

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ANTÍGENO Bm86 EN PERROS INFESTADOS
CON *Rhipicephalus sanguineus***

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS.

PRESENTA

YERANIA MARGARITA ROBLES GRAHAM

**DIRECTOR DE TESIS
PhD. ALMA ROSSANA TAMAYO SOSA**

Mexicali, Baja California, México

Octubre 2020

Evaluación del efecto del antígeno Bm86 en perros infestados con *Rhipicephalus sanguineus*. Tesis presentada por Yerania Margarita Robles Graham, como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobado por el comité particular indicado:

Ph. D. Alma Rossana Tamayo Sosa
Directora de Tesis

Dr. Luis Tinoco Gracia
Asesor

Dr. Alberto Barreras Serrano
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis realizado en la Universidad Autónoma de Baja California es un esfuerzo en el cual directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniendo paciencia, dando animo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de las personas a las que deseo agradecer en este apartado.

Primeramente a mi directora de tesis PhD. Alma Rossana Tamayo Sosa mi más amplio agradecimiento por haber confiado en mi en este proyecto de investigación, por su paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de tesis, cuya experiencia y educación fueron mi fuente de motivación para seguir adelante y culminar este proyecto durante estos años.

Al Dr. Alberto Barreras Serrano un especial agradecimiento por haberme motivado a no rendirme y seguir adelante, por consejos, paciencia, sabiduría, conocimiento y apoyo incondicional que me brindo desde el momento en que comenzó este proyecto.

Al Dr. Eduardo Sánchez por el apoyo, consejos y animo que me brindo pero sobre todo por creer en mi y motivarme a no rendirme cuando entre en crisis, gracias por siempre estar.

A la PhD. Cristina Pérez Linares y al PhD. Fernando Figueroa que desde el momento en que me conocieron estuvieron siempre pendientes y apoyándome en todo momento, siempre accesibles, gracias por sus grandes consejos.

Al Dr. Luis Tinoco Gracia y al Dr. Sergio Arturo Cueto por brindarme el apoyo durante este proyecto, por brindarme de su conocimiento y por permitirme ser parte de su equipo.

A mis compañeros de Maestría Fernanda Lastra Santos, Jesús Sarabia Vásquez y Karla García Borjas por siempre estar conmigo, acompañándome, apoyándome, dándome animo y no dejarme caer ante los momentos difíciles, más que mis amigos se convirtieron en mi familia mis hermanos.

Sin olvidar a la gente de fuera en mis agradecimientos se encuentra el PhD. Juan Mosqueda quien me brindo apoyo incondicional e hizo que me impusiera retos durante toda mi estancia en la Universidad Autónoma de Querétaro y a mis compañeros de laboratorio que desde el momento en que me conocieron me brindaron su amistad, amabilidad y apoyo especialmente Aída Olguín.

Todo esto no hubiese sido posible sin el apoyo incondicional, cariño y amor que me otorgaron e inspiraron mis padres, hermanos y abuela, quienes entendieron mi ausencia y mis malos momentos. Que a pesar de la distancia siempre estuvieron para saber como iba mi proceso, las palabras nunca serán suficientes para demostrar el amor, cariño, aprecio y agradecimiento que les tengo por siempre estar.

A toda mi familia, tíos, primos gracias por siempre estar para mi en los momentos de gran importancia.

A todos ustedes, los reconozco y les brindo mi más grande y sincera gratitud.

DEDICATORIA

Llena de regocijo, de amor y de esperanza, dedico este proyecto de investigación, a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido mis pilares para seguir adelante.

Es para mi un gran honor este proyecto que con gran esfuerzo, esmero y trabajo he logrado terminar.

A mis padres Pedro Robles Flores E Irma Yerania Graham Osorio, porque ellos son la motivación de mi vida mi orgullo de ser lo que soy.

A mis hermanos Ana Paola Robles Graham y Pedro Luis Robles Graham, por ser la razón de sentirme tan orgullosa de cumplir mi meta, gracias a ellos por confiar siempre en mí.

Sin dejar atrás a toda mi familia por confiar en mi, a mi abuela, tíos y primos, gracias por ser parte de mi vida y por permitirme ser parte de su orgullo.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	3
Control de <i>R. sanguineus</i>	7
Respuesta inmunitaria.....	8
Antígenos contra <i>R. sanguineus</i>	9
<i>Antígeno Vitelogenina</i>	10
<i>Antígeno P0</i>	11
Proteína VDAC.....	12
<i>Antígeno Bm86</i>	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16

Localización del área de estudio.....	16
Duración del experimento.....	16
Vacunación de perros.....	17
Cultivo de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18
Infestación con <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	19
Determinación de Anticuerpos.....	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
RESULTADOS.....	25
Respuesta de anticuerpos específicos de Bm86 en perros vacunados y no vacunados.....	21
Efecto de la vacunación sobre <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	22
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIÓN.....	28
LITERATURA CITADA.....	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Diferencia de valores de DO a diferentes tiempos por grupo experimental.....	22
2. Valores promedio para variables en el estudio junto con sus errores estándar.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Morfología de <i>R. sanguineus</i> : vista dorsal y vista ventral. Hembra.....	4
2. Morfología de <i>R. sanguineus</i> vista dorsal y vista ventral. Macho	4
3. Taxonomía de <i>R. sanguineus</i> Vista dorsal. A: macho; B: hembra.....	5
4. Comportamiento promedio de Densidad Óptica de los anticuerpos.....	21
5. Dispersión del número de huevos Ovopocitados.....	24
6. Dispersión del número de huevos eclosionados.....	24
7. Dispersión del peso de los huevos Ovopocitados.....	25

RESUMEN

El antígeno Bm86 es una glicoproteína obtenida de las microvellosidades del intestino de la garrapata *Rhipicephalus microplus* la cual esta presente en todos sus estadios de desarrollo. Este antígeno se ha utilizado para el desarrollo de dos vacunas comerciales que han mostrado ser efectivas contra la garrapata *R. microplus* reduciendo el uso de acaricidas. Bm86 también ha mostrado tener efecto contra los tres estadios de *Rhipicephalus sanguineus* lo cual se ha atribuido a que presenta similitud filogenética con *R. microplus*. En el presente estudio se evaluó el efecto del antígeno recombinante Bm86 de una cepa mexicana de *R. microplus* (media joya). Para lo cual 5 perros fueron vacunados con 60 mg del antígeno Bm86 y posteriormente infestados con garrapatas adultas de *R. sanguineus* para su alimentación hasta la repleción. Para determinar el efecto de la vacunación sobre las garrapatas se evaluaron las variables de: peso de las hembras repletas, número de huevos ovopositados, peso de los huevos ovopositados, número de larvas eclosionadas, número de larvas sin eclosionar y presencia de anticuerpos en suero mediante la prueba ELISA, y todos los valores se compararon con el grupo control de perros no vacunados. En las variables a medir se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) en el peso de las hembras repletas (V .07075^a vs. NV 0581^a), huevos ovopositados (V 976.59^a vs. NV 595.89^b), huevos eclosionados (V 706.38^a vs. NV 205.22^b), huevos no eclosionados (V 390.67^a vs. NV 271.19^a) y peso de los huevos ovopositados (V 0.03604^a vs. NV 0.02199^b) de las garrapatas alimentadas del grupo vacunal y no vacunal. El uso del antígeno Bm86 como vacuna redujo significativamente la reproducción de las garrapatas de *R. sanguineus*.

ABSTRACT

The Bm86 antigen is a glycoprotein obtained from the microvilli of the intestine of the *Rhipicephalus microplus* tick, which is present in all its stages of development. This antigen has been used for the development of two commercial vaccines that have been shown to be effective against the *R. microplus* tick, reducing the use of acaricides. Bm86 has also been shown to have an effect against the three stages of *Rhipicephalus sanguineus*, which has been attributed to its phylogenetic similarity to *R. microplus*. In the present study, the effect of the recombinant antigen Bm86 from a Mexican strain of *R. microplus* (half jewel) was evaluated. For which 5 dogs were vaccinated with 60 mg of the Bm86 antigen and subsequently infested with adult *R. sanguineus* ticks for their feeding until repletion. To determine the effect of vaccination on ticks, the following variables were evaluated: weight of full females, number of ovoposited eggs, weight of ovoposited eggs, number of hatched larvae, number of unhatched larvae and presence of antibodies in serum by the ELISA test, and all values were compared with the control group of unvaccinated dogs. In the variables to be measured, a significant difference ($P < 0.05$) was observed in the weight of full females (V .07075a vs. NV 0581a), ovoposited eggs (V 976.59a vs. NV 595.89b), hatched eggs (V 706.38a vs. NV 205.22b), unhatched eggs (V 390.67a vs. NV 271.19a) and weight of ovopocytes (V 0.03604a vs. NV 0.02199b) of ticks fed the vaccine and non-vaccine group. The use of the Bm86 antigen as a vaccine significantly reduced the reproduction of *R. sanguineus* ticks.

INTRODUCCION

Las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* son artrópodos ectoparásitos que se alimentan de sangre que pueden causar daño directo al huésped y se encuentran entre los vectores más importantes de patógenos que afectan tanto a los animales de compañía como a los humanos. Por tal motivo se han desarrollado acciones para disminuir o eliminar estos vectores, tales como fumigación, baños garrapaticidas, antiparasitarios sistémicos, tópicos y últimamente la vacunación (Parola et al., 2005).

Hasta ahora el control de *R. sanguineus* se ha limitado al uso de productos químicos en diferentes formas utilizando acaricidas como piretroides sin alcanzar resultados satisfactorios (Otranto et al., 2005; Dantas –Torres et al., 2008). Esta falta de eficacia se atribuye principalmente a que *R. sanguineus* por lo general se encuentra en el medio ambiente (95%) y solo sube al perro a alimentarse por periodos cortos y a la presencia de cepas resistentes al uso repetido de acaricidas. Además, el uso de estos acaricidas tiene la desventaja de que contaminan el ambiente y son tóxicos para los animales y el ser humano (Miller et al., 2001; Estrada-Pen, 2005). Actualmente existen en el mercado dos vacunas de antígeno Bm86 (una cepa de Cuba y una cepa de Australia), que han sido efectivas en bovinos contra la garrapata *Rhipicephalus microplus* disminuyendo su reproducción, ovoposición y eclosión de huevecillos (Cobon et al., 1995; Rodríguez et al., 1995; Canales et al., 1997; de la Fuente et al., 1999). Además, ese mismo antígeno ha mostrado ser efectivo en perros en estudios experimentales contra la garrapata *R. sanguineus* (Pérez-Pérez et al., 2010). Debido a que en estudios realizados por Beati

y Keirans (2001) y Murrel y Barker (2003), se encontró que existe una relación filogenética entre el gen Bm86 de *R. microplus* y el gen Rs86 de *R. sanguineus* los investigadores consideran que Bm86 pudiera ser efectivo contra la garrapata del perro similar a la que se ha logrado contra *R. microplus* en bovinos.

Por lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la vacunación con antígeno Bm86 sobre la respuesta inmunitaria en perros y la viabilidad de *Rhipicephalus sanguineus*.

REVISION DE LITERATURA

Rhipicephalus sanguineus

Las garrapatas son artrópodos (*filo Arthropoda*) de gran importancia médica y veterinaria. *Rhipicephalus sanguineus*, comúnmente conocida como la garrapata marrón del perro, es una garrapata de tres huéspedes que se alimenta principalmente de perros y ocasionalmente de otros huéspedes, incluidos los humanos. Además están ampliamente distribuidas en todo el mundo (Coutinho et al., 2005). De acuerdo a la clasificación taxonómica *R. sanguineus* pertenece a: Reino: Animalia; Filo: Arthropoda; Clase: Arachnida; Subclase: Acari; Superorden: Parasitiformes; Orden: Ixódida; Familia: Ixodidae; Género: *Rhipicephalus*; Especie: *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). Su morfología se caracteriza por la base de gnatosoma (*capitulum*) que presenta una forma hexagonal y en ocasiones se llegan a notar unos pequeños cuernos; los palpos los cuales son cortos y gruesos se encuentran al nivel del hipostoma son órganos sensoriales simples que ayudan a las garrapatas a localizar el huésped; su escudo es una placa dorsal esclerosada posterior al capitulum, es semicircular sin ornamentaciones en color café y con presencia de ocelos; sus coxas presentan una forma triangular o semitriangular y pueden presentar espinas o carecer de ellas, y tiene una placa estigmal que se encuentra abajo al lado de las coxas IV con de forma circular con una macula central y numerosas copas o esferas; cuenta con presencia de festones y su forma del cuerpo es ovalada (Osorio Miranda, 2015) (Figura 1 y 2). En el macho el escudo cubre completamente el dorso, mientras que en la hembra lo cubre parcialmente esto debido a que la ingesta de sangre es mucho mayor (Figura 3).

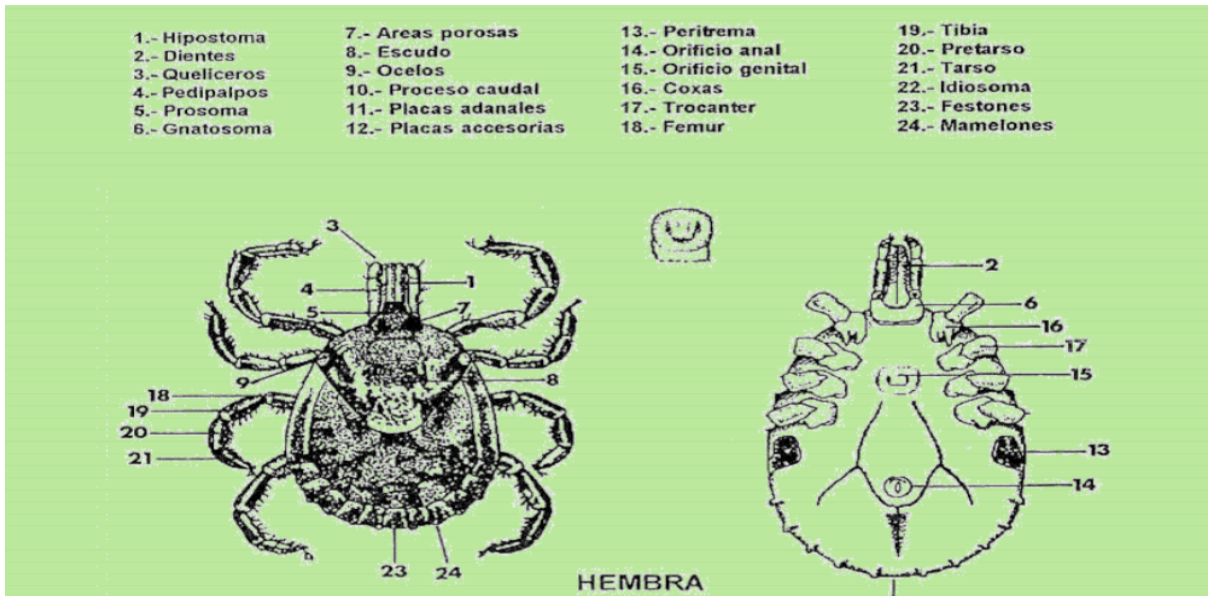


Fig. 1: Taxonomía de *R. sanguineus* (Osorio, 2015). Vista dorsal y vista ventral. Hembra.

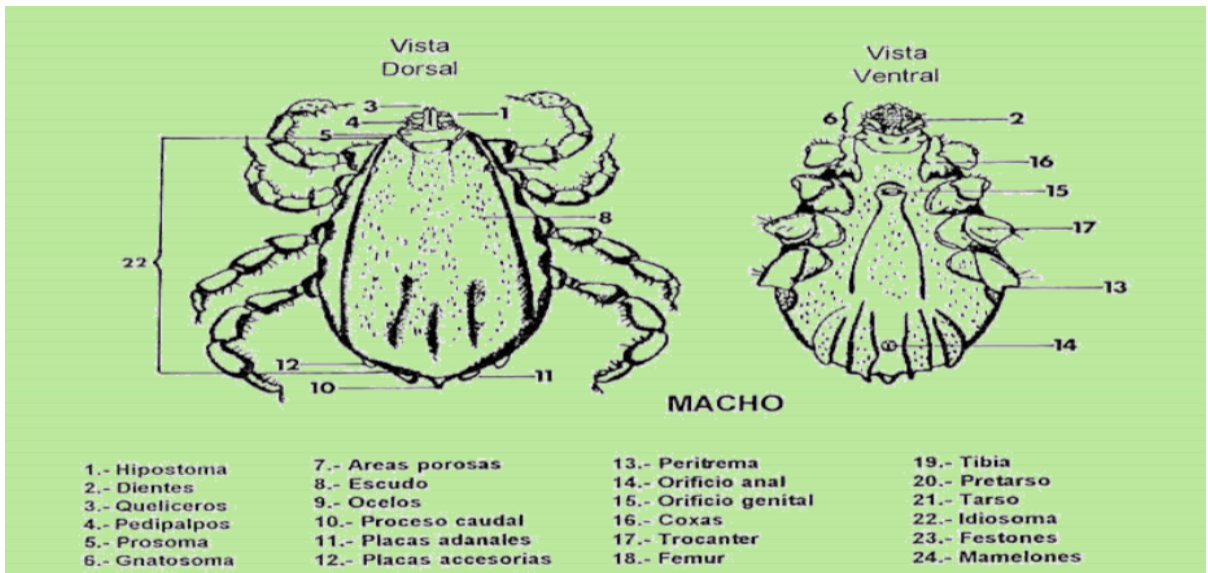


Fig. 2: Taxonomía de *R. sanguineus* (Osorio, 2015). Vista dorsal y vista ventral Macho.



Fig. 3: Morfología de *R. sanguineus* (Gray et al., 2013). Vista dorsal. A: macho; B: hembra.

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* esta ampliamente distribuida en todo el mundo, es la especie de garrapata más cosmopolita en caninos y se encuentra en todos los continentes 50° N y 35° S, a cuyo entorno esta bien adaptada, en América esta presente desde Canadá hasta Argentina, se ha descrito en diferentes países como Brasil, Argentina y en México principalmente en los estados de Morelos, Sinaloa y Mexicali Baja California (Rubio Robles et al., 2015). En un estudio realizado en perros de la zona urbana de Mexicali, Baja California, México se encontró una prevalencia de *R. sanguineus* del 65.1% (250/384) (Tinoco-Gracia et al., 2009).

Como otras garrapatas ixodídicas, *R. sanguineus* se somete a cuatro etapas de desarrollo: huevecillo, larva, ninfa y adulto (Oliveira et al., 2005). El período de alimentación de *R. sanguineus* puede variar desde dos días hasta varias semanas, dependiendo del estadio de desarrollo de la garrapata (por ejemplo, el período de alimentación de las ninfas es más largo que el de las larvas) y el hospedador (por ejemplo, la alimentación de las hembras hasta quedar repletas puede llevar más

tiempo en los conejos que en los perros). Las garrapatas machos pueden alimentarse en múltiples ocasiones con sangre. El período de alimentación es de 3 días para las larvas, 4 días para ninfas y 6 días para la hembra adulta. De hecho, se ha demostrado que las garrapatas machos previamente unidas a un perro pueden pasar a otro perro y alimentarse de él. Además, las garrapatas macho pueden permanecer durante largos períodos de tiempo en el hospedador. Curiosamente, se ha observado que la presencia de machos puede aumentar el rendimiento de alimentación de las garrapatas inmaduras de *R. sanguineus*, particularmente ninfas (Dantas-Torres, 2010).

Cuando se completa la alimentación, la hembra repleta se separa del hospedador, cae al suelo y después de un período de preovoposición (de tres días a algunas semanas) deposita miles de huevecillos. Por lo general, las hembras de *R. sanguineus* ovoposita ininterrumpidamente un promedio de 1500-4000 huevecillos. El período de ovoposición puede durar varias semanas y el número de huevecillos puestos por cada hembra se correlaciona directamente con su peso y la duración del período de ovoposición. La eclosión de los huevecillos presenta un período de incubación que dura entre 6 a 14 días hasta su eclosión como larva y su alimentación es de aproximadamente 7 días, la primer muda de larva a ninfa es de 5 a 23 días la cual se realiza abajo del perro, al eclosionar en ninfa procede a alimentarse con una duración de 4 a 7 días aproximadamente, al término de su alimentación baja del perro y su segunda muda de ninfa a adulta presenta una duración de 11 a 72 días. Terminado el proceso de muda las garrapatas adultas suben nuevamente al perro para alimentarse la cual tiene una duración de 5 a 7 días e iniciar nuevamente con su ciclo (Dantas-Torres, 2010).

Como parásito que se alimenta de sangre, puede causar daño directo debido a su comportamiento de alimentación y también pueden actuar como vector de agentes de diversas enfermedades en el perro, como son *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia rickettsii* y *Babesia vogeli* (Pereira da Costa et al., 2015), que también pueden ser transmitidas al humano ya que son causantes de zoonosis (Parolas y Padock, 2005).

Control de *R. sanguineus*

Se debe tomar en cuenta que solo el 5% de las garrapatas se encuentran en el perro mientras que el resto (95%) se encuentran en el medio ambiente. Por lo que su eliminación requiere de una estrategia de control integral, dirigida a los perros y al ambiente. Se han utilizado piretrinas y piretroides entre ellos se encuentran permetrina y cipermetrina presentando una disminución significativa de *R. sanguineus* pero su gran desventaja es que son tóxicos para el perro y para el humano, así como también contaminan al medio ambiente además de que no presenta una eliminación completa de las garrapatas (Otranto et al., 2005; Dantas-Torres et al., 2008). El uso a largo plazo de estos productos se ve continuamente afectado por la capacidad de las garrapatas para generar resistencias que generen que los productos químicos sean ineficaces, tal resistencia plantea una seria amenaza para el control de plagas. La resistencia puede resultar de un aumento en la capacidad para desintoxicarse o por cambios en su morfología. Las piretrinas y piretroides actúan sobre las proteínas del canal de sodio dependientes del voltaje que se encuentra en las membranas de las células nerviosas de los artrópodos el

cual es interrumpido por la unión de estos productos deteniendo su proceso y eventualmente hasta su muerte (Davies et al., 2007).

Respuesta inmunitaria

Cuando *R. sanguineus* intenta alimentarse de su hospedador, se enfrenta a la hemostasis del hospedador (mecanismo de defensa de los vertebrados que previene la pérdida de sangre), la inflamación (que puede producir picazón o dolor y así iniciar un comportamiento de defensa en su hospedador) y la inmunidad adaptativa a través de ambas respuestas ya sea humoral o celular. *R. sanguineus* desarrolla un mecanismo de defensa farmacológico contra la respuesta inmunitaria de su hospedador el cual consiste en lípidos y proteínas bioactivas que ayudan a su alimentación. La hemostasia, que incluye coagulación, vasoconstricción y agregación plaquetaria, es el primer mecanismo de defensa innato del hospedador contra la lesión causada en la piel por los palpos de la garrapata. Esta respuesta activa la vía alterna del complemento y la inflamación donde ocurre una infiltración rápida de leucocitos (Francischetti et. al. 2009), donde los queranocitos, células endoteliales, leucocitos, mastocitos, células dendríticas y macrófagos establecen contacto inmediato con la saliva de la garrapata y se activan liberando interleucinas y otras citosinas que atraen más células inflamatorias en el área de la infestación (Wikel, 2013). Luego de la alimentación sanguínea de las garrapatas se presenta la activación de la rama celular y humoral de la inmunidad adaptativa del hospedador (Brossard et. al. 2004), donde los linfocitos T y B amplifican la respuesta inflamatoria liberando citoquinas específicas que producen anticuerpos que se dirigen a

antígenos salivales o derivados de la saliva de *R. sanguineus* (Bowman et. al. 2008, Wikel 2013 y Brossard et. al. 2004).

Antígenos contra *R. sanguineus*

Se ha reportado que la vacunación con antígenos proteicos específicos es capaz de inducir una inmunidad significativa contra la infestación de garrapatas y esta inmunidad se ha duplicado mediante la vacunación con antígenos recombinantes el cual es un gran paso para la producción comercial de vacunas (Willadsen, 2004). Además, Merino et al. (2013), reportaron que la administración de proteínas de garrapatas mediante la vacunación no solo disminuye la alimentación y reproducción de las garrapatas, sino también la infección y transmisión de patógenos de la garrapata al hospedador.

Se han identificado dos fuentes de antígenos vacúnales candidatos que se han clasificado como antígenos expuestos y antígenos ocultos. Los expuestos son aquellos a los cuales el sistema inmune del hospedador se expone primero ya que se encuentran en la saliva de la garrapata cuando se está alimentando; estos no se consideran efectivos por estar en constante exposición al sistema inmune del hospedador por lo que presenta cierta tolerancia y no los reconoce como cuerpos extraños por lo que no proporciona una protección efectiva (Allen et al., 1979; Larregina y Faló, 2005).

Los antígenos ocultos son aquellos que no están en constante exposición con el sistema inmune del hospedador que estimulan la producción de anticuerpos y una eficaz protección en contra de las garrapatas. Un ejemplo serían aquellos que se

encuentran en la pared del intestino medio de la garrapata e interactúan con inmunoglobulinas específicas que vienen en la sangre cuando la garrapata se alimenta (Nutalle et al., 2006). La ventaja que ofrecen los antígenos ocultos es que por estar ocultos no hay riesgo de que los mecanismos inmunosupresores que se encuentran en la saliva de la garrapata induzcan tolerancia lo cual es un problema potencial para las vacunas basadas en antígenos expuestos. Además de los antígenos intestinales, los antígenos ocultos también se pueden obtener de otros órganos o tejidos de la garrapata como los ovarios, esto debido a que la digestión de la sangre se produce principalmente en las células del intestino medio y pasa a la hemolinfa por lo que las inmunoglobulinas pasan intactas a los ovarios (Nutalle et al., 2006). Algunos antígenos ocultos que se han utilizado como vacunas potenciales contra *R. sanguineus* son: antígeno vitelogenina, P0, VDAC y Bm86.

Sin embargo recientemente se ha distinguido un tercer grupo de antígenos que combina las propiedades de los antígenos expuestos y ocultos (Nutalle et al., 2006). Este último grupo ofrece la posibilidad de una vacuna de amplio espectro efectiva contra una amplia variedad de garrapatas adultas e inmaduras de *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus sanguineus*, la cual muestra actividad de bloqueo y protección de transmisión de patógenos (Allen et al., 1979; Larregina y Faló, 2005).

Antígeno Vitelogenina: Es una hemoglicoproteína de la hemolinfa en garrapatas adultas obtenida de *R. sanguineus*, es la proteína fundamental de los huevecillos de los artrópodos, son generalmente grandes glicofosfolipoproteínas oligoméricas compuestas de monómeros o dímeros, el peso molecular de la

vitelogenina varia de 210 a 652 kDa. Vitelogenina es muy importante dentro de la fisiología en *R. (B). microplus*, ya que participa en actividades vitales como la formación de huevecillos, alimentación del cigoto y posteriormente del embrión por lo que la interrupción de vitelogenina provoca la disfunción de las células intestinales, y varias de las actividades primordiales de las garrapatas y ha sido probada en *R. sanguineus* y *Dermacentor variabilis* (Granjeno et al., 2010). Los estudios realizados en *R. sanguineus* han demostrado que el estómago es uno de los sitios de síntesis de vitelogenina, la que es transportada al ovario vía hemolinfa y convertida en vitelina, constituyente del huevecillo; además de constituir una vía de penetración de microorganismos al interior de la garrapata (Kocan et. al. 1995). En la última década el estudio de las serino proteinasas en artrópodos ha despertado gran interés por constituir mediadores esenciales de ciertos procesos fisiológicos (Rosenfeld et. al 1988). Se ha demostrado que estas proteinasas están involucradas en la digestión del alimento dentro del intestino, en la activación de la cascada de la fenoloxidasa en respuesta a infecciones microbianas, en la detoxificación de agentes nocivos como los insecticidas y en la modulación del desarrollo embrionario. Resultó muy interesante encontrar una actividad endopeptidasa con estas características en el intestino a pesar de que la actividad digestiva en garrapata es intracelular con un pH muy ácido a diferencia de los insectos.

Antígeno P0: La proteína P0 es un componente estructural del ribosoma de todos los organismos, se localiza en el citoplasma de la célula y es esencial para el ensamblaje de la subunidad ribosómica. Su ausencia conduce a ribosomas inactivos para la síntesis de proteínas y la muerte celular (Wang et al., 2002). Además, la

proteína P0 actúa como un elemento regulador que ayuda a ajustar el metabolismo de los organismos a diferentes condiciones ambientales. Las secuencias de esta proteína en diferentes especies de garrapatas muestran una identidad muy alta. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el antígeno podría tener una actividad de amplio espectro y ser activo contra varias especies de garrapatas (Rodríguez-Mallon et al., 2012). Se ha identificado una región inmunogénica de la proteína ribosómica P0 de *Rhipicephalus spp.* que no están muy conservadas en comparación con la proteína homóloga secuenciada a genes en sus hospedadores. Se trata de un péptido de 20 aminoácidos que en su forma sintética se ha evaluado como antígeno vacunal contra *R. sanguineus* en un experimento de inmunización en un modelo en conejos donde el péptido P0 redujo en gran medida la supervivencia de las garrapatas con una eficacia general del 90%. Por lo que se encontró que el péptido seleccionado como antígeno de vacuna se localiza en una región altamente inmunogénica dentro de la proteína P0 (Rodríguez-Mallon et al. , 2012). En un estudio P0 se utilizó como vacuna contra la garrapata *Rhipicephalus microplus* mostrando una disminución significativa en el número de hembras repletas y en el peso de las mismas, también presentó disminución en el número de huevos ovopositados y número de huevos eclosionados dando como resultado una efectividad del 96% (Rodríguez-Mallo et al., 2015).

Proteína VDAC: VDAC es una proteína transmembranal que actúa como un poro selectivo, está presente en múltiples taxa y se sabe que está involucrada en procesos de apoptosis. Al ser un antígeno oculto VDAC es considerado un candidato vacunal siempre y cuando sea inmunogénico y se encuentre conservado. Hasta la

fecha no se ha encontrado un homólogo de VDAC en otras especies del género *Rhipicephalus*. Por otra parte, se sabe que *Pichia pastoris* tiene la capacidad de poder plegar proteínas eucariontes de manera muy similar a sus organismos nativos y se ha usado como un muy eficiente sistema de producción debido a la gran cantidad de proteína recombinante que puede ser obtenida, razón por la cual ha sido elegida como organismo modelo para la expresión de proteínas recombinantes para uso vacunal (Rodríguez-Hernández et al., 2015).

En un estudio se identificó el gen homólogo que codifica a VDAC en la especie de garrapata *R. sanguineus* y *R. annulatus* donde comprobaron su grado de conservación al nivel de secuencia de nucleótidos y de proteína predicha, así como el diseño de primers para su clonación en un vector de expresión *P. Pastoris*. Se mostraron 750 pares de bases utilizando los primers de Rodríguez-Hernández, et al., 2012. Al comparar las secuencias obtenidas de *R. sanguineus* y *R. annulatus* utilizando BLAST se observó que la cobertura es mayor a 96 % con más del 80 % de identidad con secuencias reportadas de VDAC en *R. microplus*, *Amblyomma variegatum* e *Ixodes scapularis*, lo cual sugiere que la secuencia codificante para esta proteína se encuentra altamente conservada entre especies de importancia en la salud animal (por lo menos en las secuencias de garrapatas reportadas hasta el momento). Al realizar el alineamiento con Clustal Omega, se observó una diferencia de 14 aminoácidos con respecto a la secuencia predicha de *R. sanguineus* al ser comparadas con la secuencia de *R. microplus* y 45 con respecto a *I. scapularis*. Mientras que la secuencia predicha de *R. annulatus* presentó una diferencia de seis aminoácidos con respecto a *R. microplus* y 43 con respecto a *I. scapularis*. La

predicción de epítomos B confirmó que los 4 epítomos B predichos en *R. microplus* se encuentran conservados en VDAC de *R. sanguineus*. Finalmente, utilizando la secuencia de VDAC de *R. sanguineus* se diseñaron los oligos con los cuales se logró amplificar un fragmento de 520 pares de bases en línea con el marco de lectura nativo. Debido a las construcciones diseñadas en el extremo 5' de los primers, se tiene la certeza de que al clonarse en el vector pPICZ α tendrá la dirección correcta al momento de la transcripción (Corona-Guerrero et al., 2017).

Antígeno Bm86: Es una glicoproteína aislada a partir de las células de las microvellosidades del intestino de la garrapata *R. microplus* y *R. sanguineus* (Willadsen y Kemp, 1988) que está presente durante todo el ciclo de vida de la garrapata, desde los huevecillos antes de la muda hasta la etapa adulta en la garrapata repleta de sangre. Esta proteína tiene un peso molecular de 890.000 Da esta conformada por 650 aminoácidos por lo cual se conoce que es muy plegada (León-Clavijo et al., 2012).

El gen Bm86 de forma recombinante ha sido clonado y expresado en diferentes vectores, como *E. Coli*, *baculovirus* y *Aspergillus spp*; la respuesta inducida por estos vectores ha sido baja, por lo que posteriormente se expreso en la levadura *Pichia pastori* dando resultados satisfactorios para controlar la infestación de garrapatas *R. microplus* (Brossard y Wikel, 2004; Bautista, 1987). Este antígeno se considera un candidato adecuado para su uso por que induce a una fuerte respuesta de anticuerpos y redujo la ovoposición y cantidad de garrapatas adultas que afectaban al ganado bovino (Willadsen, 2004). Sin embargo, a la fecha, se

desconoce como los anticuerpos interfieren con la garrapata, reduciendo así el número, el peso y la capacidad reproductiva de las mismas. Así mismo, la prevalencia de algunos patógenos transmitidos por garrapatas puede verse afectada indirectamente con el uso de este antígeno (de la Fuente et al., 2007).

Al investigar la eficacia recombinante expresada en la levadura *Pichia pastori* para la reducción del potencial de *R. sanguineus* mediante la vacunación en perros (Rodríguez-Mallon et al., 2012) se ha observado que puede funcionar debido a que se reportó una estrecha relación filogenética entre *R. sanguineus* y *R. microplus* (Beati y Keirans, 2001; Murrel y Barker, 2003) ya que se ha descrito una alta similitud entre el gen Bm86 y su homólogo recientemente aislado Rs86 en *R. sanguineus* (Fang y Xu, 2007).

Los estudios de Pérez-Pérez et al. (2010) mostraron que la vacunación con el antígeno Bm86 de una cepa originaria de Cuba presenta eficacia en la respuesta inmune contra *R. sanguineus*. Ellos observaron que en perros inmunizados con Bm86 e infestados con los 3 estadios de la garrapata se obtuvieron tasas de recolección significativamente menores ($P < 0.05$) tanto para larvas (38%), ninfas (29%) y hembras adultas (31%,) en comparación con los perros no inmunizados, observando también una disminución en el peso de las hembras repletas y la masa de los huevecillos, pero no en la tasa de eclosión. Por lo que los científicos llegaron a la conclusión de que el antígeno Bm86 utilizado como vacuna para perros redujo la viabilidad y el potencial de *Rhipicephalus sanguineus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El estudio se desarrolló en las instalaciones de Instituto de Investigaciones de Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, México, en un área bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad relativa (15%) dentro del edificio H, siguiendo las especificaciones técnicas indicados en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) Producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Las pruebas inmunológicas se llevaron acabo en Laboratorio de Inmunología y en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones de Ciencias Veterinarias.

Duración del experimento

El desarrollo del experimento tuvo una duración de 6 meses, que comprendió el cultivo de las garrapatas (aproximadamente 60 días), la vacunación e infestación de los perros, medición del efecto de la vacuna sobre *R. sanguineus* en cuanto a peso las hembras repletas, peso de los huevos, número de huevos ovopocitados y tasa de eclosión y posteriormente la determinación de anticuerpos mediante una prueba de ELISA.

Vacunación de perros

Se utilizaron 8 perros criollos talla mediana (4 machos y 4 hembras) de 4 a 5 meses de edad con un peso de 8 a 10 kg, desparasitados, clínicamente sanos y nunca antes expuestos a garrapatas. Se mantuvieron aislados en el laboratorio durante el tiempo que se llevo a cabo el experimento, a fin de evitar el contacto con garrapatas. En la distribución de los tratamientos sobre las unidades experimentales de manera aleatoria resultaron dos grupos, el grupo no vacunal (NV) con 3 perros y el grupo vacunal (V) con 5 perros. Los perros fueron alimentados con dieta comercial a base de croquetas y agua a libre acceso. Cada perro fue alojado en jaulas individuales de acero inoxidable con dimensiones de 24×30 pulgadas y eran sacados de sus jaulas dos veces al día para ejercitarse dentro del laboratorio durante una hora (por la mañana y por la tarde).

Al grupo no vacunal se le aplicó 1 mL de solución salina fisiológica (placebo) en el miembro posterior derecho vía intramuscular y al grupo vacunal se le aplicó 1 mL de una vacuna recombinante rBm86 (Laboratorios LaPiSA, Ciudad de México, México), a una concentración de 60 µg de antígeno Bm86 en adyuvante oleoso. Las inmunizaciones se realizaron al día 0, 84 y 115.

Antes de cada inmunización se tomo una muestra sanguínea de la vena cefálica en tubos sin anticoagulante (BD Vacutainer) para la obtención del suero. Los sueros se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Cultivo de *Rhipicephalus sanguineus*

Se desarrolló el cultivo in-vitro de 8 garrapatas obtenidas directamente de perros infestados con *R. sanguineus* del Centro de Control animal de la ciudad de Mexicali, Baja California. Se colectaron utilizando pinzas sin punta evitando pincharlas y colocándolas en frascos de plástico para su transportación al Laboratorio de Parasitología.

Las garrapatas fueron lavadas con agua destilada, secadas y después colocadas dentro de cajas de Petri. Se mantuvieron en incubadora (phcbi, modelo MCO-170AICD, Europa) a una temperatura de 30°C con un 80% de humedad durante 10-12 días hasta su ovoposición, posteriormente los huevos ovopositados de cada garrapata se colectaron y se colocaron en contenedores individuales (vasos de muestra). Se incubaron nuevamente durante 14 días hasta su eclosión a larvas. Todas las larvas fueron colocadas en la cámara de plástico aplicada en el área intercostal del perro para su alimentación durante 3-4 días. Una vez ingurgitadas se colocaron nuevamente en dos contenedores y se incubaron bajo las mismas condiciones hasta su muda como ninfas, ocurriendo en aproximadamente 10 días.

Todas las ninfas se colocaron nuevamente en el perro para su alimentación durante 5 días. Una vez repletas éstas se desprendieron por si solas, se colectaron todas y se incubaron por 7 a 10 días hasta mudar a adultas, las cuales se mantuvieron sin alimentar durante 30 días hasta ser utilizadas para infestar a los perros del grupo vacunal y del grupo no vacunal.

Infestación con *Rhipicephalus sanguineus*

A cada perro del grupo vacunal y el grupo no vacunal le fue colocada una cámara de plástico blando forrada con una media de tela la cual se adhirió en el costado afeitado en el área de las costillas dentro de la cual se colocaron 28 garrapatas adultas (14 hembras y 14 machos) para su alimentación, durante aproximadamente 6 días. Al término de su alimentación se desprendieron por si solas y se recolectaron en contenedores individuales. Se utilizaron collares isabelinos desde el primer día de la infestación para evitar la eliminación de la cámara por parte de los perros.

Las garrapatas repletas colectadas de cada uno de los perros fueron pesadas y colocadas en cajas de Petri con el nombre de cada uno de ellos. Se mantuvieron en incubadora durante 10 días hasta su ovoposición. Los huevos ovopositados se pesaron y se transfirieron a contenedores individuales (vasos de muestra) previamente identificados los cuales fueron incubados durante aproximadamente 14 días hasta su eclosión a larvas. Se procedió a realizar un conteo de huevos eclosionados y no eclosionados.

Determinación de Anticuerpos

Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante una prueba de ELISA. La prueba consistió de la aplicación de 100 μ L de antígeno Bm86 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una concentración de 5 μ g / mL en tampón carbonato 0.1 M, pH 9.6 y la placa se dejó incubando durante toda la noche en una cámara fría a 4 °C. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS-T 20 al 0.1 % y se bloqueo con 100 μ L de Blocking buffer durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, después de lavar 3 veces

con PBS-T se agregaron 100 μ L de suero a analizar en una dilución 1:400, se incubó durante 1 hora a 37°C, luego del lavado se agregaron 100 μ L de anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina IgG anti-inmunoglobulina del perro a una dilución 1:4000. Después de la incubación y el lavado, las reacciones se mantuvieron durante 5 minutos en la oscuridad utilizando 100 μ L de Ortofenilendiamina (OPD). Las placas fueron llevadas a un lector de ELISA de alto rendimiento MPM6 donde se obtuvo la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm.

Análisis Estadístico

Se obtuvieron los estadísticos descriptivos para la variable de densidad óptica en el suero sanguíneo y para las variables de la viabilidad de *Rhipicephalus sanguineus*. Con los datos de densidad óptica se construyó un gráfico para observar su comportamiento. La comparación de medias entre ambos grupos en cuanto a medición de anticuerpos y para las variables peso de las garrapatas *R. sanguineus* antes de su ovoposición y peso de los huevos ovopositados, se llevó a cabo de utilizar la prueba t de Student. La prueba de homogeneidad de varianzas entre grupos para la variable en estudio se resolvió de aplicar la prueba de Cochran. El análisis se realizó con la ayuda del procedimiento TTEST del paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0 para Windows. La comparación entre grupos para las variables de conteo: la ovoposición y la tasa de eclosión se realizó de aplicar la prueba chi-cuadrada. El análisis se realizó de aplicar el procedimiento FREQ del paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0 para Windows.

RESULTADOS

Respuesta de anticuerpos específicos de Bm86 en perros vacunados y no vacunados.

La respuesta de anticuerpos específicos anti-Bm86 en el grupo vacunal y grupo no vacunal se determinó mediante una prueba de ELISA. En el grupo vacunal se observó que solamente dos de los perros inmunizados durante la primera inmunización al día 84 presentaban una densidad óptica de .242 y .250 superior al punto de corte (.199 unidades de absorbancia) a 405 nm en una dilución de 1:400 y durante la segunda inmunización al día 115, 3 de los perros del grupo vacunal presentaron una densidad óptica de 0.206, 0.630 y 0.555 a una dilución de 1:400. Al contrastar los valores entre los grupos y utilizar para su valoración la prueba t de student, los resultados indican que hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) en los valores de DO entre el grupo vacunal y el grupo no vacunal, indicando diferencias en los niveles de anticuerpos en los grupos evaluados (Figura 4).

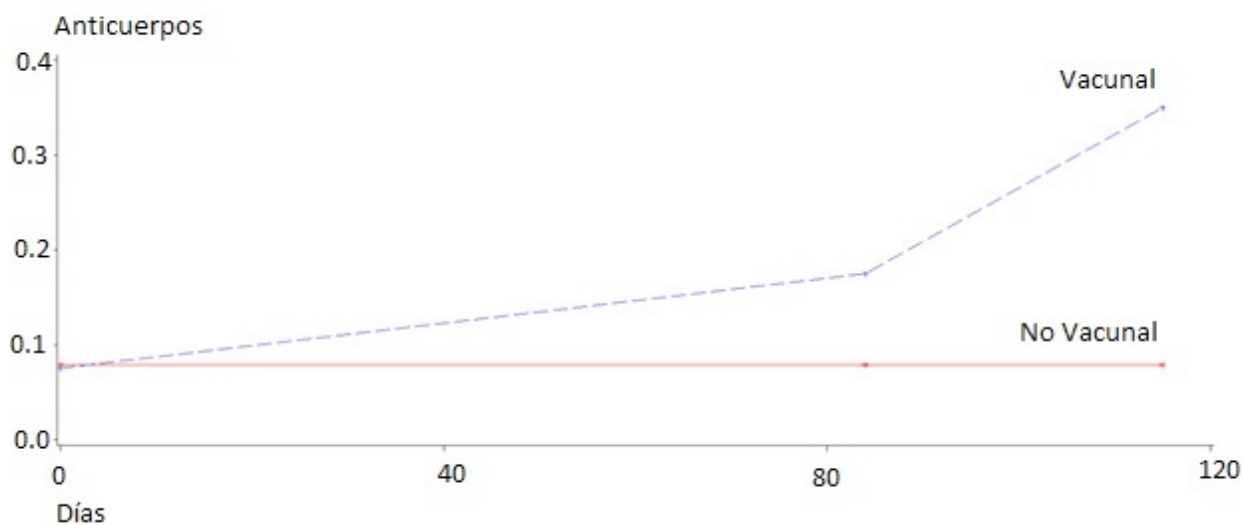


Fig. 4: Comportamiento promedio de Densidad Óptica de los anticuerpos.

En la Fig 4, se observa que el comportamiento del grupo no vacunal se encuentra por debajo del nivel 0.1 de la densidad optica de una forma constante durante todo el experimento. Para el grupo vacunal, la tasa de incremento a los 84 días fue de 0.17 estimada por regresión de los valores de DO dado el tiempo, la cual resulto ser significativa. Hacia el día 115, se puede observar una tasa de incremento en los valores de DO de hasta dos veces la tasa de incremento estimada (0.17 vs. 0.35 cuadro 1), indicando mayor cantidad de anticuerpos como la determinada en diluciones de 1:400 debido a que los perros vacunados presentaron linfocitos B y T de memoria conocido como inmunidad secundaria la cual permite que esta proliferación de linfocitos presente respuesta en contra del antígeno específico Bm86 (Bowman et. al. 2008).

Cuadro 1. Diferencia de valores de DO a diferentes tiempos por grupo experimental

Variable	V	NV	EE
DO ₀	.075	.079	.005
DO ₈₄	.175	.079	.0486
DO ₁₁₅	.350	.079	.1334

V=Grupo Vacunal NV=Grupo No-Vacunal
EE= Error Estandar

Efecto de la vacunación sobre *Rhipicephalus sanguineus*

Todos los perros de ambos grupos fueron infestados con el estadio adulto de garrapatas *R. sanguineus* para su alimentación y posteriormente se evaluaron los siguientes parámetros: el peso de las garrapatas adultas, número de huevos

ovopocitados, peso de los huevos ovopocitados, tasa de eclosión, tasa de no eclosión. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Valores promedio para variables en el estudio junto con sus errores estándar.

Variables	V	NV	EE
Peso de hembras repletas	.07075 ^a	.0581 ^a	.0156
Huevos ovopocitados	976.59 ^a	595.89 ^b	207.767
Huevos eclosionados	706.38 ^a	205.22 ^b	202.181
Huevos no eclosionados	390.67 ^a	271.19 ^a	141.56
Peso huevos ovopocitados	0.03604 ^a	0.02199 ^b	0.0076

V=Grupo Vacunal, NV=Grupo No-Vacunal

EE= Error Estandar. Letra distintas por renglón son diferentes (P<.05)

Entre grupos de comparación se ve un diferencial significativo (P< 0.05), entre el grupo vacunal y no vacunal, respectivamente, en el número de huevos ovopocitados (976.59 vs. 595.89) (Fig. 5), en el número de huevos eclosionados (706.38 vs. 205.22) (Fig. 6), sin embargo lo que resalta es el mayor rango intercuartil en el grupo vacunal en comparación al grupo no vacunal, como indicador de dispersión, en el peso de los huevos ovopocitados (0.03604 vs. 0.02199) (Fig. 7), debido a que la inmunización basada en antígeno Bm86 en perros afectó parcialmente los parámetros biológicos de *R. sanguineus* ya que presentó diferencia significativa en cada una de las variables mencionadas anteriormente. Esta diferencia significativa se debe a la unión de inmunoglobulinas a las células digestivas o células blanco donde la surge la fijación del complemento produciendo

lisis celular y aumentando la opsonización de los anticuerpos permitiendo que surja la fagocitosis y finalmente la inhibición de la endocitosis como consecuencia de la unión de los anticuerpos (Hope et al, 2010).

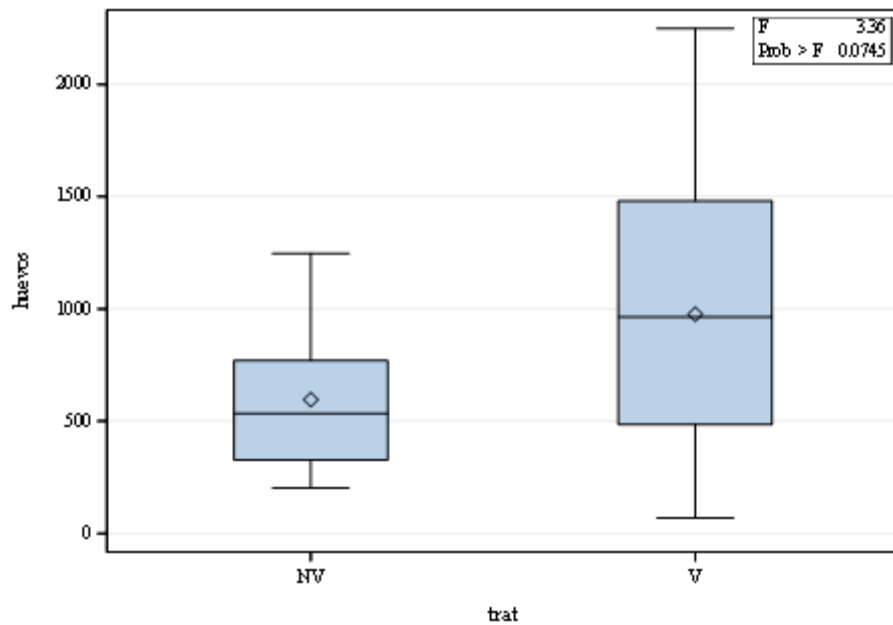


Fig. 5. Dispersión del número de huevos Ovopocitados.

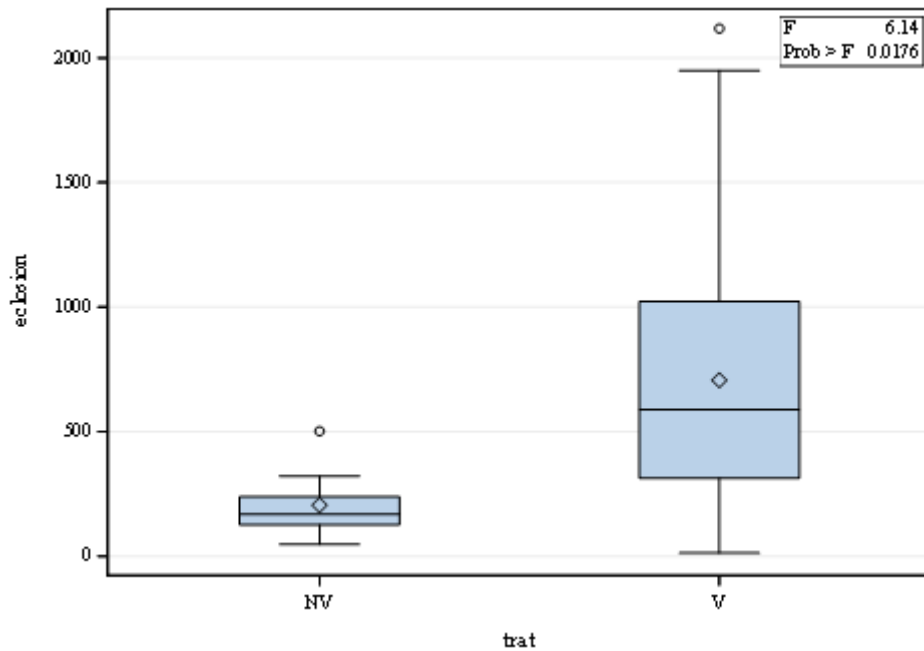


Fig. 6. Dispersión del número de huevos eclosionados.

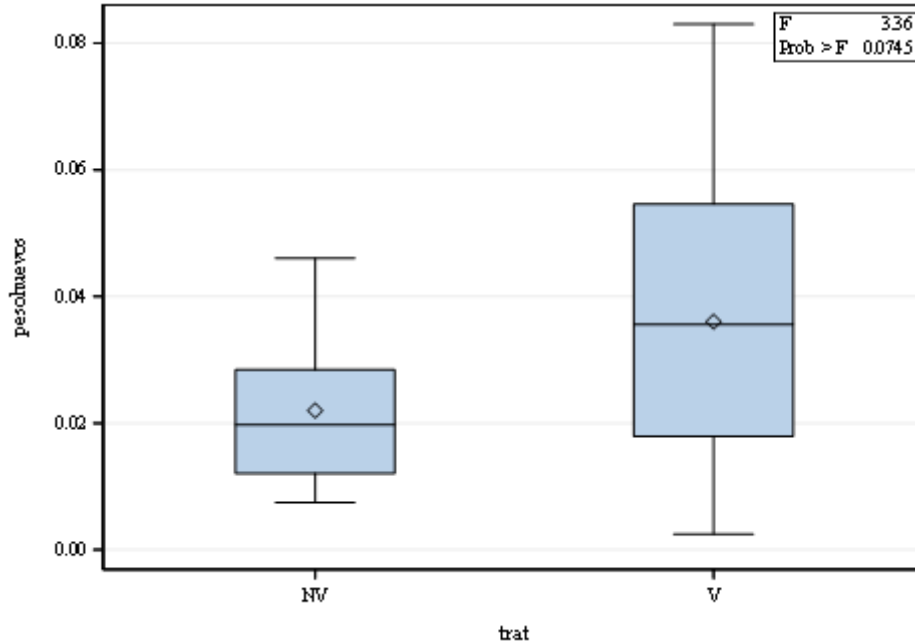


Fig. 7. Dispersión del peso de los huevos ovopositados.

DISCUSIÓN

A la fecha no se ha observado que los perros expuestos a *R. sanguineus* desarrollen un nivel de inmunidad protectora contra ésta (Szabó, 1991; Szabó et al., 1995; Ferreira et al., 2003). Esto debido a que *R. sanguineus* ha desarrollado mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune contra los antígenos de la garrapata que están presentes en su saliva y que le permiten fijarse para su alimentación y permanencia en el hospedador (Willasend, 2004). En el presente estudio se encontró una diferencia significativa en la densidad óptica (DO) de los sueros obtenidos de perros vacunados con el antígeno Bm86 con respecto a los perros no vacunados, ya que se observó un incremento de la DO luego de aplicar la segunda dosis de vacunación. Estos resultados sugieren que el antígeno utilizado en este estudio tuvo un efecto inmunogénico al estimular la producción de anticuerpos,

similar a los resultados obtenidos por Pérez- Pérez, et al. (2010) en perros vacunados con un antígeno recombinante Bm86 donde se obtuvo un aumento marcado y significativo de la DO en perros vacunados después de la segunda dosis de vacuna aplicada. Así mismo, estudios realizados por De Vos et al. (2001) y Rodríguez et al. (2004) demostraron la capacidad inmunogénica del antígeno recombinante Bm86 al estimular la producción de anticuerpos efectivos en bovinos vacunados en campo. Sin embargo los tiempos de revacunación en este estudio fueron muy prolongados en comparación a los empleados en el estudio realizado por Perez-Perez et al. (2010), lo que pudo reflejarse en la detección de un menor nivel de anticuerpos en el suero de los perros vacunados. Con respecto a los parámetros biológicos que se midieron en este estudio para determinar el efecto que la vacunación tuvo sobre *R. sanguineus*, después de realizar el desafío con hembras adultas de *R. sanguineus* que se alimentaron de perros vacunados y no vacunados, no se observó una reducción significativa en el peso de las hembras repletas y el número de huevos no eclosionados entre ambos grupos, contrario a lo obtenido por Pérez-Pérez, et al. (2010) donde se observó que hubo una reducción significativa (90%) en el peso de las hembras repletas. Además, en el presente estudio se observó una reducción significativa en el número de huevos ovopocitados, huevos eclosionados y peso de los huevos ovopocitados, entre el grupo vacunado y no vacunado, similar a lo obtenido por García-García, et al. (2000) donde observaron una reducción significativa en cuanto al número de huevos ovopocitados y peso de los huevos. Tanto en el presente estudio como en el de Pérez- Pérez, et al. (2010) el parámetro de eclosión presentó diferencias significativas entre larvas eclosionadas provenientes de perros vacunados y sin vacunar. El uso de vacunas contra

garrapatas no inducirá la muerte directa de las garrapatas si no que se basara en una disminución progresiva de su población ya que afecta directamente a su intestino medio y por consiguiente a su aparato reproductor (Rodríguez et al., 1995; Suárez et., 2007). Además, Barriga (1999) menciona que probablemente podría ser progresiva presentando una alta reducción de la población de garrapatas en cuanto al tiempo en comparación con la aplicación de acaricidas químicos.

CONCLUSIÓN

Se comprobó que ante la aplicación del antígeno Bm86 como vacuna si hubo presencia de anticuerpos contra el antígeno específico en el grupo vacunal.

El uso de este antígeno presentó una reducción significativa ante la medición de variables del peso de las hembras repletas, número de huevos ovopositados, peso de los huevos ovopositados, número de huevos eclosionados y número de huevos no eclosionados, reduciendo la reproducción de las garrapatas de *R. sanguineus*.

LITERATURA CITADA

- Allen, J., H. Khalil and S. Wikel. 1979. Langerhans cells trap tick salivary antigens in tick-resistant guinea pigs. *J Immunol.* 122: 563-570.
- Bautista, C., 1987. Interacciones artropodo respuesta inmune del huesped. *Ciencia Veterinaria*; 4: 87-130.
- Beati, L and J. E. Keirans. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) base mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological carácter. *J. Parasitol.* 87: 32-48.
- Brossard, M. and S. Wikel. 2004. Tick immunobiology. *Parasitology*; 129: 161-176.
- Canales, M., A. Enriquez and E. Ramos, 1997. Large scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine* 15: 414.
- Cobon, G., J. Hungerford, M. Woodrow, D. Smith and P. Willadsen. 1995. Vaccination against *Boophilus microplus*: the Australian field experience. In: de la Fuente, J. (Ed.), *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Ticks*. Ed. Elfos Scientiae, Cuba. 163–175.
- Corona-Guerrero, I., M. Camacho-Nuez, B. I. Carbajal-Gómez, J. Mosqueda. 2017. Caracterización molecular del gen del canal de aniones dependiente de voltaghe (VDAC) en *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (IXODIDA:IXODIDAE) y *Rhipicephalus annulatus* Say (IXODIDA:IXODIDAE). *Entomología mexicana*. 4:633-638.
- Coutinho, M.T., L.L. Bueno, A., Sterzik, R.T. Fujiwara, J.R. Botelho, M. De Maria, O. Genaro and P.M. Linardi. 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 128: 149–155.
- Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the Brown tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Rev. Act. Clin. Med.* 3: 26-30.
- Dantas-Torres, F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* 152: 173–185.

- Davies, T. G. E., L. M. Field, P. N. R. Usherwood, and M. S. Williamson. 2007. DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium channel. Rev. Biological Chemistry Division, Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire. 59(3): 151-162.
- De la Fuente, J., M. Rodríguez, C. Montero, M. Redondo, J.C. Garcia-Garcia, L. Meéndez, E. Serrano, M. Valdez, A. Enríquez, M. Canales, E. Ramos, O. Boué H. Machado and R. Lleonart. 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. Genet. Anal. 15: 143–148.
- De la Fuente, J., C. Almazán, M. Canales, J. M. Pérez de Lastra, K. M. Kocan and P. Willadsen. 2007. Aten-year review of comercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Animal Health Research Reviews. 8: 23-28.
- De la Fuente, J., K. M. Kocan, C. Almazán and E.F. Blouin. 2008. Targeting the tick–pathogen interface for novel control strategies. Front. Biosci. 13: 6947–6956.
- Estrada-Peña, A. 2005. Etude de la resistance de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus* aux acaricides. Rev. Med. Vet. 156: 67–69.
- Fang, Q. and G. Xu. 2007. Cloning and Sequencing of complete Bm86-like cFNA from the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Ticks and Tick Borne Diseases.10: 50-56.
- Fragoso, H., P. Hoshman, M Ortiz, M. Rodríguez, M. Redondo, L. Herrera and J. de la Fuente. 1998. Vaccine. 16: 1990-1992.
- Ferreira B. R., M. J. Szabó, K. A. Cavassani, G. H. Bechara, J S. Silva. 2003. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. Vet. Parasitol. 115: 35-48.
- Fragoso, H., P. Hoshman, M. Ortiz, M. Rodríguez, M. Redondo, L. Herrera, J. de la Fuente. 1998. Protection against *Boophilus annulatus* vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing. Vaccine Gavac Vaccine, 16:1990-1992.
- Garcia-Garcia, J. C., C. Montero, M. Redondo, M. Vargas, M. Canales, O. Boue, M. Rodríguez, M. Joglar, H. Machado, I. L. Gonzalez, M. Valdes, L. Mendez and J. de la Fuente. 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinat antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilis microplus*. Vaccine. 18: 2275-2287.
- Garcia-Garcia, J. C., C. Montero, M. Rodríguez, A. Soto, M. Redondo, M Valdes, L. Medez, J. De la Fuente. 1998. Effect of particulation on the immunogenic and

- protective properties of the recombinant Bm86 antigen expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine*. 16: 374-380.
- Granjeno, C., M. Estrada, J. Mosqueda, O. Hernández y V. Gracia. 2010. Variabilidad en la secuencia de un fragmento del gen de la vitelogenina de la garrapata *Boophilus microplus*. *Exp. Parasitol.* 23: 128-133.
- Gray, J., F. Dantas-Torres, A. Estrada-Peña y M. Levin. 2013. Systematics and ecology of the Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Tick and tick-borne Diseases*. 4: 171-180.
- Hassan, I. A., S.M. Hassan, A.M. El Hussein, M. Rodríguez. 2007. Evaluation of the recombinant Bm86 antigen (Gavac™) against *Hyalomma dromedarii* and *H. a. anaticum* (Acari: Ixodidae) in Sudan. *Biotechnología Aplicada*. 24:122-125.
- Hernández Álvarez, H. M., J. Mendiola Martínez, A. Fernández-Calines and M. Valdéz. 2000. Identificación de una protease neutral en intestine de *Bophilus microplus* por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina. *Rev. Cubana Med Trop.* 52 (3): 1561-3054.
- Hope M., X. Jiang, J. Gough, L. Cadogan, P. Jonsson and P. Willadsen. 2010. Experimental vaccination of sheep and cattle against tick infestation using recombinant 5'-nucleotidase. *Parasite Immunology*. 32: 135-142.
- Imamura S., B. Namangala, T. Tajima, M.T. Enala, J. Yasuda, K. Ohashi, M. Onuma. 2006. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks *Vaccine*, 24:2230-2237.
- Kocan, K. M., 1995. Targeting ticks for control of selected hemoparasites diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*. 57: 121-151.
- Larregina, A. T. and L. D. Faló. 2005. Changing paradigms in cutaneous immunology: adapting with dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 124: 1-12.
- León-Clavijo, M. A. y E. C. Hernández Rojas. 2012. Descripción de la proteína Bm86, polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. *Vaccine*. 10 (17): 111-134.
- Mendiola, J., M. Alonso, M. Marquetti and C. M. Finlay. 1996. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the Midgut. *Exp Parasitol.* 82: 27-33.

- Merino O., P. Alberdi, J. M. Pérez de la Lastra and J. de la Fuente. 2013. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Vaccine*. 29: 2248–2254.
- Miller, R.J., J.E. George, F. Guerrero, L. Carpenter and J.B. Welch. 2001. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. *J. Med. Entomol.* 38 (2): 298–302.
- Murrel, A. and S. C. Barker. 2003. Synonymy of *Boophilus Curtice* 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst. Parasitol.* 56: 169-172.
- Nuttall, P. A., A. R. Trimnell, M. Kazimirova and M. Labuda. 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling tick and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*. 28: 155-163.
- Oliveira T. C. J., M. S. C. Oliveira, J. P. Araujo and A. F. T. Amarante. 2005. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *International Journal for Parasitology*. 35(1): 105-111.
- Osorio, M. J. 2015. Taxonomía de garrapatas. Departamento de ectoparásitos y Dípteros. CENAPA, SENASICA-SAGARPA.
- Otranto, D., R.P. Lia, C. Cantacessi, G. Galli, P. Paradies, E. Mallia and G. Capelli. 2005. Efficacy of a combination of imidacloprid 10%/permethrin 50% versus fipronil 10%/(S)-methoprene 12%, against ticks in naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 130: 293–304.
- Parolas, P. and C. D. Padock, 2005. Tick-borne Rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 719-756.
- A. Pereira da Costa, F. Borges Costa, M. Bahia Labruna, I. Silveira, J. Moraes-Filho, J. Fábio Soares, M. Granziera Spolidorio, R. M. Seabra Nogueira de Candanedo Guerra. 2015. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Re. Bras. Parasitol. Vet.* 24: 1984-2961.
- Perez-Perez, D., R. Bechara, G. Machado, R. Andrade, M. Vecchio, M. Pedroso, O. Hernández and O. Farnos. 2010. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adult of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick Borne Diseases*. 167:2-4.
- Radulović, Ž.M., T. K. Kim, L. M. Potter, S. H. Sze, L. Lewis and A. Mulenga. 2014. A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. *BCM Genomics*. 15: 518-524.

- Rodríguez, M., R. Rubiera, M. Penichet, R. Montesinos, J. Cremata, V. Falcón, G. Sánchez, R. Bringas, C. Cordovés, M. Valdés, R. Lleonart, L. Herrera and J. de la Fuente. 1994. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *P. pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotechnol.* 33: 135–146.
- Rodríguez, M., C.L. Massard, A.H. Fonseca, N.F. Ramos, H. Machado, V. Labarta and J. de la Fuente. 1995. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestation of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine* 13: 1804–1808.
- Rodríguez, M., L. Méndez, M. Valdéz, M. Redondo, C.M. Espinosa, M. Vargas, R.L. Cruz, H.P. Barrios, G. Seoane, E.S. Ramírez, O. Boué, J.L. Vigil, H. Machado, C.B. Nordelo, M. Piñeiro. 2004. Integrated control of *Boophilus microplus* ticks in Cuba based on vaccination with the anti-tick vaccine Gavac. *Exp. Appl. Acarol.*, 34: 375-382.
- Rodríguez-Mallon, A., E. Fernández, P. E. Enciosa, Y. Bello, L. Méndez-Pérez, L. Cepero, D. Pérez, M. González, H. Garay, O. Reyes, L. Méndez and M. P. Estrada. 2012. A novel tick antigen shows high efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine*. 20: 1782-1789.
- Rodríguez-Mallon, A., P. E. Encinosa, P. L. Méndez, Y. Bello, F. R. Rodríguez, H. Garay, A. Cabrales, L. Méndez, C. Borroto and M. P. Estrada. 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: 530-537.
- Rubio Robles, M. C., S. M. Gaxiola Camacho, I. Enríquez Verdugo, S. C. Cota Guajardo, N. Castro del Campo. 2015. *Rhipicephalus sanguineus* en caninos en Sinaloa, México. *REDVET*. 16: (3) 1-10.
- Saifur, R. M., R. Khaledur, S. Sanjay, M. Kaykobad and R. M. Sohel. 2019. Antigenic: An improved prediction model of protective antigens. *Artificial Intelligence in Medicine*. 94: 28-41.
- Sonenshine, D. E., K. M. Kocan and J. de la Fuente. 2006. Tick control Further thoughts on a research agenda. *Trends in Parasitology*. 22: 550-551.
- Suárez, P. M., L.M. Méndez, M. Valdez, R.S. de Moura, J.A. dos Reis, N. Constanza, M. Vargas, E.A. Evanoff. 2007. Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería Cubana y en regiones de latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac® dentro de un programa de lucha integral. *REDVET*. 15:12-22.

- Sugumar, P., D. Chandran, R. Sudha, P. V. Shahana, D. K. Maske, P. N. Rangaranjan, L. N. Mangamori and V. A. Srinivasan. 2011. Recombinant mid gut antigen (Bm95) as a vaccine against Indian *Rhipicephalus haemaphysaloides* in *Bos indicus* cattle. *Res Vet. Sci.* 90: 262-268.
- Szabó, M. P. J. 1991. Aspectos da imunopatologia comparada em cães, hamsters e cobaias a carrapatos *R. sanguineus* (Latreille, 1806). M. S. Thesis, Universidade de Sao Paulo. 118.
- Szabó, M. P. J., L. S. Mukai, P. C. S. Rosa, G. H. Bechara. 1995. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters and guinea pigs to infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 32: 43-50.
- Tellan, R.L., D. Smith, D.H. Kemp and P. Willadsen. 1992. In: Yong, W.K. (Ed.), *Vaccination Against Tick. Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton. 303–331.
- Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz-Romero, M. T. Quintero-Martínez, T. B. Rentería-Evangelista, A. Barreras Serrano, M. Romano-Osuna, B. J. García-Prieto, A. M. Escáreaga-Ávila. 2009. Prevalencia de infestación de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en perros y su asociación a factores de riesgo en la zona urbana de Mexicali, Baja California, México. *AMPAVE*.
- Tirloni, L., J. Reck, R. M. Soares Terra, J. R. Martins, A. Mulenga, N. E. Sherman, J. W. Fox, J. R. Yates, C. Termignoni, A. F. M. Pinto and I. da Silva Vaz. 2014. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* saliva: a comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE*. 9: 4831-4840.
- Vargas F., T. I. y G. Tatacu F. 2014. Antígenos y Anticuerpos. *Rev. Act. Clin. Med.* 44: 2304-3768.
- Wang, J. S., X. Yang, R. Li, P. Zhou, M. L. Zhang and H. Han. 2002. Analysis of nuclear localization signal (NLS) in ribosomal protein L&Taxreb107. *Biochem Biophys.* 29: 144-148.
- Willadsen, P. and D. H. Kemp. 1988. Vaccination with ‘concealed’ antigens for tick control. *Parasitol.* 4: 196-198.
- Willadsen, P., D. Smith, G. Cobon and R. V. McKenna. 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with Bm91. *Parasite Immunol.* 5: 241-246.
- Willadsen, P. 2004. Anti-tick Vaccines. *Parasitology.* 129: 367-387.

Willadsen, P. 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*. 138: 161-168.