedadores con alta vagilidad, y conducir a un aumento en la estructura genética (Araya-Anchetta y col., 2015). Dos factores no menos importantes pueden condicionar la estructura genética de una población, como son el aislamiento geográfico (vicarianza y aislamiento por distancia) y requerimientos ecológicos (Prince, 1977). Prince (1980) predice que las poblaciones de parásitos son en gran parte homocigotas y con baja diversidad genética. La percepción de Price (1980) posiblemente surgió de la idea de que la diversidad genética de una población de parásitos de una especie dada sobre un hospedador (infracomunidad) se rige sobre todo por la fuerza de deriva génica. En contraste a lo expuesto por Prince, la mayoría de los macroparásitos, como helmintos y artrópodos, liberan su descendencia en el ambiente, mezclándose y

luego reclutándose en un nuevo hospedador (Criscione y col., 2005). El tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ), es el tamaño de una población ideal que tiene la misma tasa de endogamia que la población de interés. Generalmente, el  $N_e$  es menor que el número de individuos en la población ( $N$ ) porque algunos padres contribuyen con muchos más hijos a la próxima generación que otros (Lemey y col., 2009). Si bien el  $N_e$  ha sido tenido poco en cuenta en el área de la parasitología, Criscione y Blouin (2005) presentan un modelo conceptual para hacer estimaciones demográficas del  $N_e$  en parásitos. Este modelo destaca varios factores tales como distribuciones agregadas, efectos de exclusión e inmunidad del hospedador que pueden modificar el  $N_e$  de las poblaciones de los parásitos a través de los efectos sobre el sexo y variación en el éxito reproductivo.

La filogeografía es el estudio de los principios y procesos históricos que determinan la distribución geográfica de linajes de genes (genealogía), dentro y entre especies relacionadas (Avice y col., 1987). Es decir que esos procesos históricos podrían ser responsables de la distribución geográfica contemporánea de una especie. Los procesos históricos que pueden inferirse incluyen la expansión de la población, los cuellos de botella poblacionales, vicarianza y migración.

El foco central de cualquier estudio de genética poblacional y filogeográfico radica en la elección de un correcto marcador molecular con una tasa mutacional acorde a la escala evolutiva que se desea estudiar. Un marcador molecular es un gen o segmento de ADN con ubicación física conocida en un cromosoma (Freeland, 2005). Por lo general, existen genes conservados que cambian lentamente con el tiempo y son los más adecuados para estimar divergencias antiguas entre especies o subespecies y marcadores con mayor velocidad de mutación que son más apropiados para evaluar diferenciaciones recientes entre poblaciones (Avice, 2004). Los genes comúnmente utilizados para estudios filogenéticos y de genética de poblaciones de garrapatas se diferencian en genes ribosomales nucleares y genes mitocondriales. Los genes ribosomales nucleares 5,8S, 18S, 28S son apropiados para resolver relaciones a nivel de familias y suborden (Murrell y col., 2005; Klompen y col., 2007; Burger y col., 2014). Por otro lado, los espaciadores de transcripción internos (ITS1 e ITS2 en sus siglas en inglés) son utilizados en estudios a nivel intragenérico e intraespecífico de especie y estimación de poblaciones híbridas (Beati y col., 2013; Lado y col., 2016; Kovalev y col., 2015 y 2016). Los genes mitocondriales (ADNmt) han sido utilizados en muchos taxones para inferir relaciones filogenéticas y para analizar la diferenciación genética. El ADN mitocondrial es de herencia materna, sufre poca o ninguna recombinación y se caracteriza por altas tasas de mutación y abundantes polimorfismos inter e intra-específicos (Avice y col., 1987). Los genes mitocondriales como 16SrARN (gen ARN ribosomal sub-

unidad mayor), 12SrARN (gen ARN ribosomal sub-unidad menor), COI (citocromo oxidasa subunidad I), COII (citocromo oxidasa subunidad II) y d-loop (región control DL) de garrapatas de la familia Ixodidae han sido utilizados como marcadores moleculares adecuados para establecer relaciones filogenéticas a nivel intra-genérico e intra-específico y en ecología de poblaciones de garrapatas (Beati y Keirans, 2001; Beati y col., 2012, 2013; Lado y col., 2016; Mangold y col., 1998). Dentro de los genes mitocondriales el 16SrADN ha sido frecuentemente utilizado para determinar relaciones filogenéticas a nivel intra-genérico e intra específico en garrapatas (Black y Piesman, 1994; Klompen y col., 2000) y como marcador molecular en el estudio de genética poblacional y filogeografía de algunas especies de garrapatas de los géneros *Amblyomma* e *Ixodes* de importancia médica (Guglielmono y col., 2013; Krakowetz y Chilton, 2015; Mixon y col., 2006; Qiu y col., 2002; Trout y col., 2010). Mixon y col. (2006) estiman la tasa de mutación del gen 16S en garrapatas del género *Amblyomma* en  $4,13 \times 10^{-8}$  sustituciones por sitio por año.

Otro tipo de marcadores moleculares son los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR o STR), que consisten en secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva (Gemayel y col., 2010). Debido a la alta tasa de mutación y al carácter no codificante de los SSR, cada vez más asiduamente son utilizados en estudios sobre estructura poblacional y diversidad poblacional de garrapatas y su relación con la ecología de algunas enfermedades por estas transmitidas (Ogrzewalska y col., 2016).

A partir de la evidencia genética proporcionada por estudios realizados por Beati y col. (2013), mediante el uso de genes mitocondriales y nucleares, los autores proponen que las seis especies que componen el complejo de especies *A. cajennense* evolucionaron separadamente en alopatria desde hace aproximadamente 10 millones de años. Estos autores suponen que la distribución del antepasado de las especies del complejo *A. cajennense*, durante el mioceno temprano, abarcaba un rango mayor que el de las especies actuales. Según Beati y col. (2013), *A. tonelliae* demostró ser más cercana genéticamente a *A. interandinum* que a *A. sculptum*. Esto último, plantean los autores, estaría relacionado a que *A. tonelliae* compartiría un ancestro más reciente con *A. interandinum* (mioceno tardío) que se habría aislado en el suroeste, mientras *A. sculptum* lo tendría con *A. mixtum*, *A. cajennense* y *A. patinoi*, aislado en el noreste.

El objetivo de este capítulo es conocer la diversidad genética de poblaciones argentinas de *A. tonelliae* y *A. sculptum* utilizando para ello secuencias de un fragmento de 400 pares de bases del gen

mitocondrial 16S, y estimar la estructura genética poblacional de ambas especies, relacionando el patrón observado con la distribución geográfica de ambos taxones.

## Materiales y métodos

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando adultos de *A. sculptum* y *A. tonelliae* colectados sobre hospedadores y en su fase de vida libre en la vegetación. Los especímenes fueron identificados taxonómicamente siguiendo a Nava y col. (2014). Las garrapatas fueron sometidas a extracción de ADN mediante la digestión proteolítica con la enzima proteinasa K, colocando cada espécimen en una solución formada por: 340 µl de una solución (TRIS 10 mM a pH 8; EDTA 100 mM; NaCl 100 mM), 40 µl de SDS (sodio-dodecil fosfato) al 20 % y 20 µl de proteinasa K, 500 µg/ml (Invitrogen®). La purificación del ADN se realizó con fenol y cloroformo-álcohol isoamílico para desnaturar y precipitar las proteínas, la precipitación se hizo con etanol absoluto y finalmente el ADN extraído se reconstituyó en una solución amortiguadora TE (10nM Tris a PH 7,6; 0,1 mM EDTA).

El ADN obtenido fue amplificado para el gen mitocondrial 16S, con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el siguiente protocolo: un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 1 minuto a 94 °C; - un ciclo con desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, hibridación a 47 °C por 45 segundos y polimerización a 72 °C durante 45 segundos; - 6 ciclos con un incremento sucesivo de la temperatura de hibridación de 0,3 °C en el ciclo siguiente; - 28 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, hibridación a 50 °C por 45 segundos y polimerización a 72°C durante 45 segundos; - un ciclo de polimerización final de 7 minutos a 72 °C. La reacción se llevó a cabo con la enzima *Taq DNA Polymerase* producida por Promega y los cebadores (*primers*) utilizados fueron: 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T-3' y 5'-GCT CAA TGA TTT TTT AAA TTG CTG T-3' (16S – 1) (Mangold y col., 1998). Los productos de PCR fueron purificados con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y la secuenciación fue llevada a cabo en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar. Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR (Hall, 1999) aplicando el programa CLUSTAL W (Thompson y col., 1994) y se compararon entre sí y con aquellas depositadas en el GenBank usando el programa MEGA versión 5.0 (Tamura y col., 2011). Al grupo de secuencias obtenidas de garrapatas pertenecientes a una misma localidad geográfica se le asignó el nombre de población. Se construyó una red de haplotipos para cada especie utilizando el programa Network 5.0 (Bandelt y col., 1999) para obtener una representación gráfica de las relaciones genealógicas intraespecíficas. Para el análisis de las secuencias, se construyó una matriz de divergencia con el modelo de Tamura-Nei excluyendo las posiciones con “gaps” entre los pares de secuencias para exponer las diferencias en la composición de nucleótidos. La variabilidad genética molecular explicada

por distintos niveles jerárquicos de organización (dentro de poblaciones, entre poblaciones y entre grupos de poblaciones), fue estimada por el análisis de varianza molecular (AMOVA) basado sobre 1000 permutaciones, y se calculó el índice de fijación ( $F_{st}$ ), que determina la diferenciación genética entre pares de poblaciones, cuyos valores significativamente diferentes de 0 indican escaso flujo génico o interrupción del mismo conforme se acerca a 1. Estos procedimientos se ejecutaron con el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier y col., 2005), y la significancia estadística de los índices se determinó por los métodos no paramétricos descritos en Excoffier y col. (1992). El análisis filogenético para determinar las relaciones entre las diferentes secuencias del gen mitocondrial 16S se realizó utilizando métodos basados en caracteres y de distancia. En el primer caso se aplicó el método de máxima verosimilitud (ML) con el programa MEGA 5.0 (Tamura y col., 2011). El modelo de sustitución nucleotídica seleccionado para la construcción del árbol filogenético fue Tamura 3- parámetros utilizando la distribución gamma (+ G) que se determinó siguiendo el criterio de Akaike. Se excluyeron las posiciones con *gaps* entre los pares de secuencias y la fiabilidad de las filogenias se evaluó mediante el procedimiento de muestreo repetitivo (*bootstrap test*) con 1000 repeticiones. Las secuencias utilizadas como grupos externos (outgroups) fueron aquellas pertenecientes a *Amblyomma americanum* (Linnaeus), (n° GenBank L34314), *A. sculptum* (n° GenBank. KM519934), *A. tonelliae* (n° GenBank KF179349) y *A. mixtum* (n° GenBank KM519935). Las secuencias también se utilizaron para construir un árbol filogenético basado en el método de distancia neighbour-joining (NJ). También se calcularon la diversidad de haplotipos ( $h$ ) (definida como la probabilidad de que dos secuencias, dentro de las muestras tomadas al azar, sean haplotipos diferentes (Rozas, 2009)) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (definida como la proporción media de diferencias de nucleótidos entre todas las posibles pares de secuencias de la muestra (Hartl y Clark, 1997)) utilizando el programa DnaSP Versión 5.10 (Librado y Rozas, 2009). Se consideraron haplotipos diferentes aquellas secuencias que difirieron en al menos una base. Dentro del total de haplotipos se seleccionó como haplotipo ancestral aquel que, según la topología de la red de haplotipos, tenía más conexiones con el resto de los haplotipos (Templeton, 2006).

## Resultados

### *Amblyomma tonelliae*

Se analizaron 41 secuencias nucleotídicas del gen mitocondrial 16S obtenidas de garrapatas pertenecientes a 11 poblaciones de Argentina y dos secuencias originadas de una población de *A. tonelliae* de Paraguay (n° de Genbank: KF179348 y KF179349) (Tabla 3). Se encontraron 5 haplotipos únicos (números de acceso en GenBank: haplotipo I KM507359; haplotipo II KM507360; haplotipo III KM507361; haplotipo IV KM507362; haplotipo V KF179349), agrupados en el mismo clado monofilético (Figuras 20 y 21). La topología de la red de haplotipos y su relación con la distribución geográfica de las poblaciones mostró la existencia de un haplotipo ancestral (haplotipo I) que hipotéticamente dio origen al resto de los haplotipos (II, III, IV, V), presente en cuatro poblaciones de la distribución este (ver capítulo uno) de *A. tonelliae* y de Paraguay, un segundo haplotipo (haplotipo II) de alta frecuencia presente en ocho poblaciones de la distribución oeste de *A. tonelliae*, un tercer y único haplotipo (haplotipo III) obtenido de un individuo perteneciente a una población de la distribución oeste, un cuarto haplotipo (haplotipo IV) compuesto por un único individuo de una población de la distribución este, y finalmente un quinto haplotipo (haplotipo V) obtenido de un individuo de la población PN Teniente Agripino de Paraguay (Tabla 3). El haplotipo I ancestral coexiste con el haplotipo IV en la distribución este y el haplotipo V, pero no coexiste con los haplotipos II (de alta frecuencia) ni III característicos de la distribución oeste (Figura 19).

La variabilidad entre las secuencias fue escasa. La divergencia nucleotídica entre todas las secuencias nunca superó el 0,5 % (Tabla 5). El total de las secuencias analizadas mostró una diversidad de haplotipos (h) de 0,489 y una diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00147. La frecuencia media de cada base nucleotídica fue de 42,07% para citosina, 32,93% para timina, 0,61% para adenina y 24,39% para guanina. El número medio de diferencias de nucleótidos para todas las secuencias fue de 0,58915. El análisis de AMOVA reveló que el 76,74% de la variación molecular fue atribuible a diferencias inter-poblacionales y el 23,26% a diferencias intra-poblacionales (Tabla 4). El valor del  $F_{st}$  fue 0,76.

En el análisis filogenético, si bien los árboles construidos con los métodos NJ (Figura 20) y ML (Figura 21) mostraron topologías algo diferentes, tanto para el árbol inferido por distancia como para el árbol inferido a partir de caracteres, no se observaron clados correlacionados con la distribución geográfica de los haplotipos de *A. tonelliae*.

Tabla 3: Poblaciones geográficas de *Amblyomma tonelliae* incluidas en el análisis de las secuencias de 16S ADNr. Coordenadas se muestran en grados decimales.

País	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Secuencias , <i>n</i>	16S ADNr haplotipos
Argentina	Salta	La Estrella (LE)	-23,8144	-64,0044	4	II
	Salta	Las Tortugas (LT)	-24,2478	-64,1037	5	II
	Salta	Virgilio Tedin (VT)	-25,0500	-64,9833	5	II
	Salta	El Tunal (ET)	-25,2484	-64,3943	5	II
	Salta	Oran	-23,1370	-64,3242	1	II
	Jujuy	20 km N Palma Sola (NPS)			2	II, III
	Jujuy	Saladillo (S)	-24,0244	-64,2542	5	II
	Jujuy	Palma Sola (PS)	-23,9787	-64,2875	3	II
	Santiago del Estero	PN. Copo (PNC)	-25,6561	-61,9969	4	I, IV
	Formosa	El Simbolar (ES)	-24,2705	-61,1492	3	I
	Chaco	PN. El Impenetrable (JJC)	-25,1797	-61,0967	4	I
Paraguay	Boquerón	PN. Teniente Agripino	-21,2000	-61,6500	2	I, V

Figura 19: Relación entre la distribución geográfica y la genealogía de los cinco haplotipos de *Amblyomma tonelliae*. La topología de la red de haplotipos refleja la frecuencia de cada haplotipo (tamaño de círculos) y su composición poblacional (cada población está representada por un color). Mapa adaptado de Eco-regiones de la Argentina de Burkart y col. (1999) y de Provincias Biogeográficas de América Latina y el Caribe de Morrone (2004).

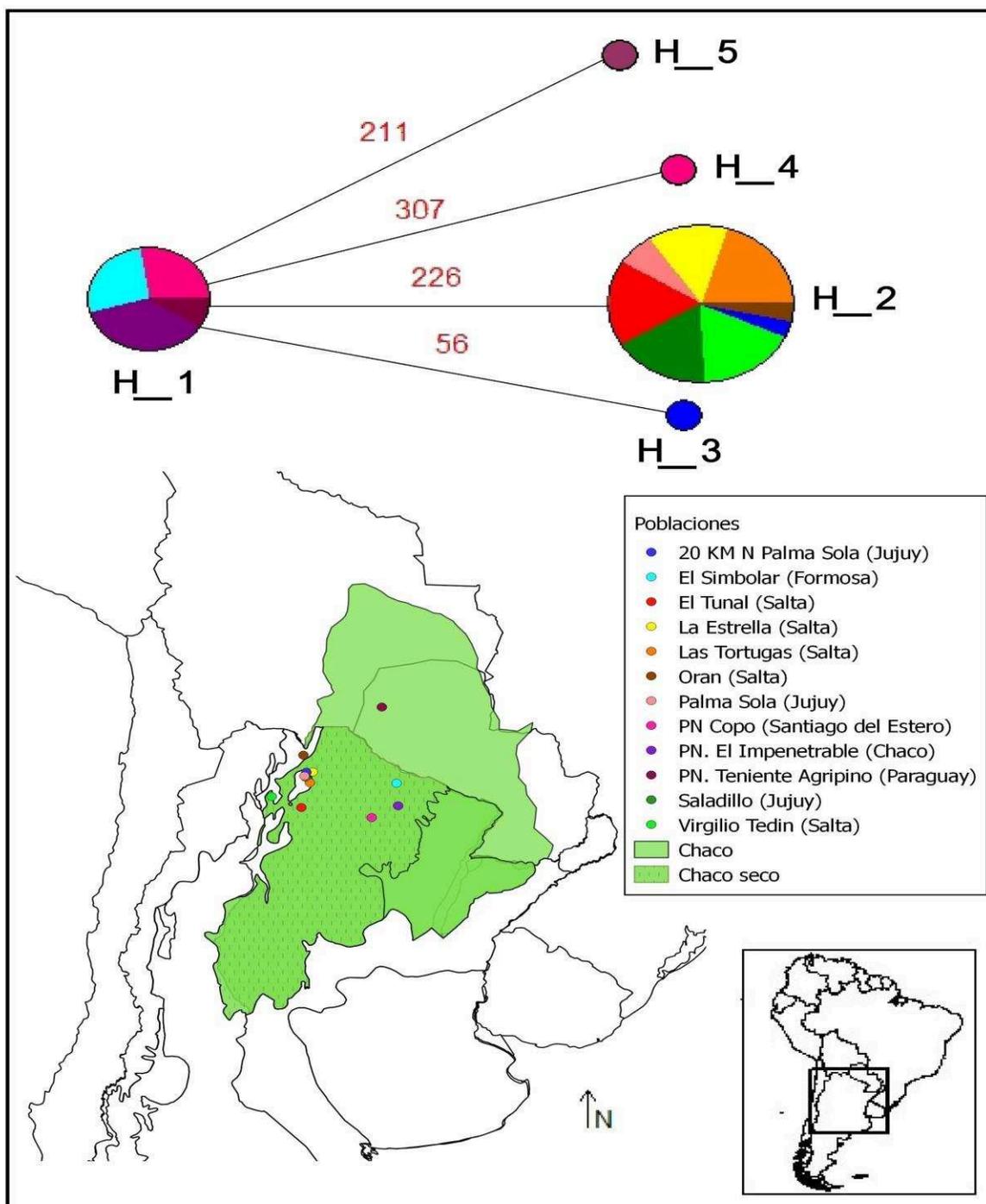


Tabla 4: Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) mostrando el porcentaje de variación en secuencias del gen mitocondrial 16S entre poblaciones y dentro de poblaciones de *Amblyomma tonelliae*.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de los cuadrados</b>	<b>Componentes de la Varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
----------------------------	---------------------------	------------------------------	-----------------------------------	--------------------------------

<b>Entre poblaciones</b>	11	10,122	0,23950 Va	76,74
<b>Dentro de poblaciones</b>	31	2,250	0,07258 Vb	23,26
<b>Total</b>	42	12,372	0,31208	

Tabla 5: Matriz de divergencia nucleotídica (%) entre las secuencias del gen mitocondrial 16S obtenidas de especímenes de *Amblyomma tonelliae* pertenecientes a distintas poblaciones de Argentina. NP: 20 km N Palma Sola; PS: Palma Sola; LT: Las Tortugas; LE: La Estrella; S: Saladillo; VT: Virgilio Tedin; ES: El Simbolar; ET: El Tunal; PNC: PN. Copo; JJC: PN. El Impenetrable; ORAN.



Figura 20: Árbol filogenético obtenido con el método de distancia “Neighbor joining” y usando el modelo de Tamura-Nei a partir de secuencias del gen 16S de distintas poblaciones de *Amblyomma tonelliae* de Argentina y Paraguay. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Detalles de cada secuencia se presentan en la Tabla 3. Entre paréntesis, números de acceso de genbank de outgroup.

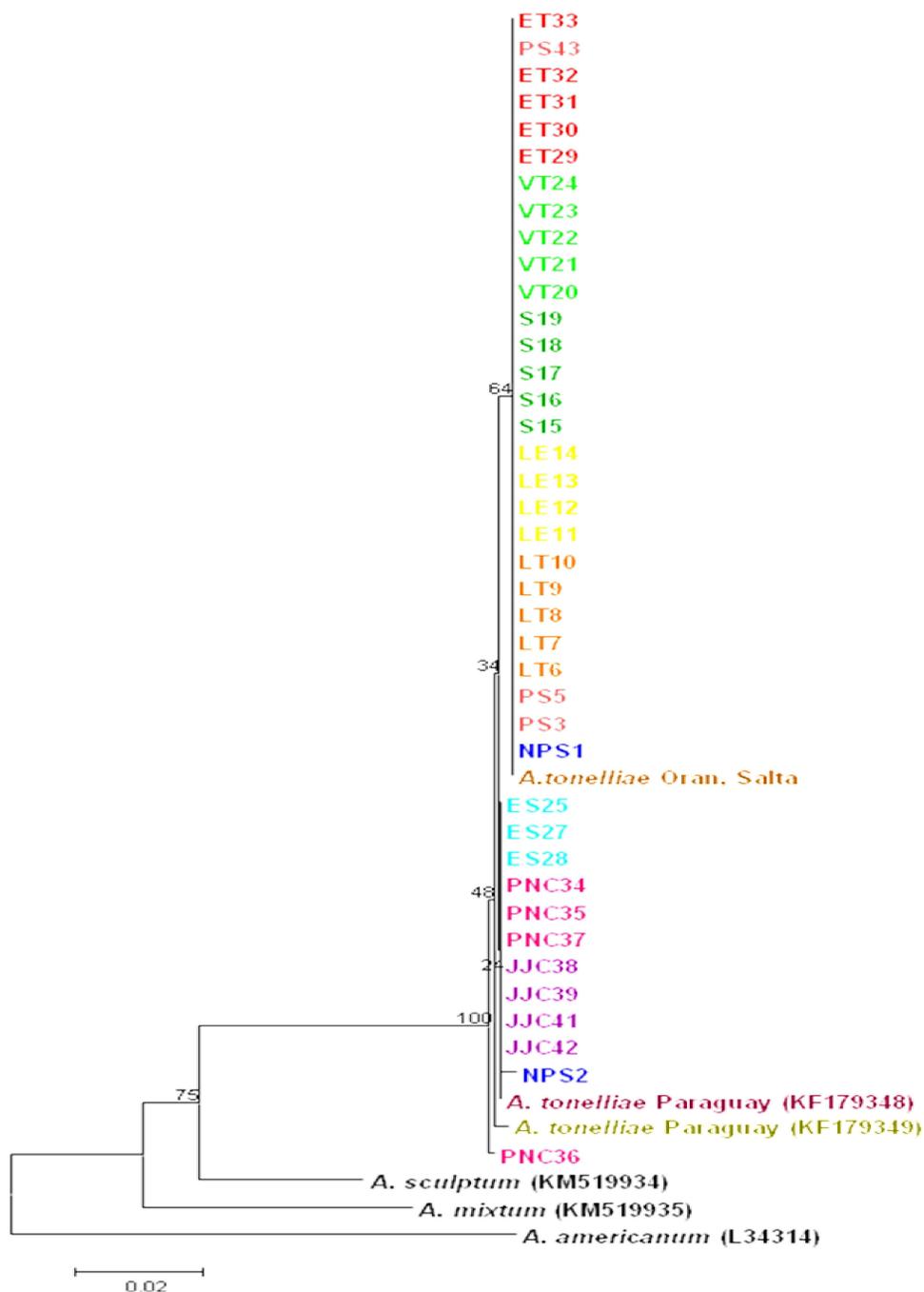
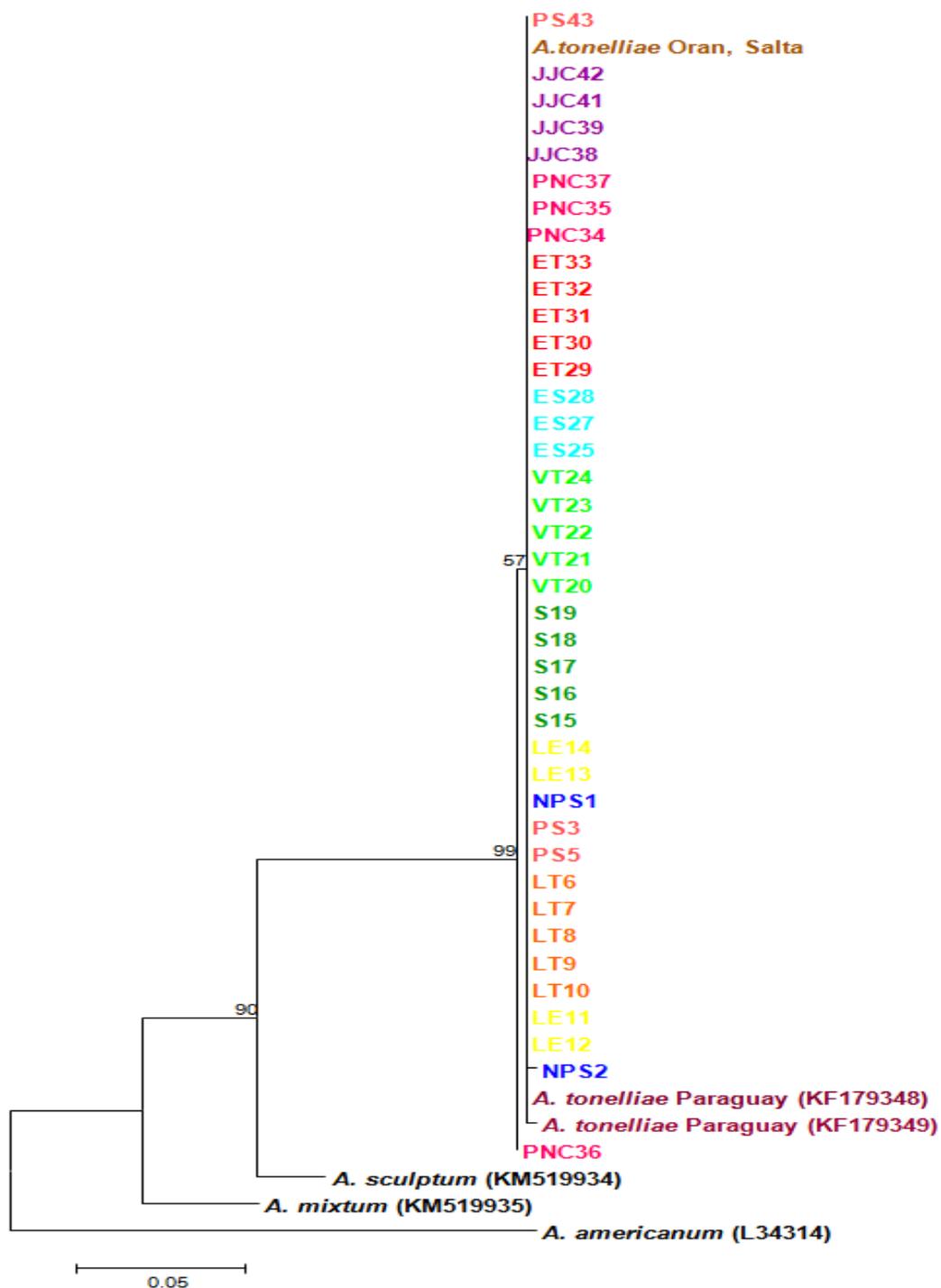


Figura 21: Árbol de máxima verosimilitud construido a partir de secuencias del gen mitocondrial 16S de *Amblyomma tonelliae*. Los números representan el apoyo de arranque generado a partir de 1000 repeticiones. Los detalles de cada secuencia se presentan en la Tabla 3. Entre paréntesis, números de acceso de genbank de los outgroups.



### *Amblyomma sculptum*

Se analizaron 40 secuencias del gen mitocondrial 16S de garrapatas determinadas como *A. sculptum* colectadas en 14 localidades de Argentina, a la que se adicionaron cuatro secuencias de especímenes de *A. sculptum* originarios de Brasil (localidades de Chapada dos Guimarães, Pirizal y Poconè estado de Mato Grosso, (n° de Genbank: KT722808, KT238826, KJ557134), y Perdizes, estado de Minas Gerais (n° de Genbank KP686061)) (Tabla 6). Se encontraron 5 haplotipos únicos: haplotipo I; haplotipo II; haplotipo III; haplotipo IV; haplotipo V (n° de Genbank: KT722808), que se agrupan en el mismo clado monofilético (Figuras 23 y 24). La topología de la red de haplotipos y su relación con la distribución geográfica de las poblaciones mostró la existencia de: 1) haplotipo I ancestral y de alta frecuencia que da origen a los haplotipos II, III y IV, presente en once poblaciones de Argentina y en dos de Brasil; 2) haplotipo II presente en tres poblaciones de Argentina; 3) haplotipo III presente en dos poblaciones de Argentina y una de Brasil; 4) haplotipo IV obtenido de un único individuo de la población Eco-Portal de Piedras, Argentina; y 5) haplotipo V perteneciente a individuos de la población Chapada dos Guimarães de MT, Brasil.

Al igual que en *A. tonelliae*, la matriz de divergencia nucleotídica arrojó una escasa variabilidad entre las secuencias de Argentina, la cual nunca superó el 0,5 % (Tabla 8). El total de las secuencias analizadas mostró una diversidad de haplotipos (h) de 0,386 y una diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,00117. La frecuencia media de cada base nucleotídica fue de 2,44 % para citosina, 0,61% para timina, 49,39% para adenina y 47,56% para guanina. El número medio de diferencias de nucleótidos para todas las secuencias fue de 0,45253. Para *A. sculptum*, del total de la variabilidad genética, el 65,21% fue atribuible a diferencias inter-poblacionales y el 34,79% a diferencias intra-poblacionales (Tabla 7). El valor del  $F_{st}$  fue 0,65.

En el análisis filogenético, los árboles construidos con los métodos NJ (Figura 23) y ML (Figuras 24) mostraron topologías similares, sin la formación de clados correlacionados con la distribución de haplotipos de las distintas poblaciones de *A. sculptum*.

Tabla 6: Poblaciones geográficas de *Amblyomma sculptum* incluidas en el análisis de las secuencias del gen mitocondrial 16s. Coordenadas se muestran en grados decimales.

País	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Secuencias, <i>n</i>	16S ADNr haplotipos
<b>Argentina</b>	Chaco	Fortin Lavalle (FL)	-25,6972	-60,19056	1	II
	Chaco	PN. Chaco (PNC)	-26,8327	-59,66667	4	I, II
	Chaco	PN. El Impenetrable (JJC)	-25,1797	-61,0967	3	III
	Corrientes	Paso Florentín (PF)	-27,7500	-57,7667	1	I
	Formosa	El Simbolar (ES)	-24,2705	-61,1492	1	III
	Formosa	RN Formosa (RNF)	-24,28889	-61,84556	5	I
	Formosa	RP. El Bagual (RPB)	-26,18139	-58,94417	4	I, II
	Jujuy	Palma Sola (PS)	-24,02221	-64,32661	4	I
	Jujuy	La Ronda (LR)	-24,06083	-64,24777	2	I
	Jujuy	Eco-Portal Piedras (REPP)	-24,09417	-64,39833	5	I, IV
	Jujuy	Santa Clara (SC)	-24,30417	-64,65861	4	I
	Salta	Las Tortugas (LT)	-24,24873	-64,11981	2	I
	Salta	Tartagal (TA)	-22,51444	-63,80278	1	I
	Salta	Tobantirenda (TO)	-24,30417	-64,65861	4	I
<b>Brasil</b>	Mato Grosso	Chapada dos Guimarães	-15,46056	-55,74972	1	V
	Mato Grosso	Pirizal	-16,21333	-56,37167	1	I
	Mato Grosso	Poconè	-16,25694	-56,62278	1	III
	Minas Gerais	Perdizes	-19,16667	-47,10000	1	I

Figura 22: Relación entre la distribución geográfica y la genealogía de los cinco haplotipos del gen mitocondrial 16S de *Amblyomma sculptum*. La topología de la red de haplotipos refleja la frecuencia de cada haplotipo (tamaño de círculos) y su composición poblacional (cada población está representada por un color). Valores en rojo representan el número de base nucleotídica donde se produce el paso mutacional. Mapa adaptado de Eco-regiones de la Argentina de Burkart y col. (1999) y de Provincias Biogeográficas de América Latina y el Caribe de Morrone (2004).

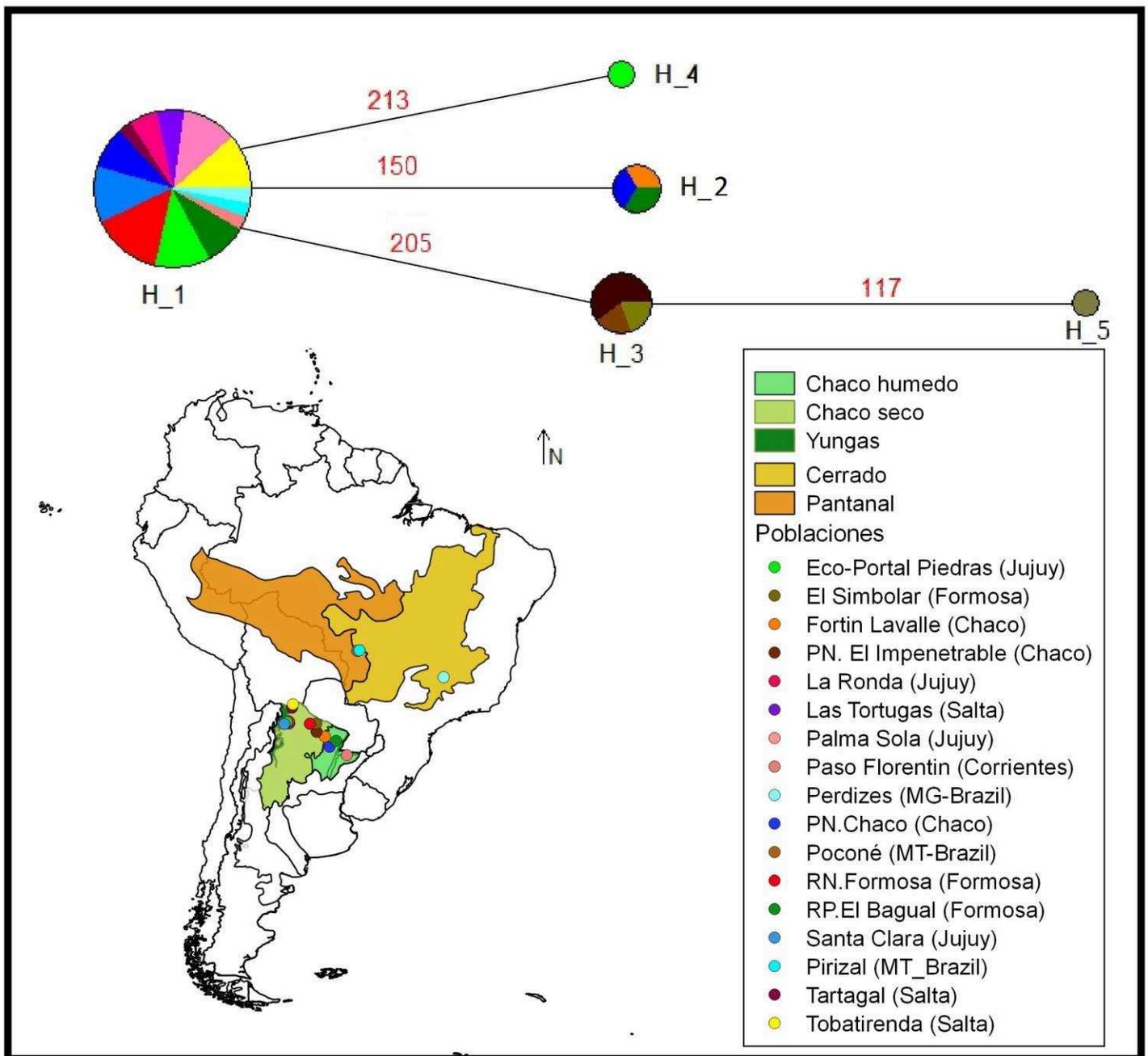


Tabla 7: Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) mostrando el porcentaje de variación en secuencias del gen mitocondrial 16S entre poblaciones y dentro de poblaciones de *Amblyomma sculptum*.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de los cuadrados</b>	<b>Componentes de la Varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
----------------------------	---------------------------	------------------------------	-----------------------------------	--------------------------------

<b>Entre poblaciones</b>	16	7,690	0,15983 Va	65,21
<b>Dentro de poblaciones</b>	26	2,217	0,08526 Vb	34,79
<b>Total</b>	42	9,907	0,24508	

Tabla 8. Matriz de divergencia nucleotídica (%) entre las secuencias del gen mitocondrial 16S

obtenidas de especímenes de *Amblyomma sculptum* pertenecientes a distintas poblaciones de

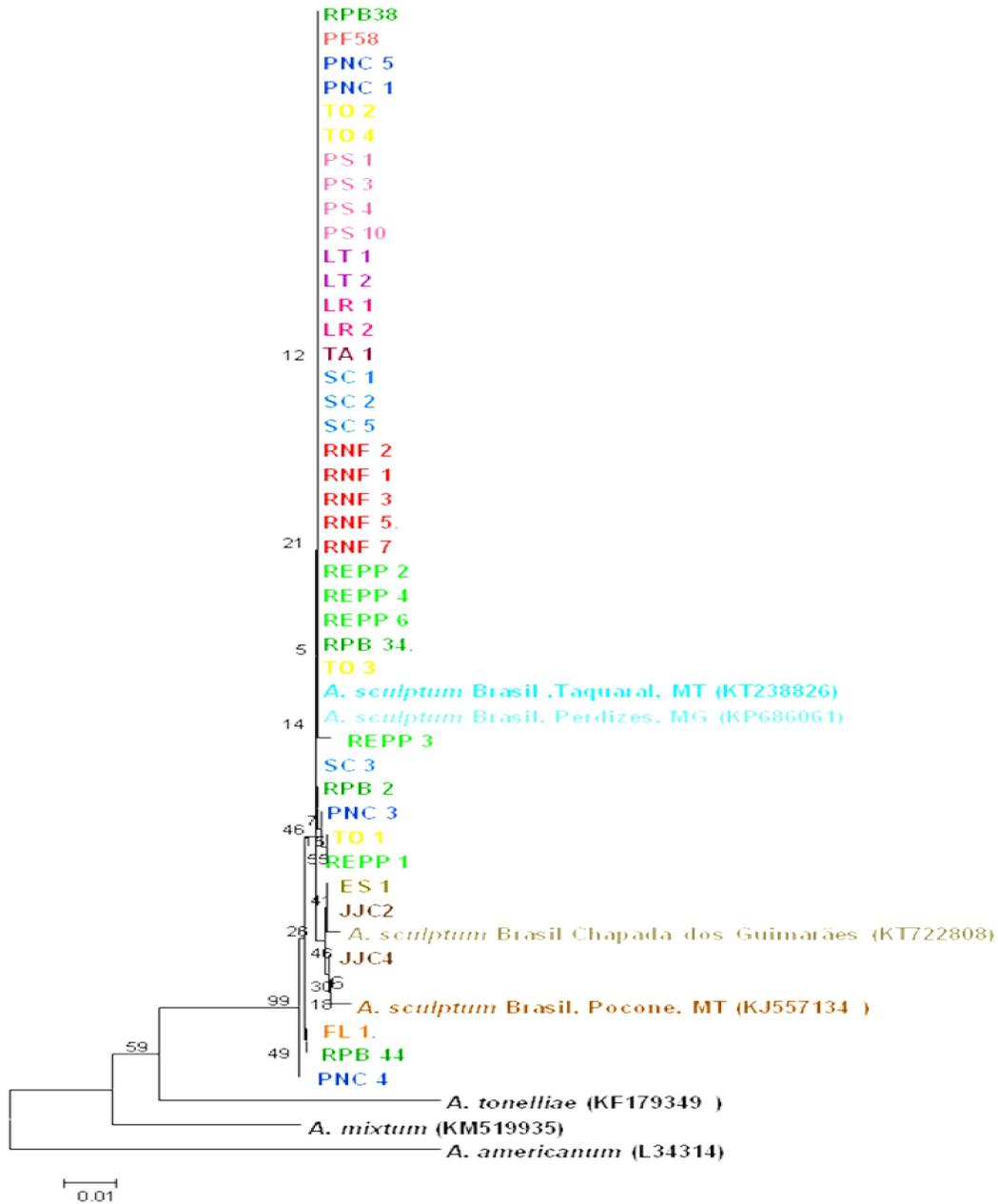
Argentina. TO: Tobantirenda; PS: Palma Sola; LT: Las Tortugas; LR: La Ronda; FL: Fortín Lavalle;

ES: El Simbolar; TA: Tartagal; JJC: PN. El Impenetrable; PNC: PN. Chaco; SC: Santa Clara; RNF:

RN Formosa; REPP: Eco-Portal Piedras; RPB: RP. El Bagual; PF: Paso Florentín.



Figura 23: Árbol filogenético obtenido con el método de distancia “Neighbor joining” (NJ) y usando el modelo de Tamura-Nei a partir de secuencias del gen mitocondrial 16S de distintas poblaciones de *Amblyomma sculptum* de Argentina y Brasil. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Detalles de cada secuencia se presentan en la Tabla 6. Entre paréntesis, números de acceso de GenBank de outgroup.





## Discusión

Las diferencias genéticas intraespecíficas en las secuencias del gen 16S encontradas para *A. tonelliae* y *A. sculptum* nunca superaron el 0,5%, oscilando en un rango entre 0% y 0,5% para las dos especies. Esto último indica una escasa diferenciación genética entre especímenes provenientes de las poblaciones estudiadas a lo largo de sus respectivas distribuciones en la Argentina y da cuenta de que todos los especímenes de *A. sculptum* y *A. tonelliae* analizados de las diferentes poblaciones de la República Argentina pertenecen a la misma especie. El bajo índice de diversidad de nucleótidos y el relativamente elevado índice de diversidad de haplotipos demuestran que la diversidad genética de las dos especies estudiadas es baja en comparación con la diversidad genética intraespecífica de secuencias de 16S de otras especies de *Amblyomma* tales como *A. americanum* de Estados Unidos (Mixson y col., 2006; Trout y col., 2010) y *A. parvum* de Argentina y Brasil (Nava y col., 2008b). Dos hipótesis podrían explicar estos resultados. La primera se basa en la posibilidad de que este fenómeno este asociado a un proceso de expansión poblacional de las dos especies tras un cuello de botella. El proceso de expansión se asocia a la “Época de Las Llanuras Sureñas” durante finales del Mioceno hasta finales del Plioceno (11-3 millones de años) y la “fase andina Diaguita” que resultó en la elevación de la cordillera (Donato y col., 2003), produciéndose una rápida expansión poblacional desde las zonas refugio originando un contacto secundario entre las dos especies en zonas ya ecológicamente aptas para ambas (Ver capítulo 1) (Beati y col., 2013). La segunda hipótesis que se plantea es que la limitada diversidad de los taxones está asociada a un sesgo de muestreo, es decir un reducido N de estudio. Sjogren y Wyoni (1994) sugieren que un tamaño muestral limitado puede generar el riesgo de hallar “monomorfismos” en verdaderas poblaciones polimórficas, omitiendo la diversidad genética real de los taxones.

El análisis de AMOVA y los valores de  $F_{st}$  para las dos especies, revelaron que tanto *A. tonelliae* como *A. sculptum* poseen una cierta estructuración genética y que la distribución de esa variabilidad es explicada, en mayor medida, por diferencias entre poblaciones. Todos los estadios parasitarios de *A. tonelliae* y *A. sculptum* se asociaron comúnmente al ganado bovino y a hospedadores silvestres que necesitan grandes áreas de bosque nativo de distribución para mantener sus poblaciones (Nava y col., 2014; ver capítulo 1) en un área sin barreras geográficas naturales. Algunos autores sugieren que los parásitos del ganado, generalmente, se caracterizan por una baja diferenciación genética entre

poblaciones debido a que el movimiento del hospedador permite un alto flujo génico (Hilburn y Sattler, 1986a, Blouin y col., 1995, Rosenthal, 2008). Esta situación, se ha reportado para el caso de otras especies de *Amblyomma* parásitos comunes del ganado, como *A. americanum* (Hilburn y Sattler, 1986b), *A. neumanni* (Nava y col., 2009) y *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Beati y col., 2012). Debido a la baja especificidad por el hospedador que presentan tanto *A. sculptum* como de *A. tonelliae*, el grado de estructura genética que presentan estas dos especies no estaría asociada a una reducida vagilidad de los hospedadores, como tampoco a un aislamiento geográfico por barrera o dispersión, ya que en el rango de dispersión de ambos taxones no existen accidentes geográficos de relevancia que limiten el flujo génico (ver capítulo 1). Según Beati y col. (2013) tanto para *A. sculptum* como *A. tonelliae*, como así también para el resto de las especies del complejo *A. cajennense*, la disponibilidad de hospedador no parece ser un factor limitante. Además, según lo expuesto en el capítulo uno, ambas especies demostraron un fuerte arraigo por un determinado nicho ecológico, pero dentro de las aéreas ecológicamente aptas para cada taxón no se observaron posibles limitantes de distribución. Por esto último, la estructuración genética explicada por la variabilidad entre poblaciones, tampoco parece ser atribuible a limitaciones por requerimientos ecológicos dentro de la gran área de distribución geográfica (Eco-regiones). Una hipótesis que toma peso entonces, es que posiblemente el grado de estructuración genética inter-poblacional de las dos especies, este asociado a un proceso estocástico vinculado a variaciones en el micro-hábitat de las diferentes poblaciones.

Las poblaciones de estudio de *A. tonelliae* demostraron tener una mayor estructuración genética que las poblaciones de *A. sculptum*. El haplotipo I ancestral de *A. tonelliae* está presente en tres poblaciones del límite este del Chaco Seco Argentino (El Simbolar, PN. Copo y PN El Impenetrable) y un individuo de la población de Paraguay. Este haplotipo ancestral sólo se encontró coexistiendo con el haplotipo IV (PN Copo) y el haplotipo V (PN Teniente Agripino, Paraguay). Pero no coexiste con el haplotipo II de mayor frecuencia presente únicamente en ocho poblaciones del extremo oeste del Chaco Seco y zonas de ecotono entre este último y las selvas Pedemontana y montana de La Yunga, ni con el haplotipo III también de distribución oeste. Es decir que, las poblaciones de *A. tonelliae* del este del Chaco Seco no comparten haplotipos con las poblaciones del oeste de esta eco-región ni con las poblaciones en los sitios de transición del oeste. Como se menciona en el capítulo uno, las variaciones climáticas en toda la distribución del Chaco Seco moduladas, principalmente, por el factor hídrico pero

que afectan a todos los elementos meteorológicos, dan cuenta que las condiciones del balance hídrico se van haciendo cada vez más negativas hacia el centro de la región del Chaco Seco (Ledesma, 1992). Por lo que, si bien no existe una barrera geográfica que limite el flujo de genes entre poblaciones de *A. tonelliae* del este y el oeste, existe una limitante de hábitat. Esta fragmentación del hábitat, hace que el intercambio genético sea más probable que ocurra entre poblaciones vecinas que con respecto a las más alejadas, a este fenómeno se lo conoce como migración restringida de genes o modelo de piedra angular (del inglés *stepping-stone*) (Kimura y Weiss, 1964). A diferencia de otras especies, en el caso de *A. tonelliae* este fenómeno estaría gobernado por las características ecológicas de cada micro-hábitat, más que por la afinidad o vagilidad de sus hospedadores.

Para el caso de *A. sculptum*, se esperaba encontrar una fuerte estructuración genética asociada a una variación atribuible a las regiones geográficas, es decir que se esperaba una variación genética marcada entre poblaciones de *A. sculptum* de las selvas Pedemontana y montana de La Yunga y zonas de transición con el Chaco Seco del oeste y las poblaciones de *A. sculptum* del Chaco Húmedo y zonas de transición con el Chaco Seco del este. En lugar de ello, se observó un haplotipo I ancestral que está presente en la mayoría las poblaciones estudiadas coexistiendo con los haplotipos restantes. Esto último, como se mencionó anteriormente, da cuenta de expansión poblacional “reciente”. La expansión de una población aumenta la retención de nuevas mutaciones (Watterson, 1984) y se caracteriza por un haplotipo común a la mayoría de los individuos que coexiste con otros haplotipos de muy baja frecuencia de él derivados y que sólo difieren en una o pocas mutaciones (Slatkin y Hudson, 1991, Rogers y Harpending, 1992). Aunque existe cierto grado de estructuración genética entre las poblaciones de *A. sculptum*, las regiones geográficas no contribuyen en gran medida a esta diferenciación, sino que al igual que en el caso de *A. tonelliae* la variación genética entre poblaciones es probable que se deba a las características ecológicas de cada micro-hábitat. Estudios de genética de poblaciones de *A. sculptum* de Rio de Janeiro, Brasil utilizando otros genes mitocondriales demostraron una alta diversidad genética en las poblaciones, pero sin estructuración genética asociada a distribución geográfica (Bitencourth y col., 2016). La reducida variación genética en estudio de Brasil es atribuida a diferencias entre garrapatas dentro de cada población. Estos autores encuentran una alta diversidad de haplotipos y de nucleótidos en las poblaciones de Rio de Janeiro, a diferencia de la relativamente alta diversidad de haplotipos y baja diversidad de nucleótidos en las poblaciones de *A. sculptum* de

Argentina analizadas con el gen mitocondrial 16S para el presente estudio. Cabe mencionar que resultados preliminares, aún no publicados, del análisis de diversidad genética de las mismas poblaciones de *A. sculptum* estudiadas en esta tesis, pero concatenando secuencias de los genes mitocondriales 12S y COII (utilizados por Bitencourth y col. (2016)) y de un espaciador de transcripción interno (ITS2), revelaron una situación similar a la diversidad genética obtenida con el gen mitocondrial 16S aquí expuesto (Tarragona y col., en preparación). Estas diferencias en la diversidad intra-específica entre poblaciones de *A. sculptum* de Brasil y Argentina podría estar asociado a que las poblaciones de *A. sculptum* de Rio de Janeiro, Brasil, se encuentran como poblaciones estables, es decir con mayor historia de establecimiento y conectividad de poblaciones que las poblaciones de *A. sculptum* de Argentina.

Tanto las poblaciones de *A. tonelliae* como de *A. sculptum* de Argentina mostraron tener una baja diversidad genética intra-específica con una marcada estructuración poblacional asociada a variabilidad genética entre poblaciones a pesar de que las dos especies se asocian a hospedadores con elevada vagilidad, como es el caso del ganado doméstico y otros hospedadores silvestres (ver capítulo 1). Tampoco pudo asociarse el grado de estructuración a una barrera geográfica o limitante de flujo génico, por lo que se estima que posibles diferencias en el micro-hábitat de las diferentes poblaciones son la fuerza fundamental que promueve la deriva génica y por consiguiente la estructuración. La posibilidad de que la estructuración genética de los taxones se deba a una fragmentación de hábitat debido a factores antrópicos, como cambios en el uso de la tierra en el área de distribución de las dos especies (Gasparri y Grau, 2009; Malizia y col., 2012), se descarta dado que no es suficiente en la escala temporal para producir disrupción del flujo génico teniendo en cuenta la estimación de la tasa de mutación del gen mitocondrial 16S para garrapatas del género *Amblyomma* (Mixon y col., 2006). Es así que, se considera necesario realizar futuros estudios utilizando marcadores moleculares con mayor tasa de mutación, como es el caso de microsatélites, con el fin de confirmar si la estructuración genética de los dos taxones podría ser atribuible al grado de fragmentación de hábitat de carácter antrópico y si es plausible vincular la aptitud vectorial al grado de variabilidad genética entre poblaciones, como ya se ha realizado con otras especies de *Amblyomma* de importancia sanitaria (Ogrzewalska y col., 2016). Finalmente, debido a que este estudio mostró que las poblaciones estudiadas de *A. sculptum* y *A. tonelliae* presentan baja divergencia genética, se puede inferir que, la competencia vectorial de ambas

especies para transmitir *R. rickettsii* (Soares y col., 2012; Tarragona y col., 2016) y la agresividad hacia humanos y animales domésticos determinadas en poblaciones particulares son características que presentan en todo su rango de distribución.

## Parte II

**Rol potencial de *Amblyomma sculptum* y *Amblyomma tonelliae* como vectores de microorganismos rickettsiales en Argentina.**

## Introducción

Reisen (2002) define una enfermedad transmitida por vectores como aquella que se produce cuando un patógeno es transmitido por un artrópodo (vector) a un hospedador susceptible, es decir, consiste en una triada que incluye: un artrópodo vector, un hospedador vertebrado susceptible y un patógeno (Reisen define patógeno como todo aquel microorganismo capaz de producir enfermedad o daño a la biología de su hospedador). El hospedador primario es esencial para mantener la transmisión del patógeno, mientras que los hospedadores secundarios y accidentales, si bien no son esenciales, contribuyen con la amplificación del patógeno (Reisen, 2002). De esto último surge el término hospedador amplificador, que según Reisen (2002) contribuye a incrementar el número de patógenos y de vectores infectados en un área. Este tipo de hospedador no permanece infectado por largos períodos de tiempo ni desarrollan enfermedad. Un hospedador amplificador se diferencia de un hospedador reservorio, en que, el último permanece infectado por largos períodos de tiempo (Reisen, 2002). El componente vector de la triada se define como el “transportador” de un parásito de un hospedador a otro (Reisen, 2002). Pero para que un artrópodo sea considerado vector debe poseer competencia para ello. Cox y col. (2011) definen competencia vectorial como la susceptibilidad intrínseca que tiene una especie de artrópodo a infectarse, replicar y transmitir un patógeno. Esto último, determinado por la alimentación del vector artrópodo candidato en un hospedador vertebrado en el que circula el patógeno, incubando la sangre en el artrópodo y realimentándose posteriormente de un hospedador susceptible no infectado y adquiriendo, este último, el patógeno (Reisen, 2002).

Las enfermedades transmitidas por vectores están limitadas a la distribución geografía del vector primario que las trasmite, como a la tolerancia ambiental del agente patógeno. El artrópodo vector, por lo general está adaptado a un tipo de hábitat que se denomina tipo de hábitat óptimo (Sonenshine y Mather, 1994) (ver parte I, capítulo uno). Una enfermedad zoonótica es una enfermedad que afecta a los animales y que ocasionalmente puede afectar a humanos. En una enfermedad zoonótica transmitida por vector el humano no es un factor indispensable para el desarrollo del ciclo de la enfermedad, sino más bien se infectan al ser picados por un vector que se alimentó previamente de un hospedador animal infectado. Los seres humanos pueden enfermar o no, pero en su organismo circula un número suficiente de parásitos como para infectar vectores y por lo tanto se definen como hospedadores sin salida (del inglés “*dead-end host*”) (Reisen, 2002). Es en este punto donde adquiere mayor relevancia

el hospedador amplificador. Un mecanismo amplificador intrínseco al vector, sobre todo en el caso de garrapatas, es la transmisión vertical. Las dos formas de transmisión vertical en garrapatas son; transmisión transestadial y transovarica. La primera vinculada al pasaje secuencial del patógeno adquirido en un estadio evolutivo del vector al estadio siguiente durante la muda. La segunda se relaciona a la capacidad del patógeno de colonizar el tejido ovárico de las hembras de garrapatas, multiplicarse y pasar a la progenie durante la ovogénesis (Reisen, 2002). Para desarrollar sistemas de vigilancia epidemiológica de una enfermedad transmitida por vectores es necesario tener en cuenta algunos factores como: las condiciones ambientales, la abundancia del vector, la tasa de transmisión enzoótica, tasa de infección del vector y tasa de infección del hospedador vertebrado y casos clínicos. Determinar la cantidad de vectores de vida libre naturalmente infectados con un patógeno determinado es el primer paso para identificar un potencial vector. En resumen, los parámetros ecológicos que afectan significativamente el ciclo de una enfermedad zoonótica transmitida por garrapatas son: competencia vectorial, actividad estacional del vector, distribución geográfica del vector, especificidad por hospedador y requisito de hábitat. El estatus de una enfermedad transmitida por vectores puede variar dependiendo de la interacción entre estos cinco factores, es decir, si se comporta de forma enzoótica (relativamente estable, sin o con pocos cambios en la incidencia de la enfermedad) o epizoótica (inestable, con alto incremento en la incidencia de la enfermedad) (Sonenshine y Mather, 1994).

Las bacterias del orden Rickettsiales son parásitos intracelulares obligados que pueden infectar a una variedad de hospedadores. El orden Rickettsiales comprende las familias Rickettsiaceae (géneros *Rickettsia*, *Orientia*, *Occidentia* entre otros), Anaplasmataceae (géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*) y Midichloriaceae (Thomas, 2016). Todas estas bacterias son gran-negativas. La inoculación de fluidos infectados por parte de un ectoparásito (piojos, pulgas o garrapatas) a un hospedador, es el principal mecanismo de transmisión de las bacterias rickettsiales, incluyendo *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Orientia* (Thomas, 2016).

El género *Rickettsia* se divide en: grupo fiebre manchada, grupo thyfus, grupo bellii, grupo canadensis y grupos ancestrales (Gillespie y col., 2007; Weinert y col., 2009). Con excepción de los registros de *Rickettsia massiliae* en *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Cicuttin y col., 2014) y *Rickettsia bellii* en *H. juxtakochi* (Sebastian y col., 2016), todas las rickettsias vectorizadas por garrapatas en Argentina se

hallaron asociadas a especies del género *Amblyomma* (Labruna y col., 2007; Pacheco y col., 2007; Nava y col., 2008a; Paddock y col., 2008; Tomassone y col., 2010; Cicuttin y Nava, 2013; Romer y col., 2014; Sebastian y col., 2016). En América del Sur, las garrapatas del complejo *A. cajennense* han sido incriminadas como el principal vector del patógeno humano *Rickettsia rickettsii* (Guedes y col., 2005; Paddock y col., 2008; Labruna, 2009; Bermúdez y col., 2016; Faccini- Martinez y col., 2015; Krawczak y col., 2014). En Argentina se informaron casos fatales de fiebre machada causados por *R. rickettsii* en áreas del noroeste donde se encontró que especímenes de *A. cajennense* s.l estaban infectados con esta especie de *Rickettsia* (Paddock y col., 2008), pero después de la reevaluación del estado taxonómico de *A. cajennense*, no es posible determinar si las garrapatas analizadas por Paddock y col. (2008) correspondieron a *A. tonelliae* o *A. sculptum* ya que en el área de los casos humanos se registraron las dos especies (ver primera parte, capítulo 1).

La ehrlichiosis como la anaplasmosis son enfermedades de interés tanto en salud animal como humana. Las especies patógenas de mayor interés en América son *Ehrlichia canis* transmitida por *R. sanguineus* s.l (Fourie y col., 2013), *Ehrlichia ruminantium* transmitida por *Amblyomma variegatum* (Kelly y col., 2011), *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia ewingii* transmitida por *Amblyomma americanum* (Killmaster y col., 2014), *Anaplasma platys* transmitida por *R. sanguineus* (Cicuttin y col., 2014) y *Anaplasma marginale* transmitida por *R. microplus*, *Dermacentor andersoni* y *Dermacentor variabilis* (Scoles y col., 2007). Esta última, de especial interés por producir importantes pérdidas económicas en la producción bovina (Kocan y col., 2003).

Si bien se desconoce la aptitud vectorial de las especies del complejo *A. cajennense* para transmitir bacterias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*, estudios realizados en Brasil incriminaron a *A. cajennense* s.l (posiblemente *A. sculptum*) como potencial vector de *Ehrlichia* sp. cepa Jaguar (Widmer y col., 2011).

El objetivo de la segunda parte de la presente tesis es determinar la prevalencia de infección con bacterias de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* en diferentes poblaciones de *A. sculptum* y *A. tonelliae* presentes en Argentina, a fin de aportar una primera línea de evidencia para inferir el rol potencial de estas especies de garrapatas como vectores de microorganismos rickettsiales.

## Materiales y métodos

Para el presente estudio se utilizaron ninfas y adultos de *A. sculptum* y *A. tonelliae* colectados de la vegetación en su fase de vida libre utilizando el método de *dragging* (ver Parte I, capítulo dos). Las garrapatas fueron identificadas siguiendo a Nava y col. (2014) y Martins y col. (2014). Posteriormente cada espécimen fue sometido, individualmente, a extracción de ADN utilizando el método de fenol-cloroformo (ver parte I, capítulo 3). Para la detección de ADN rickettsial, los ADNs de garrapatas fueron inicialmente sometidos a una PCR en tiempo real (tr) amplificando un fragmento de 147pb del gen *gltA*. Los ADNs positivos fueron posteriormente sometidos a tres PCR convencionales, la primera amplificando un fragmento mayor del gen *gltA* (834-pb), la segunda amplificando un fragmento de 532-pb del gen *ompA* (los cebadores utilizados para amplificar el gen *ompA* son específicos para rickettsias del grupo fiebre manchada) y la tercera amplificando un fragmento de 549-pb del gen *htrA*. Para la detección de ADN de bacterias de los géneros *Anaplasma* y *Ehrlichia* (Familia: Anaplasmataceae), cada ADN de garrapatas fue sometido a dos PCR convencionales. Una amplificando un fragmento de 409-pb del gen *dsb* y otra amplificando un fragmento de 458-pb del gen *Msp5*, para *Ehrlichia* y *Anaplasma* respectivamente. Todas las PCRs se desarrollaron utilizando dos controles, un control negativo (agua) y un control positivo que varió según la PCR en cuestión (*R. massiliae*, *E. canis* y *A. marginale*). En la Tabla 9 se muestran los cebadores utilizados para cada amplificación y en la Tabla 10 se describen las condiciones de ciclado en cada PCR. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados según se describe en el capítulo tres de la parte I de la presente tesis. Las secuencias se editaron utilizando BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) con edición manual cuando fue necesario, alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson y col., 1994) y comparadas con secuencias depositadas en GenBank. Los análisis filogenéticos se realizaron aplicando métodos de máxima verosimilitud utilizando el programa MEGA 5.0 (Tamura y col., 2011). Los modelos de sustitución de mejor ajuste se determinaron con el Criterio de Información de Akaike usando la prueba del modelo ML implementada en MEGA5. Los modelos de sustitución aplicados fueron GTR (G + I) para los genes *gltA* y *ompA*, y GTR + G para *htrA*. El soporte para las topologías se probó mediante bootstrapping por 1000 repeticiones y se excluyeron los *gaps* de las comparaciones.

Tabla 9: Cebadores utilizados para la detección de bacterias *Ehrlichia* spp, *Rickettsia* spp. y *Anaplasma* spp.

Patógeno	Gen	Cebador o primer	Referencia
<i>Ehrlichia</i> spp.	<i>Dsb</i>	dsb 330; 5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3' dsb 728; 5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAG-3'	Doyle y col., 2005
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i> <sup>a</sup>	CS 239; 5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3' CS 1069; 5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3'	Labruna y col., 2004
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>gltA</i> <sup>b</sup>	CS5; 5'-GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT-3' CS6; 5'-AGGGTCTTCGTGCATTTCTT-3'	Guedes y col., 2005 Labruna y col., 2004
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>ompA</i>	Rr 190.70p; 5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3' Rr 190.602n; 5'-AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT-3'	Regnery y col., 1991
<i>Rickettsia</i> spp	<i>htrA</i>	17k-3; 5'-TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC-3' 17k-5; 5'-GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA-3'	Labruna y col., 2004
<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Msp5</i>	<i>Extfor</i> ; 5'-GCATAGCCTCCGCGTCTTTC-3' <i>Extrev</i> ; 5'-TCCTCGCCTTGGCCCTCAGA-3'	Torioni de Echaide y col., 1998

<sup>a</sup> PCR convencional; <sup>b</sup> PCR en tiempo real

Tabla 10: Condiciones de ciclado de las diferentes PCR (reacción de polimerasa en cadena) para la detección de bacterias *Ehrlichia* sp., *Rickettsia* sp. y *Anaplasma* sp. según genes y cebadores

Gen	Cebador		Ciclado		
<i>gltA</i> <sup>a</sup>	CS-5	95°C	3 minutos		
	CS-6	95°C	15 segundos	40 ciclos	
		48°C	30 segundos		
	<i>gltA</i> <sup>b</sup>	CS-239	72°C		30 segundos
		CS-1069	72°C		7 minutos
<i>OmpA</i>	Rr 190.70p	95°C	5 minutos		
	Rr 190.602n	95°C	40 segundos	35 ciclos	
		58°C	30 segundos		
		65°C	45 segundos		
		72°C	10 minutos		
<i>htrA</i>	17k-3	94°C	3 minutos		
	17k-5	94°C	45 segundos	35 ciclos	
		56°C	30 segundos		
		72°C	90 segundos		
		72°C	10 minutos		
<i>Dsb</i>	dsb 330	95°C	2 minutos		
	dsb 728	95°C	15 segundos	35 ciclos	
		62°C	30 segundos		
		72°C	30 segundos		
		72°C	5 minutos		
<i>Msp5</i>	<i>Extfor</i>	95°C	3 minutos		
	<i>Extrev</i>	95°C	30 segundos	35 ciclos	
		65°C	58 segundos		
		72°C	30 segundos		
		72°C	10 minutos		

<sup>a</sup> PCR en tiempo real; <sup>b</sup> PCR convencional

## Resultados

Se procesaron un total de 2.458 garrapatas, 534 especímenes de *A. tonelliae* (160 ninfas y 374 adultos) y 1924 de *A. sculptum* (1247 ninfas y 677 adultos) (Tablas 11 y 12). Del total de garrapatas analizadas, el gen *gltA* pudo ser amplificado en tres de ellas, dos adultos de *A. tonelliae*, uno de la localidad de Palma Sola, Jujuy (PSJ) y otro de la localidad de El Tunal, Salta (ETS) y un adulto de *A. sculptum* de la Reserva privada El Bagual, Formosa (RPBF). De las tres garrapatas positivas a *gltA* solo *A. tonelliae* de PSJ fue positiva a la amplificación del gen *ompA*. Además, pudo obtenerse una secuencia parcial del gen *htrA* para *A. tonelliae* de ETS con el fin de confirmar los hallazgos mediante el gen *gltA*. La secuencia del gen *gltA* de *A. tonelliae* de ETS mostró que la rickettsia detectada no pertenece a ninguna de las especies o cepas descritas previamente. La misma se nombró como *Rickettsia* sp. cepa “El Tunal”, la cual desde una perspectiva filogenética está estrechamente relacionada con las especies de *Rickettsias* pertenecientes al grupo canadensis, *Rickettsia monteiroi*, *Rickettsia canadensis* y *Candidatus* "*Rickettsia tarasevichiae*". Estas rickettsias se agruparon todas juntas en un clado con alto soporte para los genes *gltA* y *htrA* (Figuras 24 y 25). La secuencia *gltA* de *Rickettsia* sp. cepa “El Tunal”, detectada en *A. tonelliae* de ETS (número de acceso a Genbank-KP171629) difirió en más de 4,8% con las secuencias del gen *gltA* de *R. monteiroi* (FJ269035), *R. canadensis* (U59713) y *Candidatus* "*R. Tarasevichiae*" (DQ168983). Las diferencias genéticas para el gen *gltA* se confirmaron con las divergencias genéticas encontradas entre las secuencias del gen *htrA* de *A. tonelliae* de ETS (número de acceso a Genbank: KP171630) y las secuencias del gen *htrA* de *R. monteiroi* (FJ269036), *R. canadensis* (AF445381) y *Candidatus* "*R. tarasevichiae*" (JX996052), las que fueron siempre superiores al 11,5%.

La secuencia parcial del gen *gltA* de *A. tonelliae* de PSJ (número de acceso a Genbank: KP171628) fue idéntica a la secuencia del gen *gltA* de *Rickettsia amblyommatis* sp. nov. (nombrado como *Candidatus* "*R. Amblyommii*"<sup>1</sup> cepa An13, DQ517290) hallada en *A. neumanni* de Argentina, formando un clado

---

<sup>1</sup> Si bien el nombre *Candidatus* "*R. amblyommii*" propuesto en el año 1995 ha sido aceptado por muchos autores desde entonces, este nombre no se ajusta al Código Internacional de Nomenclatura Procariota, por lo que ha sido renombrado recientemente por Karpathya y col. (2016) como *Rickettsia amblyommatis* sp. nov. Los resultados expuestos en esta tesis ya han sido publicados como *Candidatus* "*R. amblyommii*", pero se reportan aquí como *Rickettsia amblyommatis* sp. nov.

de alto soporte con *R. amblyommatis* cepa AcaIII de Brasil (nombrado como *Candidatus* "R. amblyommii" de la cepa AcaIII de Brasil, AY375163) (Figura 24).

El análisis filogenético de las secuencias de *ompA* confirmó los resultados obtenidos con *gltA*, mostrando que la secuencia de PSJ (número de acceso a Genbank: KP171631) estaba estrechamente relacionada con la secuencia de *R. amblyommatis* de Argentina (nombrado como *Candidatus* "R. amblyommii" DQ517292) y Estados Unidos (AY062007) (Figura 26). Por otro lado, la secuencia parcial del gen *gltA* para *A. sculptum* de RPBF fue idéntica, en un 99,9%, a las secuencias correspondientes de *Rickettsia bellii* disponibles en el Genbank (números de acceso U59716 y CP000087) (Figura 27).

De todos los ADNs de garrapatas procesados (Tablas 11 y 12) no se amplificó, en ningún caso, ADN de bacterias de los géneros *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp.

Tabla 11: Localidades de procedencia de garrapatas *Amblyomma tonelliae* sometidas a amplificación de ADN de bacterias de los géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Anaplasma*. En rojo se muestra localidad con garrapatas positivas a rickettsias del grupo fiebre manchada, en verde localidad con garrapatas positivas a rickettsias que no pertenecen al grupo fiebre manchada. Las coordenadas geográficas se muestran en grados sexagesimales.

Especie	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Estadio	<i>Rickettsia</i> spp. <sup>a</sup>	<i>Ehrlichia</i> spp. <sup>a</sup>	<i>Anaplasma</i> spp. <sup>a</sup>
<i>Amblyomma tonelliae</i>	<b>Chaco</b>							
		PN. El Impenetrable	25°10'S	61°05'O	Adultos	11	11	11
	<b>Formosa</b>							
		Subteniente Perín	25°39'S	60°07'O	Ninfas	1	1	1
		El Simbolar	24°16'S	61°08'O	Adultos	3	3	3
		a 15km de Las Lomitas	24°34'S	60°38'O	Adultos	2	2	2
		RN. Formosa	24°17'S	61°50'O	Adultos	10	10	10
	<b>Jujuy</b>							
		Palma Sola	23°58'S	64°17'O	Adultos	50	50	50
		20 km NE de Palma Sola	23°49'S	64°13'O	Adultos	64*	64	64
		La Ronda	24°4'S	64°14'O	Adultos	2	2	2
					Ninfas	58	58	58
		Saladillo	24°01'S	64°15'O	Adultos	33	33	33
					Ninfas	88	88	88
		10 km O de Palma Sola	23°59'S	64°22'O	Adultos	56	56	56
	<b>Salta</b>							
		Las Tortugas	24°14'S	64°06'O	Adultos	26	26	26
		La Estrella	23°48'S	64°0'O	Adultos	29	29	29
		El Tunal	25°14'S	64°23'O	Adultos	27*	27	27
					Ninfas	13	13	13

Rosario de la Frontera	25° 47'S	64°58'O	Adulto	1	1	1
Virgilio Tedín	25°3'S	64°59'O	Adultos	48	48	48
9km NO Gral. Pizarro	24°10'S	64° 03'O	Adultos	1	1	1
<b>Santiago del Estero</b>						
PN. Copo	25°55'S	61°43'O	Adultos	11	11	11
<b>Total</b>				<b>534</b>	<b>534</b>	<b>534</b>

PN Parque Nacional; RN Reserva Natural; NE Noreste; O Oeste; NO Noroeste; <sup>a</sup> Numero de garrapatas procesadas; \*Un individuo positivo.

Tabla 12: Localidades de procedencia de garrapatas *Amblyomma sculptum* sometidas a amplificación de ADN de bacterias de los géneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Anaplasma*. En verde, localidad con garrapatas positivas a rickettsias que no pertenecen al grupo fiebre manchada. Las coordenadas geográficas se muestran en grados sexagesimales.

Especie	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Estadio	<i>Rickettsia</i> spp. <sup>a</sup>	<i>Ehrlichia</i> spp. <sup>a</sup>	<i>Anaplasma</i> spp. <sup>a</sup>	
<i>Amblyomma sculptum</i>	<b>Chaco</b>								
		Fortín Lavalle	25°41'S	60°11'O	Adulto	1	1	1	
		PN. El Impenetrable	25°10'S	61°05'O	Adultos	10	10	10	
		PN. Chaco	26°49'S	59°40'O	Adultos	49	49	49	
					Ninfas	155	155	155	
		<b>Formosa</b>							
		Subteniente Perín	25°39'S	60°07'O	Ninfas	27	27	27	
		El Simbolar	24°16'S	61°08'O	Adulto	1	1	1	
		RN. Formosa	24°17'S	61°50'O	Adultos	8	8	8	
		RP. El Bagual	26°10'S	58°56'O	Adultos	46*	46	46	
					Ninfas	678	678	678	
		<b>Jujuy</b>							
		Palma Sola	23°58'S	64°17'O	Adultos	102	102	102	
		15 km NO de Palma Sola	23°53'S	64°21'O	Adultos	23	23	23	
		La Ronda	24°4'S	64°14'O	Adultos	4	4	4	
					Ninfas	6	6	6	
		El Fuerte	24°15'S	64°24'O	Adultos	86	86	86	
		Saladillo	24°01'S	64°15'O	Adultos	49	49	49	

			Ninfas	4	4	4
	Santa Clara	24°18'S	64°39'O	Adultos	74	74
			Ninfas	16	16	16
	RP. Eco-Portal de Piedras	24°05'S	64°23'O	Adultos	190	190
			Ninfas	361	361	361
<b>Salta</b>						
	Las Tortugas	24°14'S	64°06'O	Adultos	32	32
	Tartagal	22°30'S	63°48'O	Adultos	2	2
<b>Total</b>				<b>1924</b>	<b>1924</b>	<b>1924</b>

*PN* Parque Nacional; *RP* Reserva Privada; *RN* Reserva Natural; *NO* Noroeste; <sup>a</sup> Numero de garrapatas procesadas; \*Un individuo positivo.

Figura 24: Árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen *gltA*. En negrita se muestran las secuencias del gen *gltA* obtenidas de ADN de garrapatas *Amblyomma tonelliae*. Los números representan el soporte de bootstrap a partir de 1000 repeticiones. Entre paréntesis se muestran los números acceso a GenBank.

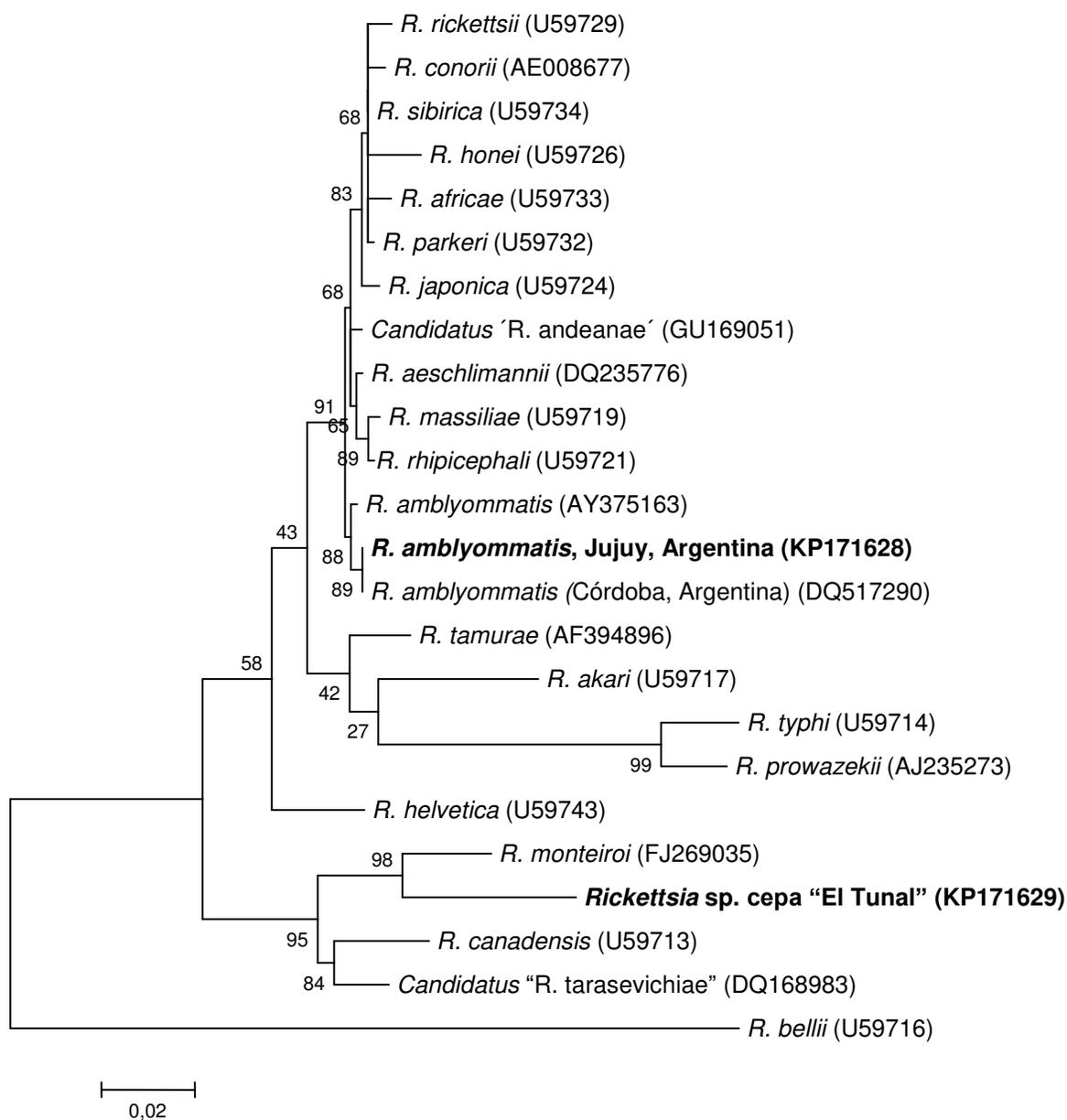


Figura 25: Árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen *htrA*. En negrita se muestran las secuencias del gen *htrA* obtenidas de ADN de garrapatas *Amblyomma tonelliae*. Los números representan el soporte de bootstrap a partir de 1000 repeticiones. Entre paréntesis se muestran los números de acceso a GenBank.

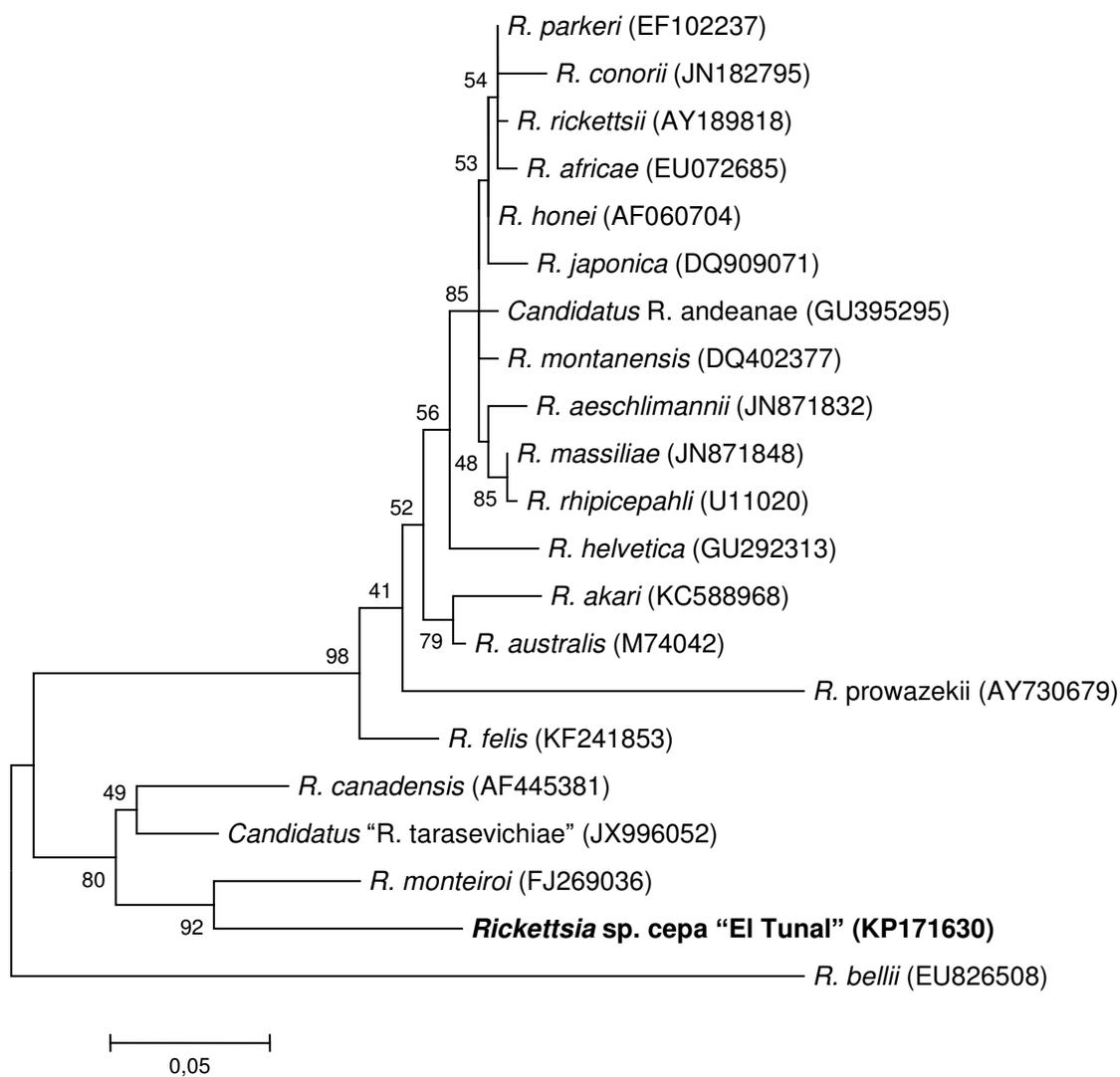


Figura 26: Árbol de máxima verosimilitud construido a partir de secuencias parciales del gen *ompA*. En negrita se muestran las secuencias de gen *ompA* obtenida a partir de ADN de garrapatas *Amblyomma tonelliae*. Los números representan el soporte de bootstrap generado a partir de las 1000 repeticiones. Los números de acceso a GenBank se muestran entre paréntesis.

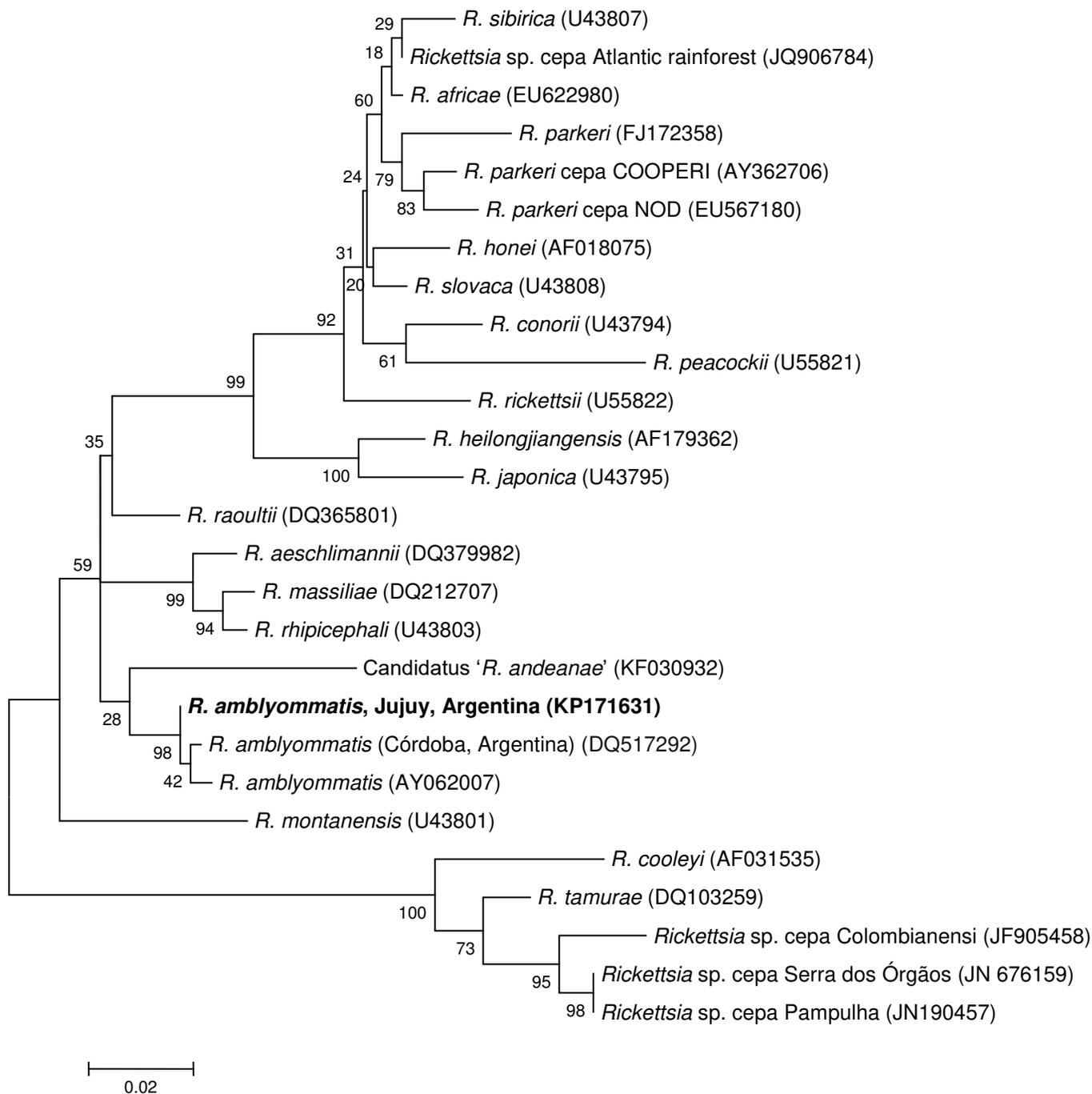
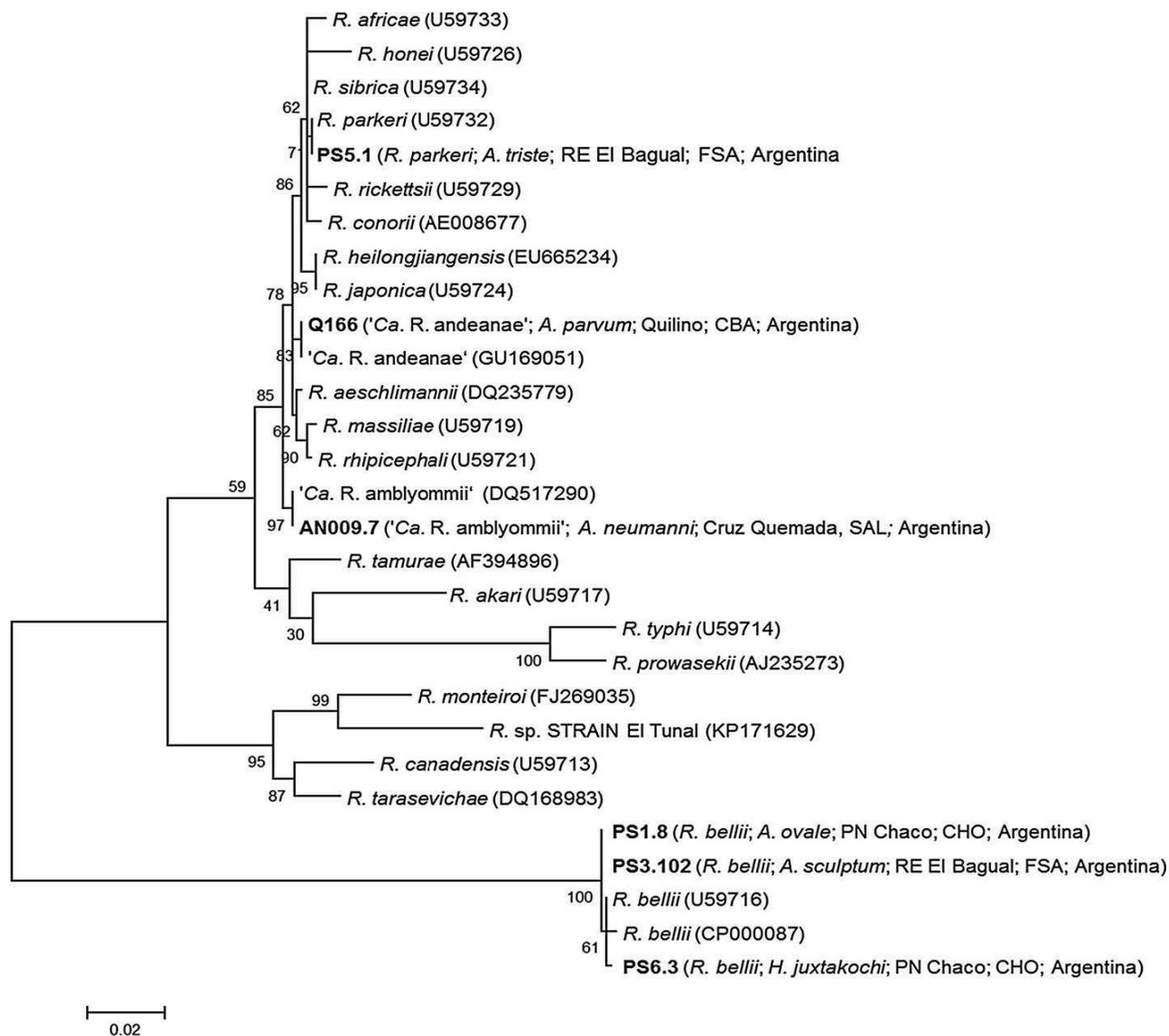


Figura 27: Árbol de máxima verosimilitud construido a partir de secuencias parciales del gen *gltA*. PS3.102 en negrita corresponde a la secuencia del gen *gltA* obtenida a partir de ADN de garrapatas *Amblyomma sculptum*. Los números representan el soporte de bootstrap generado a partir de las 1000 repeticiones. Los números de acceso a GenBank se muestran entre paréntesis.



## Discusión

El análisis de las secuencias de los genes *gltA* y *htrA* han demostrado que la bacteria detectada en un adulto de *A. tonelliae* de ETS representa un nuevo linaje dentro del género *Rickettsia*, al que se ha llamado *Rickettsia sp.* cepa El Tunal. Filogenéticamente, esta *Rickettsia* está estrechamente relacionada con *R. monteiroi*, y forman un clado junto con *R. canadensis* y *Candidatus "R. tarasevichiae"* (Figuras 24 y 25). Este hecho indica que *Rickettsia sp.* cepa El Tunal pertenece al grupo canadensis. Se considera que la divergencia genética para las secuencias de *gltA* y *htrA* (ver resultados) entre *Rickettsia sp.* cepa El Tunal y las tres especies del grupo canadensis fueron superiores a los valores esperados en caso de un polimorfismo intraespecífico (Fournier y Raoult, 2009; Pacheco y col. 2011). Sin embargo, para realizar una caracterización completa de este nuevo linaje, *Rickettsia sp.* cepa El Tunal, es necesario realizar comparaciones de genes adicionales y aislamiento de la bacteria en cultivos celulares. *R. monteiroi*, *R. canadensis*, *Candidatus "R. tarasevichiae"* y *Rickettsia sp.* cepa El Tunal constituyen un grupo filogenético con suficiente soporte, que se encuentra distante de las restantes especies de Rickettsias, aún habiéndose encontrado vinculadas a especies de garrapatas sin relación filogenética entre ellas y de localidades distantes. *R. monteiroi* se aisló de garrapatas *Amblyomma incisum* de Brasil (Pacheco y col., 2011), *R. canadensis* se detectó en garrapatas *Haemaphysalis leporispalustris* del Norte y Centroamérica (McKiel y col., 1967, Parola y col., 2013) y *Candidatus "R. tarasevichiae"* se ha vinculado con *Ixodes persulcatus* y *Haemaphysalis japonica* de Rusia y Japón (Eremeeva y col., 2006, Mediannikov y col., 2006, Inokuma y col., 2007). A pesar de que algunos de sus potenciales vectores pueden ser agresivos para los seres humanos, como es el caso de *A. incisum* y *A. tonelliae* (Guglielmone y col., 2006; Nava y col., 2014), la patogenicidad de *R. monteiroi*, *R. canadensis* y *Rickettsia sp.* cepa El Tunal permanece hasta el momento incierta. *Candidatus "R. tarasevichiae"* constituye una excepción, ya que ha sido implicado como patógeno de humanos en China (Jia y col., 2013).

El hallazgo de *R. amblyommatis* en *A. tonelliae* de PSJ constituye el primer registro de esta asociación. *R. amblyommatis* ha sido previamente detectado en Argentina infectando garrapatas *A. neumanni* de las provincias de Jujuy y Córdoba y *Amblyomma hadanii* de Salta (Labruna y col., 2007; Mastropaolo y col., 2016; Saracho Bottero y col., 2015). *Amblyomma tonelliae* tiene una distribución en simpatria con *A. neumanni*, en el Chaco Seco, pero no así con *A. hadanii*, especie endémica de la selva nublada de

La Yunga. Por lo que resulta interesante determinar, en futuros estudios, si existe variación genética a nivel intraespecífico entre *R. amblyommatis* de garrapatas del Chaco Seco y de La Yunga. Además de en Argentina, *R. amblyommatis* ha sido reportado en otros países de América, como Brasil, Costa Rica, Guyana Francesa, Panamá y Estados Unidos asociado a varias especies de garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus* (Labruna y col., 2011; Parola y col., 2013; Saraiva y col., 2013), incluyendo otras especies del complejo *A. cajennense*, como ser *A. mixtum*, *A. sculptum* y *A. cajennense* s.s (Labruna y col., 2004, Bermúdez y col., 2009, Hun y col., 2011, Alves y col., 2014; Nunes y col., 2015). La ubicuidad de *R. amblyommatis* implica un riesgo para la salud pública porque se encuentra en diferentes vectores potenciales a lo largo de un amplio rango geográfico aumentando la probabilidad de su transmisión a los seres humanos. En este sentido, Apperson y col. (2008) han sugerido que algunos casos de rickettsiosis en humanos reportados en Estados Unidos pueden haber sido causados por *R. amblyommatis* (nombrado como *candidatus* "R. amblyommii"), si bien esta hipótesis no se ha confirmado hasta el momento, estudios experimentales realizados por Rivas y col. (2015) demostraron la patogenicidad de *R. amblyommatis* en cobayos y su capacidad para generar inmunidad protectora contra *R. rickettsii* lo que, según los autores, podría modular la epidemiología y severidad de la enfermedad de la fiebre manchada en áreas donde ambas especies circulan.

*Rickettsia bellii* es una bacteria con patogenicidad desconocida (Parola y col., 2013), si bien durante el presente estudio se encontró infectando garrapatas *A. sculptum* de la provincia de Formosa, esta rickettsia fue reportada previamente en Argentina, infectando garrapatas, *A. neumanni*, *A. tigrinum*, *A. dubitatum*, *A. ovale* y *H. juxtakochi* (Labruna y col., 2007; Monje y col., 2015; Sebastian y col., 2016). Este hallazgo constituye el primer informe de *R. bellii* asociado a *A. sculptum*.

Si bien, en el presente estudio no se ha detectado infección con *R. rickettsii* en *A. tonelliae* ni en *A. sculptum*, esta bacteria es la especie más patógena en América del Sur, y las garrapatas del complejo *A. cajennense* son sus principales vectores (Labruna, 2009). Aunque una cierta proporción de garrapatas analizadas correspondían a localidades próximas donde se han reportado casos humanos de fiebre manchada por *R. rickettsii* (Ripoll y col., 1999; Paddock y col., 2008; Seijo y col., 2016), este hallazgo era esperable dado que, se ha demostrado que la tasa de infección de poblaciones naturales de *A. cajennense* s.l con *R. rickettsii* es relativamente baja (usualmente  $\leq 1\%$ ) o inexistente (Sangioni y col., 2005; Krawczak y col., 2014), contrariamente a lo que ocurre con *R. amblyommatis*, observándose tasas de infección en garrapatas del complejo *A. cajennense* comúnmente  $> 25\%$  (Bermúdez y col.,

2009; Labruna y col., 2004). La baja tasa de infección con *R. rickettsii* en garrapatas de vida libre del complejo *A. cajennense*, se vinculó con la elevada letalidad que provoca esta bacteria en garrapatas del complejo (Labruna y col., 2008). Según Szabó y col. (2013), *A. sculptum* (nombrado como *A. cajennense*), requiere la participación de un hospedador amplificador para mantener *R. rickettsii* en poblaciones naturales debido a que esta garrapata es incapaz de mantener *R. rickettsii* a través de generaciones sucesivas. En Brasil, estudios experimentales incriminan a *H. hydrochaeris* (carpinchos) y *Didelphis aurita* (comadreja) como hospedadores amplificadores de *R. rickettsii* en poblaciones de *A. sculptum* (Hora y col., 2009, Souza y col., 2009). Estas dos especies de mamíferos no están presentes en el rango de distribución de *A. tonelliae*, pero sí en el de poblaciones de *A. sculptum* de Argentina (ver capítulo 1, parte I). Futuros estudios son necesarios para determinar los potenciales amplificadores vertebrados de *R. rickettsii* que podrían actuar como hospedadores de *A. tonelliae* y *A. sculptum* de Argentina. Si bien, como se mencionó anteriormente, la tasa de infección de garrapatas de vida libre con *R. rickettsii* es baja, la actitud vectorial de *A. sculptum* (nombrado como *A. cajennense*) y *A. tonelliae* ha sido comprobada mediante estudios experimentales (Soares y col., 2012; Tarragona y col., 2016).

En el presente estudio no se han reportado especímenes de *A. tonelliae* y *A. sculptum* naturalmente infectadas con bacterias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Estos resultados se refuerzan, para el caso de *Ehrlichia*, por estudios realizados en Brasil, donde a pesar de analizarse más de 1.500 garrapatas *A. sculptum* en busca de infección con *Ehrlichia*, de ninguna de ellas pudo amplificarse ADN de estas bacterias (Carvalho y col., 2016). En el caso de bacterias del género *Anaplasma*, estudios experimentales realizados por la tesista y el grupo de trabajo al que esta pertenece (en preparación), demostraron la ausencia de aptitud vectorial por parte de *A. tonelliae* y *A. sculptum* para transmitir *A. marginale* a los bovinos domésticos.

## Conclusión general

Tanto *A. tonelliae* como *A. sculptum* demostraron tener una alta especificidad por el hábitat, condicionando su distribución a áreas donde las características micro-ambientales eran óptimas para su desarrollo, no dependiendo de la distribución de los hospedadores. En este trabajo de tesis no solo se refuerza la hipótesis de Nava y Guglielmo (2013) de la ausencia de una especificidad estricta de las dos especies por el hospedador, sino que además se denota una remarcable capacidad para adaptarse a hospedadores domésticos introducidos. Las diferencias genéticas intraespecíficas encontradas en las secuencias del gen 16S para las dos especies fueron escasas, nunca superaron el 0,5%, demostrando que todos los especímenes de *A. sculptum* y *A. tonelliae* analizados de las diferentes poblaciones de la República Argentina pertenecen a la misma especie y que las dos especies tienen una baja diversidad genética intra-específica.

La distribución geográfica de *A. tonelliae* en Argentina se restringe a la Eco- región del Chaco Seco sensu Burkart y col. (1999). El nicho ecológico de distribución potencial de *A. tonelliae* en América del Sur también se vio restringido a la eco-región del Chaco Seco de Argentina, Bolivia y Paraguay. La distribución geográfica se divide en dos grandes grupos de poblaciones (este y oeste). Las poblaciones del oeste se distribuyen en las provincias de Jujuy y Salta, y las poblaciones del este están distribuidas en el extremo oriental de la subregión Chaco Semiárido, provincias de Formosa, Chaco y Santiago del Estero. Los dos grupos de poblaciones se ven separadas por un área de ausencia en el centro de la subregión del Chaco semiárido (“El impenetrable”), observándose no sólo en los mapas de distribución basados en presencias sino también en el rango de distribución potencial para la especie. Se hipotetiza que las características ecológicas en el área de ausencia, el balance hídrico negativo, las características de la fisonomía vegetal, y una reducida vagilidad de hospedadores domésticos, hacen de esta área un microambiente no compatible con el desarrollo de *A. tonelliae*. La topología de la red de haplotipos en relación a la distribución geográfica antes descripta muestra que las poblaciones de *A. tonelliae* del este (haplotipo I ancestral y haplotipo IV) no comparten haplotipos con las poblaciones del oeste (haplotipo II de alta frecuencia y haplotipo III) y que el flujo génico entre ambos grupos de poblaciones es restringido.

En cuanto a la distribución geográfica de *A. sculptum*, se muestra una distribución real para Argentina restringida principalmente a la región del Chaco Húmedo (provincias de Formosa, Chaco y Corrientes), Selvas Pedemontana y montana de la Eco- región de la Yunga (Jujuy y Salta) y bosques ribereños o de albardones que recorren la vera de los grandes ríos que componen los humedales del Chaco Seco (Formosa, Chaco y Salta) y una distribución potencial amplia para Sudamérica, abarcando los biomas de la Selva Mata Atlántica, La Yunga y Chaco Húmedo en áreas de Brasil, Paraguay y norte de Argentina (donde existen datos de presencia), hasta la Selva Paranaense, Catinga de Brasil, Bosque Chiquitano de Bolivia, Valle interandino de Colombia, Bosque pacífico del Ecuador y Valle interandino de Perú (como áreas de distribución potencial). La topología de la red de haplotipos en relación a la distribución geográfica antes descrita muestra un haplotipo I ancestral que está presente en la mayoría las poblaciones estudiadas coexistiendo con los haplotipos restantes (II, III y IV). Esto último da cuenta de expansión poblacional “reciente”. Si bien existe cierto grado de estructuración genética entre las poblaciones de *A. sculptum*, las regiones geográficas no contribuyen en gran medida a esta diferenciación, sino que al igual que en el caso de *A. tonelliae* la variación genética entre poblaciones es probable que se deba a las características ecológicas de cada microambiente, por limitado flujo de genes entre poblaciones no atribuible a barreras geográficas.

*Amblyomma tonelliae* y *A. sculptum* comparten áreas de co-ocurrencia en Argentina. Esta distribución parapátrica se observó en zonas de transición entre las Selvas Pedemontana y montana de La Yunga y el Chaco Seco y zonas de transición entre Chaco Seco y bosques ribereños en los humedales del Chaco Seco. Se deduce que la temperatura no es estadísticamente significativa para los sitios en los que las dos especies se encuentran en parapatría, con excepción de un período aproximado de 12 semanas en primavera y verano, cuando la temperatura era intermedia en parapatría en relación con los sitios de alopatría. Esta observación sugiere que esas 12 semanas son críticas en el ciclo de vida de *A. sculptum* y *A. tonelliae* y que por lo tanto sólo coexistirán en sitios con las condiciones apropiadas. Sin embargo, en términos de NDVI, los sitios en los que se pronosticó coexistencia de *A. sculptum* y *A. tonelliae* no eran intermedios en relación con sitios en los que se predijo que las especies estarían en alopatría. El NDVI para áreas de parapatría fue de 15-20% más alto que en las áreas de alopatría en todo el año. Se hipotetiza que las relaciones complejas (no lineales) entre las variables abióticas pueden ser los factores primarios que modulan la co-ocurrencia entre las dos especies.

En cuanto a la distribución estacional de las dos especies, tanto *A. tonelliae* como *A. sculptum* tienen un ciclo de vida con una generación por año, en coincidencia con lo descrito en Brasil (Oliveira y col., 2000, 2003; Labruna y col., 2002). Las larvas de las dos especies están activas desde el otoño hasta mediados del invierno, con el pico de abundancia a finales del otoño y mediados de invierno. Las ninfas se encuentran activas desde principios del invierno hasta finales de la primavera con el pico de abundancia en el comienzo de la primavera en ambas especies. Las hembras de las dos especies se encuentran en la vegetación durante todo el año, pero el pico de abundancia se da a principios y mediados del verano. Es así que las garrapatas adultas predominan durante la estación lluviosa y las etapas inmaduras lo hacen en las temporadas más secas. En consecuencia, la oviposición de las hembras ocurre en temporadas lluviosas, permitiendo durante los períodos de incubación que los huevos no se vean expuestos a un estrés por desecación como así tampoco las larvas.

De los 2.458 especímenes de *A. tonelliae* y *A. sculptum* analizados para la detección de bacterias rickettsiales, sólo de tres especímenes de garrapatas pudo amplificarse ADN bacterial. Se amplificó ADN de: *Rickettsia* sp. cepa “El Tunal” en un espécimen *A. tonelliae* de la localidad de El Tunal, Salta, *R. amblyommatis* de un espécimen de *A. tonelliae* cercano a la localidad de Palma Sola, Jujuy y *R. bellii* de un espécimen *A. sculptum* de la Reserva Privada El Bagual, Formosa. En ningún caso se asoció infección con *Ehrlichia* sp. o *Anaplasma* sp. a *A. tonelliae* o *A. sculptum*. El hallazgo de *R. amblyommatis* en *A. tonelliae* se considera de importancia sanitaria potencial teniendo en cuenta que: algunos autores han asociado a este microorganismo con casos de enfermedad rickettsial en humanos (Apperson y col., 2008), que la prevalencia de infección en garrapatas del complejo *A. cajennense* es comúnmente mayor al 25% (Bermúdez y col., 2009; Labruna y col., 2004) ya que algunos estudios sugieren que la primo infección de un hospedador con, *R. amblyommatis* proporciona inmunidad cruzada contra *R. rickettsii* (Rivas y col., 2015) lo que podría modular la epidemiología y severidad de la enfermedad de la fiebre manchada en áreas donde ambas especies circulan. Si bien no se detectaron garrapatas infectadas con *R. rickettsii*, lo cual era esperable considerando la prevalencia de infección con *R. rickettsii* en garrapatas del complejo *A. cajennense* (menor al 1%), el riesgo potencial de ocurrencia de casos por este patógeno existe. Teniendo en cuenta que: se ha comprobado experimentalmente que las dos especies de garrapatas (ninfas y adultos) poseen competencia vectorial para transmitir *R. rickettsii* experimentalmente (Soares y col., 2012; Tarragona y col., 2016), que se han

reportado casos de fiebre manchada en humanos en el área de distribución de las dos especies de garrapatas (Ripoll y col., 1999; Paddock y col., 2008; Seijo y col., 2016), que todos los estadios de estas dos especies de garrapatas parasitan durante todo el año a humanos en los sitios con presencia de casos y a que se desconoce la presencia de posibles hospedadores amplificadores en los sitios, es que se estima que la fiebre manchada por *R. rickettsii* en Argentina es una enfermedad que se comporta con una tendencia cíclica con pulsaciones endémicas (Thursfield, 2007). Es decir que, la probabilidad de ocurrencia de casos está estrechamente vinculada a: la dinámica estacional de los vectores (teniendo en cuenta que los casos reportados coinciden con las estaciones del año donde priman ninfas y adultos de *A. tonellilae* y *A. sculptum*) y a la densidad de hospedadores susceptibles, ya que las áreas donde se han reportado los casos humanos corresponden a zonas donde si bien la población humana estable es baja, la densidad de animales domésticos de producción que pueden sustentar el ciclo de estas dos garrapatas está actualmente en aumento, debido principalmente al cambio en el uso de la tierra por la expansión del área agrícola en el centro del país y el desplazamiento de la ganadería hacia áreas del norte argentino donde *A. tonelliae* y *A. sculptum* prevalecen (Gasparri y Grau, 2009).

#### **Estudios futuros propuestos en relación a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis:**

- Determinar si la ausencia de *A. tonelliae* en la región coloquialmente conocida como “El Impenetrable” está vinculada a condiciones micro-ambientales negativas para el desarrollo de la especie o a un sesgo vinculado a esfuerzo de muestreo.
- Determinar cuáles son las variables climáticas a micro-escala que modulan la ocurrencia de *A. tonelliae* y *A. sculptum* en áreas de parapatría.
- Determinar si la actividad estacional de *A. tonelliae* y *A. sculptum* de Argentina son modulados por diapausa comportamental de larvas como ocurre en poblaciones de *A. sculptum* de latitudes tropicales.
- Determinar, utilizando marcados moleculares con altas tasas de mutación, si la estructuración genética de *A. sculptum* y *A. tonelliae* puede ser atribuible al grado de fragmentación de hábitat

de carácter antrópico y si es plausible vincular la aptitud vectorial al grado de variabilidad genética entre poblaciones de la misma especie.

- Determinar si existe variación genética a nivel intraespecífico entre *R. amblyommatis* aislado de garrapatas del Chaco Seco y de La Yunga.
- Determinar los potenciales amplificadores vertebrados de *R. rickettsii* que podrían actuar como hospedadores de *A. tonelliae* y *A. sculptum* de Argentina.

# Bibliografía

- Adler GH, Telford SR, Wilson ML, Spielman A. 1992. Vegetation structure influences the burden of immature *Ixodes dammini* on its main host, *Peromyscus leucopus*. *Parasitology*. 105: 105-110.
- Alfonso E. 2007. El desarrollo local en un contexto de asimetrías regionales. El caso de la provincia del Chaco.  
<http://www.econ.uba.ar/planfenix/novedades/Area%20III/El%20desarrollo%20local%20en%20un%20contexto%20-%20Alfonso.pdf>.
- Alves ADS, Melo A L, Amorim MV, Borges AM, Silva LGE, Martins TF, Pacheco RC. 2014. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in equids and molecular detection of ‘*Candidatus Rickettsia amblyommii*’ in *Amblyomma cajennense* sensu lato ticks from the Pantanal region of Mato Grosso, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 51(6): 1242-1247.
- Anderson RP. 2013. A framework for using niche models to estimate impacts of climate change on species distributions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1297: 8 –28.
- Anderson RP, González I. 2011. Species specific tuning increases robustness to sampling bias in models of species distributions: an implementation with Maxent. *Ecological Modelling*. 222: 2796–2811.
- Apperson CS, Engber B, Nicholson WL, Mead DG, Engel J, Yabsley MJ, Dail K, Johnson J, Watson DW. 2008. Tick-borne diseases in North Carolina: is “*Rickettsia amblyommii*” a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever. *Vector Borne Zoonotic Diseases*. 8, 1–9.
- Aragão HB, Fonseca FDA. 1953. Notas de ixodologia. V. A propósito da validade de algumas espécies do género *Amblyomma* do continente Americano. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 51: 485-492.
- Araya-Anchetta A, Busch JD, Scoles GA, Wagner DM. 2015. Thirty years of tick population genetics: A comprehensive review. *Infection, Genetics and Evolution*. 29: 164–179.
- Arthur W. 1982. The evolutionary consequences of interspecific competition. *Advances in Ecological Research*. 12: 127–187.

- Ash A, Elliot A, Godfrey A, Burmej H, Yazid Abdad M, Northover A, Wayne A, Morris K, Clode P, Lymbery A, Thompson RCA. 2017. Morphological and molecular description of *Ixodes woyliei* n. sp. (Ixodidae) with consideration for co-extinction with its critically endangered marsupial host. *Parasites and Vectors*. 10: 70
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Ed. Harvard University Press, Inc. Cambridge. p. 447.
- Avise JC. 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, 2nd Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Niegel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic*. 18: 489–522
- Balashov YS. 1967. Blood-sucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals. *Blood-sucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals*. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America. 8:159-376.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48
- Beati L, Keirans JE. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*. 87: 32-48.
- Beati L, Patel J, Lucas-Williams H, Adakal H, Kanduma EG, Tembo-Mwase E, Krecek R, Mertins JW, Alfred JT, Kelly S, Kelly P. 2012. Phylogeography and demographic history of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the tropical bont tick. *Vector Borne Zoonotic Disease*. 12: 514–525.
- Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti, DM, Labruna MB, Guglielmone AA, Cáceres AG, Guzmán-Cornejo CM, León R, Durden LA, Faccini JLH. 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius,

1787) (Acari: Ixodidae), the Cayennetick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*. 13: 267.

Beck DL, Zavala J, Montalvo EO, Quintana FG. 2011. Meteorological indicators for *Amblyomma cajennense* and populations dynamics in the Tamaulipan biotic province in Texas. *Journal of Vector Ecology*. 36: 135–146.

Belozero VN. 1982. Diapause and biological rhythms in ticks. En: Obenchanin FD, Galun R, *Physiology of Ticks*. p 469–500. Ed. Pergamon Press, Inc. Oxford.

Bermúdez SE, Eremeeva ME, Karpathy SE, Samudio F, Zambrano ML, Zaldivar Y, Dasch GA. 2009. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in eastern Panama. *Journal of Medical Entomology*. 46: 856-861.

Bermúdez SE, Castro AM, Trejos D, García GG, Gabster A, Miranda RJ, Paternina LE. 2016. Distribution of Spotted Fever Group Rickettsiae in Hard Ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments (2007–2013). *EcoHealth*. 13: 274-284.

Biani NB, Vesprini JL, Prado DE. 2006. Conocimiento sobre el gran Chaco Argentino en el siglo XX. *Ecología y Manejo de los bosques de Argentina*. p. 19.

Biello D. 2011. Human population reaches 7 billion—how did this happen and can it go on? *Scientific American*. <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=human-population-reaches-seven-billion>

Bitencourth K, Voloch CM, Serra-Freire NM, Machado-Ferreira E, Amorim M, Gazêta GS. 2016. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. *Medical and Veterinary Entomology*. 30: 342-350.

Black IV WC, Piesman J. 1994. Phylogeny of hard- and soft- tick taxa (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91: 10034-10038.

Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, Dame JB. 1995. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics*. 141: 1007–1014.

Boero JJ. 1957. Las garrapatas de la República Argentina (Acarina: Ixodoidea). Ed. Departamento Editorial Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. p 113.

Burger TD, Shao R, Labruna MB, Barker SC. 2014. Molecular phylogeny of soft ticks (Ixodida: Argasidae) inferred from mitochondrial genome and nuclear rRNA sequences. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 5: 195–207.

Burkart R, Bárbaro O, Sánchez RO, Gómez DA. 1999. *Eco-Regiones de la Argentina*. Administración de Parques Nacionales, Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentables, Buenos Aires.

Cabrera AL. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. 2ª edición, Ed. ACME, Buenos Aires. p. 73.

Cabrera RR, Labruna MB. 2009. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 46: 1303-1309

Carvalho IT, Melo AL, Freitas LC, Verçozza RV, Alves AS, Costa JS, Aguiar DM. 2016. Minimum infection rate of *Ehrlichia minasensis* in *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma sculptum* ticks in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7: 849-852.

Canevari JT, Mangold AJ, Guglielmono AA, Nava S. 2016. Population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in a subtropical subhumid region of Argentina for use in the design of control strategies. *Medical and Veterinary Entomology*. 31: 6-14.

Carnevali R. 1994. Fitogeografía de la provincia de Corrientes: cartas, escalas 1: 500.000 y 1: 1.000.000. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Corrientes, Argentina. p. 324. ISBN, 914426007.

Chebez JC. 2008. Los que se van. Tomo 3, Ed. Albatros. Bs. As. p.176.

Chunco AJ, Jobe T, Pfennig KS. 2012. Why do species co-occur? A test of alternative hypotheses describing abiotic differences in sympatry versus allopatry using spadefoot toads. *PLoS One*. 7, e32748.

- Cicuttin G, Nava S. 2013. Molecular identification of *Rickettsia parkeri* infecting *Amblyomma triste* ticks in an area of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108: 123–125.
- Cicuttin GL, Brambati DF, Rodríguez Eugui JI, Lebrero CG, De Salvo MN, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE, Jado I, Anda P. 2014. Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). *Ticks and Tick-borne Diseases*. 5: 484–488.
- Cox CB, Moore PD. 2000. *Biogeography: An Ecological and Evolutionary Approach* (6th edn). Blackwell Scientific Publications: Oxford.
- Cox J, Brown HE, Rico-Hesse R. 2011. Variation in vector competence for dengue viruses does not depend on mosquito midgut binding affinity. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1172.
- Criscione CD, Blouin MS. 2005. Effective sizes of macroparasite populations: a conceptual model. *Trends in Parasitology*. 21: 212–217
- Criscione CD, Poulin R, Blouin MS. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology*. 14: 2247–2257
- Cumming GS. 2002. Comparing climate and vegetation as limiting factors for species ranges of African ticks. *Ecology*. 83: 255–268.
- Dobzhansky T. 1950. Evolution in the tropics. *American Scientist*. 38: 209–221.
- Donato M, Posadas P, Miranda-Esquivel R, Ortiz Jaureguizar E, Cladera G. 2003. Historical biogeography of the Andean region: evidence from *Listroderina* (Coleoptera: Curculionidae: Rhytirrhini) in the context of the South American geobiotic scenario. *Biological Journal of the Linnean Society*. 80: 339–352.
- Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang YW, Corstvet RE, Hegarty BC, Bloch KC, Li P, Walker DH, McBride JW. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor

TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *Journal of Molecular Diagnostics*. 7: 504-510.

Elith J, Kearney M, Phillips S. 2010. The art of modelling range-shifting species. *Methods in Ecology and Evolution*. 1: 330–342.

Eremeeva ME, Oliveira A, Robinson JB, Ribakova N, Tokarevich NK, Dasch GA. 2006. Prevalence of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* ticks from the Vologda Province of Russia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1078: 291–298.

Espinosa D, Aguilar C, Escalante T. 2001. Endemismo, áreas de endemismo y regionalización biogeográfica. En: *Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: Teorías, conceptos, métodos y aplicaciones*. Llorente J, Morrone JJ eds. p. 31-37. Ed. Las Prensas de Ciencias. Inc. México, D. F.

Estrada- Peña A. 2008. Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitology Research*.103: 87–95.

Estrada-Peña A, Guglielmone AA, Mangold AJ, Castellá J. 1993. Patterns of cuticular hydrocarbon variation and genetic similarity between natural populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Acta Trópica*. 55: 61-78.

Estrada-Peña A, Guglielmone AA, Mangold AJ. 2004. The distribution and ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 98: 283-292.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.

- Faccini-Martínez AA, Costa FB, Ueno TEH, Labruna MB, Hidalgo M. 2015. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* ticks, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*. 21: 537–539.
- Fayer R. 2000. Global change and emerging infectious diseases. *Journal of Parasitology*. 86: 1174–1181.
- Freeland JR. 2005. *Molecular Ecology*. Ed. Willey-Liss. Chichester, West Sussex. p. 388.
- Fries BC, Mayer J. 2009. Climate change and infectious disease. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2009. doi: 10.1155/2009/976403.
- Fourie JJ, Stanneck D, Luus HG, Beugnet F, Wijnveld M, Jongejan F. 2013. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Veterinary Parasitology*. 197: 595-603.
- Fournier PE, Raoult D. 2009. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1166: 1–11.
- Gasparri NI, Grau HR. 2009. Deforestation and fragmentation of Chaco dry forest in NW Argentina (1972–2007). *Forest Ecology and Management* .258: 913–921.
- Gemayel R, Vences MD, Legendre M, Verstrepen KJ. 2010. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annual Review of Genetic*. 44: 445–477.
- Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A., Sobral BS, Azad AF, 2007. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. *PLoS ONE* 2, 266.
- Ginzburg R, Adámoli J, Herrera P, Torrella S. 2005. Los Humedales del Chaco: clasificación, inventario y mapeo a escala regional. *Insugeo, miscelánea*, San Miguel de Tucumán, 121-138.
- Graham CH, Ron SR, Santos JC, Schneider CJ, Moritz C. 2004. Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution*. 58: 1781-1793.

Gray JS. 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Medical and Veterinary Entomology*. 79: 323–333.

Guedes E, Leite RC, Prata MCA, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100: 841–845.

Guglielmone AA, Nava S. 2006. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): distribución y hospedadores. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 35: 135–155.

Guglielmone AA, Mangold AJ, Viñabal AE. 1991. Ticks (Ixodidae) parasitizing humans in four provinces of northwestern Argentina. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 85: 539–542.

Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB. 1990. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle, in Salta, Northwest Argentina. *Veterinary Parasitology*. 35: 93–101.

Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MJP, Martins JR, González Acuña D, Estrada-Peña A. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental and Applied Acarology*. 40: 83–100.

Guglielmone AA, Nava S, Mastropaolo M, Mangold AJ. 2013. Distribution and genetic variation of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 4: 386–390.

Hardin G. 1960. The competitive exclusion principle. *Science*. 131: 1292–1297.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95–98.

Hartl DL. 2000. Molecular melodies in high and low C. *Nature Reviews Genetics*. 1: 145–149.

Hartl DL, Clark AG. 1997. Principles of population genetics. Ed. Sinauer Associates, Sunderland. p. 542.

- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 25: 1965-1978.
- Hilburn LR, Sattler PW. 1986a. Are tick populations really less variable and should they be? *Heredity*. 57: 113–117.
- Hilburn LR, Sattler PW. 1986b. Electrophoretically detectable protein variation in natural populations of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Heredity*. 56: 67–74.
- Hoogstraal, H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advance in Parasitology*. 24: 135-238.
- Hoogstraal H, Aeschlimann A. 1982. Tick-host specificity. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse*. 55: 5-32.
- Horta MC, Moraes-Filho J, Casagrande RA, Saito SCR, Ogrzewalska M, Matushima ER, Labruna MB. 2009. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 9: 109–118.
- Hun L, Troyo A, Taylor L, Babibieri AM, Labruna MB. 2011. First report of the isolation and molecular characterization of *Rickettsia amblyomii* and *Rickettsia felis* in Central America. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11: 1395–1397.
- Hutchinson G E. 1957. The multivariate niche. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 22: 415-421.
- Inokuma H, Ohashi MJ, Tanabe S, Myahara K. 2007. Prevalence of tick-borne *Rickettsia* and *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Tokachidistrict, eastern Hokkaido, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 69: 661–664.
- Ivancovich JC, Luciani CA. 1992. Las garrapatas de Argentina. Monografía. Ed. Mimeo, Bs As. p. 95.

- IPCC. 2007. Climate change 2007: synthesis report. En: Core Writing Team, Pachauri RK, Reisinger A (eds) Contribution of working groups I, II and III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. IPCC. Geneva. p. 104.
- Jia N, Zheng YC, Jiang J, Ma F, Cao LWC. 2013. Human infection with *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. The New England Journal of Medicine. 369:1178–1180.
- Jongejan F, Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. Parasitology. 129: S1-S12
- Karpathy SE, Slater KS, Goldsmith CS, Nicholson WL, Paddock CD. 2016. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with multiple species of Amblyomma ticks in North and South America. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66: 5236-5243.
- Krasnov BR, Korolov Vinarskay NP, Vinarski MV, Shenbrot D, Mouillot GI, Poulin R. 2008. Searching for general patterns in parasite ecology: host identity versus environmental influence on gamasid mite assemblages in small mammals. Parasitology. 135, 229–242.
- Kelly PJ, Lucas H, Yowell C, Beati L, Dame J, Urdaz-Rodriguez J, Mahan S. 2011. *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* and domestic ruminants in the Caribbean. Journal of medical Entomology. 48: 485-488.
- Killmaster LF, Loftis AD, Zemtsova GE, Levin ML. 2014. Detection of bacterial agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from Georgia, USA, and the use of a multiplex assay to differentiate *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii*. Journal of Medical Entomology. 51: 868-872.
- Kimura M, Weiss GH. 1964. The step- ping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. Genetics. 49:561-576.
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Oliver JH. 1996. Evolution of ticks. Annual Review of Entomology. 41:141-161.
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Norris DE. 2000. Systematic and Biogeography of Hard Ticks, a total Evidence Approach. Cladistic. 16: 79-102.

- Klompfen H, Lekveishvili M, Black IV WC. 2007. Phylogeny of parasitiform mites (Acari) based on rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43: 936-951.
- Kocan KM, De La Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 698-712.
- Koch CL. 1844. Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken, *Archiv Für Naturgeschichte*. 10: 217-239.
- Kohls GM. 1958. *Amblyomma imitator*, a new species of ticks from Texas and Mexico, and remarks on the synonymy of *A. cajennense* (Fabricius) (Acarina: Ixodidae). *Journal of Parasitology*. 44: 430-433.
- Kovalev SY, Mikhaylishcheva MS, Mukhacheva TA. 2015. Natural hybridization of the ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in their sympatric populations in Western Siberia. *Infection, Genetics and Evolution*. 32: 388–395.
- Kovalev SY, Golovljova IV, Mukhacheva TA. 2016. Natural hybridization between *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks evidenced by molecular genetics methods. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7: 113–118.
- Krakowetz CN, Chilton NB. 2015. Sequence and secondary structure of the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene of *Ixodes scapularis*. *Molecular and Cellular Probes*. 29: 35-38.
- Krawczak FS, Nieri-Bastos FA, Nunes FP, Soares JF, Moraes-Filho J, Labruna MB. 2014. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. *Parasites and Vectors*. 7: 7.
- Labruna MB. 2009. Ecology of Rickettsia in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1166: 156–166.
- Labruna MB, Kasai N, Ferreira F, Faccini JL, Gennari SM. 2002. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 105: 65-77.

- Labruna MB, Amaku M, Metzner JA, Pinter A, Ferreira F. 2003. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in southeast Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 40: 170–178.
- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari S, Walker, DH. 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 90–98.
- Labruna MB, Pacheco RC, Nava S, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Guglielmone AA. 2007. Infection by *Rickettsia bellii* and “*Rickettsia amblyommii*” in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. *Microbial Ecology*. 54:126–133
- Labruna MB, Ogrzewalska M, Martins TF, Pinter A, Horta MC. 2008. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. *Journal of Medical Entomology*. 45: 1156-1159.
- Labruna MB, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G, Abarca K, Romero L, de Sousa R, Oteo J, Zavala-Castro J. 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*. 16: 2435–2457.
- Labruna MB, Nava S, Marcili A, Barbieri AR, Nunes PH, Horta MC, Venzal JM. 2016. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. *Parasites and Vectors*. 9: 5-11.
- Laclau, P. 1994. La conservación de los recursos naturales y el hombre en la Selva Paranaense. Fundación Vida Silvestre Argentina. Boletín Técnico No 20, Bs. As. p. 139.
- Lado P, Nava S, Labruna MB, Szabod MPJ, Durden LA, Bermúdez S, Montagna M, Sánchez Quirós AC, Beati L. 2016. *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae): Phylogeography and systematic considerations. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7: 817–827.
- Lamattina D, Tarragona EL, Costa SA, Guglielmone AA, Nava S. 2014. Ticks (Acari: Ixodidae) of northern Misiones Province, Argentina. *Systematic and Applied Acarology*. 19: 393–398.

- Ledesma N. 1992. "Caracteres de la semiaridez en el Chaco Seco", en El ambiente del Chaco Semiárido, Reunión Interacadémica, Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Buenos Aires. p. 21-44.
- Lemey P, Salemi M, Vandamme AM. 2009. The phylogenetic handbook. Ed. Cambridge University Press. Inc. Cambridge, UK. p.723.
- Librado P y Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451–1452.
- Linthicum KJ, Logan TM, Bailey CL, Gordon S W, Peters CJ, Monath TP, Osorio J, Francy DB, Mclean Sr. G, Leduc JW, Grahan RR, Jahrling PB, Moulton JR, Dohm DJ. 1991. Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection and transmission by the tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 28: 405-409.
- Malizia L, Pacheco S, Blundo C, Brown AD. 2012. Caracterización altitudinal, uso y conservación de las Yungas Subtropicales de Argentina. *Ecosistemas* 21: 53-73.
- Madder M, Thys E, Achi L, Touré A, De Deken R. 2011. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most successful invasive tick species in West-Africa. *Experimental and Applied Acarology*. 53: 139-145.
- Mangold AJ, Gualberto A, Guglielmone AA. 1990. La distribución geográfica de *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787, (Acari: Ixodoidea-Ixodidae) en Argentina. *Veterinaria Argentina*. 7: 306-315.
- Mangold AJ, Bargués MD, Mas-Coma S. 1998. Mitochondrial 16S rRNA sequences and phylogenetic relationships of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastrata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 84: 478–484.
- Martins TF, Labruna MB, Mangold AJ, Cafrune MM, Guglielmone AA, Nava S. 2014. Taxonomic key to nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) in Argentina, with description and redescription of the nymphal stage of four *Amblyomma* species. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 5: 753-770.

- Martins TF, Barbieri A R, Costa FB, Terassini FA, Camargo LM, Peterka CR, Scofield A, Artur K. Campos, Horta MC, Guilloux AGA, Benatti HR, Ramírez DG, Barros-Battesti DM, Labruna MB. 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites and Vectors*. 9: 186.
- Mastropaolo M, Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. 2011. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*. 53: 371-375.
- Mastropaolo M, Tarragona EL, Silaghi C, Pfister K, Thiel C, Nava S. 2016. High prevalence of “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” in *Amblyomma* ticks from a Spotted Fever Endemic Region in North Argentina. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 46: 73-76.
- McKiel JA, Bell EJ, Lackman DB. 1967. *Rickettsia canada*: a new member of the typhus group rickettsiae isolated from *Haemaphysalis leporispalustris* Ticks in Canada. *Canadian Journal of Microbiology*. 13: 503–510.
- Mediannikov O, Sidelnirov Y, Ivanov L, Fournier PE, Tarasevich I, Raoult D. 2006. Far eastern tick-borne rickettsiosis. Identification of two new cases and tick vector. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1078: 80–88.
- Merow C, Smith MJ, Silander JA. 2013. A practical guide to MaxEnt for modeling species’ distributions: What it does, and why inputs and settings matter. *Ecography*. 36: 1058–1069.
- Mixson TR, Lydy SL, Dasch GA, Real LA. 2006. Inferring the population structure and demographic history of the tick, *Amblyomma americanum* Linnaeus. *Journal of Vector Ecology*. 31: 181–192.
- Monje LD, Nava S, Eberhardt AT, Correa AI, Guglielmone AA, Beldómenico PM. 2015. Molecular detection of the human pathogenic *Rickettsia* sp. cepa Atlantic Rainforest in *Amblyomma dubitatum* ticks from Argentina. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 15:167–169.

- Morales JM, Sirombra M, Brown AO. 1995. Riqueza de árboles de las Yungas Argentinas. En: Brown AO, Grau HR, Investigación, conservación y desarrollo en selvas de montañas. p 163-174. Ed. Miguel Lillo, Tucumán.
- Moreira JR, Alvarez MR, Tarifa T, Pacheco V, Taber A, Tirira DG, Macdonald DW. 2013. Taxonomy, natural history and distribution of the capybara. En Capybara. p. 3-37. Inc. Springer, New York.
- Morrone JJ. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin American and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology*. 51: 467–494.
- Murrell A, Dobson SJ, Walter DE, Campbell NJH, Shao R, Barker S. 2005. Relationships among the three major lineages of the Acari (Arthropoda: Arachnida) inferred from small subunit rRNA: paraphyly of the parasitiformes with respect to the Opilioacariformes and relative rates of nucleotide substitution. *Invertebrate Systematics*. 19: 383-389.
- Nava S, Guglielmone AA. 2013. A meta-analysis of host specificity in Neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). *Bulletin of Entomological Research*. 103: 216-224.
- Nava S, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2006. The natural hosts for larvae and nymphs of *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 40: 123-131.
- Nava S, Elshenawy Y, Eremeeva ME, Sumner JW, Mastropaolo M, Paddock CD. 2008a. *Rickettsia parkeri* in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. 14: 1894–1897.
- Nava S, Szabó MPJ, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2008b. Distribution, hosts, 16S rDNA sequences and phylogenetic position of the Neotropical tick *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 102: 409–425.
- Nava S, Mastropaolo M, Guglielmone AA, Mangold AJ. 2013. Effect of deforestation and introduction of exotic grasses as livestock forage on the population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in northern Argentina. *Research in Veterinary Science*. 95: 1046–1054.

- Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*. 5: 252–276.
- Nava S, Venzal JM, González-Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA. 2017. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Ed. Elsevier, Academic Press, London. p. 352.
- Nunes EDC, Vizzoni VF, Navarro DL, Iani FCDM, Durães LS, Daemon E, Gazeta, GS. 2015. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 110: 1058-1061.
- Oliveira PR, Borges LMF, Lopes CML, Leite RC. 2000. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 92: 295–301.
- Oliveira PR, Borges LMF, Leite RC, Freitas CMV. 2003. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*. 17: 412–416.
- Oliver Jr JH. 1989. Biology and Systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematic*. 20: 397-430.
- Osava CF, do Nascimento Ramos V, Rodrigues AC, dos Reis Neto HV, Martins MM, Pascoal JO, Szabó MPJ. 2016. *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) tick population maintained solely by domestic pigs. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 6: 9-13.
- Ogrzewalska M, Schwarcz K, Bajay MM, Bajay SK, Pinheiro JB, Zucchi MI, Pinter A, Labruna MB. 2016. Characterization of Genetic Variability and Population Structure of the Tick *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 53: 843-850.

- Pacheco RC, Moraes-Filho J, Nava S, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Labruna MB. 2007. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Experimental and Applied Acarology*. 43: 63–71.
- Pacheco R, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Szabó MPJ, Catroxo MHB, Bouyer DH, Labruna MB. 2011. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. *Applied. Environmental. Microbiology*. 77: 5207–5211.
- Paddock CD, Fernández S, Echenique GA, Summer JW, Reeves WK, Zaki SR, Remondegui CE. 2008. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 78, 687–692.
- Parola P, Paddock CD, Scolovschi C, Labruna MB, Mediannokov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 26:657–702
- Peterson AT. 2003. Predicting the geography of species' invasions via ecological niche modeling. *The Quarterly Review of Biology*. 78: 419-433.
- Peterson AT, Soberón J, Sánchez-Cordero V. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science*. 285: 1265-1267.
- Peterson AT, Soberón J, Pearson RG, Anderson RP, Martínez-Meyer E, Nakamura M, Araújo MB. 2011. Ecological niches and geographic distributions. Ed. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. *Monographs in Population Biology*. p 49.
- Pfennig KS, Pfennig DW. 2005. Character displacement as the “best of a bad situation”: fitness trade-offs resulting from selection to minimize resource and mate competition. *Evolution* 59: 2200-2208.
- Phillips SJ, Dudík M, Schapire RE. 2004. A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: *Proceedings of the 21st International Conference on Machine Learning*. 69: 83-99.
- Phillips SJ, Dudík M. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography*. 31: 161–175.

- Pianka ER. 2000. Evolutionary ecology. Ed. Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- Pinter A, França AC, Souza CE, Sabbo C, Nascimento EMM, Santos FCP, Labruna MB, Horta MC, Oliveira VLM. 2011. Febre maculosa brasileira. Suplemento Bepa. 8: 2-31.
- Poulin R. 2007. Evolutionary Ecology of Parasites (2<sup>nd</sup> edition). Ed. Princenton University Press. New Jersey. p. 332.
- Prado DE, Gibbs PE. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 902-927.
- Price PW. 1977. General concepts on the evolutionary biology of parasites. *Evolution*. 31: 405–420.
- Price PW. 1980. *Evolutionary Biology of Parasites*. Ed. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Qiu WG, Dykhuizen DE, Acosta MS, Luft BJ. 2002. Geographic uniformity of the Lyme Disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the northeastern United States. *Genetics*. 160: 833-849.
- Randolph SE. 1999. Epidemiological uses of a population model for the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Tropical Medicine and International Health*. 4: 34–42.
- Randolph SE, Storey K. 1999. Impact of microclimate on immature tick rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of Medical Entomology*. 36: 741–748.
- Randolph SE. 2008. The impact of tick ecology on pathogen transmission dynamics. En: A.S. Bowman and P. Nuttall. p. 40-72. Ed. *Ticks: Biology, Diseases and Control*, Cambridge University Press, Inc. Cambridge.
- Reboratti CE. 1979. Migraciones y frontera agraria: Argentina y Brasil en la cuenca del Alto Paraná-Uruguay. *Desarrollo Económico*: 189-209.
- Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. 1991. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*. 173:1576–1589.

- Remondegui C. 2012. Tick paralysis cases in Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45: 533-534.
- Reisen WK. 2002. Epidemiology of vector-borne diseases. *Medical and Veterinary Entomology*. p. 19-34. Ed. Academic Press, Boston, MA.
- Ripoll CM, Remondegui CE, Ordoñez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, Paddock CD, Zaki SR, Olson JG, Santos-Buch CA. 1999. Evidence of Rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61: 350–354.
- Rivas JJ, Moreira-Soto A, Alvarado G, Taylor L, Calderón-Arguedas O, Hun L, Troyo A. 2015. Pathogenic potential of a Costa Rican cepa of '*Candidatus Rickettsia amblyommii*' in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and protective immunity against *Rickettsia rickettsii*. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 6: 805-811.
- Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Journal of Molecular Evolution*. 9: 552-569.
- Rosenthal BM. 2008. How has agriculture influenced the geography and genetics of animal parasites? *Trends in Parasitology*. 25: 67–70.
- Rossanigo C, Arano A, Rodríguez Vázquez G. 2010. Stock 2010 del ganado bovino, mapas de existencias e indicadores ganaderos. *Información Técnica n°178*. Ediciones INTA. 16p.
- Rozas J. 2009. DNA sequences polymorphism analysis using DnaSP. *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis* (ed. por D. Posada), p. 337–350. Ed. Humana Press (Springer), New York, NY.
- Romer Y, Nava S, Govedic F, Cicuttin G, Denison AM, Singleton J, Kelly AJ, Kato CI, Paddock CD. 2014. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis in different ecological regions of Argentina and its association with *Amblyomma tigrinum* as a potential vector. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 91:1156–1160.

- Sangioni LA, Horta MC, Vianna MCB, Gennari SM, Soares RM, Galvao MAM, Schumaker TTS, Ferreira F, Vidotto O, Labruna MB. 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 265-270.
- Saracho Bottero MN, Tarragona EL, Nava S. 2015. Spotted fever group Rickettsiae in *Amblyomma* ticks likely to infest humans in rural areas from northwestern Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 75: 391-395.
- Saraiva DG, Nieri-Bastos F, Horta MC, Soraes HS, Nicola PA, Pereira LCM, Labruna MB. 2013. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, northeastern Brazil: isolation, transovarial transmission and transstadial perpetuation. *Vector-Borne Zoonotic Disease*. 13: 615–618.
- Sarmiento NF, Gimenez M, Martinez I, Alvarez J, Nava S. 2015. Jornada Veterinaria del 95° Aniversario de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Noreste. Corrientes, octubre 2015.
- Schluter D. 1994. Experimental evidence that competition promotes divergence in adaptive radiation. *Science*. 266: 798–801
- Schulze TL, Jordan RA. 1996. Seasonal and long-term variations in abundance of adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in different coastal plain habitats of New Jersey. *Journal of Medical Entomology*. 33: 963-970.
- Scoles GA, Ueti MW, Noh SM, Knowles DP, Palmer GH. 2007. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) ceptas among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 44: 484-491.
- Sebastian PS, Tarragona EL, Saracho Bottero MN, Mangold AJ, Mackenstedt U, Nava S. 2016. Bacteria of the genera *Ehrlichia* and *Rickettsia* in ticks of the family Ixodidae with medical importance in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*. 71: 87-96.
- Seijo A, Giamperetti S, Ortiz MS, González MB, Ortega ES, González RC. 2016. Severe spotted fever by *Rickettsia rickettsii*, in tourist in the Argentine Northwest. *Medicina*. 76: 317.

- Sjogren P, Wyoni PI. 1994. Conservation genetics and detection of rare alleles in finite populations. *Conservation Biology*. 8: 267–270.
- Slatkin M, Hudson RR. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. 123: 603-613.
- Soares JF, Soares HS, Barbieri AM, Cabruna MB. 2012. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. *Medical and Veterinary Entomology*. 26: 139-151.
- Sonenshine DE. 1991. *Biology of ticks*. Vol 1. Ed. Oxford University Press, Oxford.
- Sonenshine DE. 1993. *Biology of Ticks*, vol. 2. Ed. Oxford University Press. New York. p. 465.
- Sonenshine DE, Mather TN. 1994. Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. Ed. Oxford University Press. Demand. p.441.
- Sonenshine DE, Roe RM. 2014. *Biology of Ticks*, 2nd edn, Vol. 1. Ed. Oxford University Press, Oxford. Inc. Sutherst RW.
- Souza CE, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Labruna MB. 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Veterinary Parasitology*. 161: 116–121.
- Sutherst RW. 2001. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. *International Journal of Parasitology*. 31:933–948.
- Sutherst RW, Bourne AS. 2006. The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae). *International Journal for Parasitology*. 36: 193-200.
- Szabó MPJ, Castro MB, Ramos HGC. 2007. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*. 143: 147–154.

- Szabó MPJ, Pinter A, Labruna MB. 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontier in Cellular and Infections Microbiology*. 3: 1–9.
- Tagliapietra V, Rosà R, Arnoldi D, Cagnacci F, Capelli G, Montarsi F, Rizzoli A. 2011. Saturation deficit and deer density affect questing activity and local abundance of *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) in Italy. *Veterinary Parasitology*. 183: 114-124.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731–2739.
- Tarragona EL, Mangold AJ, Mastropaolo M, Guglielmone AA, Nava S. 2015. Ecology and genetic variation of *Amblyomma tonelliae* in Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*. 29: 297-304.
- Tarragona EL, Soares JF, Costa FB, Labruna MB, Nava S. 2016. Vectorial competence of *Amblyomma tonelliae* to transmit *Rickettsia rickettsii*. *Medical and Veterinary Entomology*. 30: 410–415.
- Templeton AR. 2006. *Population Genetic and Microevolutionary Theory*. Ed. Willey-Liss. Inc. Hoboken, New Jersey. p.705.
- Thompson JD, Higgins D, Gibson TJ. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequenceweighting, position-specific gap penalties andweight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673–4680.
- Thomas S, Alexander W, Gilligan J, Rikihisa Y. 2016. The Importance of Rickettsiales Infections. En: Thomas, S, *Rickettsiales*. p. 3-21. Ed. Springer International Publishing, Inc. Columbus.
- Thrusfield M. 2007. *Veterinary Epidemiology*. 3rd edition, reissued with updates. Ed: Oxford, Blakwell Science Ltd. p. 610.
- Thuiller W, Broennimann O, Hughes G, Alkemade JRM, Midgley GF, Corsi F. 2006. Vulnerability of African mammals to anthropogenic climate change under conservative land transformation assumptions. *Global Change Biology*. 12: 424–440.

- Tomassone L, Nuñez P, Ceballos LA, Gurtler RE, Kitron U, Farber M. 2010. Detection of “*Candidatus Rickettsia* sp. cepa Argentina” and *Rickettsia belli* in *Amblyomma ticks* (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. *Experimental and Applied Acarology*. 52: 93–100.
- Tonelli Rondelli, M. 1937. Ixodoidea. Parte I. *Amblyomma ovale* Koch, *Amblyomma cajennense* Fabricius (sic) e le specie a lor affini nuove o poco note. *Rivista di Parassitologia*. 1: 273-298.
- Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 777-782.
- Torrella SA, Adámoli J. 2006. Situación ambiental de la ecorregión del Chaco Seco. En: Brown A, Martínez Ortiz U, Acerbi M, Corcuera J, La Situación Ambiental Argentina 2005, p 73-82. Ed. Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires.
- Torres R, Jayat JP. 2010. Modelos predictivos de distribución para cuatro especies de mamíferos (Cingulata, Artiodactyla y Rodentia) típicas del Chaco en Argentina. *Mastozoología Neotropical*. 17: 335-352.
- Trout RT, Steelman CD, Szalanski AL. 2010. Population genetics of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from Arkansas. *Journal of Medical Entomology*. 47: 152–161.
- Walker BH, Steffen WL. 1999. The nature of global change. *The Terrestrial Biosphere and Global Change*. Ed. Cambridge University Press, Cambridge. p. 18.
- Watterson GA. 1984. Allele frequencies after a bottleneck. *Theoretical Population Biology*. 26: 387-407.
- Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 6.

Widmer CE, Azevedo FCC, Almeida AP, Ferreira F, Labruna MB. 2011. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 11: 1001-1005.

Wilson ML, Dykstra EA, Schmidt EA. 1993. Temperature- and humidity dependent longevity of unfed adult *Hyalomma truncatum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 27: 945-954.