



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**"EVALUACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN CON UN POLIPÉPTIDO DE RmS17
SOBRE LA INFESTACIÓN DE GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus* EN
CONEJOS"**

PROTOCOLO DE TESIS QUE PRESENTA:

JORGE MENDOZA LÓPEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. JUAN JOSÉ OJEDA CARRASCO

**DR. RODOLFO ESTEBAN LAGUNES
QUINTANILLA**

AMECAMECA, ESTADO DE MÉXICO

Mayo 2021

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue financiado a través del proyecto titulado: “Evaluación de la inmunización con un polipéptido de RmS17 sobre la infestación de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en conejos”, con N° SIGI: 10533234452.

Agradezco también las facilidades prestadas por el Laboratorio de Artropodología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI, INIFAP), en especial a mi tutor el Dr. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla, gracias por su confianza, sus enseñanzas, apoyo y paciencia aportadas para la realización de este trabajo.

Finalmente agradezco al Dr. Juan José Ojeda Carrasco y a mis revisores el MVZ. José Juan Lira y la Dra. Virginia García Rubio, gracias por siempre apoyarme, hacerme comentarios y la paciencia que tuvieron a lo largo del desarrollo de mi trabajo.

Resumen

La garrapata *R. microplus* representa el problema de salud más importante de la ganadería bovina de zonas tropicales y subtropicales. Debido a la resistencia a ixodicidas se requieren alternativas de control diferentes al control químico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inmunización con un polipéptido de RmS17 sobre la infestación de garrapatas *R. microplus* en conejos. Se utilizaron 12 conejos raza Nueva Zelanda divididos en 3 grupos; el grupo 1 fue inmunizado con el polipéptido de RmS17, el grupo 2 con el antígeno Bm86 y el grupo 3 con solución salina más adyuvante (testigo). Todos los animales recibieron 3 dosis de 100 µg los días 0, 15 y 30. Se tomaron muestras de sangre antes de cada inmunización y al término del experimento para medir la cinética de anticuerpos mediante la técnica de ELISA indirecto. La eficacia general de la inmunización con el polipéptido de RmS-17 fue de 79%. Los niveles de anticuerpos fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) a partir de la segunda inmunización. Con base en los resultados alcanzados, se concluye que el polipéptido de RmS17 produce una respuesta inmune protectora, reflejándose en la producción de anticuerpos y en la reducción del potencial biótico de las garrapatas *R. microplus*.

Abstract

The *R. microplus* tick represents the most important health problem for the cattle farming from the tropical and subtropical regions. Due to the resistance to ixodicides, control alternatives different to chemical control are needed. The aim of this assignment was to evaluate the effects of immunization with a RmS17 polypeptide over the *R. microplus* tick infestation in rabbits. There were used 12 New Zealand breed rabbits divided into three groups; the group 1 was immunized with the RmS17 polypeptide, the group 2 with the Bm86 antigen, and the group 3 with a saline solution plus adjuvant (control). All animals received 3 doses of 100 µg on the days 0, 15, 30. Blood samples were taken before each immunization and at the end of the experiment to measure the antibody kinetics through the ELISA indirect technique. The general immunization effectiveness with the RmS-17 polypeptide was 79%. The antibodies levels were statistically significant ($p < 0.05$) starting from the second immunization. Based on the reached results, it is concluded that the RmS17 polypeptide produces a protective immune response, being reflected on the antibodies production and on the biotic potential reduction of the *R. microplus* tick.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	PLANTAMIENTO DE PROBLEMA	4
III.	JUSTIFICACIÓN	6
IV.	MARCO TEÓRICO.....	7
4.1	Importancia de la ganadería en México	7
4.2	Factores que afectan la producción de ganado bovino	8
4.3	Garrapatas y su importancia	8
4.4	Garrapatas en los bovinos	10
4.5	Morfología de garrapatas	10
4.6	Clasificación taxonómica.....	12
4.7	Alimentación de garrapatas.....	15
4.8	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16
4.9	Importancia económica	17
4.10	Ciclo biológico.....	18
4.10.1	Fase de vida libre (no parasítica)	18
4.10.2	Fase de encuentro	19
4.10.3	Fase parasítica.....	19
4.11	Distribución geográfica de <i>R. microplus</i>	20
4.12	Efectos de <i>R. microplus</i>	22
4.13	Enfermedades transmitidas por <i>R. microplus</i>	23
4.14	Métodos de control.....	24
4.14.1	Control químico	24
4.14.2	Control no químico	25
4.15	Resistencia a ixodicidas	27
4.16	Control inmunológico	29
4.17	Relación inmunológica hospedador - garrapata	30
4.18	Antígenos en el desarrollo de vacunas contra <i>R. microplus</i>	30
4.18.1	Bm95.....	32

4.18.2 Bm91.....	32
4.18.3 Vitelogenina	32
4.18.4 ATAQ	33
4.18.5 Bm86.....	34
4.18.6 Subolesina	35
4.18.7 Ferritina.....	36
4.18.8 Serpinas.....	36
4.18.9 RmS17	39
4.19 Análisis bioinformáticos.....	40
4.20 Características de un candidato vacunal.....	40
4.21 Clasificación de vacunas en la actualidad	42
4.21.1 Vacunas de nueva generación	42
4.21.2 Vacunas atenuadas mediante modificación genética	43
4.21.3 Vacunas sintéticas	43
4.21.4 Vacunas anti-idiotipo	43
4.21.5 Vacunas génicas	44
4.21.5 Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes.....	44
V. HIPÓTESIS	46
VI. OBJETIVOS	47
6.1.1 Objetivo general	47
6.1.2 Objetivos particulares.....	47
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	48
7.1 Ubicación.....	48
7.2 Cepa de referencia.....	48
7.3 Garrapatas.....	48
7.4 Protocolo de inmunización	48
7.5 Infestación de conejos	49
7.6 Determinación del título de anticuerpos por iELISA.....	49
7.7 Evaluación de resultados	49
7.8 Análisis estadístico.....	50
VIII. Resultados	51

IX. Discusión	55
X. Conclusiones.....	58
XI. Referencias	59
XII. Anexos	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de la garrapata.....	11
Figura 2. Filogenia de la subfamilia de garrapatas	13
Figura 3. Estructura taxonómica de garrapatas Ixodidae	15
Figura 4. Identificación de <i>R. microplus</i>	17
Figura 5. Ciclo de vida de la garrapata <i>R. microplus</i>	20
Figura 6. Situación actual del estatus zoonosario de la garrapata <i>R. microplus</i>	21
Figura 7. Esquema del desarrollo de la resistencia a los ixodicidas.....	29
Figura 8. Mecanismo de acción de la inmunidad contra garrapatas	31
Figura 9. Ejemplo de la estructura de una serpina.....	38
Figura 10. Homología del sitio central reactivo (RCL) en diferentes serpinas	39
Figura 11. Grafica de la cinética de anticuerpos.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>R. microplus</i>	16
Cuadro 2. Porcentajes de reducción de garrapatas <i>R. microplus</i> en conejos	52

I. INTRODUCCION

La ganadería extensiva se conserva como una actividad de relevancia en el contexto socioeconómico del país, ha sido sustento para el desarrollo de la industria nacional, debido a que proporciona alimentos, materias primas, divisas y empleos; además, distribuye ingresos en el sector rural y utiliza recursos naturales que no tienen cualidades adecuadas para la agricultura u otra actividad pecuaria. En México, esta actividad es fundamental para el subsector pecuario nacional, por la contribución que realiza a la oferta de productos cárnicos, así como su participación en la balanza comercial del país donde las exportaciones de ganado en pie, es su principal rubro (García, 2003).

Por su parte, las garrapatas son un problema global que se ha incrementado en los últimos años, afectando animales silvestres, domésticos y al humano; su capacidad para adaptarse a la mayoría de los ecosistemas del mundo pone de manifiesto la evolución biológica que han obtenido a través de generaciones. La hematofagia, es su principal característica para ocasionar daño, mediante este hábito se puede llevar a cabo la transmisión de diferentes patógenos como protozoarios (*Babesia* spp., *Theileria* spp.), bacterias (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp.), virus (*Flavivirus*, *Nairovirus*) y nematodos (*Acanthocheilonema*) (de la Fuente *et al.*, 2008), los cuales causan enfermedades en diferentes especies, además de costosas pérdidas transcendentales en animales en producción (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

En México, los géneros de garrapatas de mayor importancia en el sector pecuario son principalmente *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. y *Amblyomma* spp., las cuales ocasionan pérdidas que se traducen en la disminución de la producción de carne y leche, el incremento de los costos de producción por tratamientos con ixodicidas, así como tratamientos contra enfermedades transmitidas por las garrapatas al ganado, como babesiosis y anaplasmosis (Almazán *et al.*, 2018).

Por largo tiempo el método más utilizado para el control de las garrapatas se basa en el uso de productos químicos, los cuales tienen como principal función romper el ciclo biológico de las mismas con la aplicación de ixodicidas a intervalos específicos mediante baños de aspersión, inmersión, derrame dorsal o la

administración de fármacos inyectables. Por otra parte, el control no químico, se basa en la selección de hospedadores resistentes, introducción de depredadores naturales, rotación, descanso y quema controlada de praderas, tipo de vegetación e inclusive el control biológico (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

La realidad es que estos métodos de control no han sido tan eficientes para disminuir las poblaciones de garrapatas presentes en la ganadería bovina por diferentes circunstancias, destacando principalmente el fenómeno conocido como resistencia. Se requieren nuevas alternativas y estrategias de control donde se incorporen vacunas como medida sinérgica para reducir las poblaciones de garrapatas. El control inmunológico basado en el uso de vacunas representa una alternativa promisorio, debido a que se ha logrado disminuir la infestación de artrópodos y a la vez bloquear la transmisión de patógenos a los hospedadores (de la Fuente, 2000; Willadsen, 2004).

Al respecto, se han identificado diferentes proteínas como posibles candidatos a vacunas; sin embargo, son pocos los antígenos que han sido evaluados en experimentos de inmunización en campo (de la Fuente y Kocan, 2003). El antígeno Bm86, es el componente de las vacunas comerciales contra garrapatas que han sido utilizadas en la ganadería. Estas vacunas disminuyen los parámetros reproductivos de las garrapatas, afectando con ello la progenie. No obstante, presenta limitaciones, por lo que no han tenido un éxito rotundo (García-García *et al.*, 1999; Popara *et al.*, 2013).

En la garrapata *R. microplus* se expresan 22 serpinas (Rodríguez-Valle *et al.*, 2015). Dentro de éstas, la serpin 17 (RmS-17) se logró identificar en distintos órganos de la garrapata *R. microplus* como: glándulas salivales, intestino medio, ovarios y la carcasa (remanente de tejido después de la disección de órganos). Esta proteína cuenta con funciones importantes en la inhibición de la coagulación sanguínea al momento de la alimentación y modula la inhibición de la respuesta inflamatoria contra hospedador, podrían desempeñar una función que genera un desequilibrio hemostático durante la hematofagia permitiendo la absorción de la sangre y manteniéndola en un estado fluido en el sitio de alimentación y después de la ingestión; por lo tanto se le puede otorgar dicha función a RmS17 (Tirloni *et al.*, 2016).

En otros estudios con RmS17 se ha demostrado que esta proteína interfiere con el tiempo de recalcificación, característica relacionada con la inhibición del factor XIa, el cual está implicado en la cascada de la coagulación (Tirloni *et al.*, 2016). Entre otras características de interés, será importante dilucidar el potencial de la proteína RmS17 como antígeno vacunal con la finalidad de reducir las infestaciones de garrapatas *R. microplus* en bovinos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se cuenta con un gran potencial para la ganadería, principalmente en aquellos estados que se encuentran limitando con el Golfo de México, donde se localizan las regiones más importantes productoras de ganado bovino. El sistema de producción que predomina es la ganadería extensiva para la producción de carne, debido a la diversidad climática con la que se cuenta y la cual llega a favorecer la producción a través del aprovechamiento de pastizales. No obstante, también se convierten en zonas de riesgo para el ganado bovino debido a la ocurrencia de manera natural de algunas enfermedades infecciosas y parasitarias.

Las enfermedades parasitarias representan un problema importante en la ganadería, debido a las limitantes en salud y rendimiento productivo de los animales; como lo es el caso de la garrapata *R. microplus* la cual se encuentra ampliamente distribuida en regiones ganaderas cercanas a la zona del Golfo de México, y es vector de los protozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, agentes causales de la babesiosis o piroplasmosis bovina. Esta enfermedad representa un alto riesgo en las zonas ganaderas tropicales ya que se llega a presentar de manera clínica, principalmente en animales adultos, ocasionando pérdidas productivas (pérdida de peso y disminución de la producción láctea) y económicas (costos por tratamiento de animales enfermos y en ocasiones muerte de los mismos), así como también una limitante en la importación de ganado para el mejoramiento de los hatos en estas zonas tropicales.

En la actualidad existen distintos métodos para el control de la garrapata *R. microplus*, los cuales se basan en el control químico y no químico, el control químico se usa para romper el ciclo biológico de la garrapata con la aplicación de ixodicidas en ciertos tiempos de aplicación, pueden ser baños del ganado en estanques o baño de aspersion, aplicación en el dorso o soluciones inyectables. Dentro del control no químico se encuentran; la rotación, quema y descanso de praderas, controladores biológicos, selección de razas con mejor resistencia a las garrapatas y depredadores naturales.

Hasta el momento estos métodos de control no han sido tan eficientes para disminuir las poblaciones de las garrapatas en el ganado bovino, esto se debe por el uso indiscriminado de ixodicidas, lo cual ha generado una resistencia a los productos empleados para el control. Se buscan nuevas alternativas y productos que sirvan para el control, se requiere incorporar vacunas como medida sinérgica para reducir la población de la garrapata *R. microplus*.

III. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día se presentan muchos problemas a nivel sanitario y pérdidas económicas en la industria bovina, teniendo como principal agente a las garrapatas *R. microplus*, pueden provocar varias afectaciones al hospedador bovino, inclusive la muerte. Una de las maneras utilizadas para controlar este problema es el uso de sustancias químicas denominados ixodicidas; sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos presenta ciertas limitantes como la contaminación ambiental, riesgos a la salud pública y la selección de garrapatas resistentes; por esta razón se requieren nuevas alternativas de control.

Como nueva posibilidad se da a conocer el control inmunológico, el cual se basa en el uso de vacunas que representan una alternativa de alto valor, debido a que se ha logrado disminuir el número de poblaciones de garrapatas y a la vez bloquear la transmisión de otros patógenos en el ganado bovino.

Existen dos vacunas comerciales, sin embargo, su eficacia se ve limitada ante el polimorfismo del gen entre cepas de garrapatas de distinto origen geográfico, siendo su efecto nulo en algunos casos. Es por esta razón que se considera de gran importancia el diseño de antígenos vacunales a partir de cepas locales y/o nacionales. La proteína RmS17 presenta características de interés para ser considerada como candidato vacunal y así, controlar infestaciones por garrapatas *R. microplus*.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Importancia de la ganadería en México

La ganadería es una actividad social que contribuye a la alimentación de los seres humanos aportando proteínas, micronutrientes y energía. Actualmente, es una de las más dinámicas del sector agropecuario y se estima que coadyuva a la subsistencia y a la seguridad alimentaria de mil millones de personas en todo el mundo (Rubio y Pérez, 2012).

Pérez (1988), menciona que, debido a sus características físicas y climáticas, México tiene una mayor capacidad ganadera que agrícola; el ganado bovino, porcino y el sector avícola generan en conjunto el 90% del valor de la producción pecuaria, la cual incluye productos alimenticios y no alimenticios. En México el sector ganadero utiliza aproximadamente un 65.96% del total de la superficie del país y aporta cerca del 40% del producto interno bruto (PIB) del sector (SENASICA, 2019).

México presenta un mayor consumo importante de productos derivados del ganado bovino y gracias a la incorporación de nuevas razas especializadas se ha aumentado la calidad y cantidad trayendo ganancias de hasta 480 millones de dólares en exportación de bovinos y 68 mil millones de pesos en la producción de leche (SAGARPA, 2018).

A nivel nacional, la producción de ganado bovino representa una de las actividades primarias primordiales en el sector agropecuario. En zonas rurales es la actividad económica de mayor importancia, la cual se basa en la cría de animales y se desarrolla en diferentes condiciones agroecológicas que dan origen a varios sistemas de producción (García-Martínez *et al.*, 2016); es la que proporciona los mayores volúmenes de leche, derivados lácteos, carne y piel.

Para que la industria ganadera pueda tener una aportación significativa en la economía es necesario el suministro de alimentos de calidad elevada y seguridad alimentaria. La Cumbre Mundial de la Alimentación (1996) define que existe la seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos, nutritivos

para satisfacer sus necesidades alimentarias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana.

4.2 Factores que afectan la producción de ganado bovino

- A. **Comida y agua:** La ingestión de alimento y agua dulce y fresca son los requerimientos principales y que tienen mayor efecto en la producción y calidad de la leche.
- B. **Temperamento:** Es necesario mantener al rumiante en un entorno sin estrés, ya que de lo contrario se pueden tener consecuencias como menor producción de leche, pérdidas de celos, aumento en el número de peleas, entre otros.
- C. **Plan sanitario:** Tener un plan sanitario completo de vacunación para la prevención de enfermedades y así lograr la reducción de costos, aumento de la productividad y maximizar ingresos.
- D. **Garrapatas:** Las garrapatas suponen uno de los factores más importantes ya que alteran al animal provocando molestias, inapetencia, estrés, desnutrición, debilidad, lesiones a los cueros, entre otros. Estos signos alteran la reproducción, los estros comienzan a ser escasos y disminuye el porcentaje de preñez, provocando grandes pérdidas económicas.

4.3 Garrapatas y su importancia

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de mamíferos, aves, reptiles y el hombre, que se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta (Domínguez *et al.*, 2010). Se han identificado más de 899 especies dentro de las 3 familias de garrapatas, la familia *Ixodidae* o “garrapatas duras”, la familia *Argasidae* o “garrapatas blandas” y la familia *Nuttalliellidae*, esta última no son de importancia parasitaria (Cordero *et al.*, 1999; Hernández, 2006).

La garrapata *Boophilus microplus* reclasificada como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Barker y Muller, 2008) es la que más afecta al ganado y requiere un solo hospedador para desarrollar su ciclo evolutivo que consta de cuatro estadios: huevo, larva hexápoda o pinolillo, ninfa

octópoda y adulto. El ciclo se divide en 2 fases, una conocida como fase parasítica, la cual desarrolla sobre el hospedador y la otra conocida como no parasítica o de vida libre que comprende desde que la hembra repleta cae al suelo hasta su oviposición y eclosión (Benavides y Romero, 2002; Quiroz, 2006).

La distribución geográfica de *R. microplus* se encuentra entre los paralelos 32 del hemisferio Norte y Sur en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, abarcando gran parte de países de América, África, Asia y Australia (Alonso *et al.*, 2006; Hernández, 2006).

Los efectos de *R. microplus* en la industria ganadera del mundo se reflejan en la disminución de la producción de carne y leche, daños en la piel de los bovinos, toxicosis, aumento en gastos por tratamientos con productos ixodicidas y las enfermedades que transmite, la limitación a la comercialización y movilización de animales infestados a zonas libres de garrapatas, impidiendo también de esta manera la exportación de ganado (Mejía *et al.*, 2004; Rosario-Cruz y Domínguez, 2006; González, 2007), lo que implica un costo de 13.9 a 18.9 billones de dólares anuales (Castro, 1997). Además de su importancia en la transmisión de virus, bacterias, rickettsias y protozoarios, son consideradas el vector más importante de patógenos en el ganado (Hernández, 2006; Canales *et al.*, 2009).

La babesiosis y la anaplasmosis causadas por *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* son las enfermedades de mayor importancia en la ganadería que son transmitidas por *R. microplus*, enfermedades que causan alta morbilidad y mortalidad en la ganadería (Soulsby, 1987; Blood y Radostits, 1992).

Para el control de *R. microplus* se utilizan comúnmente los ixodicidas mediante aspersión o inmersión (Almazán *et al.*, 2007) de arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazolonas y recientemente los inhibidores del desarrollo (Rosario-Cruz y Domínguez, 2006). Desafortunadamente el uso continuo ha traído consigo la selección de garrapatas resistentes a tal grado que actualmente se han detectado cepas de garrapatas con resistencia múltiple a los ixodicidas (Domínguez *et al.*, 2010).

Otros métodos de control contra *R. microplus* que han sido considerados son la utilización de razas de bovinos con resistencia natural a las garrapatas, el control cultural donde se involucran actividades como la quema controlada, rotación de praderas y modificación del hábitat con el cultivo de especies forrajeras que tienen un efecto anti garrapata, como la gramínea *Melinis minutiflora*; el control biológico con el empleo de enemigos naturales como los hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y el control inmunológico (Fernández-Ruvalcaba *et al.*, 2003; García, 2006; Fernández, 2009; Hernández *et al.*, 2010).

4.4 Garrapatas en los bovinos

Las garrapatas de mayor importancia en bovinos pertenecen a la familia *Ixodidae* y son conocidas como garrapatas duras. En México, se han identificado 13 géneros con más de 70 especies, el mayor impacto para la ganadería desde el punto de vista económico se debe a los géneros *R. (Boophilus) spp.* y *Amblyomma spp.*

La garrapata *R. microplus* tiene un ciclo parasítico breve sobre los bovinos. Este se inicia con la fijación de larvas de garrapatas que se desarrollan hasta ninfas que, a su vez, mudan a adultos machos y hembras. Una vez fecundadas, las hembras repletas de sangre se desprenden del bovino. Este ciclo parasítico dura alrededor de 22 días, una vez en el suelo, la hembra repleta se refugia para colocar una sola masa de huevos que darán lugar a una nueva generación de larvas. La presencia de garrapatas en un área determinada requiere de inviernos benignos (la mayoría de los meses del año con temperaturas promedio superior a 14,5° C) y su abundancia está asociada a climas relativamente húmedos que garantizan el mayor éxito en la oviposición de las hembras y la eclosión de larvas (Quiroz, 2005).

4.5 Morfología de garrapatas

La morfología que presentan las especies de la familia *Ixodidae* es ampliamente reconocida por su característico cuerpo aplanado con una longitud entre 1 y 10mm. Incluso mayores una vez alimentada y repleta de sangre con un peso de hasta 250mg (León-Clavijo y Hernández-Rojas, 2012).

La cabeza del artrópodo se compone por una sustancia llamada quitina que protege su sistema nervioso, esta presenta un par de quelíceros (órganos adaptados al parasitismo) capaces de rasgar la piel del hospedador para la introducción de su pronunciado dentado hipostoma, encargado de la succión de la sangre. En ambos lados se encuentran los palpos que cumplen funciones diferentes, la primera es ubicar la zona apropiada para alimentarse (mayor lavativa de sangre y menor calibre del tegumento), la segunda es sujetarse y mantener inmóvil el hipostoma a lo largo de su alimentación, y como tercero fungen como órganos protectores para la estructura dentada (hipostoma) (Almazán, 2009). En la vista ventral se puede observar el orificio genital (Fig. 1), en la línea media del cuerpo paralelo al segundo par de patas de la garrapata con el que se diferencia la sexualidad de ésta. Durante su estado de ninfa este no se presenta, en cambio el surco anal se observa en todos los estados de la garrapata.

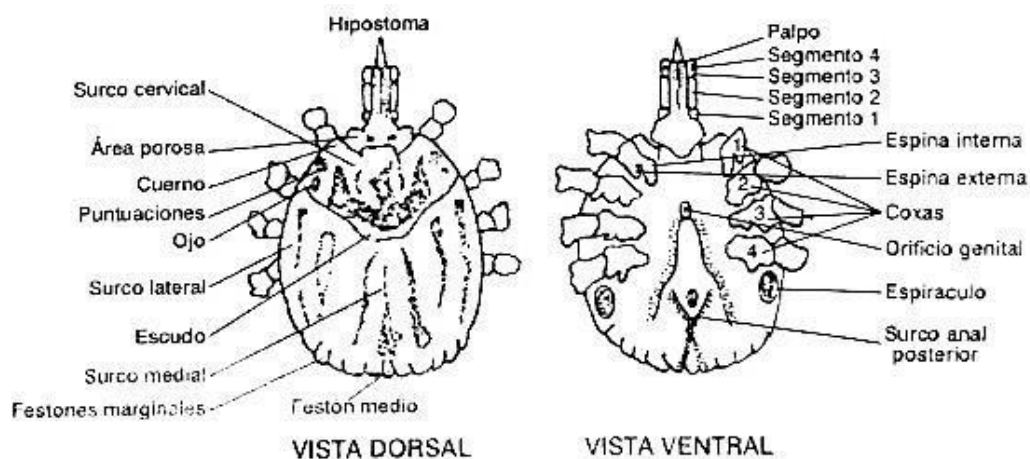


Figura 1. Morfología general de una garrapata. Se muestran las partes que componen la estructura de la garrapata vistas tanto dorsal como ventralmente (Parra *et al.*, 1999).

En el cuerpo de las hembras ingurgitadas se observan surcos marginales a los lados después del escudo, y en la parte posterior se observa un surco medial que da paso a los festones con números variables de hasta once. Esto permite a la hembra distender su abdomen a lo largo de su alimentación sin problemas. En cuanto a su morfología interna se componen por estructuras rudimentarias que dan mayor fuerza y cuentan con un aparato circulatorio de tipo abierto muy simple; su sistema digestivo consta de un dentado, seguido por una faringe y esófago, continuando con el estómago que presenta varios divertículos o ciegos gástricos. En esta parte del cuerpo del artrópodo la sangre es transformada a sustancias básicas que serán absorbidas por osmosis y pasarán a la mayor parte del cuerpo (celoma) y así diluirse en la hemolinfa. Aquellas sustancias que la garrapata no absorbe terminan en el intestino a través de canales excretores que pasan al orificio anal, por donde se secretan los desechos (León-Clavijo y Hernández-Rojas, 2012).

Las garrapatas se encuentran presentes en muchas áreas debido a su supervivencia en climas tropicales y subtropicales; sin embargo, algunos de los factores físicos importantes para la sobrevivencia del ectoparásito es la temperatura y la humedad. En regiones tropicales las garrapatas ovipositan con mayor frecuencia durante todo el año y las infestaciones son continuas, en condiciones donde la lluvia es abundante, se reduce la población de garrapatas por las inundaciones y la disminución de la temperatura (León-Clavijo y Hernández-Rojas, 2012).

4.6 Clasificación taxonómica

Las garrapatas en general, se encuentran ubicadas taxonómicamente dentro de la clase *Arachnida* y, junto con las arañas, los escorpiones y los ácaros, son llamados artrópodos ya que comparten la característica principal de poseer cuatro pares de patas en su vida adulta y la división de su cuerpo en dos regiones: cefalotórax y abdomen (Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016).

Mundialmente, se han descrito aproximadamente 896 especies que se agrupan en el suborden *Ixodida* (Guglielmone *et al.*, 2010) y se dividen en tres

familias de acuerdo con sus características morfológicas: *Ixodidae* conocidas como garrapatas duras, *Argasidae* o garrapatas blandas y *Nuttalliellidae*, esta última familia representada por el género *Nuttalliella*, que posee características intermedias de las dos familias principales (Barker y Murrell, 2008) (Fig. 2).

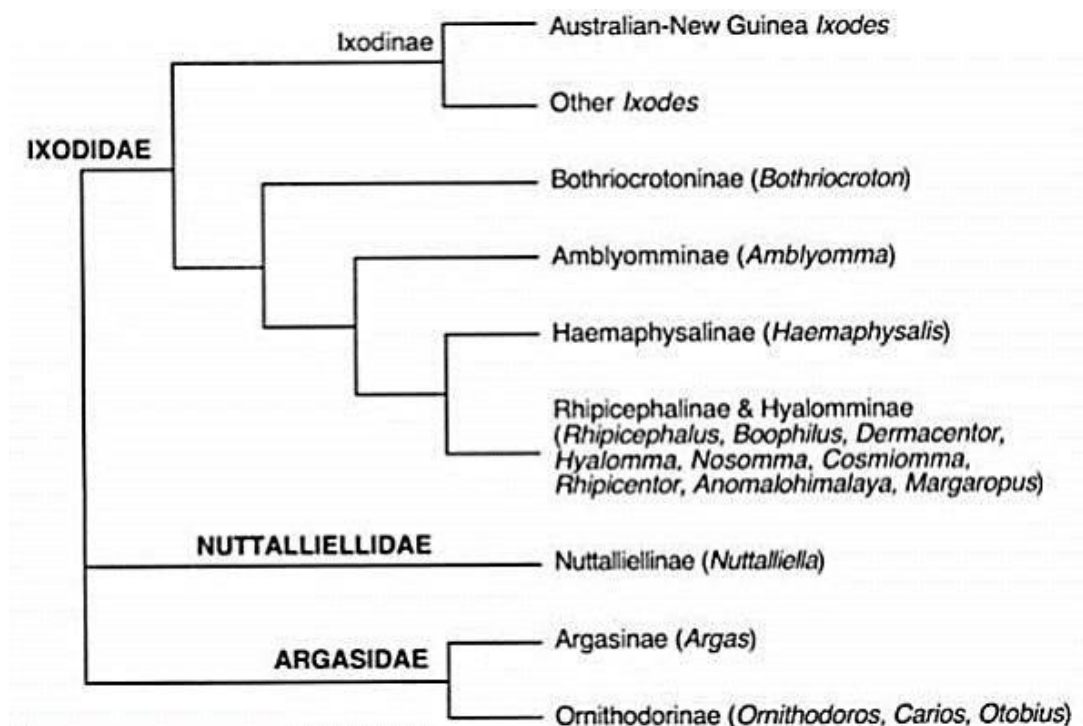


Figura 2. Filogenia de las subfamilias de garrapatas (Barker y Murrell, 2004).

- **Familia *Ixodidae***

A las garrapatas pertenecientes a esta familia se les conoce como garrapatas duras debido a que poseen un escudo dorsal, el cual presenta un dimorfismo sexual, pues el escudo del macho cubre completamente el dorso mientras que en la hembra solo cubre una parte de la zona dorsal, esto debido a que la hembra aumenta su tamaño tras alimentarse (Quiroz, 2006; Bowman, 2011). El cuerpo de estas garrapatas es ovalado y plano cuando están vacías, pero en el caso de las hembras, cuando están repletas de sangre adquieren una forma redondeada o globosa (Salazar, 1993). El capítulo se ubica anterior al cuerpo y puede verse desde una vista dorsal. Conductualmente, esta familia se caracteriza por realizar la cópula sobre el hospedador y por qué las ninfas y adultas se adhieren y se

alimentan de su hospedador solo una vez durante todos sus estadios (Quiroz, 2006). Con base en esta conducta, las garrapatas de esta familia se pueden clasificar como garrapatas de tres hospedadores cuando cada estadio (larva, ninfa, adulta) es desarrollado en un hospedador diferente. Las garrapatas de dos hospedadores son aquellas que completan dos estadios sobre el mismo animal afectado y solo un estadio se realiza sobre uno diferente y las garrapatas de un hospedador son aquellos que utiliza un solo hospedador durante todo su ciclo biológico (Bowman, 2011).

Las especies de garrapatas que afectan más comúnmente al ganado bovino pertenecen a la familia *Ixodidae*, entre ellas se encuentran las especies *A. cajennense*, *R. annulatus* y *R. microplus*, por mencionar algunas, siendo esta última la de mayor relevancia en la producción bovina alrededor del mundo (Merino, 2010; de la Fuente y Merino, 2013).

- **Familia *Argasidae***

Las garrapatas de esta familia no presentan escudo, motivo por el cual son conocidas como garrapatas suaves o garrapatas blandas. El capítulo se encuentra debajo del cuerpo en ninfas y adultos, por lo que no se puede apreciar cuando se observa dorsalmente a la garrapata, en larvas la posición del capítulo es anterior al cuerpo (Salazar, 1993; Quiroz, 2006). La mayoría de las garrapatas de esta familia no se mantienen siempre sobre su hospedador, generalmente habitan en los nidos de los animales que infectan, como las aves, roedores o murciélagos y solo salen repentinamente para alimentarse de su hospedador y después regresan a su escondite (Bowman, 2011). Sin embargo, hay algunas que si se mantienen siempre sobre su hospedador como lo son las garrapatas del género *Otobius*. Algunas especies de garrapatas suaves pueden también afectar a los humanos y transmitir patógenos (Stafford III, 2007).

- **Familia *Nuttalliellidae***

Esta familia de garrapatas que comparte ciertas características morfológicas con las otras dos familias antes mencionadas, fue descrita a partir de una sola hembra repleta descubierta en el sur de África (Bedford, 1931).

4.7 Alimentación de las garrapatas

Para poder desarrollarse durante todos sus estadios, las garrapatas necesitan alimentarse de fluidos tisulares y sanguíneos de forma exclusiva, es por esto que son llamadas ectoparásitos obligados y de la misma forma son nombrados artrópodos hemimetábolos (Cortés-Vecino, 2011).

Al inicio del proceso de alimentación, la garrapata se une al hospedador cortando su piel con sus estructuras bucales, llamadas quelíceros y se ancla en el tejido con el hipostoma, estas estructuras se encuentran ubicadas en el capitulum o capítulo (Fig. 3).

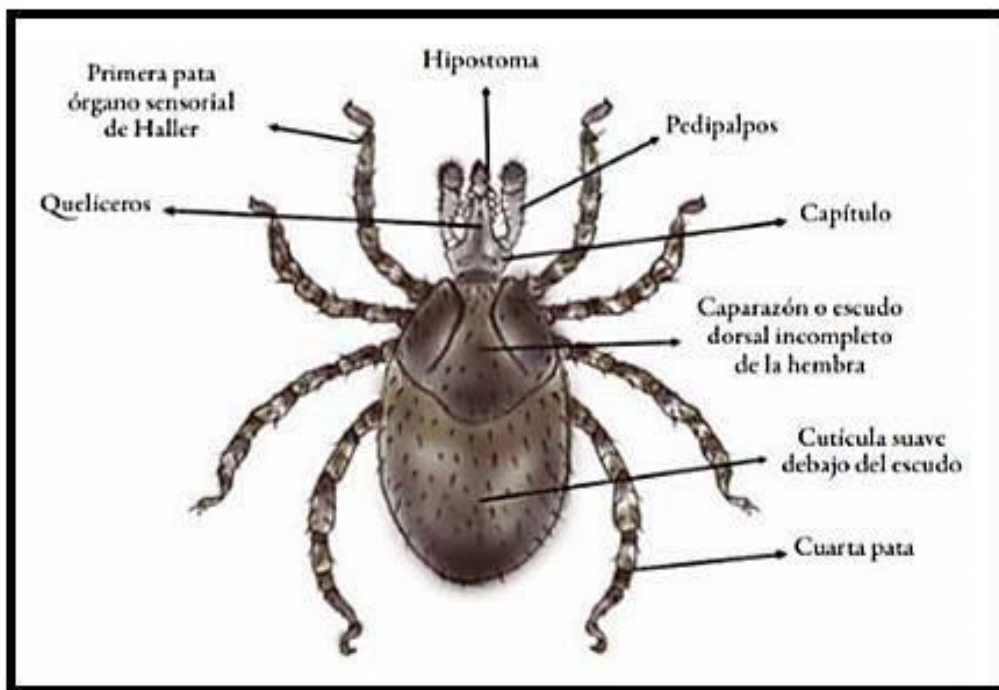


Figura 3. Estructuras taxonómicas de garrapatas de la familia *Ixodidae* (Polanco-Echeverry y Rios-Osorio, 2015).

4.8 *Rhipicephalus microplus*

R. microplus es un miembro de la familia *Ixodidae*, anteriormente se conocía a esta garrapata como *Boophilus microplus*, pero de manera reciente *Boophilus* se convirtió en un subgénero del género *Rhipicephalus* (Spickler, 2007). Es una garrapata dura capaz de infestar una gran diversidad de animales entre las que se encuentran principalmente bovinos. Desde el punto de vista económico, *R. microplus* es la garrapata más importante debido a su amplia distribución en las regiones tropicales a nivel mundial; la clasificación taxonómica de *R. microplus* se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *R. microplus*

Phylum	<i>Arthropoda</i>
Subphylum	<i>Chelicerata</i>
Clase	<i>Arachnida</i>
Subclase	<i>Acari</i>
Super orden	<i>Parasitiformes</i>
Orden	<i>Ixodida</i>
Super familia	<i>Ixodidea</i>
Familia	<i>Ixodidae</i>
Subfamilia	<i>Rhipicephalinae</i>
Género	<i>Rhipicephalus</i>
Subgénero	<i>Boophilus</i>
Especie	<i>microplus</i>

Fuente: Datos obtenidos de Genome Assembly and Annotation report, National Center For Biotechnology Information (NCBI, 2017).

R. microplus puede ser identificada por su color rojizo en sus etapas no ingurgitadas, la fórmula dentaria del hipostoma, ausencia de festones y de su escudo que no tiene ornamentas; en las hembras la espina en la coxa está bien desarrollada, y los machos tienen cuatro placas adanales y un proceso caudal (Pérez, 2016) (Fig. 4).

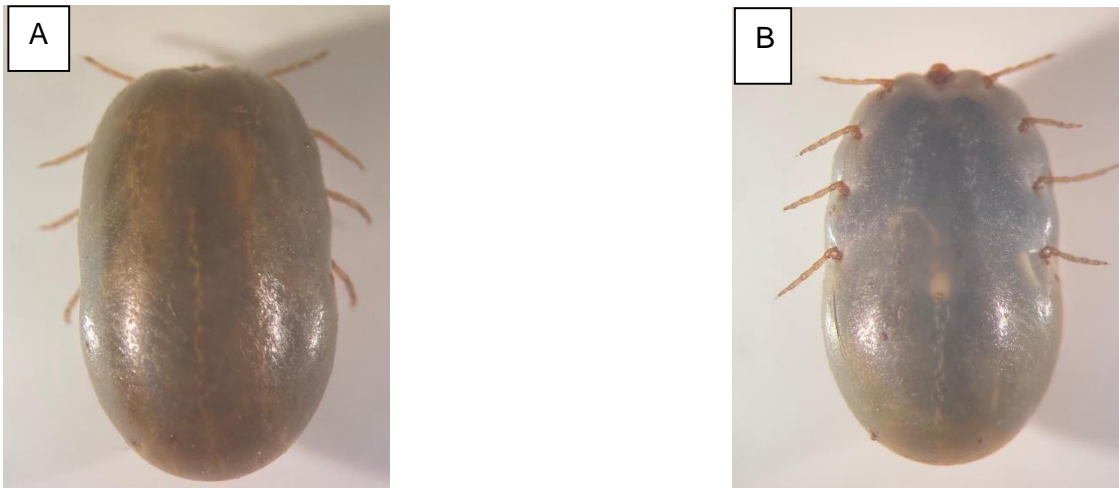


Figura 4. Identificación de *R. microplus*. A) Vista dorsal B) Vista ventral de una garrapata hembra adulta. Créditos de la imagen Dr. Rodolfo E. Laguanes Quintanilla (CENID-SAI, INIFAP, 2020).

Las garrapatas son reconocidas por su capacidad de parasitar vertebrados domésticos, silvestres y al hombre; *R. microplus* es capaz de infestar diversos animales entre los que se encuentran: borregos, caballos, ovejas, cabras, cerdos y bovinos, lo cual puede resultar en problemas sanitarios para sus hospedadores.

4.9 Importancia económica

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten han sido consideradas como limitantes de la industria del ganado bovino en el mundo (Cortés-Vecino, 2011). Los efectos causados por las infestaciones representan uno de los principales problemas que repercuten en la salud y productividad del ganado bovino en las regiones donde se distribuye este ectoparásito (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018). Estos efectos negativos se encuentran divididos en dos, los directos como la falta de apetito, anemia severa, depreciación de las pieles afectadas, disminución de la producción láctea y la consecuente muerte; y los efectos indirectos donde al momento de que la piel es lesionada, puede ser posible la transmisión de patógenos causantes de enfermedades como babesiosis y anaplasmosis, pueden conducir a cuadros agudos, crónicos o incluso pueden causar la muerte de los animales (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005).

En consideración con la población en riesgo de infestación con la garrapata *R. microplus*, se realizó un estimado de las pérdidas económicas potenciales en ganado lechero de 68 millones de dólares, tomando en cuenta las pérdidas de leche aproximadas evaluadas en litros, en correlación con el costo estimado en dólares, para la producción de un litro de leche. En lo que corresponde al ganado de carne se estimaron cerca de 573 millones de dólares en pérdidas económicas potenciales, con respecto a la pérdida de peso en gramos, por garrapata por bovino asociado con el costo en dólares, para la producción de un kilogramo de carne (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

Actualmente EUA logró controlar la babesiosis en su territorio a través de las medidas de erradicación de eliminar los vectores *R. microplus* y *R. annulatus*. Antes de la erradicación, este país invertía anualmente más de 130 millones de dólares en tratar los efectos de la babesiosis en su ganado (CFSPH, 2007).

4.10 Ciclo biológico

R. microplus es una garrapata de un solo hospedador, ya que pasa todos sus estadios de vida parásita (larva, ninfa y adulto) a expensas de un animal (CFSPH, 2007; Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016). Su ciclo vital se divide en tres fases: la no parásita o de vida libre sobre la vegetación, la fase de encuentro y la parásita que se lleva a cabo sobre el bovino (Fig. 5).

4.10.1 Fase de vida libre (no parasítica)

Esta etapa inicia con la garrapata hembra grávida y repleta que se ha desprendido del bovino y, después de un periodo de preoviposición que dura aproximadamente 7 días, deposita de 2,000 a 5,000 huevos en un sitio húmedo y protegido. Los huevos se incuban de 7 a 21 días hasta la eclosión, dando lugar al nacimiento de una nueva generación de larvas (con tres pares de patas) que, habitualmente, se refugian en la vegetación en la búsqueda de un hospedador susceptible (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011; Domínguez- García *et al.*, 2014).

4.10.2 Fase de encuentro

Posterior a la fase no parásita, se lleva a cabo la fase de encuentro, donde las larvas se desplazan hacia la punta de las hojas del pasto; este movimiento se debe a que sus órganos sensoriales perciben el dióxido de carbono, calor corporal y feromonas de los animales hospedadores, hacia los cuales se desplazan adoptando una posición particular al sostenerse en sus dos patas posteriores, extendiendo el par anterior, para tratar de adherirse al posible hospedador (Bazán-Tene, 2002; Rojas *et al.*, 2011). La duración de la fase de encuentro varía de acuerdo a las condiciones climáticas (Rojas *et al.*, 2011); en el verano, las larvas de *R. microplus* pueden sobrevivir durante un período de hasta cuatro meses sin alimentarse, mientras que en temperaturas más frías pueden vivir sin alimento hasta seis meses; sin embargo, aquellas que no pueden encontrar un hospedador finalmente mueren de inanición (CFSPH, 2007). Esta etapa es de gran importancia cuando se desea combatir y/o erradicar a este ectoparásito ya que la presencia de larvas se manifiesta en mayor medida en las praderas (fase no parasítica) que en los animales (fase parasítica) (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

4.10.3 Fase de vida parasítica

Una vez que las larvas de *R. microplus* infestan al bovino, estas se desplazan hasta alcanzar las zonas blandas del animal para alimentarse de sangre durante su ciclo, con el fin de desarrollarse y llevar a cabo los diferentes procesos de muda o cambio de estadios (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011). Las larvas son prácticamente indetectables durante una semana; posteriormente, mudan al estadio de ninfa (con cuatro pares de patas), las cuales es posible observar como pequeños granos de 1-2 mm de tamaño (Benavides-Ortiz *et al.*, 2016). Al mudar al estadio de adultas, se lleva a cabo el dimorfismo sexual, es decir, la diferenciación entre machos y hembras (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011). Machos y hembras copulan, las hembras adultas se alimentan lentamente por alrededor de una semana, repletándose rápidamente de sangre durante las últimas 24 horas. Por último, las hembras repletas y grávidas se desprenden del

hospedador, caen al suelo y se refugian en la hierba para colocar la masa de huevos y finalmente, mueren. (García-Vázquez, 2010; Domínguez *et al.*, 2014).

R. microplus puede completar la etapa de vida parasitaria en un plazo de 20 a 41 días, aunque en promedio tiene una duración de 21 días (Domínguez *et al.*, 2014). Esta característica puede causar una gran carga de garrapatas en los animales (CFSPH, 2007) (Fig. 5).



Figura 5. Ciclo de vida de la garrapata *R. microplus* (Cantú-Covarrubias y García-Vázquez, 2013).

4.11 Distribución geográfica de *R. microplus*

La garrapata *R. microplus*, debido al hecho de ser transmisora de enfermedades como babesiosis y anaplasmosis es considerada como la garrapata de mayor importancia económica para el ganado bovino en México, Centro y Sudamérica y Australia (Quiroz, 1990).

En México, los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California, Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur están reconocidos oficialmente como libres del ectoparásito. La superficie libre comprende 599,367.84 km cuadrados; es decir,

el 30.6% del territorio nacional. En fase de erradicación se encuentran los municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecho del río El Fuerte; así como los municipios de la zona Desierto del Estado de Coahuila: Cuatro Ciénegas, Ocampo y Sierra Mojada. Estos municipios abarcan una superficie en erradicación de 67,472.76 km cuadrados, que corresponde al 3.44% del territorio nacional. El resto del país comparte regiones en control y zonas libres naturales de garrapata *R. microplus*, donde la superficie en control comprende 1, 292, 407.02 km cuadrados, con el 65.96% del territorio nacional (Fig. 6) (SENASICA-SADER, 2020).



Figura 6. Situación actual del estatus zoonosanitario de la garrapata *R. microplus* a nivel nacional (SENASICA-SADER, 2020).

4.12 Efectos de *R. microplus*

Efectos directos

Las garrapatas poseen hábitos hematófagos tanto en animales homeotermos como los poiquilotermos, por lo que causan una gran pérdida de sangre en los animales que infestan llegando a causar anemia severa. Se conoce que una hembra ingurgitada puede llegar a extraer un aproximado de 3 cm³ de sangre bovina diariamente (Busch *et al.*, 2014), lo que se desencadenará en una anemia progresiva pero poco perceptible, aunque en infestaciones altas puede conducir al animal a la muerte.

Al momento de alimentarse, *R. microplus* introduce su saliva la cual contiene algunas proteínas como toxinas que van directo al torrente sanguíneo del hospedador; estas toxinas pueden producir parálisis flácida aguda (parálisis por garrapatas). Otras proteínas tienen como función principal evitar la coagulación de la sangre, esto provoca que las heridas tarden más en cicatrizar y el hospedador se vuelva susceptible a contraer diversas infecciones causando estrés en el animal, irritación, prurito constante y por ende una disminución en la alimentación, lo que puede desencadenar en una inmunodepresión (Pérez, 2016).

Efectos indirectos

Este ectoparásito provoca la transmisión de enfermedades como la babesiosis causada por los hemoparásitos *B. bigemina* y *B. bovis*, y anaplasmosis causada por *A. marginale*.

Las pérdidas económicas por muerte de los animales, disminución de la producción de leche, gastos en medicinas y aplicación de tratamientos contra las enfermedades antes mencionadas son algunas de las consecuencias de la infestación de los rebaños bovinos con *R. microplus* (Jonsson, 2006).

4.13 Enfermedades transmitidas por *R. microplus*

Las garrapatas pueden ser vectores de diversos patógenos que les transmiten a sus hospedadores a través de la saliva, como pueden ser virus (virus de la encefalitis transmitida por garrapata), bacterias (*Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi*, etc.) rickettsias (*Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., etc.) y protozoarios (*Babesia* spp.). En el caso de *R. microplus*, los patógenos más importantes que esta garrapata transmite al ganado bovino son los protozoarios *B. bovis* y *B. bigemina* causantes de la enfermedad conocida como babesiosis o piroplasmosis y la rickettsia *A. marginale* causante de la anaplasmosis (Stafford III 2007; Amaro, 2012; Lagunes *et al.*, 2016).

La babesiosis bovina, también conocida como piroplasmosis bovina, fiebre del ganado, fiebre de Texas, agua roja o fiebre esplénica (USDA, 1976; CFSPH, 2007), fue la primera enfermedad en descubrir que era transmitida por garrapatas (Stafford III, 2007). En el hospedador, el protozoario se multiplica dentro de los eritrocitos lo que ocasiona su destrucción, causando hemoglobinuria y anemia. Los signos que comúnmente se manifiestan son fiebre cercana a los 41°C, depresión, disminución del apetito y pérdida de peso (United States Department of Agriculture 1976; Stafford III 2007).

A. marginale es otro hemoparásito de importancia transmitido por la garrapata *R. microplus*. Esta es una rickettsia que se comporta como un parásito intracelular obligado afectando a los eritrocitos. Sus efectos en el ganado pueden manifestarse por medio de signos como fiebre, anemia, debilidad, dificultad respiratoria, pérdida progresiva de peso y abortos (Torioni de Echaide *et al.*, 1998; Howden y Geale, 2010).

En las garrapatas infectadas con *Babesia* spp. ocurre la transmisión vertical, esto significa que una garrapata portadora de la infección con *Babesia* spp. puede transmitir el protozoario a la progenie y dando lugar a larvas infectadas después de la eclosión de los huevos, esta transmisión es la única manera que las garrapatas de un solo hospedador como *R. microplus* pueden actuar como vectores de esta enfermedad en el ganado (Bowman, 2011).

4.14 Métodos de control

El control de las infestaciones por garrapatas se lleva a cabo mediante diferentes estrategias de control y la aplicación sistemática de dos o más métodos (control integrado de garrapatas); estos métodos se pueden clasificar en químicos y no químicos (Rojas *et al.*, 2011; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

Los métodos de control no químicos se dividen en: control biológico, control cultural e inmunológico (García Pérez y Barral, 1999; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

El método de control químico está basado en químicos sintéticos como organofosforados, piretroides, amidinas, fenilpirazolonas y lactonas macrocíclicas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012), y químicos naturales que pueden ser compuestos de plantas con propiedades ixodicidas (Kiss *et al.*, 2012; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

4.14.1 Control químico

El método químico para el control de *R. microplus* consiste en la aplicación de sustancias con un efecto ixodicida, con el fin de controlar a esta garrapata (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014; Escobar-Chavarría, 2014).

En México se utilizan como ixodicidas más de 50 productos químicos, los cuales de acuerdo a sus características químicas y mecanismos de acción se han clasificado en los siguientes 6 grupos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

- Organofosforados: Son ésteres del ácido fosfórico y de sus derivados, actúan inhibiendo enzimas con actividad esterasa, la más importante es la acetilcolinesterasa, lo que genera una acumulación de acetilcolina que lleva a la alteración del impulso nervioso, parálisis y muerte de las garrapatas (Fernández *et al.*, 2010).
- Piretroides sintéticos: Los piretroides son moléculas químicas sintéticas, análogas de las piretrinas. Estos tienen un efecto sobre el transporte de sodio a las membranas nerviosas, lo que lleva a parálisis y muerte (Narahashi, 1971).

- Amidinas: Las amidinas son moléculas sintéticas derivadas de aminas, son antagonistas de los receptores de octopamina en parásitos, lo que provoca una hiper-excitabilidad de las garrapatas, seguida de la muerte (Beyer y Walter, 1987).
- Fenilpirazoles: Un grupo de moléculas de acción prolongada. Éstas tienen un efecto antagonista sobre el receptor GABA, interfiriendo con los canales de cloro de las membranas, impidiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos nerviosos (Devine *et al.*, 2008).
- Reguladores del crecimiento: Su principal exponente es el fluorazon, el cual es un inhibidor de la quitina en los artrópodos. Esta molécula difunde en la sangre del hospedador de donde es ingerida por el artrópodo, impidiéndole la muda de larvas y ninfas, los huevos ovipositados por garrapatas adultas tratadas no eclosionan (FAO, 2017).
- Lactonas macrocíclicas: Son moléculas complejas derivadas de la fermentación de actinomicetos. Las lactonas macrocíclicas se dividen en dos grandes familias, avermectinas e ivermectinas. Las lactonas macrocíclicas ejercen su efecto antiparasitario al incrementar la permeabilidad de la membrana a los iones cloruro con la consecuente hiper-polarización y parálisis de la musculatura del parásito con lo cual producen la muerte (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2010).

4.14.2 Control no químico

- Control biológico

El control biológico se enfoca en maximizar los efectos de reguladores biológicos como son los enemigos naturales de la garrapata (Rojas *et al.*, 2011).

En el 2014, Rodríguez-Vivas y colaboradores, señalaron que se tienen cuatro grupos de agentes biológicos potenciales. Estos grupos incluyen los hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*), las bacterias (*Bacillus thuringiensis* y *Cedecea lapagei*), los nemátodos entomopatógenos (*Heterorhabditidae* y *Steinernematidae*) y depredadores como aves (garzas “garrapateras”), hormigas (*Pachycondyla* spp.), escarabajos, avispas (*Ixodiphagus* spp.) y arañas (*Lycosa* spp.) (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se busca que este método solamente afecte al parásito blanco y no al hospedador o al hombre de manera que su implementación sea económica y ambientalmente viable (Rojas *et al.*, 2011).

- Control mecánico

Los bovinos pueden destruir algunas garrapatas por aplastamiento al realizar su conducta típica de frotamiento contra diferentes objetos (Quiroz, 2006). Aunque no es recomendable, se puede retirar a las garrapatas de forma manual individualmente, para ello se utilizan pinzas pequeñas para sujetar la garrapata lo más próximo posible a la piel, de ahí se tira hacia arriba con una fuerza constante, pero cuidando de no romper el hipostoma de la garrapata pues este puede romperse y quedarse dentro de la piel. Una vez retirada la garrapata, se limpia el área de la mordedura con algún antiséptico como alcohol, tintura de yodo o agua y jabón. Las garrapatas retiradas pueden eliminarse sumergiéndolas en alcohol y posteriormente envolviéndolas en envase sellado o con cinta adhesiva (Center for Disease Control and Prevention, 2015).

- Control cultural

Este tipo de control se emplea sobre la fase de vida libre de la garrapata y se lleva a cabo modificando su hábitat con la finalidad de perjudicar su desarrollo (Domínguez *et al.*, 2014). Algunas de estas prácticas son: quema controlada, remoción de la vegetación y el subsuelo, y descanso y rotación de praderas para impedir que larvas activas encuentren a su hospedador, y como consecuencia mueran de inanición (Rosario *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2014).

Además, se incluye al uso de algunos pastos forrajeros que intervengan con la fase de encuentro, ya que tienen la característica de repeler o atrapar a larvas de garrapatas que afectan al ganado bovino, como el pasto gordura (*Melinis minutiflora*) caracterizado por secretar una oleorresina por sus tricomas presentes en hojas y tallos, la cual contiene metabolitos secundarios como 1-8 cineol, eicosano, carvacol y geraniol que propician un efecto anti-garrapata (Iriarte Del Hoyo *et al.*, 2013); jaragua (*Hiparrhenia rufa*) que brinda una

temperatura y humedad desfavorables al desarrollo de las larvas, afectando la sobrevivencia de éstas; el pasto insurgentes (*Brachiaria brizantha*) que a través de sus finas vellosidades produce una secreción densa con un olor característico que funciona como repelente; y finalmente, el pasto llanero (*Andropogon gayanus*) que manifiesta una alta densidad de vellos prolongados no glandulares, lo que impide que las larvas escalen a las puntas de la hojas, para esperar al hospedador (Iriarte Del Hoyo *et al.*, 2012; Iriarte Del Hoyo *et al.*, 2013).

El control cultural es una alternativa ecológica que ha formado parte del manejo integral de plagas en el área agrícola y pecuaria en otros países, presentando el concepto de ganadería sustentable (Domínguez *et al.*, 2014).

- Selección de hospedadores resistentes

Este método se basa en la utilización de razas de bovinos resistentes a las garrapatas. Esta resistencia se define como: la capacidad inmunológica y genética por la cual el animal limita el número de garrapatas que llegan al estadio adulto cuando los parasitan; capacidad que poseen todos los bovinos en mayor o menor grado (Ferrari, 2002). La resistencia de los bovinos puede ser de dos tipos: Innata (debido a lo largo del pelo, grosor de la piel, secreción de las glándulas sebáceas y sudoríparas, movilidad de la piel y hábitos del animal) y adquirida (se manifiesta después que el animal ha sido expuesto a algunas infecciones y es hereditaria) (Ferrari, 2002). Se ha observado que ganado *Bos indicus* o raza cebú presenta del 10 al 20% menos garrapatas durante las infestaciones que el ganado *Bos Taurus*. Por lo tanto, la eficiencia de este método radica en la selección de animales que presenten poca carga de garrapatas, y su posterior cruzamiento con otros animales con la misma característica, así como también la introducción de razas cebú en el hato (Ferrari, 2002; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

4.15 Resistencia a ixodícidas

La resistencia a ixodícidas en las poblaciones de *R. microplus* es un evento que ocurre con gran frecuencia, desde hace muchos años en México. La frecuencia y magnitud de la resistencia es más alta en las regiones costeras tropicales que

en el interior del país. Esta distribución de la resistencia probablemente es debida al número de tratamientos con ixodicidas que se requieren por año para el control de garrapatas dentro de cada área geográfica (Miller *et al.*, 2007).

Este fenómeno, se desarrolla cuando las mutaciones genéticas naturales permiten a una pequeña proporción de la población (alrededor de 1 en 1 000 000 de individuos) resistir y sobrevivir a los efectos de los productos químicos empleados como ixodicidas (Roush, 1993). Es importante considerar la resistencia como un problema de población más que de individuos, ya que en una población normal de artrópodos que no ha sido expuesta a algún ixodicida, se pueden encontrar tres tipos de individuos: homocigotos susceptibles, heterocigotos susceptible-resistentes y homocigotos resistentes (Conway y Comins, 1979).

La resistencia a los ixodicidas es una condición genética que le confiere a una población de garrapatas, la capacidad para adaptarse exitosamente a un ambiente tóxico que le permite sobrevivir a la exposición de los ixodicidas que matan a otros individuos de la misma población (Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

El primer reporte de resistencia en garrapatas *R. microplus* en México se realizó en 1981, en una muestra del municipio de Tuxpan, Veracruz que presentó resistencia a los organofosforados. Posteriormente, en 1993 se detectaron los primeros hallazgos de resistencia a productos piretroides, en Soto la Marina, Tamaulipas y Emiliano Zapata, Tabasco (Ortíz *et al.*, 1994). A principios del año 2001 se detectó en una muestra de garrapatas *R. microplus* del estado de Tabasco el primer caso de resistencia a amitraz (Fragoso y Soberanes, 2001).

La resistencia múltiple a los ixodicidas en el territorio mexicano continúa extendiéndose a razón de la presión que se ha ejercido mediante el empleo de ixodicidas durante los últimos años. Actualmente se han diagnosticado poblaciones de garrapatas resistentes a organofosforados, piretroides, amidinas (Rosario-Cruz *et al.*, 2009), fipronil (Miller *et al.*, 2007) y de manera más reciente a las ivermectinas (Pérez-Cogollo *et al.*, 2010) (Fig. 7).

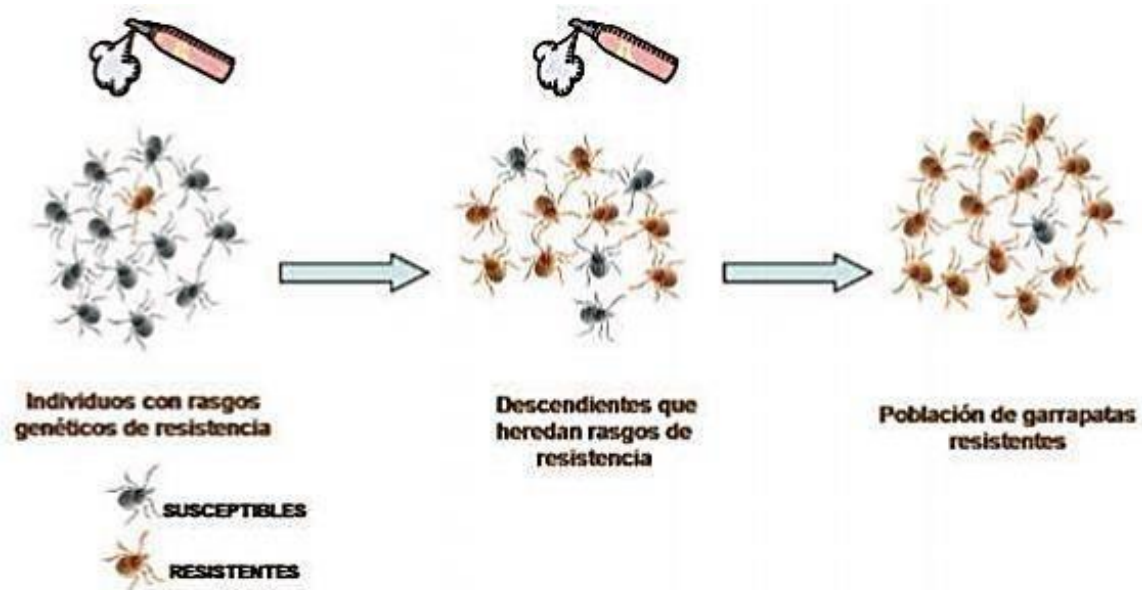


Figura 7. Esquema del desarrollo de la resistencia a los ixodicidas (Rosario *et al.*, 2009).

4.16 Control inmunológico

El control inmunológico se basa en la utilización de vacunas que contienen antígenos específicos, siendo posible y factible ya que producen una protección inmunológica en los animales que se ve reflejada en la reducción de las funciones vitales de las garrapatas (Willadsen y Kemp, 1988; Merino *et al.*, 2011).

En el desarrollo de vacunas para el control de garrapatas, se han utilizado dos tipos de antígenos. Los primeros son antígenos convencionales, secretados a través de la saliva de las garrapatas durante su fijación y alimentación en el hospedador, estos son llamados antígenos “expuestos”. Por lo general, son proteínas o péptidos sintetizados en las glándulas salivales. Estos antígenos son recogidos por las células dendríticas del hospedador, que los procesan y los presentan a los linfocitos T, induciendo una respuesta inmune mediada por anticuerpos o células (Nuttal *et al.*, 2006).

En contraste, los antígenos “ocultos” generalmente no tienen contacto con los mecanismos inmunitarios del hospedador (Willadsen y Kemp, 1988). Los antígenos ocultos típicos son aquellos que se encuentran en la pared intestinal de la garrapata e interactúan con inmunoglobulinas específicas absorbidas

durante la alimentación de la garrapata. Sin embargo, cualquier antígeno que normalmente no se presenta al hospedador es un antígeno oculto, y es un candidato potencial vacunal sí: a) interacciona con inmunoglobulinas que ingresan en la hemolinfa y b) se asocia con alguna función biológica para la garrapata (Nuttall *et al.*, 2006).

4.17 Relación inmunológica hospedador – garrapata

Durante la infestación por garrapatas se establece una relación muy estrecha con el hospedador que ocasiona una estimulación de la respuesta inmunológica del bovino. Las garrapatas poseen varias sustancias, que, al momento de ser ingresadas al cuerpo del hospedador, en este caso del bovino son reconocidas como sustancias extrañas y se comienzan a sintetizar biomoléculas y células que actuarán en contra de ellas (León-Clavijo *et al.*, 2012).

Se debe tener en cuenta que el tipo de respuesta inmunológica va a depender de la especie de garrapata y del hospedador, se debe de considerar las variaciones que se presentan, debido a que son factores importantes para asegurar el control de la infestación (Brossard y Wikel, 2004).

4.18 Antígenos en el desarrollo de vacunas contra *R. microplus*

Se conocen tres tipos de antígenos que pueden ser utilizados como blancos moleculares en el desarrollo de vacunas para control inmunológico en bovinos: antígenos expuestos, antígenos ocultos y antígenos mixtos (Nuttall, 2006).

Los antígenos expuestos son proteínas que secretan las garrapatas en la saliva cuando se alimenta del hospedador bovino. Se le llaman expuestos ya que son los primeros con los que tienen contacto e inmediatamente desencadenan una respuesta inmunológica. Ocasionando una serie de medidas de inmunosupresión a través de moléculas en la saliva por parte de las garrapatas (Wikel, 1979).

Los antígenos ocultos no presentan una interacción inmediata con el hospedador durante la infección, por lo que es necesario la exposición de estos de forma “artificial” (por inoculación en vacunas) para lograr una respuesta inmune, de otro modo no se presenta respuesta inmune de ningún tipo. Un ejemplo de moléculas en este tipo de antígenos son aquellas relacionadas al endotelio intestinal, en músculos, en embriogénesis, entre otras (Fig. 8).

Los antígenos mixtos presentan características de los expuestos y los ocultos, ya que tienen el potencial para proteger contra diferentes estadios y pueden brindar protección contra distintas especies de garrapatas (Trimnell, 2002).

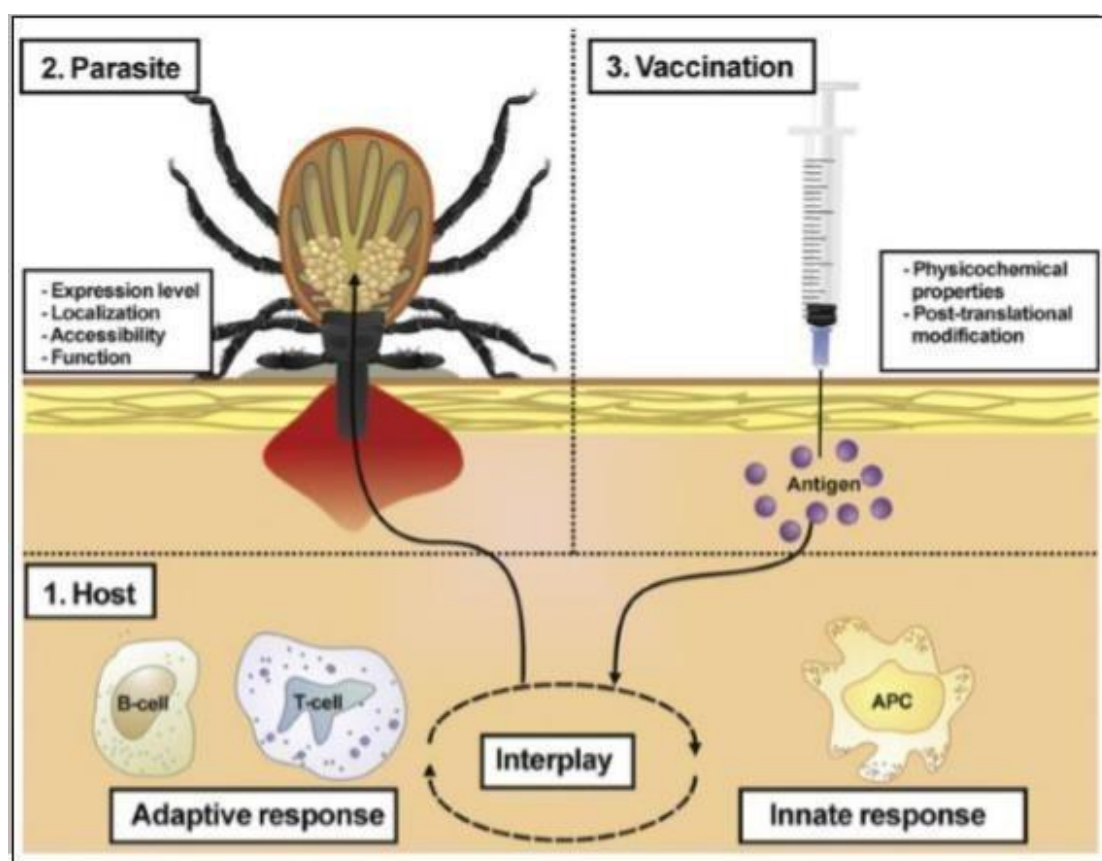


Figura 8. Mecanismo de acción de la inmunidad contra garrapatas. (1) Respuesta inmunitaria del hospedador, (2) Proteoma de la garrapata, y (3) Interacción de la respuesta inmunitaria en presencia de un antígeno vacunal (Maritz *et al.*, 2012).

Hoy en día las vacunas disponibles comercialmente están dirigidas hacia los antígenos ocultos (Almazán *et al.*, 2010; Almazán *et al.*, 2012).

Algunos antígenos ocultos han sido aislados como candidatos vacunales, entre ellos están los que han sido extraídos de la garrapata *R. microplus* como son: Bm95, Bm91, Vitelogenina, ATAQ y el más conocido Bm86 (García-García *et al.*, 2000).

4.18.1 Bm95

Un análisis de poblaciones realizado en Argentina mostró polimorfismos en el gen que codifica para el antígeno Bm86, la cual resultó en una proteína soluble, en lugar de una proteína de membrana como la detectada en garrapatas de Australia y Cuba, lo cual llevó a que estas garrapatas sean resistentes al efecto de la vacunación. Bm95 (homólogo de Bm86) es una proteína recombinante y fue sintetizada con la finalidad de evitar la resistencia ocasionada por los polimorfismos de Bm86 (Alzugaray, 2017). Esta proteína fue aislada de células intestinales de *R. microplus* de una cepa de Argentina (Tellam *et al.*, 2002). Fue secuenciada en 1999 y se encontró que sólo difiere en 21 residuos de aa de la proteína Bm86 (Peconick *et al.*, 2008). Bm95 fue probada en bovinos en condiciones de producción y se demostró que es eficiente contra varias cepas de garrapatas *R. microplus* (Turnbull, 1990; Andreotti, 2006).

4.18.2 Bm91

Bm91 es una glicoproteína que se encuentra en las glándulas salivales y en el intestino medio de *R. microplus* (Riding *et al.*, 1994), este antígeno ha sido expresado de forma recombinante en *E. coli* (Hernández *et al.*, 1998). La eficacia de este antígeno no supera los resultados obtenidos con Bm86, pero en conjunto su efecto se potencializa (León-Clavijo *et al.*, 2012).

4.18.3 Vitelogenina

Esta proteína es sintetizada en los ovarios, intestinos y cuerpos grasos de los artrópodos, es un precursor de la vitelina, la cual funciona como alimento para embriones y larvas (Granjeno *et al.*, 2006).

4.18.4 ATAQ

En estudios recientes, se describe a la proteína ATAQ, como una proteína con gran similitud a Bm86 en estructuras primarias y secundarias. Fue descubierta mediante análisis bioinformáticos realizados a la secuencia de la proteína, donde se identificó un péptido compuesto por 11 aminoácidos (YFNATAQRCYH) del cual fue elegida la secuencia Alanina-Treonina-Alanina-Glutamina para dar lugar al nombre “ATAQ” (Nijhof *et al.*, 2010).

Mediante la técnica de qRT-PCR (transcripción reversa cuantitativa), se ha demostrado que la proteína ATAQ se expresa tanto en el intestino medio como en los túbulos de Malpighi, en contraste con los ortólogos de Bm86 que se expresan exclusivamente en el intestino medio de la garrapata (Nijhof *et al.*, 2010; Sonenshine y Roe 2013); esto es destacable ya que, de ser ingeridos los anticuerpos anti-ATAQ, puede provocar daños en ambos órganos de la garrapata al alimentarse.

Hasta la fecha, se ha reportado que ATAQ se encuentra conservada en 10 especies de garrapatas (*Amblyomma variegatum*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor variabilis*, *Haemaphysalis elliptica*, *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. eversti*, *R. microplus*, *R. annulatus* y *R. decoloratus*).

Además, la expresión de esta proteína durante los diferentes estadios de *R. microplus* y *R. appendiculatus* ha demostrado ser más constante en comparación con Bm86; característica que la hace más interesante en el desarrollo de vacunas para el control de infestaciones de garrapatas (Nijhof *et al.*, 2010).

En el año 2016, Aguirre y colaboradores, realizaron un estudio *in silico* de la proteína ATAQ en donde se identificó un péptido señal en su región N-terminal, seguido por una larga porción extracelular de la proteína que se encuentra anclada a la membrana por una hélice transmembranal tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI); también mostró la presencia de cinco regiones potencialmente antigénicas (epítomos de células B), de las cuales se descartaron

aquellas que poseen similitud con proteínas de *Bos taurus*, como en el caso de dos de ellas que se localizaron en dominios EGF (Factor de crecimiento epidérmico), hasta seleccionar la de mayor carácter antigénico en una región extracelular, dando lugar a un péptido de 17 aminoácidos derivado de la proteína ATAQ. Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de inmunización (con dicho péptido sintetizado) en ratones, conejos y ganado vacuno que mostraron un 35% de eficacia en *R. microplus*, por lo que constituye una estrategia prometedora para el control integrado de garrapatas ante la posibilidad de mejorar su potencial e implementarla en el desarrollo de una vacuna multiantigénica.

4.18.5 Bm86

Es una glicoproteína considerada hasta ahora como el mejor inmunógeno frente al control de la garrapata *R. microplus*, fue aislada por Willadsen y colaboradores (1989) a partir de células de las microvellosidades del intestino de la garrapata *R. microplus* cepa Yeerongpilly (León-Clavijo y Hernández-Rojas, 2012); análisis realizados a esta proteína mencionan que se interrumpe la endocitosis causando la lisis de las células y reduciendo la capacidad reproductiva de las hembras repletas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

Es una proteína con un peso molecular de 71.7 kDa, su punto isoeléctrico es de 5.1–5.6. Presenta una estructura compleja y con dominios EGF similares a factor de crecimiento epidérmico, se encuentra en las regiones intra y extracelular con índice de hidropatía de -0.579 siendo una proteína medianamente hidrofóbica y 4 sitios glicosilados (Rand *et al.*, 1989).

Desde hace algunos años se comercializan vacunas que contienen el antígeno recombinante Bm86 contra garrapatas *R. microplus*. La primera vacuna en comercializarse fue la TickGardPlus®, de origen australiano; sin embargo, actualmente ya no está disponible. La segunda una vacuna de origen cubano (Gavac™) y una tercera desarrollada en México (Bovimune Ixovac®) (Manual Ixovac, 2017).

- Tick GARD™ (Australiana): Consisten en la expresión del antígeno recombinante rBm86 en la bacteria *E. coli*, esta vacuna fue lanzada al

mercado en 1994 y ha reportado una reducción total de infestación del 56% en bovinos vacunados.

- Gavac® (Cubana): vacuna recombinante, basada en la producción de rBm86 en *Pichia pastoris* (Bautista-Gálvez *et al.*, 2007).

Si bien las vacunas contra las garrapatas presentan la desventaja de no inducir la muerte de manera inmediata, sigue siendo una alternativa de control del ganado bovino debido a que ofrece otras ventajas como ser de fácil administración, amigables con el medio ambiente, no contaminan los productos destinados a consumo humano (carne y leche), además de representar un mejor costo-beneficio comparado con el uso de ixodicidas; adicionalmente, porque la resistencia a la vacunación a través de la adaptación selectiva es menos probable que ocurra en comparación con los ixodicidas (De la Fuente *et al.*, 2007).

4.18.6 Subolesina

La proteína subolesina se descubrió en *Ixodes scapularis* como un antígeno protector contra garrapatas y luego se caracterizó en varias especies, incluyendo *R. microplus* (de la Fuente *et al.*, 2008) siendo altamente conservado entre las especies de garrapatas ixódidas a nivel de nucleótidos y aminoácidos (Lagunes-Quintanilla *et al.*, 2014). Se localiza en glándulas salivales, intestino y aparato reproductor de diferentes géneros de garrapatas (Zivkovic *et al.*, 2010) y es un factor de transcripción, afectando múltiples procesos celulares tales como la respuesta inmune de las garrapatas, su alimentación, reproducción y desarrollo (de la Fuente *et al.*, 2008; Shakya *et al.*, 2014).

Estudios recientes han demostrado que la inhibición de subolesina por interferencia de ARN (ARNi) causa la degeneración de los tejidos de la garrapata, incluido el intestino medio, las glándulas salivales y los tejidos reproductivos (Merino *et al.*, 2011). Se han llevado a cabo ensayos de inmunización con subolesina recombinante que han dado como resultado la protección de los hospedadores contra las infestaciones por garrapatas al disminuir las tasas de supervivencia y reproducción de éstas (Almazán *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de subolesina recombinante no es totalmente exitoso,

ya que solo se ha obtenido una eficacia del 60% en experimentos de infestación controlada. (Lagunes-Quintanilla *et al.*, 2014). Por lo tanto, subolesina es considerada un candidato vacunal de interés para el control de múltiples especies de garrapatas, pero se requiere una mayor eficacia.

4.18.7 Ferritina

La regulación del hierro es fundamental en todos los organismos ya que es un elemento esencial pero potencialmente tóxico. De este modo, la ferritina es una proteína de almacenamiento intracelular importante para la regulación de hierro durante la alimentación de las garrapatas, ya que se encuentra en gran cantidad en la sangre del hospedador (Hajdusek *et al.*, 2010). Consta de 2 tipos de subunidades: una cadena ligera (sitios de nucleación) y una pesada (sitios de ferroxidasa), la cadena pesada corresponde a la ferritina tipo 2 (RmFER2) (Hajdusek *et al.*, 2009) que se ha caracterizado como una proteína específica del intestino secretada en la hemolinfa de la garrapata, donde actúa como transportador de hierro y se expresa en todas las etapas de su desarrollo, además de no poseer ortólogos funcionales en vertebrados (Hajdusek *et al.*, 2009; Merino *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la inhibición de la RmFER2 por interferencia de ARN y la vacunación con la proteína recombinante han reducido la alimentación, la oviposición y la fertilidad en *Ixodes ricinus*, *R. microplus* y *R. annulatus* (Hajdusek *et al.*, 2009, 2010), sugiriendo su posible uso como un futuro candidato vacunal contra garrapatas y enfermedades de doble acción (Merino *et al.*, 2013).

4.18.8 Serpinas (inhibidores de serina proteasas)

Las serpinas son una superfamilia de proteínas de entre 350 y 500 residuos de aminoácidos con pesos moleculares que varían de 40 a 60 kDa y poseen estructuras similares que fueron identificadas en un principio por su inhibición de proteasa serina (Gettins, 2002).

Presentan características que sugieren podrían ser un candidato vacunal, debido a que son conocidas por regular procesos celulares como la coagulación sanguínea, inflamación y activación del complemento, desempeñando un papel

importante en el mantenimiento de la hemostasis en la zona de la piel de donde se alimentan (Tirloni *et al.*, 2016).

Se caracterizan por tener residuos que se pliegan en un solo dominio compuesto por tres hojas β , y 8 o más hélices α ; dentro de las hojas β se localizan dos regiones funcionalmente importantes para el mecanismo de la serpina, la brecha y el shutter. Para funcionar como un inhibidor de la proteasa, es crítico un bucle expuesto, denominado el sitio central reactivo (RCL) (Ye *et al.*, 2001; Law *et al.*, 2006; Gettins y Olson, 2016) (Fig 9). El RCL también hace interacciones temporales con el resto de la estructura y por lo tanto es sumamente flexible (Stein *et al.*, 1990).

En artrópodos la primera serpina caracterizada fue en el gusano de seda (*Bombix mori*), la cual inhibe la tripsina y quimotripsina (Sasaki *et al.*, 1990). En garrapatas se han caracterizado diversas serpinas como IRIS e Irs2 en *Ixodes ricinus*, RaS1, RaS2 y RaS4 en *Rhipicephalus appendiculatus*, AAS27 en *Amblyoma americanum*, entre muchas otras, cuya función en la mayoría de estas serpinas se enfoca en la coagulación sanguínea y la respuesta inmune del hospedador (Tirloni *et al.*, 2014; Meekins *et al.*, 2017).

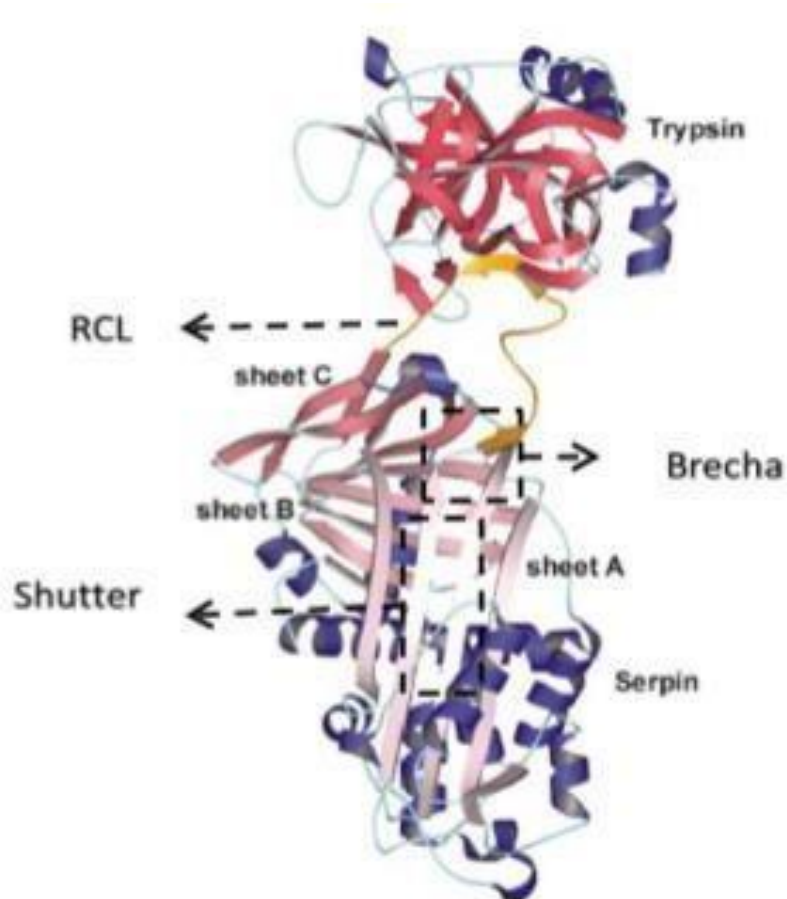


Figura 9. Ejemplo de la estructura de una serpina de la especie *Lepidoptera* spp. y la unión con tripsina mediante el RCL para su inhibición (Ye *et al.*, 2001).

En la garrapata *R. microplus* se expresan 22 serpinas (Fig. 10) (Rodríguez-Valle *et al.*, 2015). Dentro de éstas, la serpina 17 (RmS17) se logró identificar en distintos órganos de la garrapata *R. microplus* tales como: glándulas salivales, intestino medio, ovarios y la carcasa (remanente de tejido después de la disección de órganos). Esta proteína cuenta con funciones importantes en la inhibición de la coagulación sanguínea al momento de la alimentación y modula la inhibición de la respuesta inflamatoria contra hospedador. Por otra parte, en un estudio donde se realizó la incubación de quimiotripsina como proteasa diana, la serpina RmS17 y suero policlonal anti-RmS17 obtenido mediante la aplicación de una proteína recombinante de RmS17 en conejos, resultó en el bloqueo de la función inhibitoria de la serpina (Tirloni *et al.*, 2016).

Consensus	VNEEGTEAAAXTXXX-----XXXXXXXXXXXX-X-XXXFXVDHPFX
RmS-1	VNEEGTEAAAATAVM-----MAACCLSSAP-PQTYKFI VDRPEM
RmS-2	VNEEGTEAAAATAVT-----LMFYCAR-----IDDTRFVVDHPFL
RmS-3	VNEEGTIATAVTGLG-----FVPLSAHYN-PPPIEFTVDHPEI
RmS-4	VNEEGTIAAAVTGLF-----VMSSSLYE-PPPIFFTVDHPFL
RmS-5	VSEQGTAAAATAIR-----VSVKSGKSAGPLPPI SFRVEHPFA
RmS-6	VNEEGTEAAAVTGV I-----GVNR-IGIEP-----FLFTADHPFL
RmS-7	VDEKGTEAVALSSGI-----VRHSSTPGGE-----VEFKADHPFL
RmS-8	VNEEGTEAAAATAVV-----MGFGCSANM--VIEKKFVVDHPFM
RmS-9	LDEEGSEADSATLLR-----ISGKAEEGE-----SVVADHPEI
RmS-10	VNEEGTAAAATGLF-----VRETAPLPE-PPPIILFTVDHPEL
RmS-11	VNEEGTEAAAATAVM-----MVAQCMSSLP-PRTYKFI VDRPEM
RmS-12	VDEDGVEG--LFLTP-----LIMNYAGVS-----FNYNVNRPEM
RmS-13	VDEVGTRAVAATQAO-----FVSKELVHFK-----QFTVDRPEL
RmS-14	VDEEGTEAAAATAVA-----GAGSAAPAA--TQTTEFLVDHPFM
RmS-15	VNEEGSEAAAVTGFV-----IQRTAAAFVTPPPLPKVYVDHPEI
RmS-16	VNEEGSEAAAVTGVT-----INTR-TTTGP-----SEIHVDRPEL
RmS-17	VNEEGSEAAAGATAVI-----FYTKAAAVG-----IPFVVDHPFL
RmS-18	VNEEGTEAAAATGMV-----AMARCASMG-----IPFSVDHPFM
RmS-19	VDEEGTEAAAATVDI-----GVGAATPPRE-VLRTHFVVDHPFM
RmS-20	VNEEGTEAASATALD-----MCGCAALD-----QTVFIVNRPEM
RmS-21	LTTKGGPSPPGFSTLLS--VCSTIPNEP-----VRFVVDRPEV
RmS-22	TSEEGVGEATKPPEP-----LDASVIT-----FRANRPEL

Figura 10. Homología del sitio central reactivo (RCL) en diferentes serpinas de la garrapata *R. microplus*. (Rodríguez-Valle *et al.*, 2015). La región señalada con líneas punteadas se refiere al enlace escindible, el cual le brinda especificidad a las serpinas frente a la proteasa blanco para realizar su función inhibitoria (Gettins, 2002).

4.18.9 RmS17

RmS17 no ha tenido una caracterización molecular completa, sin embargo, en la literatura se menciona que se han realizado distintos estudios con ella (Tirloni *et al.*, 2016). Anteriormente, se realizó un estudio con diferentes serpinas, en ellas incluida RmS17, en donde fue sintetizado cDNA de diferentes órganos de la garrapata *R. microplus* (glándulas salivales, intestino medio y ovarios) con el fin de identificar en que órganos de la garrapata se encontraban presentes las serpinas analizadas; los autores muestran que RmS17 se localiza en los tres órganos más importantes para el desarrollo de la garrapata y menciona que las serpinas localizadas en glándulas salivales y en intestino medio podrían desempeñar una función en la hematofagia permitiendo la absorción de la sangre y manteniéndola en un estado fluido en el sitio de alimentación y después de la ingestión; por lo tanto se le puede otorgar dicha función a RmS17.

En otros estudios con RmS17 se ha demostrado que esta proteína interfiere con el tiempo de recalcificación de hospedador en donde dicha característica parece tener cierta relación con la inhibición del factor XIa, el cual está implicado en la

cascada de la coagulación (Tirloni *et al.*, 2016).

4.19 Análisis bioinformáticos

Existe una gran variedad de base de datos disponibles para la búsqueda de secuencias de ADN o proteínas. Los métodos más empleados son los que usan algoritmos de búsqueda de secuencias similares, la predicción de la localización de la proteína en la célula, así como los dominios de familias de proteínas (generadas de la comparación global de todas las secuencias de proteínas). También existen programas y servidores que permiten predecir las propiedades antigénicas de una molécula (Ferreira y Porco, 2008). El éxito del proceso todavía depende de la exactitud con la que se pueden predecir las características del antígeno, lo cual depende del algoritmo utilizado por el programa (Domínguez García y Rosario-Cruz, 2016).

En la búsqueda de nuevos candidatos vacunales comienza con la investigación *in silico* de la información del genoma del organismo de interés, a los cuales mediante el uso de programas bioinformáticos se les puede asignar una función putativa de la proteína hasta la predicción de las regiones antigénicas potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas (Prudencio *et al.*, 2009).

4.20 Características de un candidato vacunal

Para poder comprender como es la función del sistema inmunitario es necesario conocer algunos conceptos necesarios; a continuación, se describen brevemente algunos de los que se abordaron en esta investigación (Gallastegui *et a.*, 2002; Vega- Robledo 2009):

- Antígeno: Es una molécula de procedencia exógeno o endógena que resulta extraña al organismo. Puede presentar una unión específica a un anticuerpo o un receptor de célula T, pero no siempre puede generar una respuesta en el sistema inmune.
- Inmunógeno: Es aquel antígeno que induce una respuesta inmune.
- Anticuerpo: Proteína específica producida por los linfocitos B como respuesta a un inmunógeno.

- Epítopos: Es aquella región o lugar de reconocimiento específico de los anticuerpos.
- Antigenicidad: Es referido a la capacidad de que interaccionen un antígeno con los productos de una respuesta inmune, ya sea un anticuerpo o células T.
- Inmunidad innata: Esta inmunidad es la que posee cada individuo por naturaleza a pesar de no tener una previa exposición a un antígeno.
- Inmunidad adquirida: Ocurre cuando se expone a un antígeno y aumenta en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a una macromolécula en particular.

La búsqueda de candidatos vacunales es el análisis a nuevas macromoléculas capaces de desencadenar una respuesta inmunológica mediante herramientas computacionales para la caracterización y determinar si pueden ser utilizados en vacunas para el control de garrapatas. Algunas de las propiedades importantes a considerar son:

- Tamaño

Aquellas proteínas con masa molecular mayor a los 10 kDa y con presencia de grupos químicos activos son más inmunogénicas, también se sabe que aquellas proteínas de menor masa pueden ser inoculadas con un coadyuvante e inducir la producción de anticuerpos.

- Grupos químicos activos

La presencia de ciertos grupos químicos activos, especialmente de carácter polar, confieren inmunogenicidad. También la presencia de aminoácidos aromáticos en la superficie de la proteína contribuya a aumentar su antigenicidad.

- Antígenos solubles

Sustancias que permanecen diluidas en soluciones en condiciones favorables. Pueden ser productos de metabolismo celular u obtener por antígenos insolubles (Florentino *et al.*, 1994).

- Sitios glicosilados

La glicosilación es una modificación postraducciona que permite distinguir a proteínas ajenas de las propias. Estas modificaciones pos-traduccionales afectan las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, lo cual permite la conformación de nuevas estructuras que pueden ser consideradas como epítomos (Rosete *et al.*, 2009). El tipo y grado de glicosilación influye en la antigenicidad de las moléculas reconocidas por los linfocitos T (Mouritsen *et al.*, 1994).

4.21 Clasificación de vacunas en la actualidad

4.21.1 Vacunas de nueva generación

Una de las estrategias que han mostrado mayor impacto en el control de infestaciones parasitarias, son las vacunas, que fungen con un rol de gran importancia ya que brindan protección en salud animal, disminuyendo enfermedades y sufrimiento a los animales, al igual que el aprovechamiento de una mayor producción en cárnicos y leche de cualquier tipo de ganado (Abalos *et al.*, 2011).

Existen diferentes tipos de vacunas que pueden ser utilizadas, pero cada una está diseñada para que el sistema inmunitario responda ante el contacto con ciertos patógenos. Algunas de las características más importantes que se deben tomar en cuenta cuando se hace el diseño de una vacuna es el tipo de respuesta que se tiene por parte del sistema inmune ante la presencia del organismo exógeno y a quién va dirigida la vacuna, entre otras (Maritz *et al.*, 2012).

Los antígenos no se almacenan en la memoria, los antígenos inducen una respuesta inmune debido a que son reconocidos y procesados por células presentadoras de antígenos (CPA), quienes a su vez los presentan a los linfocitos B y los linfocitos Th1 como parte del proceso de la inmunidad adquirida. También durante este proceso, los linfocitos B se dividen en células plasmáticas productoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria, favoreciendo el reconocimiento de los antígenos de la segunda exposición (Grande, 2016).

4.21.2 Vacunas atenuadas mediante modificación genética

Una de las nuevas tecnologías es la genética reversa que permite la fabricación de vacunas recombinantes por medio de la identificación de zona con fenotipos virulentos y mutantes. Desarrollando virus y bacterias genéticamente modificados ya sea con una mutación o delección en los genes relacionados a la patogenicidad (López *et al.*, 2004).

4.21.3 Vacunas sintéticas

Este tipo de vacunas consiste en la síntesis química de la secuencia genotípica contiene información sobre proteínas antigénicas de los patógenos. Estas proteínas procedentes de bacterias o virus con características antigénicas tienen múltiples epítomos, pero sólo ciertos epítomos pueden desencadenar una respuesta protectora eficaz. Por medio de herramientas genéticas y el uso de anticuerpos monoclonales, se puede identificar esos epítomos con capacidad inmunogénica y así hacer la síntesis química de fragmentos más específicos, obteniendo mimotopos que sean reconocidos por el sistema inmunológico del hospedador (Mallorquín *et al.*, 2004).

Una de las desventajas de esta síntesis química es que pueden no tener las mismas características que el péptido natural, de modo que se pierda actividad en la vacuna.

4.21.4 Vacunas anti-idiotipo

Las vacunas de anti-idiotipo se caracterizan por utilizar un anticuerpo inocuo, en lugar de un antígeno, que pueda reproducir la morfología del antígeno con características de inmunología. Para la producción de una vacuna es necesario obtener el anticuerpo contra el antígeno. A este anticuerpo se le llama idiopático, el cual es inyectado en el hospedador provocando la producción de anticuerpos contra él, los anticuerpos anti idiopáticos. Y así este anticuerpo utilizarlo en vacunas ya que presentan un antigénico similar al original (Pardo *et al.*, 2004).

Este tipo de inmunidad es diferente a las anteriores, pues ya que se inyectan anticuerpos en lugar de antígeno se confiere inmunidad adquirida pasiva. En las

anteriores se presenta inmunidad activa ya que son los antígenos del patógeno los que provocan la respuesta inmune.

4.21.5 Vacunas génicas

Lo que caracteriza a este tipo de vacunas es que se introduce el gen que codifica al antígeno, el cual después de ser sintetizado por las células del hospedador desencadenan la respuesta inmunitaria, la cual es tipo humoral y celular. Una ventaja que presenta este tipo de vacunas es que pueden ser suministrados más de un antígeno a la vez (Vega *et al.*, 2004). Existen dos tipos de vacunas génicas:

- A. Inserción de los genes de interés en vectores vivos: Los genes de los antígenos son insertados en bacterias o virus atenuados por medio de técnicas de recombinación genética.
- B. Vacunas de ADN desnudo: El ADN que se introduce no se encuentra cubierto por ninguna estructura, es inserto en un plásmido.

4.21.6 Vacunas de proteínas y péptidos recombinantes

Para este tipo de vacunas es necesario el aislamiento de genes codificantes a péptidos o proteínas que se encuentren en la superficie del patógeno y presenten características antigénicas. Por medio de tecnologías de ADN recombinante, se introduce el gen en bacterias, plantas, levaduras u otro vector de expresión que permita la producción en masa de la proteína antigénica. Posteriormente, se purifica la proteína y se utiliza en vacunas.

Las garrapatas secretan varias sustancias en la saliva que son consideradas como antígenos, que al ingresar al hospedador serán reconocidos como extraños y comenzará la producción de biomoléculas y células que intentaran actuar contra ellos (Hernández, 2016). La repetida exposición con estos antígenos hará que entren en contacto con elementos de la respuesta inmune primaria. Por lo que los antígenos o inmunógenos salivales estimularán una respuesta de memoria de linfocitos T y B, garantizando una potente respuesta inmune después de la reinfestación con poblaciones de garrapatas (Grande, 2016).

Si se presenta de nuevo una infestación con garrapatas a los hospedadores que ya han adquirido la inmunidad, los inmunógenos salivales provocan una respuesta de memoria de linfocitos T y B. Durante el proceso de esta respuesta también hacen presencia algunos elementos de la inmunidad innata, como las células de Langerhans, macrófagos y células dendríticas que son importantes en el procesamiento y presentación de antígenos (Rodríguez, 1995).

V. HIPOTESIS

Las garrapatas *Rhipicephalus microplus* alimentadas sobre conejos inmunizados con un polipéptido de RmS17 (pRmS17) disminuyen el porcentaje de repleción, peso, oviposición y eclosión en comparación con garrapatas alimentadas sobre conejos no inmunizados.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inmunización de conejos con el pRmS17 sobre la infestación de garrapatas *Rhipicephalus microplus*.

6.2 Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la inmunización de conejos con el pRmS17 sobre la repleción, peso, oviposición y eclosión de garrapatas *Rhipicephalus microplus*.

Determinar la respuesta inmune humoral en los conejos inmunizados con el pRmS17 y su relación con la infestación de garrapatas *Rhipicephalus microplus*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Ubicación

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de la Unidad de Artropodología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No 8534, Col. Progreso. C.P. 62550. Jiutepec, Morelos, México.

7.2 Cepa de referencia

Se utilizó la cepa de garrapatas “Media Joya”, perteneciente al germoplasma del CENID-SAI, INIFAP, y mantenida en condiciones controladas. Esta cepa fue aislada en el municipio de Tapalpa, Jalisco, México.

7.3 Garrapatas

Las larvas de *R. microplus* que se utilizaron en este ensayo provienen de una cepa susceptible a ixodicidas colectada en Tapalpa, Jal., México y que fue caracterizada en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, SENASICA SADER, la cual ha sido mantenida en condiciones controladas en la Unidad de Artropodología del CENID-SAI, INIFAP.

7.4 Protocolo de inmunización

En el trabajo se utilizaron 12 conejos de raza Nueva Zelanda de tres meses de edad, los cuales fueron divididos en 3 grupos de 4 conejos, el primer grupo fue inmunizado con el pRms17, el segundo grupo con el antígeno Bm86 y el tercer grupo que fungió como testigo se inmunizó con solución salina más adyuvante. Se realizaron 3 inmunizaciones en total, administrando 2 dosis de 100 µg del antígeno recombinante en cada una más adyuvante Montanide (ISA 50 V2, Seppic®) en un volumen final de 1 ml por dosis los días 0, 15 y 30. La inmunización se llevó a cabo en forma subcutánea mediante jeringas de 5 ml con agujas de 22G.

7.5 Infestación de conejos

Cada conejo se infestó con 60 parejas de garrapatas *R. microplus* adultas juveniles el día 45 post-inmunización, y las cuales fueron colocadas dentro de las celdas para su fijación sobre la piel de los conejos (Anexo 1).

7.6 Determinación del título de anticuerpos por ELISA indirecto

Para evaluar la cinética de anticuerpos se realizó el ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) de acuerdo a protocolos establecidos en la Unidad de Artropodología del CENID-SAI, INIFAP (Anexo 2).

7.7 Evaluación de resultados

Los efectos de la inmunización sobre las garrapatas *R. microplus* fueron evaluados de acuerdo con lo descrito por de la Fuente y colaboradores (1999) utilizando las siguientes formulas:

Efecto sobre el número de hembras adultas (GA)= $100 [(1-NGV/NGC)]$, donde NGV es el número de garrapatas hembras adultas en el grupo vacunado y NGC es el número de garrapatas en el grupo testigo.

Efecto sobre el peso de hembras repletas (PG) = $100 [1-(PGV/PGC)]$, donde PGV es el promedio de peso de hembras adultas en el grupo vacunado y PGC es el promedio del peso de hembras adultas en el grupo testigo.

Efecto sobre la oviposición (PO) = $100 [1-(POGV/POGC)]$, donde POGV es el promedio del peso de la masa de huevos en el grupo vacunado y POGC es el promedio del peso de la masa de huevos del grupo testigo.

Efecto sobre la eclosión (EF) = $100 [1-(PPLOV/PPLOC)]$, donde PPLOV es el promedio del peso de larvas por gramo de huevos en el grupo vacunado y

PPLOC es el promedio del peso de larvas por gramo de huevos en el grupo testigo.

Eficacia de la inmunización (E)= $100 [1-(CRG \times CR0 \times CRF)]$, donde CRG = NGV/NGC, CR0 = POGV/POGC y CRF = PPLOV/PPLOC, representan la reducción del número de garrapatas hembras adultas, la oviposición y la eclosión de huevos comparada con el grupo testigo respectivamente.

7.8 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y análisis de varianza ($p < 0.05$), para comparar los resultados del número de garrapatas de hembras repletas, el peso, la oviposición y la eclosión entre los grupos experimentales. Así mismo, para comparar los resultados de la cinética de anticuerpos mediante ELISA indirecto, se determinarán por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

VIII. Resultados

- **Efecto de la inmunización del pRmS17 sobre *R. microplus***

De acuerdo con los porcentajes de reducción de garrapatas *R. microplus* obtenidos para cada grupo después de las inmunizaciones se puede observar que existieron diferencias notorias entre todos los grupos (Cuadro 2). Los conejos inmunizados con el pRmS17 mostraron un mayor porcentaje de reducción sobre el número de garrapatas repletas con un 72% ($p < 0.05$) a diferencia del grupo de Bm86 y el grupo testigo cuyos porcentajes fueron menores. Para el parámetro del peso de las garrapatas repletas, el grupo de Bm86 fue el que tuvo un mejor porcentaje de reducción con un 2%, el grupo del pRmS17 que presentó 0% de reducción. Sin embargo, se considera un efecto nulo o poco significativo ya que no presenta un efecto determinante.

En lo que corresponde al parámetro de oviposición, el grupo que presentó diferencias estadísticamente significativas, fue el grupo Bm86 con 32% ($p < 0.05$), el grupo de pRmS17 únicamente presentó 15% de reducción. Así mismo, en el efecto sobre la eclosión, el grupo que tuvo mayor porcentaje de reducción fue el de Bm86 con 23% a diferencia del grupo pRmS17 que obtuvo 12%. En este parámetro no existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo testigo.

Finalmente, con base en los resultados conseguidos en los diferentes parámetros evaluados, se obtuvo un porcentaje final que corresponde a la eficacia general de cada antígeno en estudio. El grupo que presentó una mayor eficacia en cuanto a reducción de garrapatas *R. microplus*, fue el de pRmS17 con un 79% a diferencia del grupo Bm86 con un 62%.

- **Cuadro 2.** Porcentajes de reducción de garrapatas *R. microplus* en conejos inmunizados con el polipéptido recombinante RmS17 y Bm86.

Grupo experimental	<u>Rhipicephalus microplus (Cepa Media Joya)</u>				
	<u>Porcentaje de reducción</u>				E
	<u>(antígeno/testigo)</u>				
	GA	PG	PO	EF	
pRmS17	72%* (13±12)	0% (230±88)	15% (110±60)	12% (0.54±0.35)	79%
Bm86	26% (35±7)	2% (224±92)	32%* (87±53)	23% (0.47±0.34)	62%
<u>Testigo</u>	(47±5)	(228±98)	(130±44)	(0.61±0.58)	---

El porcentaje de reducción fue calculado con respecto al grupo testigo: GA, efecto sobre el número de hembras adultas; PG, efecto sobre el peso de hembras repletas; PO, efecto sobre la oviposición; EF, efecto sobre la eclosión; E eficacia general de la inmunización. En paréntesis se muestra la media \pm la desviación estándar por número de hembras adultas, peso, oviposición y eclosión.

* Señala diferencias significativas, según prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

- **Determinación de la cinética de anticuerpos en los conejos inmunizados**

Para obtener la cinética de anticuerpos se realizó el iELISA con los sueros obtenidos de los conejos en las semanas 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Las gráficas fueron elaboradas con el promedio de los valores de absorbancia obtenidos por grupo (a 450 nm de densidad óptica) utilizando la dilución 1:100.

La cinética de anticuerpos en los grupos inmunizados con el pRmS17 y Bm86 demostraron que el promedio de la absorbancia obtenida a partir de la segunda inmunización fue estadísticamente diferente ($p<0.05$) del grupo testigo, manteniéndose así desde la semana 2, semana 6 cuando se realizó la infestación artificial y hasta la semana 12 que concluyó el experimento.

Al principio del experimento, los conejos mostraron un comportamiento similar obteniéndose valores de absorbancia basales de 0.68, 0.55 y 0.53 para el grupo testigo, Bm86 y pRmS17, respectivamente. Posteriormente, en la semana 2 cuando se realizó la segunda inmunización, hubo un incremento notorio en los dos grupos evaluados. El grupo de pRmS17 obtuvo valores de absorbancia de 3.23 y el grupo Bm86 de 1.88, siendo ambos estadísticamente diferentes ($p<0.05$). El grupo testigo se mantuvo de manera basal 0.83.

En la tercera inmunización realizada en la semana 4, nuevamente en los dos grupos en estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). En esta semana, el grupo de pRmS17 demostró tener el mayor valor con 4.22, el grupo Bm86 y testigo obtuvieron valores de absorbancia de 2.68 y 0.629 respectivamente.

En la semana 6 se llevó a cabo la infestación artificial con garrapatas *R. microplus*. En este momento los valores de absorbancia para el grupo pRmS17 se encontraron en su pico más alto con 4.30. El grupo de Bm86 mostró también valores elevados (3.28); sin embargo, no llegó a su pico máximo. Ambos resultados fueron estadísticamente diferentes ($p<0.05$) al grupo testigo que presentó 0.763.

Para el final del experimento los resultados alcanzados por los dos grupos también mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El grupo de pRmS17 disminuyó su valor a 4.08 y el grupo Bm86 llegó a su pico máximo con 3.80, destacando que así se mantuvieron ambos grupos hasta la semana 12 cuando se realizó el último muestreo. En el caso del grupo testigo, en la semana se 8 mostró un incremento en la cinética de anticuerpos y posteriormente disminuyó para la semana 10 y 12. El máximo valor de absorbancia alcanzado por este grupo fue de 1.51.

En la Figura 11 se muestra la cinética de anticuerpos obtenida durante el experimento. Los valores fueron considerados positivos ($p < 0.05$) cuando el nivel de absorbancia fue de al menos dos veces el valor del suero pre inmune.

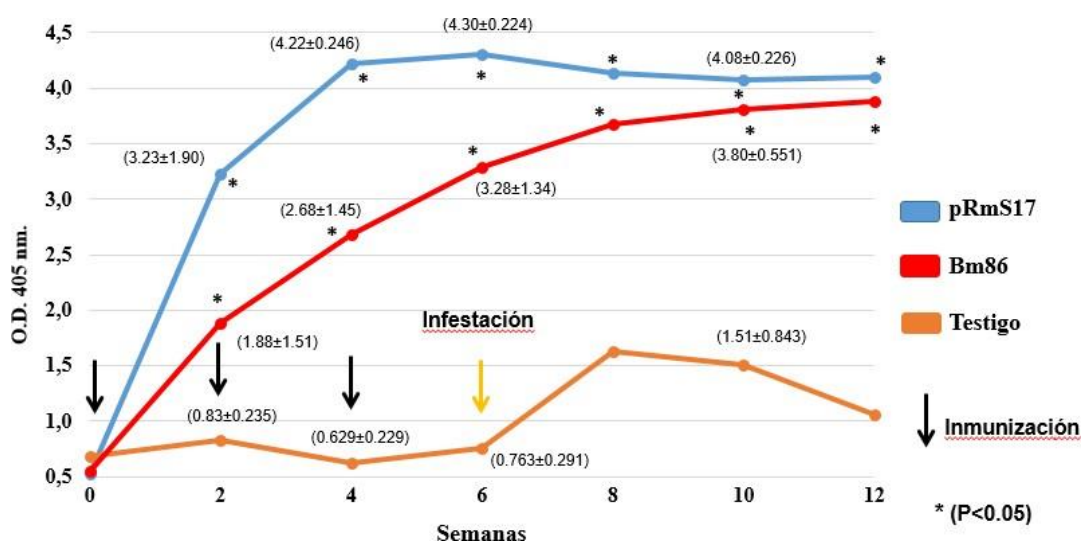


Figura 11. Gráfica de la cinética de anticuerpos en los conejos inmunizados con los antígenos en estudio.

En la gráfica se aprecia la curva de la cinética de anticuerpos para cada grupo. El nivel de anticuerpos de los conejos inmunizados fue obtenido mediante un espectrofotómetro a 450 nm. de longitud de onda, analizados por grupo inmunizado y comparados con el grupo testigo mediante una prueba de ANOVA ($p < 0.05$).

Las flechas negras indican las inmunizaciones y la flecha amarilla la infestación.

IX. Discusión

La búsqueda de alternativas para el control de las garrapatas se ha realizado por décadas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014), en las unidades de producción ganaderas donde *R. microplus* es el ectoparásito de mayor importancia.

Por lo anterior, el control inmunológico basado en antígenos recombinantes que generen protección contra garrapatas ha ido en avance y recientemente se han identificado nuevas proteínas con diferente mecanismo de acción, pero solo algunos han mostrado eficacia en ensayos controlados contra diferentes especies de garrapatas (Almazán *et al.*, 2010, Hajdusek *et al.*, 2010, Guerrero *et al.*, 2014, Rodríguez-Mallon *et al.*, 2015). Adicionalmente, las vacunas comerciales disponibles en el mercado se basan en la proteína recombinante Bm86, las cuales presentan ciertas limitaciones en la eficacia entre las diferentes cepas de *R. microplus* de acuerdo con su localización geográfica (Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias, 2020).

Este es el primer trabajo de investigación donde se evaluó la capacidad de un polipéptido derivado de la proteína RmS17 para controlar infestaciones por garrapatas mediante un ensayo de inmunización de conejos. Con los resultados alcanzados en el presente estudio, el pRmS17 muestra un efecto de protección sobre la infestación de garrapatas *R. microplus*, lo que significa que; los animales inmunizados desarrollaron anticuerpos contra el antígeno, reduciendo el número de hembras repletas y disminuyendo la oviposición y eclosión. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas donde se han evaluado posibles candidatos a vacuna contra la garrapata *R. microplus* (Almazán *et al.*, 2010, Guerrero *et al.*, 2014, Lagunes *et al.*, 2016).

El pRmS17 resulta de interés ya que se localiza en los tres órganos más importantes para el desarrollo de las garrapatas *R. microplus*, se menciona que las serpinas localizadas en glándulas salivales y en intestino medio podrían desempeñar una función que genera un desequilibrio hemostático durante la hematofagia permitiendo la absorción de sangre y manteniéndola en un estado fluido en el sitio de alimentación y después de la ingestión; por lo tanto, resulta ser atractivo para el desarrollo de una vacuna contra garrapatas (Tirloni *et al.*,

2016).

En el ensayo, la cinética de anticuerpos de los grupos inmunizados con pRmS17 y Bm86 mostrando una respuesta típica, es decir que incrementaron conforme se realizaban inmunizaciones (Jittapalapong *et al.*, 2010, Lagunes *et al.*, 2016, Martínez *et al.*, 2017). Esto sugiere que la cantidad de proteína necesaria para inducir una respuesta inmune protectora es indispensable que aumente de manera sustancial. Lo anterior puede deberse a varios factores como el manejo de los inmunógenos, el adyuvante empleado y a la buena respuesta inmunitaria de los animales empleados en el experimento.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de inmunización con los dos diferentes antígenos sobre los porcentajes de reducción y eficacia general de la inmunización, ambos grupos mostraron un efecto drástico sobre las infestaciones de garrapatas *R. microplus* comparados con el grupo testigo. El grupo inmunizado con el pRmS17 obtuvo una eficacia del 79%, superando al antígeno Bm86 que alcanzó el 62%, lo que sugiere que el pRmS17 provoca un mayor efecto de los anticuerpos circulantes en la sangre de los conejos inmunizados contra garrapatas *R. microplus*, trayendo como consecuencia una reducción en el número de garrapatas, reducción de peso, de oviposición y la eclosión.

Estudios anteriores con Bm86 confirmaron que es posible controlar las infestaciones por garrapatas *Rhipicephalus*. (*Boophilus*) spp. (Rodríguez *et al.*, 2002; de la Fuente y Kocan 2003, 2006; Nuttall *et al.*, 2006; Sonenshine *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2006). En este trabajo se obtuvo una eficacia general de la inmunización con Bm86 del 62% contra *R. microplus*, estos resultados concuerdan con lo reportado en estudios anteriores (Cobon *et al.*, 1995; Fragoso *et al.*, 1998; de la Fuente *et al.*, 1998, 1999, 2000 ab; García-García *et al.*, 2000; de Vos *et al.*, 2001; de la Fuente y Kocan 2003, 2006; Canales *et al.*, 2009), quienes encontraron disminución en la repleción, peso, oviposición y fertilidad de huevos de hembras de garrapata *R. microplus*, con una eficacia general que varía de 45% a 86% por lo tanto lo obtenido en este estudio indica que la eficacia se encuentra dentro de los rangos reportados.

En otros estudios con RmS17 se ha demostrado que esta proteína interfiere con el tiempo de recalcificación, característica relacionada con la inhibición del factor XIa, el cual está implicado en la cascada de la coagulación, lo cual presenta a Rms17 como posible antígeno para el control de garrapatas *R. microplus* (Tirloni *et al.*, 2016).

X. Conclusiones

En este trabajo se evaluó un antígeno recombinante como posible inmunógeno contra la infestación por garrapatas *R. microplus*. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

La inmunización con el pRmS17 produce una respuesta inmune protectora, reflejándose en la producción de anticuerpos, y correlacionándose con el efecto en la reducción de los parámetros reproductivos de garrapatas *R. microplus*.

Este es el primer estudio donde se evaluó la eficacia del pRmS17 para el control de infestaciones por garrapatas *R. microplus* en conejos, sin embargo se requieren de más trabajos de investigación, para evaluar el efecto de este antígeno en ensayos controlados y evaluaciones de campo en bovinos, donde se pueda observar un resultado similar.

Finalmente, las vacunas recombinantes han demostrado su efectividad y viabilidad económica para el control de infestaciones por garrapatas en bovinos. Sin embargo, estas vacunas deben incluirse como parte de un programa de control integrado, debiendo ser aplicadas en combinación con ixodicidas en animales expuestos a infestaciones naturales por garrapatas y de esta manera disminuir el riesgo de infestación y transmisión de patógenos.

XI. REFERENCIAS

- Abalos, P., Fredes, F. y Retamal, P. (2011). Enfermedades animales producidas por agentes biológicos. *Revista chilena de infectología*, 28(3), 284.
- Aguirre, A.A., Lobo, F.P., Casquero-Cunha, R., Garcia, M. V. y Andreotti, R. (2016). Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Veterinary Parasitology*. 221: 30-38.
- Almazán, C., Kocan, KM., Bergman, DK., García-García, JC., Blouin, E. F. y de la Fuente, J. (2003). Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*. 21: 1492-1501.
- Almazán, C., Gutiérrez, J. C., Rosario-Cruz, R., Naranjo, V. y de la Fuente, J. (2007). Establecimiento de metodologías para el descubrimiento de antígenos protectores contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Simposium Internacional Garrapatas, babesiosis y anaplasmosis. Cd. Victoria, Tam. México. 72-81.
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F. y de la Fuente, J. (2010). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research*. Tamaulipas, México.
- Almazán, C., Moreno-Cantú O., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Canales, M., Villar, M. y de la Fuente, J. (2012). Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*. Tamaulipas, México.
- Almazán, C., Aguilar-Tipacamu, G., Rodríguez, S., Mosqueda, J. y Pérez de León, A. A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*. 23: 15351551.

Alonso Díaz M. A., Rodríguez Vivas, R. I., Fragoso Sánchez, H. y Rosario Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Archivos de Medicina Veterinaria. 30; 2: 105-113.

Alzugaray G, M. F. (2017). Caracterización molecular y funcional de Bm05br de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y su potencial uso para el desarrollo de vacunas. Tesis de doctorado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

Amaro B, C. S. (2012). Evaluación del efecto de dos cepas *Metarhizium anisopliae* sobre la infestación de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y pastizales. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UAT. Cd. Victoria.

Ammazán, C., Lagunes, R., Villar, M. y Canales, M. (2009). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. Recuperado el 2018 de Octubre de 28, de Springerlink: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797406/>

Andreotti, R. (2006). Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria. 15; 3: 97–100.

Barker, S.C. y Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Parasitology. Cambridge University Press, 129:15-36.

Barker, S. y Murrell, A. (2008). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. En Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (editores) Ticks: biology, disease and control. Cambridge University Press. 1: 1-39.

Bautista-Gálvez, A., Pimentel Segura, R. y Gómez Vázquez, A. (2007). Control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con hongos

entomopatógenos. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*. 6; 12.

Bazán-Tene, M. (2002). Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Tecomán, Colima.

Bedford, G. (1931). *Nuttalliella namaqua*, a new genus and species of tick. *Parasitology*. 23: 230–232.

Benavides, E. y Romero, A. (2002). Consideraciones para el control integral de parásitos externos del ganado. Carta FEDEGAN, Edición No. 70: 1-7.

Benavides-Ortiz, E., Romero-Prada, J. y Villamil-Jiménez, L. C. (2016). Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático: Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Universidad de La Salle. San José, Costa Rica. 33.

Beyer, H. y Walter, W. (1987). Manual de química orgánica. Reverté.

Blood, D. C. y Radostits, O. M. (1992). Medicina Veterinaria. 7ª edición. Interamericana –McGraw-Hill, p. 1038-1039, 1059-1061.

Bowman, D. D. (2011). Parasitología para veterinarios (Novena ed.). Barcelona, España: ELSEVIER.

Brossard, M. y Wikel, S. K. (2004). Tick immunobiology. *Parasitology*, 129 *Suppl.* S161–S176.

Busch, J., Stone, N., Nottingham, R., Araya-anchetta, A., Lewis, J., Hochhalter, C. y Wagner, D. (2014). Widespread movement of invasive cattle fever ticks (*Rhipicephalus microplus*) in southern Texas leads to shared local infestations on cattle and deer. 1–16.

Castro J. J. (1997). Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitology*. 71: 77-97.

Canales, M., Almazán, C., Naranjo, V., Jonjean, F. y de la Fuente, J. (2009). Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotech*. 9:29.

Cantú-Covarrubias, A. y García-Vázquez, Z. (2013). Estrategias para el control integrado de garrapata (*Boophilus* spp.) en la producción de bovinos de carne en pastoreo en Tamaulipas. Folleto Técnico No. MX-0-310402-4303-14-09-36. INIFAP-CIRNE- Campo experimental las Huastecas. Villa Cuauhtémoc, Tamaulipas. 1-37.

Center for Disease Control and Prevention. (2015). Ticks. Obtenido de https://www.cdc.gov/ticks/removing_a_tick.html

Center for Food Security and Public Health (CFSPH). (2007). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Iowa State University: College of Veterinary Medicine. Recuperado de: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_microplus-es.pdf.

Cobon, G., Hungerford, J., Woodrow, M., Smith, D. y Willadsen, P. (1995). Vaccination against *Boophilus microplus*. The Australian field experience. In: de la Fuente J (ed) Recombinant vaccines for the control of cattle tick. *Elfos Scientiae*, La Habana, Cuba, pp. 163–176.

Conway, G. R. y Comins, H. N. (1979). Resistance to pesticides: Lessons in strategy from mathematical models. *Span*. 22; 2: 53-55.

Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F. A., Martínez Fernández, A. R., Sánchez Acedo, M. C., Hernández Rodríguez, S., Naverrete López-Cozar, I., Díez Baños, P., Quiroz Romero, H. y Carvalho Varela, M. (1999). *Parasitología Veterinaria*. Mac-Graw-Hill Interamericana. Madrid, España. p. 420. 20.

Cortés-Vecino, J. (2011). Garrapatas: estado actual y perspectivas. Biomédica. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

de la Fuente, J., Rodríguez, M., Redondo, M., Montero, C., García-García, J. C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., de Armas, C. A., Rey, S., Rodríguez, J. L., Artilés, M. y García, L. (1998). Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*. 16: 366–373.

de la Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J.C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H. y Leonart, R. (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™. *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering*. 15:143-148.

de la Fuente, J., García-García, J. C., González, D. M., Izquierdo, G. y Ochagavía ME. (2000). Molecular analysis of *Boophilus* spp. (Acari: *Ixodidae*) tick strains. *Veterinary Parasitology*. 92: 209– 222.

de la Fuente, J. (2000). Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 916: 617-621.

de la Fuente, J. y Kocan, K. M. (2003). Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Vaccine*. 4: 583-593.

de la Fuente, J. y Kocan, K. M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*. 28: 275-283.

de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J. M., Kocan, K. M. y Willadsen, P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 8; 1: 23–28.

de la Fuente, J., Maritz-Olivier, C., Naranjo, V., Ayoubi, P., Nijhof, A. M., Almazán, C., Canales, M. y Kocan, K. M. (2008). Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC Genomics*. 9: 372.

de la Fuente, J., Merino, y Charrez, J. O. (2013). Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine*. 31: 5923-5929.

Devine, G.J., Eza, D., Ogusuku, E. y Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas*. *Revista peruana de Medicina Experimenta Salud Pública* 25.

De Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P. y Jongejan, F. (2001). Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against the tick species. *Experimental Applied Acarology*. 25: 245-261.

Domínguez García, D. I., Rosario Cruz, R., Almazán, C., Saltijeral, Oaxaca, J. A. y de la Fuente, J. (2010). *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 181-192.

Domínguez, G. D., Rosario, R. y Ortiz, M. (2014). Manual para el control integral de la garrapata del ganado bovino en la región costera del estado de Guerrero. Chilpancingo, México: UAG.

Domínguez-García, D. y Rosario-Cruz, R. (2016). Avances y perspectivas de las vacunas contra las garrapatas del ganado Bovino en México. *Repensando la ganadería*. Universidad Autónoma Metropolitana. Oaxaca.

Escobar-Chavarría, O. (2014). Determinación de apoptosis en células ováricas de hembras de *Rhipicephalus microplus* tratadas con carbamatos inhibidores de la reproducción. Tesis, UNAM.

FAO, (2017). Fluazuron [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/docrep/W8338E/w8338e09.htm#TopOfPage> (accessed 3.29.17).

Fernández, R. M. (2009). Manejo integral de *Boophilus microplus*. Libro científico No. 2. Perspectivas de control biológico parasitario y nuevas alternativas en el sector pecuario. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. 227-267.

Fernández, D.G., Md, A., Mancipe, L.C., Md, G., Fernández, D.C. (2010). Intoxicación por organofosforados. Revista Médica. 18: 84–92.

Fernández-Ruvalcaba, M., Cruz, V. C., Preciado de la T. J. F. y García, V. Z. (2003). Evaluación del efecto anti-garrapata de los pastos gordura y llanero sobre la garrapata *Boophilus microplus* en un periodo de cinco años, XXVII Congreso Nacional de Buiatría, Villahermosa, Tab. México.

Ferrari, M. (2002). Garrapata, la resistencia del hospedador como forma de control. Marca Líquida. 12(109): 17-20.

Ferreira, J. y Porco, A. (2008). Vacunas derivadas del análisis de los genomas: vacunología inversa. Interciencia. 33(5): 353-358.

Florentino Gómez, S., Gutiérrez Fernández, M., Rueda Ardila, N. y Rodríguez Rodríguez, J. (1994). La inmunología en el diagnóstico clínico. Bogotá: CEJA.

Fragoso, H., Hoshman-Rad, P., Ortiz, M., Rodríguez, M., Redondo, M., Herrera, L. y de la Fuente, J. (1998). Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the B. microplus Bm86-containing vaccine Gavac. Vaccine. 16: 1990-1992.

Fragoso, S. H. Y Soberanes, C. N. (2001). Control de la resistencia a los ixodicidas a la luz de los conocimientos actuales. XXV Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, México. 40-48.

Gallastegui, C., Bernardez, B., Regueira, A., Dávila, C. y Leboreiro, B. (2002). Inmunología. En M. C. Gamundi Planas (Coordinadora). Madrid: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria Tomo II: 1077-1106.

García-García, J. C., Gonzalez, I. L., Gonzalez, D. M., Valdés, M., Méndez, L., Lamberti, J., D'Agostino, B., Citroni, D., Fragoso, H., Ortiz, M., Rodríguez, M. y de la Fuente, J. (1999). Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Experimental and Applied Acarology*. 23: 883-895.

García-García, J. C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., Rodríguez, M., Joglar, M., Machado, H., González, I. L., Valdés, M., Méndez, L. y de la Fuente, J. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*. 18(21): 2275–2287.

García, C. M. (2003). Perspectivas de la Ganadería Tropical de México ante la Globalización. Conferencia Magistral: Memorias del XXVII Congreso Nacional de Buiatría. Villahermosa, Tab., México. 172-182.

García-Vázquez, Z. S. (2006). Epidemiología de la resistencia a los ixodicidas en la garrapata *Boophilus microplus* en México. Simposium Internacional de resistencia a pesticidas en artrópodos: Un enfoque toxicológico y molecular. Colima, Col. México. 4-11.

García-Martínez. (2016). Estudios socioeconómicos y ambientales de la ganadería. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México.

García-Pérez, A. L. y Barral, M. (1999). Métodos de control de las garrapatas. *Revista Ovis (Madrid)*. 65: 64-73.

García-Vázquez, Z. (2010). Garrapatas que afectan al ganado bovino y enfermedades que transmiten en México. 1er. Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, Ags. En el Marco de La Feria de San Marcos 2010. CENID-PAVET, INIFAP.

Gettins, P. (2002). Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chemical Reviews*. 102: 4751-4803.

Gettins, P. y Olson, S. (2016). Inhibitory Serpins. New insights into their folding, polymerization, regulation and clearance. *Biochemical Journal*. 473: 2273-2293.

Grande, M. M. (2016). *Vacunas Veterinarias*. UEX Mérida.

Granjeno, C., Estrada, M., Mosqueda, J., Hernández, O. y García, V. (2006). Variabilidad en la secuencia de un fragmento del gen de la vitelogenina de la garrapata del ganado *Boophilus microplus*. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales. Querétaro, Querétaro.

González Sáenz Pardo, J. R. (2007). Importancia de la garrapata *Boophilus* en la exportación de ganado. Simposium Internacional Garrapatas, Babesiosis y anaplasmosis. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tam. México. 30- 34.

Guerrero, F., Andreotti, R., Bendele, K., Cunha, R., Miller, R., Yeater, K. y colaboradores. (2014). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. *Parasites & Vectors*. 7: 475.

Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T., Estrada-Peña, A., Horak, I., Shao, R. y S. Barker. (2010). The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (Acari: *Ixodida*) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 2528: 1-28.

Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I., Winzerling, J. y Grubhoffer, L. (2009). Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(4): 1033-1038.

Hajdusek, O., Almazán, C., Loosova, G., Villar, M., Canales, M., Grubhoffer, L., Kopacek, P. y de la Fuente, J. (2010). Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine*. 28 (17): 2993-2998.

Hernández, O. R. (2006). Avances en el control inmunológico de la garrapata *Boophilus microplus*. Simposium Internacional de resistencia a pesticidas en artrópodos: Un enfoque toxicológico y molecular. Colima, Col. México. 56- 64.

Hernández, O. R., Falcón, N.A., García, O. M. A., Palacios, F. A., Mosqueda, G. J. J., Preciado de la Torre, J. F., Mejía, E. F., Ramos, A. J. A., Rosas, P. J., Cantú, C. A., Rojas, R. E. E., Alpírez, M. F., Vega y Murguía, C. A., Solís, C., J. J. y Rodríguez C. S.D. (2010). Control integrado de garrapatas y enfermedades que transmite en ganado bovino. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Jiutepec, Mor., México. 1-12.

Hernández, R., Chen, A., Davey, R., Ivie, G., Wagner, G. y George, J. (1998). Comparison of genomic DNA in various strains of *B. microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Medicine Entomologic. 35: 895-900.

Hernández, Y. F. (2016). Control integrado de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en un pequeño rebaño bovino. . Revista Electronica Veterinariaa, 110.

Howden, K. J. y Geale, D. W. (2010). An update on bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) in Canada. The Canadian Veterinary Journal. 8: 837-40.

Iriarte Del Hoyo, P., Martínez-González, S., Aguirre-Ortega, J., Barajas-Cruz, R., Romo-Rubio, J., Loya-Olguín, L. y Molina-Torres, J. (2012). Repelencia de algunas plantas forrajeras a la garrapata. Abanico Veterinario. 2(3): 47-57.

Iriarte Del Hoyo, P.G., Aguirre-Ortega, J., Martínez-González, S., Gómez-Danes, A.A., Loya-Olguin, J.L., Fernández-Ruvalcaba, M. y Ulloa-Castañeda, R. R. (2013). Repelencia de los pastos *Melinis minutiflora*, *Andropogon gayanus*, *Brachiaria brizantha* y *Cenchrus ciliaris* sobre larvas de garrapata *Amblyomma cajennense* F. (Acari: Ixodidae). Bio Ciencias. 2(3): 140-147.

Ixovac, M. (2017). Manual Ixovac: Vacuna recombinante coadyuvante para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* La Piedad, Michoacán. México.: LAPISA, S.A. DE C.V.

Jittapalapong, S., Kaewhom, P., Pumhom, P., Canales, M., de la Fuente, J. y Stich, R.W. (2010). Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor reduces the performance of adult female *Rhipicephalus microplus*. *Transboundary and Emerging Diseases*. 57: 103–106.

Jonsson, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, 137(1–2), 1–10.

Kiss, T., Cadar, D. y Spinu, M. (2012). Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. *Veterinary Parasitology*. 187: 357–366.

Lagunes-Quintanilla, R., Domínguez-García, D.I., Martínez-Velázquez, M., Quiroz-Romero, H. y Rosario-Cruz, R. (2014). Molecular Cloning and Variability of a Subolesin Recombinant Peptide from a Mexican *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Tick Strain. *Biochemistry and molecular biology*. 2:17.

Lagunes, R., Domínguez-García, D., Quiroz, H., Martínez, M. y Rosario-Cruz, R. (2016). Potential effects on *Rhipicephalus microplus* tick larvae fed on calves immunized with a Subolesin peptide predicted by epitope analysis. *Tropical Biomedicine*. 33(4): 726-738.

León Clavijo, M. y Hernández Rojas, E. (2012). Descripción de la proteína Bm86, polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. *NOVA*. 10(17).

Maritz O, C., van Zyl, W. y Strutzer, C. (2012). A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 179 - 187.

Martínez, E. P., Seron, S. G., Guerrero, F. D., Pérez de León, A. y Henrique B.G. (2017). Immunogenic potential of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin 1 against *Rhipicephalus sanguineus* in domestic dogs. Brazil. Journal. Veterinary. Parasitology. 26; 1: 60-66.

Mejía E. F., García V. Z. y Rosario, C. R. (2004). Control de garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a Piretroides en el municipio de Pichucalco, Chiapas. Memorias del XXVIII Congreso de Buiatria 2004. Villermosa, Tab. México.

Meekins, D., Kanost, M. y Michel, K. (2017). Serpins in arthropod biology. Seminars in Cell & Developmental Biology; 62: 105-119.

Merino, C. J. (2010). Evaluación de la inmunización e interferencia de ARN de suboselin contra la infestación de garrapatas en bovinos. Tesis Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UAT. Cd. Victoria, Tam.

Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J. A., Estrada-Peña, A., Kocan, K. y De la Fuente, J. (2011). Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks express cattle. Vaccine. 29: 2248–2254.

Merino, O., Alberdi, P., Pérez de la Lastra, J. M. y de la Fuente, J. (2013). Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 3:30.

Miller, R. J., Davey, R. B., White, W. H. y George, J. E. (2007). A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus*. Journal of Medicine Entomologic. 44(2): 283-294.

Mouritsen, S., Meldal, M., Christiansen-Brams, I., Elsner, H. y Werdelin, O. (1994). Attachment of oligosaccharides to peptide antigen profoundly affects binding to major histocompatibility complex class II molecules and peptide immunogenicity. European Journal of Immunology. 24(5).

Narahashi, T. (1971). Mode of Action of Pyrethroids*. Bull. Org. mond. St. Bull Wld Hlth Org. 44: 337–345.

National Center for Biotechnology Information. (NCBI). (2017). *Rhipicephalus microplus* - Taxonomy Result. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6941>.

Nijhof, A. M., Balk, J. A., Postigo, M., Rhebergen, A. M., Taoufik, A. y Jongejan, F. (2010). Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth factor (EGF) like domains from hard and soft ticks. International Journal for Parasitology. 40(14): 1587– 1597.

Nuttall, P. T. A. (2006). Anti-tick vaccines: Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. Parasite Immunology. 155 - 163.

Nuttall, A. R., Trimmell, M., Kazimírová, M. y Labuda, M. (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. Parasite Immunology. 28: 155–163.

Ortíz, E. M., Santamaria, V. M. y Fragoso, S. H. (1994). Resistencia en garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas en México. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, Gro. México.

Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. y Cruz-Vásquez, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2: 177–192.

Parra, M., Peláez, L., Segura, F., Arcos, J., Londoño, J., Díaz, E. y Vanegas, M. (1999). Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Publicación CORPOICA.

Peconick, A., Sossai, S., Girào, M., Rodríguez, C., Souza e Silva, F., Guzmán Q. y Patarroyo, A. (2008). Synthetic vaccine (SBm 7462) against the cattle tick

Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Experimental Parasitology*. 119(1): 37–43.

Pérez, R. (1988). El sector pecuario en México: características y perspectivas. *Comercio Exterior*. 38(8): 686–693.

Pérez, X. (2016). Resistencia a Alfa-cipermetrina, Ivermectina y Amitraz en garrapatas *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) colectadas en cuatro localidades. Universidad CENTRAL Del Ecuador, Quito.

Pérez-Cogollo, L. C., Rodríguez-Vivas, R. I., Ramírez-Cruz, G. T. y Miller, R. J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 168: 165-169.

Polanco-Echeverry, D. y Ríos-Osorio, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 17: 81–95.

Popara, M., Villar, M., Mateos-Hernández, L., Fernández de Mera, I. G., Marina, A., del Valle, M., Almazán, C., Domingos, A. y de la Fuente, J. (2013). Lesser protein degradation machinery correlates with higher BM86 tick vaccine efficacy in *Rhipicephalus annulatus* when compared to *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine*. 31: 4728-4735.

Prudencio, C.R., Nascimento, R., Filho, M., Marra, A.O., de Souza, G.R., Almeida JF, Cardoso R, Szabó, M. P. y Goulart, L. R. (2009). *In silico* analyses for identification of tick phagotopes selected by phage-displayed libraries. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 18(1): 39-41.

Quiroz, H. (1990). Cap.31: Ixodidos. En *Parasitología Veterinaria y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México DF: Editorial Limusa. 767-802.

Quiroz, R. H. (2005). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos*. Limusa. México, DF. 796-802.

Quiroz, R. H. (2006). Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Editorial Limusa. 768-770.

Rand, K. N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P. y Cobon, G. S. (1989). Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86(24): 9657–9661.

Riding, G. A., Jarney, J., McKenna, R. V., Pearson, R., Cobon, G. S. y Willadsen, P. (1994). A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). 153(11): 5158–5166.

Rodríguez, M., Massard, C., Fonseca, A. H., Fonseca Ramos, N., Machado, H., Labarta, V. y otros. (1995). Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. Vaccine. 13(12): 1804 - 1808.

Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., Méndez, L., Valdés, M., Leonart, R., Pérez, H., Seoane, G., Vargas, M., Borroto, C., Serrano, E., Boué, O., Lodos, J. y Machado, H. (2002). Extensión e impacto de la vacuna Gavac en el programa de lucha contra *Boophilus microplus* en Cuba. Premio Anual de Innovación Tecnológica, Agencia de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Resolución No. 09/2002.

Rodríguez-Mallon, A., Encinosa, P. E., Méndez-Pérez, L., Bello, Y., Rodríguez Fernández, R., Garay, H., Cabrales, A., Méndez, L., Borroto, C., & Estrada, M. P. (2015). High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. Ticks and tick-borne diseases. 6(4): 530–537.

Rodríguez-Valle, M., Xu, T., Kurscheid, S. y Lew-Tabor, A. E. (2015). *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterization assessment. Parasites and Vectors. 7:1-9.

Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A. F. y Fragoso, S.H. (2005). Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rodríguez- Vivas, R.I. Editor. México D.F. McGraw-Hill-UADY. 571-592.

Rodríguez-Vivas, R., Arieta-Román, R., Pérez-Cogollo, L., Rosado-Aguilar, J., Ramírez-Cruz, G. y Basto-Estrella, G. (2010). Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Archive. Medical. Veterinary.* 42: 115–123. doi: 10.4067/S0301-732X2010000300002 Rodríguez

Rodríguez-Vivas, R.I., Ojeda-Chi, M.M., Pérez-Cogollo, L. C. y Rosado-Aguilar, J.A. (2011). Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos.* Editores: Quiroz RH, Figueroa CJA, López AME. *AMPAVE.* 3: 477-504.

Rodríguez-Vivas, R., Hodgkinson, J. y Trees, A. (2012). Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.* 3: 9–24.

Rodríguez-Vivas, R., Rosado-Aguilar, A., Ojeda-Chi, M., Pérez, L., Trinidad-Martínez, I. y Bolio-González, M. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.* 1(3): 295–308.

Rodríguez-Vivas, R., Grisi, L., Pérez de León, A., Humberto Silva, H., Torres-Acosta, J., Fragoso, H., Romero, S. D., Rosario, C. R., Saldiernah, F. y García, C. D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. *Review. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.* 8: 61-74.

Rodríguez-Vivas, R. y otros. (2018). Cap. 7: Epidemiología y control de garrapatas, moscas y nemátodos gastrointestinales que afectan a los bovinos en México. En *Estado del Arte Sobre Investigación e Innovación Tecnológica en Ganadería Bovina Tropical.* México.

Rojas, E., García, Z., Fajardo, J., Rosario-Cruz, R. y Fernández, M. (2011). Manual de control integral de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del ganado bovino en el estado de México. Cd. México, México: CENID-PAVET INIFAP.

Rosario, R., Domínguez, D., Rojas, E., Ortiz, M. y Martínez, F. (2009). Estrategia para el control de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Jiutepec, México: CENID-PAVET, INIFAP.

Rosario-Cruz, R., Almazán, C., Miller, R. I., Domínguez-García, D. I., Hernández-Ortíz, R. y de la Fuente, J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience*; 14: 2657-2665.

Rosario-Cruz, R. y Domínguez G, D. I. (2006). Diagnóstico molecular de la resistencia a piretroides en la garrapata *Boophilus microplus* en México. Simposium Internacional de resistencia a pesticidas en artrópodos: Un enfoque toxicológico y molecular. Colima, Col. México. 49-55.

Rosete, P., Atzín, J., Saldaña, A., Vásquez, N., Urrea, N., Urrea, F. y otros. (2009). Comportamiento tumoral y glicosilación. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 21(4): 280 - 287.

Roush, R. T. (1993). Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol Today*. 9(5): 174-9.

Rubio, E. y Pérez, E. (2012). Desarrollo de la ganadería en el estado de Chihuahua 2000-2011: Líneas de trabajo para un estudio del impacto ambiental. 271–292.

SAGARPA. (2018). gob.mx. Recuperado el Noviembre de 2 de 2018, de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-delcontrol-de-la-garrapata-boophilus-spp>

Salazar L, M. A. (1993). Manual para identificar garrapatas. Cd. Victoria, Tamaulipas, Mexico.

Sasaki, T., Kohara, A., Shimidzu, T. y Kobayashi., K. (1990). Single site proteolysis in silkworm antitrypsin causes structural changes in behavior against denaturing reagents. *Agricultural and Biological Chemistry*. 54: 13945.

Secretaria Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) – Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2020). Situación actual del control de la garrapata *Boophilus* spp. 04 de noviembre de 2019, de Secretaria Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) Sitio web: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>.

SENASICA. (2019). Situación actual del control de la garrapata *Bophilus* spp. Sitio web: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>.

Shakya M., Kumar B., Nagar G., de la Fuente, J. y Ghosh, S. (2014). Subolesin: A candidate vaccine antigen for the control of cattle tick infestations in Indian situation. *Vaccine*. 32-28.

Sonenshine, D. E., Kocan, K. M. y de la Fuente J. (2006). Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends Parasitology*. 22: 550-551.

Sonenshine, D. E. y Roe, R. M. (2013). *The Biology of Ticks*. Oxford University

Soulsby, L. J., E. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. 7ª edición. Nueva editorial interamericana. 765-766: 724-728.

Spickler, A. R. (2007). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino. *The Center for Food Security & Public Health*. 1–3.

Stafford III, K. C. (2007). *Tick Management Handbook*. Connecticut: The Connecticut Agricultural Experiment Station.

Stein, P. E., Leslie, A. G., Finch, J. T., Turnell, W. G., McLaughlin, P. J. y Carrell, R. W. (1990). Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive center of serpins. *Nature*. 347: 99-102.

Tellam, R. L., Kemp, D., Riding, G., Briscoe, S., Smith, D., Sharp, P., Irving, D. y Willadsen, P. (2002). Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Veterinary parasitology*. 103(1-2): 141–156.

The Center For Food Security and Public Health. (2007). *Rhipicephalus*. Recuperado el 26 de marzo de 2017, de http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_microplus-es.pdf

Torioni de Echaide, S., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Suarez, C. E. y McElwain, T. F. (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(3): 777–782.

Tirloni, L., Seixas, A., Mulenga, A., Da Silva Vaz Jr. I. y Termignoni, C. (2014). A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Experimental Parasitology*. 137: 25–34.

Tirloni, L., Kim, T. K., Coutinho, M. L., Ali, A., Seixas, A., Termignoni, C., Mulenga, A. y da Silva Vaz, I., Jr (2016). The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect biochemistry and molecular biology*. 71: 12–28.

Trimnell AR, H. R. (2002). Dual/action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “canceled” antigens. *Vaccine*. 3560 - 3568.

Turnbull, I., Smith, D., Sharp, P., Cobon, G. y Hynes, M. (1990). Expression and secretion in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger* of a Cell Surface Glycoprotein from the Cattle Tick, *Boophilus microplus*, by Using the Fungal Promoter System. *Applied and environmental microbiology*. 56(9): 2847-2852.

United States Department of Agriculture. (1976). Ticks of Veterinary Importance. Recuperado el 28 de marzo de 2017, de <https://naldc.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=CAT87208761ycontent=PDF>.

Vega-Robledo, G. (2009). Antígenos e inmunógenos. Revista de la Facultad Médica UNAM. 41 - 42.

Wikel, S, A. J. (1979). Langerhans cells trap tick salivary antigens in tick-resistant guinea pigs. Journal of Immunology. 563 - 565.

Willadsen, P. (2004). Anti-tick vaccines. Parasitology. 129: S367-S387.

Willadsen, P. y Kemp, D. H. (1988). Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. Parasitology Today. 4:196–198.

Willadsen, P., McKenna, R. V. y Riding, G. A. (1988). Isolation from the cattle ticks *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. International Journal Parasitology. 18: 183-189.

Willadsen, P., Riding, G., McKenna, R., Kemp, D., Tellam, R., Nielsen, J. y Gough, J. (1989). Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950). 143(4): 1346–1351.

Ye, S., Cech, A., Belmares, R., Bergstrom, R., Tong, T., Corey, D., Kanost, M. y Goldsmith, H. (2001). The structure of a Michaelis serpin–protease complex. Nature Structural Biology. 8: 979-983.

Zivkovic, Z., Torina, A., Mitra, R., Alongi, A., Scimeca, S., Kocan, K. M. y de la Fuente, J. (2010). Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. BMC Immunology. 11: 7.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la infestación de conejos

1. Los conejos son trasladados a la unidad experimental adaptada para el ensayo de infestación con garrapatas.
2. Cada animal es bañado y rasurado en un área circular en el dorso para así facilitar la adhesión de las celdas en la piel, la cual es elaborada manualmente utilizando licra de algodón.
3. 24 horas después de adherido el parche a los conejos, se introducen las garrapatas *R. microplus* dentro de las celdas para su fijación.
4. Los conejos se mantienen con alimento balanceado línea el Nogal, agua *ad libitum*, ambiente controlado y limpieza diaria.
5. El desarrollo de las garrapatas se observa durante 6 días hasta su repleción.
6. Los animales se observan periódicamente y una vez que las garrapatas completaron su repleción son colectadas, pesadas y depositadas en cajas de Petri dentro de incubadoras con humedad de 80% y temperatura de 27°C para permitir la oviposición y eclosión a las 2 y 5 semanas respectivamente.

Anexo 2. Protocolo para la determinación del título de anticuerpos por ELISA indirecto.

✓ **Toma de muestra sanguínea**

1. Con la ayuda de una jeringa se obtiene sangre de la vena marginal de la oreja de los conejos y se deposita en tubos al vacío sin anticoagulante.
2. El suero se obtiene por centrifugación a 6000 rpm durante X minutos y posteriormente se almacena a -20oC hasta su análisis.

✓ **Técnica de ELISA indirecto**

1. Se utiliza 1 µg/pozo del péptido purificado y diluido en la solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 para cubrir la microplaca de ELISA.
2. Incubar a 4 o C durante toda la noche.
3. Los sueros son diluidos 1:100 en solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.2 y adicionada con tween 20 al 0.05% (PBS-T 0.05%) y 5% de leche descremada.
4. La microplaca es incubada con el suero diluido durante 1 hora a 37°C.
5. Posteriormente, se incuba con el conjugado IgG anti bovino acoplado a fosfatasa alcalina producido en ratón 1 hora a 37°C.
6. La reacción de color se desarrolla con p-Nitrofenil-fosfato (Sigma)
7. La densidad óptica se determina en un lector de ELISA a 405 nm.
8. En la cinética de la producción de anticuerpos fueron considerados como positivos cuando el valor de la absorbancia de los sueros fue de al menos dos veces el valor en comparación con el suero control negativo (suero pre-inmunización).
9. Los valores de la absorbancia se analizaron y se compararon con el grupo testigo.