

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



**TIPIFICACIÓN GÉNICA DE *Rhipicephalus sanguineus* SENSU
LATO EN MEXICALI BAJA CALIFORNIA.**

**TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**PRESENTA:
OMAR CARO CRUZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS TINOCO GRACIA**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

JUNIO DE 2021

Tipificación Génica De *Rhipicephalus Sanguineus* Sensu Lato En Mexicali Baja California. Tesis Presentada Por Omar Caro Cruz como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

**DR. LUIS TINOCO GRACIA
DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. ALMA ROSSANA TAMAYO SOSA
SECRETARIO**

**DRA. SAWAKO OSHIMA
SINODAL**

**DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO
SINODAL**

**DR. ALBERTO BARRERAS SERRANO
SINODAL**

MEXICALI, B. C., MÉXICO, JUNIO DE 2021

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	V
LISTA DE CUADROS.....	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Clasificación taxonómica de la garrapata café.....	4
Morfología <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5
Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	6
Aspectos fisiológicos.....	7
Distribución.....	7
Comportamiento de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> en hospedador.....	8
Alimentación.....	8
Enfermedades transmitidas por <i>Rh. sanguineus</i>	10
Factores de riesgo	11
Diversidad genética.....	11
Técnica de genotipificación.....	12
Genes diana.....	13

Genoma mitocondrial.....	15
MATERIALES Y METODOS.....	16
Localización del área de estudio.....	16
Origen de las muestras.....	16
Duración del estudio	16
Numero de muestras	16
Extracción de ADN	16
Iniciadores.....	17
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	18
Visualización de productos de PCR.....	18
Electroforesis.....	18
Selección de muestras amplificadas.....	19
Purificación de secuencias amplificadas (Método de purificación por membrana de nitrocelulosa)	19
Secuenciación de las muestras.....	20
BioEdit.....	20
Alineación de secuencias por BioEdit.....	20
BLAST.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	24
LITERATURA CITADA.....	25

AGRADECIMIENTOS

Un enorme agradecimiento a mi tutor el Dr. Luis Tinoco Gracia y a la Dra. Oshima Sawako por su apoyo, el conocimiento que compartieron conmigo, pero sobre todo el tiempo que me dedicaron para finalizar este trabajo.

También al Dr. Gerardo Medina Basulto por su gran ayuda proporcionándonos un método alternativo de purificación para nuestras muestras de ADN

Gracias a la Doctora Maritza Manríquez por el apoyo que me brindo durante estos 2 años de estudio.

Gracias a mi compañera de clase Valeria López Villareal por el apoyo incondicional para seguir adelante en esta etapa académica y por una amistad real y duradera.

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico que me brindo durante estos 2 años de posgrado

Un agradecimiento enorme a UABC y sobre todo al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, en el cual he pasado años maravillosos de mi vida, por prestarme la oportunidad de superarme aun mas académicamente.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado principalmente a mi madre que ya no se encuentra conmigo, a mis tíos y a mi padre que me han apoyado durante todo este tiempo, a mi tutor que me ayudo a comprender mejor sobre el tema presente y a mis compañeros, que más que compañeros se convirtieron en mis amigos a lo largo de esta etapa de mí.

Y un agradecimiento especial a Vladimiro Ramiro (Vlad), mi gato que con su compañía me ayudo a no estresarme tanto realizando este proyecto.

RESUMEN

La garrapata de género *Rhipicephalus sanguineus* está distribuida en todo el mundo. Los estudios genéticos han informado la existencia de dos linajes bien definidos dentro de *R. sanguineus*: el linaje sur (linaje templado) y el linaje norte (linaje tropical). Los datos científicos disponibles indican que la situación con respecto al estado taxonómico de *R. sanguineus* (s.l.). Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de México, se tiene registro de la presencia de rickettsiosis, con mayor prevalencia en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Sinaloa y Sonora, con una tasa de mortalidad de hasta 35% en pacientes no tratados. Durante el periodo 2007 – 2009 se confirmaron brotes importantes en Mexicali Baja California (278 casos). En Mexicali, Baja California en el año 2011 se detectó un brote importante de *Rickettsia rickettsii* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*. De acuerdo a artículos escritos por otros autores que han investigado a *R. sanguineus* se han encontrado pruebas de polimorfismos al analizar el material genético de las mismas, por lo que basándonos en esa información se tomó la iniciativa de analizar de manera genotípica a la garrapata encontrada en Mexicali B.C. presuntamente identificada como *Rhipicephalus sanguineus*. Al no haberse realizado este tipo de estudio con anterioridad en la región no se puede garantizar su veracidad. Han surgido casos de contagios por Borrelia en la ciudad la cual es Transmitida por *Ixodes escapularis*, la cual es una garrapata que se encuentra en el este de México. Al realizar este estudio des podría descartar la posible presencia de tal garrapata en la zona. Para este estudio se utilizaron garrapatas de Mexicali Baja California, México. Provenientes del ejido puebla.

Ante este auge de las metodologías moleculares para el estudio de diversos aspectos de la ecología y la taxonomía de las garrapatas (7), es necesario conocer los beneficios y limitaciones de los marcadores moleculares utilizados para tales fines. Entre dichos marcadores se encuentran las secuencias mitocondriales de la subunidad 16S del ARN ribosómico (16S), la subunidad 12S del ARN ribosomal (12S), la región D-loop, el gen del citocromo oxidasa I (COX1), el gen de la. Entre las secuencias

mencionadas, el gen 16S es uno de los más utilizados en los estudios de taxonomía y variabilidad genética de este grupo de artrópodos y, recientemente, algunos autores han empleado el gen mitocondrial COX1 de la iniciativa de código de barras de ADN (Barcode of Life, www.barcodeoflife.org) (27), con la cual se aspira a identificar y reconocer la diversidad de especies a nivel global con base en la variabilidad genética que exhiben regiones del gen COX1 en diversos grupos de artrópodos (16,26,28).

Para el estudio se utilizaron 10 garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* las cuales se obtuvieron de la campaña anti rickettsiosis del 2019, las cuales fueron procesadas y se obtuvo su ADN

ABSTRACT

The tick of the genus *Rhipicephalus sanguineus* is distributed throughout the world. Genetic studies have reported the existence of two well-defined lineages within *R. sanguineus*: the southern lineage (temperate lineage) and the northern lineage (tropical lineage). The available scientific data indicate that the situation with respect to the taxonomic status of *Rh. sanguineus* (s.l.). According to the National Epidemiological Surveillance System of Mexico, there is a record of the presence of rickettsiosis, with a higher prevalence in the states of Baja California North, Baja California Sur, Sinaloa and Sonora, with a mortality rate of up to 35% in non-patients. treatments. During the period 2007 - 2009, important outbreaks were confirmed in Mexicali Baja California (278 cases). In Mexicali, Baja California, in 2011 an important outbreak of *Rickettsia rickettsii* was detected in *Rh. sanguineus* ticks. According to articles written by other authors who have investigated *Rh. sanguineus*, evidence of polymorphisms has been found when analyzing their genetic material, so based on this information, the initiative was taken to genotypically analyze the tick found. in Mexicali BC presumably identified as *Rh. sanguineus*. As this type of study has not been carried out previously in the region, its veracity cannot be guaranteed. Cases of *Borrelia* infections have emerged in the city, which is transmitted by *Ixodes scapularis*, which is a tick found in eastern Mexico. By carrying out this study, you could rule out the possible presence of such a tick in the area. For this study, ticks from Mexicali Baja California, Mexico were used. Coming from the ejido Puebla.

Given this boom in molecular methodologies for the study of various aspects of the ecology and taxonomy of ticks (7), it is necessary to know the benefits and limitations of the molecular markers used for such purposes. These markers include the mitochondrial sequences of the 16S subunit of ribosomal RNA (16S), the 12S subunit of ribosomal RNA (12S), the D-loop region, the cytochrome oxidase I gene (COX1), the gene for. Among the sequences mentioned, the 16S gene is one of the most used in taxonomy and genetic variability studies of this group of arthropods and, recently, some authors have used the mitochondrial gene COX1 from the DNA barcode initiative (Barcode of Life, www.barcodeoflife.org) (27), which aims to identify and

recognize the diversity of species at a global level based on the genetic variability exhibited by regions of the COX1 gene in various groups of arthropods (16,26, 28).

For the study, 10 *Rh. sanguineus* ticks were used, which were obtained from the 2019 anti-rickettsiosis campaign, which were processed and their DNA was obtained.

LISTA DE CUADROS

Cuadro

1. Posición taxonómica de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	4
2. Agentes patógenos transmitidos por <i>Rh. Sanguineus</i>	10
3. Muestras de garrapata seleccionadas para secuenciación.....	20
4. Diferencias encontradas mediante alineación por BioEdit.....	24
5. Comparación de resultados con banco de genes NCBI.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura

1. Escudo y Gnatosoma de garrapatas hembras.....5
2. Genoma mitocondrial de *Rh. Sanguineus*.....16
3. Muestras de ADN en proceso de purificación.....20
4. Resultados de PCR vistos a través de electroforesis.....23

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son arácnidos sistemáticamente próximos a las arañas, escorpiones, y sobre todo a los ácaros. Puede considerárseles como ácaros macroscópicos, caracterizados por poseer cuatro pares de patas y un cuerpo globoso, aplanado dorsoventralmente y no segmentado, Son ectoparásitos obligados que se alimentan de la sangre de sus hospederos. (Martínez Mier, 2016) Algunas de las enfermedades que pueden transmitir son la enfermedad de Lyme, la babesiosis, la anaplasmosis, la tularemia y la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, siendo esta última transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*. (Boston public health commission, 2015; ESCCAP, 2011)

Rhipicephalus sanguineus es también conocida como la garrapata común del perro o garrapata marrón del perro, donde el nombre de su parasitosis se le conoce como garrapatosis. Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos en su mayoría de climas medios y cálidos. El principal hospedador es el perro y en menor grado, gatos, ciervos, roedores, conejos, liebres, bovinos, ovinos, caprinos, caballo, león, reptiles, algunos anfibios y aves; incluso a humanos. Se puede localizar sobre la piel de hospedero para alimentarse de su sangre, en el perro las regiones corporales más infestadas son las orejas, cuello, dorso y espacios interdigitales. No hay una predilección de edad, talla, largo de pelaje o sexo de huésped. La larva y ninfa se adhieren frecuentemente al pelo largo del dorso o en el cuello. La hembra adulta deposita sus huevos en grietas cerca de los lugares habita el perro macho y hembra pueden ser encontrados copulando mientras la hembra se alimenta. Tienen gran tendencia a escalar, a menudo se esconde en los marcos de las ventanas o en cortinas, durante la alimentación las garrapatas permanecen fijas en el hospedador por horas o días. (Tinoco Gracia, 2012; Ramírez Hernández, 2014).

JUSTIFICACION

Es relevante que se llevara a cabo este estudio por la importancia que representa la garrapata como vector de enfermedades, siendo un problema de creciente importancia en salud pública, debiéndose tomar en cuenta para el mejoramiento de programas sobre medidas preventivas las cuales benefician tanto al hombre como a los animales puesto que se ha demostrado que la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (*Rh. sanguineus* (s.l.)) está ligada a casos de mordeduras en humanos, dando lugar a un riesgo zoonótico por parte de patógenos rickettsiales alojados en el tracto digestivo del parásito, como lo son ehrliquiosis y anaplasmosis por nombrar algunos, los cuales son causantes de enfermedades febriles agudas pudiendo resultar mortales tanto para los animales como para humanos. En México, *Rh. sanguineus* (s.l.) se encuentra distribuida en todo el territorio nacional, en regiones desde el nivel del mar hasta los 1,500 metros de altitud, aunque con el cambio climático esta condición se ha estado ampliando.

Al estar implicada como vector patógeno en la zona de Mexicali B.C. se necesita indagar más y aclarar con qué tipo de garrapata se está tratando pues hasta el momento se han registrados 2 tipos de *Rh. sanguineus* (s.l.); uno templado y otro tropical. Sin embargo, se han registrado casos de *Borrelia burgdorferi* en la ciudad de Mexicali (prevalencia de infección de 1.1% en la población general del país), siendo una enfermedad transmitida principalmente por la garrapata *Ixodes scapularis*, la cual se encuentra localizada en el noreste de EE. UU y México. Al no poderse encontrar este espécimen en esta zona del país es necesario realizar un estudio genotípico a *Rh. sanguineus* (s.l.) de la zona para descartar algún posible polimorfismo entre *Ixodes scapularis* o alguna variante genética de que sugiera que *Rh. sanguineus* (s.l.) pueda transmitir dicha enfermedad, puesto que hay registros de que este tipo de circunstancias han surgido con anterioridad.

Esta sería la primera vez que este procedimiento se lleva a cabo en *Rh. sanguineus* (s.l.) dentro de la ciudad de Mexicali, esperando fomentar un cambio tanto cultural como científico hacia un enfoque donde nos pueda beneficiar a todos, y como una posible visión al futuro, se podría trabajar para generar una vacuna específica endémica de Mexicali si es que se llegara a encontrar dicho espécimen.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio genotípico sobre la garrapata *Rh. sanguineus* en Mexicali Baja California, México. Mediante genes utilizados por otros autores en identificación de especies y así descartar posibles polimorfismos o algún otro cambio a nivel genético en la especie que habita dicha región.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar un estudio genotípico sobre la garrapata *Rh. sanguineus* en Mexicali Baja California, México. Utilizando genes seleccionados de ADN mitocondrial 12S, 16S y COX1.
- b) Descartar diferencias genéticas significativas
- c) Descartar polimorfismos en la especie
- d) Registrar los resultados al banco de genes en NCBI para aportar los hallazgos encontrados en este estudio.

REVISION DE LITERATURA

Clasificación taxonómica de la garrapata café

Fue descrita por primera vez en 1804 por Latreille, como *Ixodes sanguineus*, poco se sabe del origen de esta garrapata, algunos autores creen que es típica de África mientras que otros creen que es una especie del mediterráneo. Pero el género *Rhipicephalus* es típico de África, por esta razón la primera hipótesis. La taxonomía de esta especie de garrapata es un tema de un debate en curso, principalmente porque no hay una descripción morfológica de material de buena fe (Bona fide). Por lo que existe un consenso de que las poblaciones de esta especie de garrapata deben denominarse *Rh. sanguineus* (sensu lato) hasta que se resuelva su estado taxonómico. (Dantas Torres, 2007; Dantas Torres, 2017).

Cuadro 1.

Posición taxonómica de <i>Rh. Sanguineus</i>	
Filo	Arthropoda
Subfilo	Chelicerata
Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Orden	Parasitiformes
Suborden	Ixodida
Superfamilia	Ixodoidea
Familia	Ixodidae
Subfamilia	Rhipicephalinae
Genus	<i>Rhipicephalus</i>
Especie	<i>Rh. sanguineus</i>

Morfología *Rhipicephalus sanguineus*

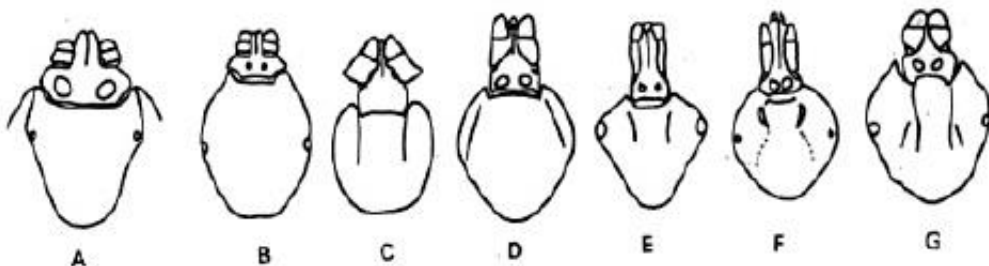
La estructura general del cuerpo de las garrapatas duras se divide en dos secciones: gnatosoma anterior e idiosoma posterior. En el gnatosoma (capitulum) se encuentran un par de palpos segmentados que son órganos sensoriales que ayudan a las garrapatas a localizar el huésped. El escudo es una placa dorsal esclerosada posterior al capitulum, esta estructura y el gnatosoma varía según la especie, lo cual puede aportar en la identificación de las garrapatas.

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.

La identificación de *Rh. sanguineus*, se basa en las diferencias morfológicas que presentan en relación con las otras especies. La base del capítulo es hexagonal y el escudo es marrón claro, sin ornamentación y con festones. La coxa I presenta una hendidura formando dos espinas muy cercanas y las coxas II, III y IV poseen un diente externo corto y un tubérculo como en el ángulo posterior interno. (R. Alvares, 2017; Zemtsova, 2016)

Figura 1. Escudo y Gnatosoma de garrapatas hembras.

A. *Boophilus*; B. *Rhipicephalus*; C. *Haemaphysalis*; D. *Ixodes*; E. *Amblyomma*; F. *Hyalomma*; G. *Dermacentor*; H. *Boophilus annulatus* (Quiroz, 2005)



Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*

R. sanguineus presenta tres formas parasitarias dentro de su ciclo de vida las cuales son: larva, ninfa y adulto. El ciclo comienza cuando los huevos eclosionan y en un periodo de 6 días a varias semanas después se convierten en larvas de seis patas. A bordo de su hospedador estas larvas se alimentan de sangre durante 3 a 10 días. Posteriormente caen al suelo donde experimentan la muda larval, este proceso tiene una duración de 5 a 15 días donde posteriormente pasan a su siguiente estado móvil de ninfa. Las ninfas se arriman a su hospedador y se alimentan de 3 a 11 días, después de este periodo de tiempo dejan a su hospedador para poder mudar nuevamente. En condiciones favorables a los 63 días se convierten en machos y hembras adultas listas para parasitar a su tercer hospedador, donde se alimentan y reproducen. La hembra luego de estar abastecida con suficiente sangre y fecundada, se deja caer al suelo donde pone de 1.000 a 3.000 huevos en un periodo de tres meses, reiniciando el ciclo. (R. Alvares, 2017)

La hembra adulta se alimenta en el huésped aproximadamente por una semana luego cae al suelo y busca algún lugar apartado para el desarrollo de los huevos. Después comienza a ovopositar durante 4 días. Al haberse alimentado 4 días después de caer del huésped su etapa de pre ovoposición puede extenderse hasta 21 días. Cuando ovoposita sus huevos sobre parte causal de la base del gnatosoma, los cubre con sus secreciones para mantenerlos con humedad y termina la ovoposición muere. La producción máxima de huevos puede ser entre 3,200 por cada hembra. Incubación de 19 a 92 días. El periodo de premuda de la larva es de 9.5 a 36.5 días y de la ninfa 15 a 44.5 días. Después de cada etapa comienzan a buscar huésped, todos sus estadios prefieren perros. Sin embargo, pueden alimentarse de otros animales.

Presentan un dimorfismo sexual, donde el macho puede ser confundido con fases juveniles, a diferencia de la hembra que es muy similar a una lenteja; el macho más oscuro que la hembra, debido a que se

encuentra cubierto por un escudo. En estado adulto poseen 4 pares de patas y en estado juveniles sólo 3. (Anasac, 2008; Tinoco Gracia, 2012)

Aspectos fisiológicos

Cuando la garrapata se fija al hospedador produce la secreción del cemento que contribuye a la fijación de la garrapata. Todo el proceso dura alrededor de una hora, y termina cuando los palpos se abren hacia los lados permitiendo la penetración profunda del hipostoma en la piel. En garrapatas con un capítulo largo, el hipostoma se sitúa profundamente en la dermis y puede llegar incluso hasta la hipodermis. En aquellas especies con capítulo corto, el hipostoma llega aproximadamente hasta la dermis. En cualquier caso, su inserción implica la rotura de vasos sanguíneos en el trayecto. Sin embargo, los factores mecánicos no pueden proporcionar el aporte de sangre que la garrapata necesita para su alimentación por sí mismos. Los focos de inflamación y de necrosis progresan conforme la alimentación avanza, desde la ruta original de inserción del hipostoma hasta las zonas de músculos y vasos sanguíneos que rodean a la misma. (Estrada Pena, 2015)

Distribución

Rh. sanguineus es el vector primario de *R. rickettsii* en México, es la especie de garrapata de mayor distribución en el mundo, se le encuentra en América desde Canadá hasta Argentina. En México, se encuentra distribuida en todo el territorio nacional, en regiones desde el nivel del mar hasta los 1,500 metros de altitud. Siendo un complejo de especies de origen africano, su distribución cosmopolita es el resultado de las migraciones humanas de un continente a otro, realizadas en compañía de sus mascotas principalmente perros, que son el hospedero principal de esta garrapata. Se considera una especie intra-domiciliaria por su facilidad de adaptación, por lo que se comporta como altamente endofilica; en exteriores, se mantiene generalmente en refugios como grietas y/o enterradas en el suelo para su supervivencia. (Narro Robles, 2018)

Comportamiento de *Rhipicephalus sanguineus* en hospedador

Cuando se busca un huésped, la garrapata del perro marrón es un cazador puesto que inicia un comportamiento de búsqueda de anfitrión, aunque también puede adoptar la estrategia de emboscada. Los patrones de *Rh. sanguineus* han sido adquiridos a lo largo de su historia evolutiva. Tal vez, estos rasgos de esta garrapata hayan evolucionado a partir de su relación con el perro doméstico y su entorno compartido, siendo parte de la estrategia de garrapata para la supervivencia y la perpetuación. Una vez que encuentra y sube un hospedador, normalmente caminan durante varias horas sobre la superficie del mismo antes de encontrar el lugar que les pueda parecer adecuado para completar la alimentación. Tras encontrarlo, la garrapata adopta un ángulo de unos 40° sobre la superficie, contrae sus músculos dorsoventrales y hace que los quelíceros salgan de su cuerpo y ejerzan presión sobre la piel del hospedador. Los dedos de los quelíceros se mueven, realizan pequeños cortes en la piel y avanzan para terminar de perforar la piel hasta el estrato córneo. Este proceso puede llevar entre 3 y 5 minutos y, posteriormente, la garrapata se traslada normalmente a un lugar próximo y repite todo el proceso. Cuando los quelíceros se han asentado en la lesión, los movimientos de la garrapata aumentan y poco a poco el hipostoma se introduce en lo que será la zona de alimentación. (Dantas Torres, 2010; Estrada Pena, 2015)

Alimentación

Su alimentación está influenciada por factores bióticos como la accesibilidad de los hospederos presentes, así como factores abióticos como los ciclos de luz y la temperatura ambiental. Los estadios larvarios presentan un periodo de alimentación que puede durar de dos días a varias semanas; sin embargo, pueden sobrevivir hasta ocho meses sin alimentarse. Al transformarse en ninfas, el periodo de alimentación en hospedero durará cerca de 2 a 3 días, aunque pueden sobrevivir hasta 18 meses sin alimentarse. En estadios adultos, las hembras pueden permanecer periodos muy prolongados sobre el mismo hospedero; en

cambio, los machos incrementan o estimulan la alimentación de estadios finales. (Narro Robles, 2018)

Durante los dos o tres primeros días de alimentación, no ingieren sangre, sino una mezcla lisada de células y tejidos. Debido a que la alimentación de los ixódidos puede durar varios días, e incluso semanas, es necesaria la participación de sustancias que evadan la respuesta inmune del hospedador. Durante este tiempo de infusión y alimentación tan largo, es indudable que la respuesta inmune aparecerá tarde o temprano, dependiendo también del número de garrapatas fijadas al mismo hospedador. Sin embargo, la sustancia activa en la mezcla salival asegura una completa evasión de la respuesta inmune. La fijación de los argásidos al hospedador es similar a lo comentado para los ixódidos, pero dura tan solo unos pocos minutos. En este caso se forma una pequeña hemorragia en el punto de introducción del hipostoma, producida por la rotura de unos pocos y pequeños capilares. Normalmente, los argásidos no se alimentan a partir de grandes vasos sanguíneos, ya que alternan los periodos de alimentación rápida con momentos en los que prácticamente está interrumpida, lo que facilita la salivación dentro de la cavidad alimentaria. (Estrada Pena 2015)

Al alimentarse, la hembra adulta engrosa hasta alcanzar a medir de 6.3 mm de ancho y 12.7 mm, de longitud y adquiere un color gris a verde olivo, mientras que el macho conserva su color marrón rojizo uniforme y mide sólo 3.1 mm de longitud. Los sitios principales de anclaje en el perro son en el área de la cabeza, particularmente en las orejas, los espacios interdigitales y las regiones axilar e inguinal; no obstante, cuando el grado de infestación es severo pueden anclarse en cualquier parte del cuerpo. (Narro Robles, 2018)

Enfermedades transmitidas por *Rhipicephalus sanguineus*

Cuadro.2 Agentes patógenos transmitidos por *Rh. sanguineus*

<i>Anaplasma marginale</i>	Anaplasmosis bovina	Parker and Wilson (1979)
<i>Anaplasma platys</i>	Trombocitopenia cíclica canina	Simpson <i>et al.</i> (1991)
<i>Babesia caballii</i>	Babesiosis equina	Enigk (1943)
<i>Babesia canis</i>	Babesiosis canina	Regendanz and Muniz (1936)
<i>Babesia gibsoni</i>	Babesiosis canina	Sen <i>et al.</i> (1933)
<i>Cercopithifilaria grassi</i>	Filaria Canina	Bain <i>et al.</i> (1982)
<i>Coxiella burnetti</i>	Fiebre Q	Mantovani <i>et al.</i> (1953)
<i>Dipetalonema dracunculoides</i>	Filaria canina	Bain <i>et al.</i> (1972) Olmeda-García <i>et al.</i> (1993)
<i>Hepatozoon canis</i>	Hepatozonosis Canina	Nordgren <i>et al.</i> (1984)
<i>Leishmania infantum</i> / <i>Leishmania chagasi</i>	Leishmaniosis canina visceral	Blanc <i>et al.</i> (1930)
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	Hemobartonelosis canina	Seneviatna <i>et al.</i> (1973)
<i>Ehrlichia canis</i>	Ehrlichiosis monocítica canina	Groves <i>et al.</i> (1975)
<i>Rickettsia conorii</i>	Fiebre manchada mediterránea	Brumpt (1932)
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Fiebre manchada de las Montañas Rocosas	Parker <i>et al.</i> (1933)
<i>Theileria equi</i>	Theilerosis	Enigk (1943)

Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*

Factores de riesgo

Algunos de los factores de riesgo conocidos son:

Temperatura alrededor de 30 °C es condición endémica para la infestación de garrapatas. No realizar desparasitación externa a sus perros, asimismo, se puede observar la presencia de muchos perros callejeros, lo cual facilita que la garrapata *R. sanguineus* se reproduzca con mayor facilidad. Por lo tanto, la presencia de vectores competentes de garrapatas conocidas, así como hospederos reservorios, determina en gran medida los factores de riesgo para transmisión de enfermedades, principalmente por *Rh. sanguineus*. (Huerto-Medina, 2015; Cortazares, 2015; ESCCAP, 2006)

Diversidad genética

Originalmente descrito "*Ixodes sanguineus*", se reclasificó como perteneciente al género *Rhipicephalus* por Koch. Más adelante, varios autores se esforzaron por estudiar este grupo de especies, cuya taxonomía sigue siendo objeto de debate. De acuerdo a Cámicas y colegas, la llamada "grupo *Rh. sanguineus*" incluye 17 especies: *Rhipicephalus aurantiacus* Neumann, 1907; *Rhipicephalus bergeoni* Morel y Balis, 1976, *Rhipicephalus boueti* Morel, 1957; *Rhipicephalus camicasi* Morel, Mouchet y Rodhain, 1976; *Rhipicephalus guilhoni* Morel y Vassiliades, 1963; *Rhipicephalus leporis* Pomerantzev, 1946; *Rhipicephalus moucheti* Morel, 1965; *Rhipicephalus pumilio* Schulze, 1935; *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1936; *Rhipicephalus ramachandrai* Dhanda, 1966; *Rhipicephalus rossicus* Yakimov y Kol-Yakimova, 1911; *R. sanguineus sensu stricto* (s.s.); *Rhipicephalus schulzei* Olenov, 1929; *Rhipicephalus sulcatus* Neumann, 1908; *Rhipicephalus tetracornus* Kitaoka y Suzuki, 1983; *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev, 1940; y *Rhipicephalus ziemanni* Neumann, 1904.

Sin embargo, no hay consenso y las similitudes morfológicas entre las garrapatas que pertenecen al grupo *Rh. sanguineus* hacen que su identificación sea una tarea difícil, incluso para taxónomos experimentados.

Durante esta última década, investigaciones moleculares han intentado evaluar la variabilidad genética de *Rh. sanguineus sensu lato* (sl)

y diferenciar taxones estrechamente relacionados dentro del grupo de *Rh. sanguineus* de diferentes zonas geográficas. Los estudios han afirmado la existencia de dos linajes divergentes dentro de *Rh. sanguineus* s.l. El llamado "linaje del sur" (especies templadas) incluía garrapatas de las localidades de Argentina, Uruguay, Chile e Italia, mientras que el linaje del norte (especies tropicales) incluía garrapatas de Brasil, Paraguay, Colombia y el sur. África, Mozambique y de dos localidades del norte de Argentina. (Dantas Torres, 2013)

Técnica de genotipificación

Es el procedimiento mediante el cual se obtiene el genotipo (huella de ADN o perfil genético) de un organismo. Estas técnicas utilizan el ADN de un organismo que se encuentra en todas las células nucleadas del cuerpo y normalmente se mantiene conservado durante toda la vida del animal. Su análisis permite conocer el material genético que un individuo ha heredado de sus padres biológicos. Existen varias técnicas dependiendo del tipo de tejido como las que se muestran a continuación.

1. Se realiza la extracción de ADN como se de cualquier célula con núcleo (por ejemplo, los glóbulos rojos no tienen núcleo y por lo tanto no tienen ADN) mediante un proceso químico. Este ADN pasa a un procedimiento que se llama Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), el cual realiza millones de copias de los alelos (para que puedan ser detectados posteriormente) de cada uno de los microsatélites que se están analizando en el animal.

2. Visualización de los alelos. En este punto Las muestras son llevadas a equipos denominados analizadores genéticos. Estos permiten visualizar los alelos que fueron detectados y amplificados en la PCR anterior.

3. En este último paso el perito (profesional capacitado en técnicas de biología molecular que pasa a ser testigo de la prueba y realiza el

seguimiento de la muestra dentro del laboratorio) mediante software especializado y parámetros internacionales asigna el nombre de cada uno de los alelos a la muestra proveniente de un animal determinado.

Resumen de los pasos realizados en laboratorio para obtener el genotipo de un ejemplar.

Genes diana

Se han empleado muchos marcadores genéticos para dilucidar la filogenia y la evolución de las garrapatas *Rhipicephalus*. En particular, las regiones diana del ADN ribosomal 16S y 12S (ADNr) mitocondrial se han utilizado con frecuencia y, en menor medida, la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (cox 1) y el espaciador transcrito interno 2 (ITS-2) se ha utilizado. No obstante, todavía hay mucha discusión sobre el estado biosistemático de las especies de garrapatas que pertenecen a este género. (Dantas Torres, 2013)

12s rRNA: El ARNr mitocondrial 12S ha demostrado ser un marcador molecular útil para una mejor conservación y manejo de los animales en peligro de extinción. La reacción en cadena de la polimerasa de la longitud del fragmento de polimorfismo (PCR-RFLP) del gen mitocondrial 12s rRNA ha demostrado ser una herramienta confiable y eficiente para la identificación de diferentes especies.

Las filogenias de la garrapata del ARN ribosomal (rRNA) 12S ya han demostrado que resuelven los eventos de especiación relativamente recientes mejor que los anteriores. Los RNA ribosómicos (rRNA 12S y rRNA 16S) codificados por el genoma mitocondrial son necesarios para la traducción de RNA mensajeros en proteínas mitocondriales. El gen del rRNA 12S ocupa 1/16 de todo el genoma mitocondrial, respectivamente. Similar a otros genes mitocondriales, en el ADNmt animal, tienen numerosas sustituciones de nucleótidos al igual que el 16s rRNA. (Siddappa et al 2013; Li Yang, 2014).

Se estudió variabilidad genética molecular del gen 12S rRNA, sobre la base de la secuencia primaria parcial y las estructuras secundarias entre garrapatas *Dermacentor reticulatus* (Fabricius 1794), en la Zona de Exclusión de la Central Nuclear de Chernobyl (ChNPP). En total, se examinaron 20, 20 y 25 muestras conservadas en etanol, previamente recolectadas en 3 sitios con 0.76, 1.91 y 4.5 milisievert (mSv) / hr de radiación ionizante de fondo. El análisis de secuencia primaria generó 4 haplotipos definidos por 3 sitios polimórficos. (Movila, 2012)

16s rRNA: El gen 16S es uno de los más utilizados en los estudios de taxonomía y variabilidad genética de este grupo de artrópodos, la comparación de las secuencias de los ARNr 16S permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos. Se utiliza frecuentemente este gen pues sus secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos. Para utilizar este gen pares de secuencias de rRNA 16S de organismos distintos se comparan, las diferencias se valoran y se toma como medida de la distancia evolutiva entre esos organismos. El gen 16s rRNA ocupa 1/10 del genoma mitocondrial. (Patermina., et al 2016; Krakowetz, 2014; Li Yang, 2014)

Parte del gen 16 rRNA de *I. scapularis* fue amplificado por PCR a partir de 582 garrapatas del sur de Canadá. Las secuencias analizadas revelaron 52 aplotipos variados en una longitud de 404 – 407 pb. (Krakowetz, 2014)

Ciclooxigenasa – 1 (COX1): Algunos autores han empleado el gen mitocondrial COX1 de la iniciativa de código de barras de ADN, con la cual se aspira a identificar y reconocer la diversidad de especies a nivel global con base en la variabilidad genética que exhiben regiones del gen COX1 en diversos grupos de artrópodos. La COX-1 desempeña un papel importante en la síntesis de los prostanoïdes para propósitos fisiológicos y regula funciones como la protección gastrointestinal, la homeostasis vascular, la

hemodinámica renal y la función plaquetaria. El gen de la COX-1 mide aproximadamente 22 kb, tiene 11 exones y procede de una duplicación de un gen común muy ancestro. Se encuentra en el cromosoma 9 y su región promotora no tiene caja TATA pero sí que contiene muchos lugares de transcripción, lo que sugiere que su gen es del tipo de «genes de mantenimiento». En la célula, generalmente la COX-1 se encuentra en el citoplasma o cerca del retículo endoplásmico. Aunque la COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos, sus valores cambian durante el desarrollo. La estructura proteica de ambas enzimas es similar, con una homología superior al 90%. Su estructura presenta dos dominios, el que se une a las membranas está constituido por cuatro hélices que forman un canal que permite la entrada del ácido araquidónico de la membrana al lugar con actividad enzimática. En esta región hay dos lugares activos, uno que cataliza la ciclooxygenación y otro la peroxidación. (Patermina., et al 2016; Meijide y Gomez, 2000)

Genoma mitocondrial

El genoma del metazoo mt, con una longitud de 14 a 18 kb aproximadamente, es típicamente circular y generalmente contiene 36-37 genes, incluidos 12-13 genes codificantes de proteínas, 2 genes de ARN ribosomal (ARNr), 22 genes de ARN de transferencia (ARNt) y 2 regiones de control no codificantes (NCR) y algunos espaciadores intergénicos. Las secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) son marcadores moleculares útiles para la identificación y diferenciación de organismos, en particular para investigaciones de genética de poblaciones y sistemáticas entre especies animales. (Hua Liu., et al 2013)

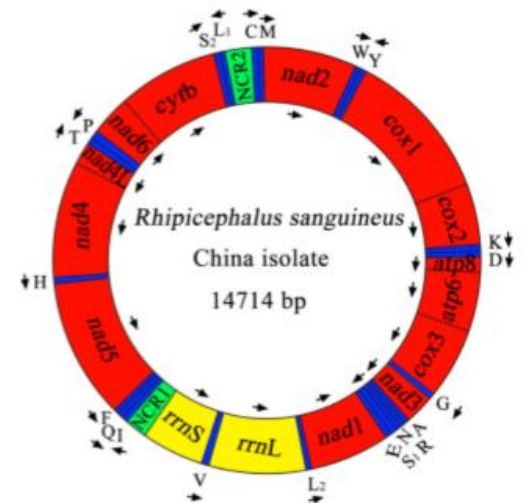


Figura 2. Genoma mitocondrial de *Rh. Sanguineus*

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria dentro del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, de la Universidad Autónoma de Baja California, el cual está localizado en el Km. 3.5 Carretera San Felipe. Fracc. Campestre Mexicali, Baja California. México.

Origen de las muestras

Las garrapatas que se utilizaron para este estudio se recolectaron en tubos falcón de 15ml de perros con dueño y de trampas puestas en los hogares de los mismos, partiendo de varias campañas contra la rickettsiosis que han sido realizadas por parte del encargado del laboratorio de salud pública, en el año 2018 en Mexicali Baja California.

La especie de cada espécimen recolectado fue determinado en base a su morfología descrita en documentos previos a este enfocándonos principalmente por lo descrito en Dantas-Torres 2017. Las garrapatas examinadas serán identificadas como *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

Duración del estudio

El periodo de tiempo del estudio abarcará 12 meses, comenzando en verano del año en curso (2019) y terminando en verano del 2020.

Numero de muestras

Se utilizaron 10 garrapatas adultas completas, *Rh. sanguineus* sensu lato las cuales fueron sometidos a un estudio para genotipificación.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando un kit comercial DNeasy Blood & Tissue 2006 QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los kits de tejido y sangre DNeasy están diseñados para la

purificación rápida del ADN total, ya sea genómico, mitocondrial o de algún patógeno de una variedad de fuentes de muestra que incluyen células y tejidos de animales frescos o congelados, sangre o bacterias.

Se generaron y analizaron secuencias genéticas parciales de los genes: ARNr 16S (300 pb~), que es uno de los más utilizados en los estudios de taxonomía y variabilidad genética de este grupo de artrópodos, el 12S ARNr mitocondrial (437 pb~), el cual ha demostrado ser una herramienta confiable y eficiente para la identificación de diferentes especies, COX1 (710 pb~), por su idoneidad como marcador de código de ADN para identificación entre especies. Los iniciadores (oligonucleótidos) utilizados están diseñados para amplificar los genes 16S rRNA, 12S rRNA, COX1. Se utilizarán las siguientes secuencias para la familia *Rh.sanguineus* (s.l.): (Jizhou, et al., 2014, Janda, 2007, Guo-Hua, 2013)

Iniciadores

- 12S rRNA: Adelante (5"-AAA CTA GGA TTA GAT ACC CTA TTA TTT TAG-3"); Reversa, (5"-CTA TGT AAC GAC TTA TCT TAA TAA AGA GTG3") (Black y Piesman 1994, Siddapa, 2013, Cateano R. et al., 2017).

- 16S rRNA: Adelante (5"-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG3"); Reversa, (5"-TTA CGC TGT TAT CCC TAG AG-3") (Szabo et al. 2005, Patermina, 2016).

- COX1: Adelante (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'); Reversa, (5"-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3"); (Hornok, et al. 2017, Meijide, 2000).

Cada reacción consistió de 4 µl de ADN genómico de garrapata y 46 µl de mezcla de PCR que contenga MgCl₂ 2,5 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3) y KCl 50 mM, 250 µM de cada dNTP, 50 pmol de cada cebador y 1,25 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Aproximadamente 100 ng de ADN genómico se agregarán a cada PCR.

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

- Desnaturalización inicial: fue de 2 minutos a 94–95 ° C. (Hot start) - Desnaturalizaciones siguientes: del paso inicial de 2 minutos deben estar entre 30 segundos y 1 minuto. - Alineación: durara 1 minuto. - Extensión: La reacción de extensión se realizará a la temperatura óptima para el ADN polimerasa Taq, que es de 72–74 ° C. z Se amplificara aproximadamente 1 minuto por cada 1kb de ADN.

Se generarán 30 ciclos con los pasos previamente mencionados que según la literatura resultan en una amplificación óptima de los productos deseados. (GoTaq® Hot Start Green Master Mix, 2008)

Visualización de productos de PCR

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% de la marca PROMEGA, en solución amortiguadora TAE 1X conteniendo GR safe el cual se adherirá y marcará el ADN recolectado, sustituyendo al bromuro de etidio. Los geles se elaboraron siguiendo el protocolo de rutina proporcionada por la marca anterior mencionada. (Dantas, 2017)

Electroforesis

Siendo una técnica clasificada para separar fragmentos de ADN según su tamaño. Las muestras de ADN se cargaron en pozos (ranuras) en un extremo de un gel de agarosa junto con un marcador de peso para medición de resultados y se aplicó una corriente eléctrica para arrastrarlas a través del gel.

Los fragmentos tienen carga negativa, por lo que se mueven hacia el electrodo positivo. Los fragmentos pequeños atraviesan el gel más rápido que los grandes. Cuando un gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN, los fragmentos de ADN pueden ser como bandas, los grupos de fragmentos de ADN del mismo tamaño. La duración de la electroforesis fue de 20 minutos (Chang et al., 2000).

Selección de muestras amplificadas

Se seleccionaron las muestras de garrapata con las bandas más intensas y con el peso correspondiente a sus iniciadores para llevar a cabo los siguientes pasos, los cuales consistieron en la purificación y secuenciación de los resultados obtenidos.

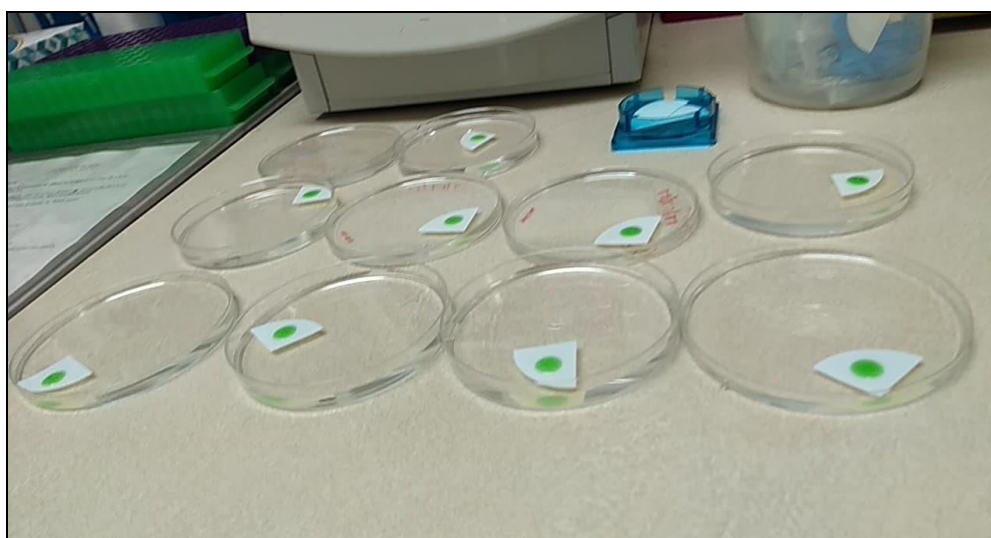
Cuadro 3. Muestras de garrapata seleccionadas para secuenciación

Muestra	Genes seleccionados
Garrapata #7	12S
Garrapata #8	16S, COX1
Garrapata #9	12S,16S, COX1
Garrapata #10	12S,16S, COX1

Purificación de secuencias amplificadas (Método de purificación por membrana de nitrocelulosa)

Al comprobar la presencia de ADN en los tubos, por medio de la electroforesis, las muestras fueron sometidas a un proceso de purificación por medio de membranas de nitrocelulosa de 0.025nm.

Figura 3. Muestras de ADN en proceso de purificación



Secuenciación de las muestras

Al no contar con el equipo adecuado en las instalaciones, los fragmentos amplificados en PCR fueron enviados a secuenciar a los laboratorios Eurofins Genomics en tubos eppendorff de 5 ml. Contando con un 97.3% de éxito en todas las aplicaciones, tenemos la certeza de que fue una opción confiable.

Al obtener los resultados de secuenciación, se tuvo que descartar la muestra G8_COX1. Esto porque lamentablemente no se obtuvo secuenciación alguna al observarla en BioEdit.

BioEdit

BioEdit es uno de los programas más comunes utilizados en estudios de biología molecular. Contiene muchas características para modos de fácil alineación de secuencias, vista de ventana dividida, color definido por el usuario, sombreado basado en información e integración automática con otros programas como ClustalW y Blast.

Se convirtió en uno de los programas más utilizados en biología molecular con sus herramientas multipropósito. Su capacidad rápida de producir resultados lo convierten en uno de los programas más populares para el biólogo molecular en la actualidad.

Alineación de secuencias por BioEdit

Cada secuencia seleccionada fue introducida al sistema de alineación de BioEdit con su respectivo complemento de modo que se obtuvo un fragmento de ADN. Con el cual se pudieron comparar y de esta manera buscar y encontrar diferencias entre los nucleótidos

Lamentablemente las secuencias complementarias de G8_16S, G9_16S y G10_16S presentaban una compatibilidad muy pobre por lo cual no fue posible encontrar diferencias suficientemente relevantes para poder tomarlas como reales

BLAST

Es una herramienta de análisis de secuencia de nucleótidos.

Mediante esta herramienta se compararon las secuencias de nucleótidos de las muestras con las de NCBI para así encontrar similitudes entre ellas, así podemos inferir si se encuentra alguna secuencia de genes nueva. Predecir nuevos miembros de familias de genes e investigar relaciones evolutivas.

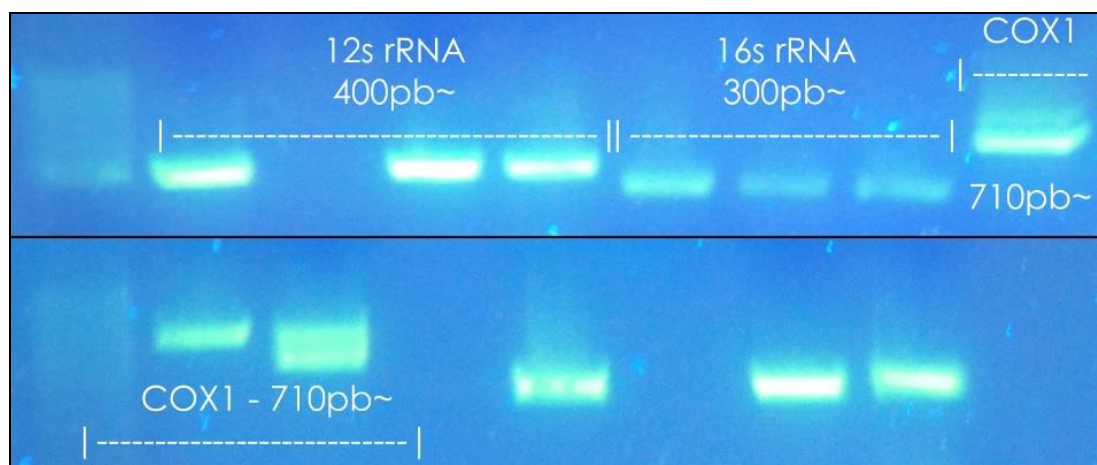
Secuenciando genomas completos, la similitud se secuencia puede usarse para para predecir la ubicación y la función de las regiones de codificación de proteínas y de regulación de la transcripción en el ADN genómico.

BLAST, basándose en atajos, realiza alineaciones locales, la mayoría de las proteínas son de naturaleza modular, tienen dominio funcional que a menudo se repiten en diferentes especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la siguiente figura se muestran los resultados de PCR visualizados gracias a electroforesis en gel de agarosa, se aprecian las bandas correspondientes al peso en pares de bases que se describe en Jizhou, et al., 2014, Janda, 2007, Guo-Hua, 2013.

Figura 4. Resultados de PCR vistos a través de electroforesis



Al contar con los resultados provenientes de la electroforesis se pudieron tomar las bandas con los pares de bases mas intensos y de esta manera someterlas a purificación y mandar a secuenciar con seguridad de que contábamos con muestras de ADN confiable para llevar a cabo el siguiente paso.

Lamentablemente no todas las muestras contaban con el total de los pares de bases que mencionaban autores anteriores al volver del laboratorio Eurofin Genomics. Otro inconveniente fueron las muestras 16S las cuales al alinearlas con su par complementario en BioEdit estas tenían un porcentaje de similitud muy bajo y contaban con varios desplazamientos entre medio de las secuencias. Como no resultaron secuencias confiables se optó por solo colocar su porcentaje de compatibilidad en el cuadro a continuación.

El siguiente cuadro 4 nos muestra los resultados de las secuencias finales alineadas gracias al programa BioEdit. Se pudo apreciar la longitud total que se pudo obtener en cada una de ellas junto a las diferencias encontradas.

Cuadro 4. Diferencias encontradas mediante alineación por BioEdit

Muestra	Región analizada			No. Diferencias	% de compatibilidad	Diferencia de secuencias
	Principio	Final	Longitud			
G7-12S	21	320	341	2	0.9906	279, T->A 315, T->A
G8-16S					0.5737	
G9-12S	14	291	305	2	0.9965	296, C->T 305, A->T
G9-16S					0.3007	
G9-COX	85	316	401	7	0.9353	119, A->C 237, T->A 263, C->A 303, A->G 306, T->G 309, G->C 314, T->G
G10-12S	49	260	309	2	0.9807	42, T->C 49, T->A
G10-16S					0.3109	
G10-COX	30	437	467	1	0.9908	433, A->T

El siguiente cuadro nos muestra la compatibilidad genética que se obtuvo al subirlas al banco de genes de NCBI con los datos ya registrados en dicho portal. La mayoría muestran un porcentaje de identidad mayor al 90%. Excepto por la muestra G10_COX1, la cual no nos arrojó resultados.

Cuadro 5. Comparación de resultados con banco de genes NCBI

Muestra	Query Cover	E - Value	Percent Identity	Accession Length
G7_12SF	100%	2e-161	99.38%	341
G7_12SR	100%	3e-163	99.69%	341
G9_12SF	100%	4e-147	99.66%	341
G9_12SR	100%	9e-149	100%	341
G9_COX1F	100%	2e-94	94.40%	642
G9_COX1R	100%	1e-112	99.14%	525
G10_12SF	100%	2e-124	98.46%	341
G10_12SR	100%	5e-126	98.85%	341
G10_COX1F	Not found			
G10_COX1R	Not found			

CONCLUSIONES

1. Existen mas de 900 especies de garrapatas en el mundo. De las cuales *Rh. Sanguineus* es la que se encuentra distribuida en mayor medida por el mundo.
2. En cuanto a las diferencias encontradas gracias a BioEdit y al banco de genes de NCBI. Existen varios motivos por los cuales pudo haber sucedido tales cambios, desde la calidad de las muestras, errores en el laboratorio al cual fue mandado incluso mutaciones.
3. Al no contar con la suficiente experiencia en el campo, seria recomendable recurrir a otros expertos y a otra alternativa distinta para secuenciar como lo es el caso del MinION.
4. Se obtuvo un porcentaje de similitud mayor del 90% en el banco de genes de NCBI en relaciona la garrapata *Rh. sanguineus*. Lamentablemente no queda claro si los resultados fueron reales o por causas ajenas a un cambio a nivel genético.
5. Serán necesarios más estudios relacionados a *Rh. sanguineus* en las regiones tanto de Mexicali y Sonora, ya que solo con este trabajo no será suficiente para determinar un cambio real en el genoma de la garrapata.

LITERATURA CITADA

- Agustín Estrada Pena, 2015. Orden Ixodida: Las garrapatas. Revista IDE@ - SEA, nº 13 (30-06-2015): 1–15.
- Cateano R. et al., 2017. Ultrastructural Morphology and Molecular Analyses of Tropical and Temperate “Species” of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in Brazil. 1201–1212:11. doi: 10.1093/jme/tjx066
- Chandra Mohan Siddappa, 1MohiniSaini,1 AsitDas,1RameshDoreswamy,1,2 AnilK.Sharma,1 and PraveenK.Gupta, 2013. Sequence Characterization of Mitochondrial 12S rRNA Gene in Mouse Deer (*Moschiola indica*) for PCR-RFLP Based Species Identification. Molecular Biology International Volumen 2013, Articulo ID 783925, 6 páginas.
- Dantas T. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. BioMed Central Ltd. *Parasites & Vectors*. **3**:26:11 doi.org/10.1186/1756-3305-3-26.
- Dantas T. 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the new and old worlds. *Parasites & Vectors* **6**: 213.
- Dantas, T. et al., 2017. Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. *Parasit Vectors*. 2017; 10: 133. doi. 10.1186/s13071-017-2072-1
- Dantas, T., L. Figueredo and S. Brandão-Filho. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39(1):64-67
- Dr. Armando Ulloa García, 2016. Especificidad de hospedero de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en cuatro gradientes altitudinales en el municipio de Tapachula, Chiapas. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MEXICO CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA, 59pag.
- Erika Nava-Reyna, Antonio Castillo-Martínez, Vicente Homero González-Álvarez, Ramón Méndez-López, Sarai Monserrat Cueto-Medina y Aldo I. Ortega-Morales., 2016. INCIDENCIA DE LA GARRAPATA CAFÉ DEL PERRO DE ZONAS RURALES DE LA COMARCA LAGUNERA DE COAHUILA, MÉXICO. Research Gate, Pag: 6.

- Ernieenor Faraliana Che Lah^{1,2}, Salmah Yaakop², Mariana Ahamad¹, Shukor Md Nor², 2015. Molecular identification of blood meal sources of ticks (Acari, Ixodidae) using cytochrome b gene as a genetic marker. *Zookeys*, 2015 Jan 28;(478):27-43. doi: 10.3897/zookeys.478.8037. eCollection 2015.
- ESCCAP, 2011. Control de enfermedades transmitidas por vectores en perros y Gatos. Pag: 40
- Felipe Dantas Torres, 2007. The Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) From taxonomy to control. *Vet Parasitol*. 2008 Apr 15;152(3-4):173-85.
- Felipe Dantas Torres, 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. BioMed Central Ltd. *Parasites & Vectors* 2010 3:26. Pag: 11.
- Felipe Dantas Torres, 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the new and old worlds. *Parasites & Vectors* 6: 213
- Filipe Dantas-Torres¹, Luciana Aguiar Figueredo² and Sinval Pinto Brandão-Filho¹, 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.39 no.1 Uberaba Jan./Feb. 2006.
- Filipe Dantas-Torres^{1,2*}, Carla Maia^{3,4}, Maria Stefania Latrofa², Giada Annoscia², Luís Cardoso⁵ and Domenico Otranto²., 2017. Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. *Parasit Vectors*. 2017; 10: 133.
- G. Zemtsova, et al., 2016. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. *Exp Appl Acarol*. 69(2):191-203. doi:10.1007/s10493-016-0035-4.
- Galina E. Zemtsova, Dmitry A. Apanaskevich², Will K. Reeves³, Micah Hahn^{4,5}, Alyssa Snellgrove¹, and Michael L. Levin., 2016. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. *Exp Appl Acarol*. 2016 Jun;69(2):191-203. Epub 2016 Mar 22.
- García Mejjide, Juan A; Gómez-Reino Carnota, Juan J, 2000. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista española de Reumatología*, Vol. 27. Núm. 1.Enero 2000 páginas 1-40

- Guo-Hua Liu^{1,2}, Fen Chen^{1,3}, Yi-Zhou Chen^{1,4}, Hui-Qun Song¹, Rui-Qing Lin^{1,4}, Dong-Hui Zhou¹, Xing-Quan Zhu^{1,2}, 2013, Complete Mitochondrial Genome Sequence Data Provides Genetic Evidence That the Brown Dog Tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Represents a Species Complex. *Int J Biol Sci.* 2013 Apr 22;9(4):361-9. doi: 10.7150/ijbs.6081. Print 2013.
- Gutiérrez, Clara Nancy; Pérez-Ybarra, Luis; Fátima Agrela, Irma., 2016 EHRlichiosis Canina. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente* 2016, 28 (4)
- Hornok, S. et al. 2017. East and west separation of *Rhipicephalus sanguineus* mitochondrial lineages in the Mediterranean Basin. *Parasites & Vector Sci.* 10:39. DOI 10.1186/s13071-017-1985-z
- J. Michael Janda* and Sharon L. Abbott, 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin Microbiol, MiSep*;45(9):2761-4. Epub 2007 Jul 11.
- Janda J. and L. Abbott, 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin Microbiol, MiSep*;45(9):2761-4. Epub. doi: 10.7150/ijbs.6081.
- Jizhou Lv, et al., 2014. Assessment of four DNA fragments (COI,16S rDNA, ITS2, 12s rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasit Vectors*, Mar 3;7:93. doi: 10.1186/1756-3305-7-93.
- Jizhou Lv, Shaoqiang Wu, Yongning Zhang, Yan Chen, Chunyan Feng, Xiangfen Yuan, Guangle Jia, Junhua Deng, Caixia Wang, Quin Wang, Lin Mei and Xiangmei Lin. 2014, Assessment of four DNA fragments (COI,16S rDNA, ITS2, 12s rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasit Vectors*, 2014 Mar 3;7:93. doi: 10.1186/1756-3305-7-93.
- Jorge Field-Cortazares^{1*}, Angélica María Escárcega-Ávila², Gilberto López-Valencia², Alberto Barreras-Serrano² y Luis Tinoco-Gracia²., 2015. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) en humanos de Ensenada, Baja California, México. *Gac Med Mex* 2015; 151 (1) Pag. 42 – 46.
- José Narro Robles, 2018. Vigilancia Entomológica de la Garrapata Café del Perro. *Secretaría de Salud.* Pag. 76
- L. Guo-Hua, et al., 2013, Complete Mitochondrial Genome Sequence Data Provides Genetic Evidence That the Brown Dog Tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Represents a Species Complex. *Int J Biol Sci.* 2013 Apr 22;9(4):361-9. doi: 10.7150/ijbs.6081.

- LiYang^{1,2},ZongqingTan¹,DarenWang³,LingXue^{1,4},Min-xinGuan⁵,TaoshengHuang^{1,6} &RonghuaLi^{1,6}. 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Sci Rep*. 2014 Feb 13;4:4089. doi: 10.1038/srep04089.
- Luis Enrique Paternina^{1,2}, Daniel Verbel-Vergara¹, Eduar Elías Bejarano¹, 2016, Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (Acari: Ixodidae). *Revista del INS*. Vol. 36, Núm. 2 (2016)
- MauroDegliEsposti^aSimonDeVries^bMassimoCrimi^aAnnaGhelli^aTomasoPaternello^cAxelMeyer^d, 1993, Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. En: Biochim Biophys Acta. 1993 Jul 26; volume 1143, páginas:243-271.*
- McLain, D. 1995. Evolution of the rDNA spacer, ITS 2, in the ticks *Ixodes scapularis* and *I. pacificus* (Acari: Ixodidae). *The Genetical Society of Great Britain*. 03—319:17.
- Meijide, G, J. A; G. Carnota, J. J, 2000. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y Ciclooxigenasa-2. *Revista española de Reumatología*. Vol, Num. 27. 1:40.
- Paternina, L., D. Vergara, E. Bejarano¹. 2016. Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (Acari: Ixodidae). *Revista del INS*. doi org/10.7705/biomedica. v36i2.3116.
- Paternina, L., D. Vergara, y E. Bejarano. 2016. Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (Acari: Ixodidae). *Biomédica*. 2016;36: 295-302.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3116.
- Romina Álvarez, 2017. REVISION SOBRE LA BIOLOGIA DE *Rhipicephalus sanguineus* (ARTHROPODA, CHELICERATA) (LATREILLE, 1806). *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research*. Vol 5, No 1 (2017). Pag: 6.
- Sandra Ríos T, 1 M.Sc, Leonardo Ríos O, 1,* Ph.D.,2011, Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Revista MVZ Córdoba Volumen 16(2)* Mayo-Agosto 2011.
- Secretaría ESCCAP,2016. Ectoparásitos Control de insectos y garrapatas que parasitan a perros y gatos. Pag: 44.

Siddappa, C et al. 2013. Sequence Characterization of Mitochondrial 12S rRNA Gene in Mouse Deer (*Moschiola indica*) for PCR-RFLP Based Species Identification. *Molecular Biology International*, Article ID 783925, :6. doi.org/10.1155/2013/783925.

Yang L, et al., 2014. Species Identification Through Mitochondrial rRNA Genetic Analysis. Sci Rep. *Sci.* 13; 4:4089. doi: 10.1038/srep04089.