

01683
1
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE
PROTEINAS DE SUPERFICIE DE INTESTINO DE
GARRAPATA Boophilus microplus

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

P R E S E N T A D A P O R

CARLOS RICARDO CRUZ VAZQUEZ



DIRECTORES DE TESIS:

MVZ. MPVM. PHD. ZEFERINO GARCIA VAZQUEZ

MVZ. M EN C. MA. TERESA QUINTERO MARTINEZ

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la presente Tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Ricardo Cruz Vázquez', with a stylized flourish at the end.

Carlos Ricardo Cruz Vázquez

Para Alma Margarita,

Alma Lilia y

Adriana.

A mis padres.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Secretaría de Educación Pública, que a través de la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria y del Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica, financió mis estudios de Doctorado.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, financió parcialmente el presente trabajo de investigación.

Al Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, quien dentro del Proyecto Métodos de control integrado de la garrapata Boophilus spp del ganado bovino, financió parcialmente y facilitó sus instalaciones para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mis Directores de Tesis, Dr. Zeferino García Vázquez y M en C. Ma. Teresa Quintero Martínez, por su apoyo académico y humano durante el desarrollo de mis estudios.

A los miembros del Comité Tutorial que supervisó mis estudios: Dr. Carlos A. Vega y Murguía, Dr. Héctor Quiroz Romero, Dr. Fernando Parrodi López, MVZ.E.E.A. Jorge Lecumberrí López y M en C. Rodrigo Rosario Cruz, por sus valiosas contribuciones para el mejor desempeño de mis estudios.

A los miembros del Proyecto Métodos de control integrado de la garrapata Boophilus spp del ganado bovino, M en C. Estefan Miranda Miranda y M en C. Rubén Hernández Ortiz, por sus orientaciones académicas en la presente investigación.

Al Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, quien a través de los Departamentos de Bioterio y de Arbovirus, apoyó algunas etapas de este trabajo de investigación, particularmente las siguientes personas: MVZ. Fernando Romero Torres, MVZ. Alberto Arzave Suárez, TLC. Maribel Acosta Pérez y Dr. Celso Ramos García.

RESUMEN

CARLOS RICARDO CRUZ VAZQUEZ: CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE PROTEINAS DE SUPERFICIE DE INTESTINO DE GARRAPATA Boophilus microplus, BAJO LA DIRECCION DE ZEFERINO GARCIA VAZQUEZ Y MA. TERESA QUINTERO MARTINEZ.

El control inmunológico ha mostrado tener valor como elemento complementario en el manejo de las infestaciones por la garrapata Boophilus microplus en el ganado bovino; el intestino de este ectoparásito se ha considerado como fuente de antígenos inmunoprotectores en diversas investigaciones realizadas al respecto.

El objetivo del estudio fue la identificación y localización de proteínas de superficie de intestino de B. microplus, así como el caracterizarlas inmunoquímicamente. Se disectaron y procesaron intestinos de hembras semi-ingurgitadas y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras. El patrón electroforético obtenido mostró 18 bandas con pesos moleculares aparentes en un rango de 17 a 258 kDa; al realizar la detección por inmunoensayo enzimático de azúcares en glicoconjugados, al referido patrón, se determinó que el 61% de las proteínas se encontraban asociadas con carbohidratos.

Este patrón se sometió a una Inmunolectrotransferencia (IET) y se confrontó con un suero de conejo anti-intestino homólogo, identificándose cinco proteínas con pesos moleculares aparentes de 208, 189, 141, 99 y 89 kDa, que han sido consideradas como antigénicas; dichas proteínas fueron localizadas en la superficie del tejido intestinal por medio de Inmunofluorescencia Indirecta en cortes histológicos.

Además, se identificó la presencia de seis antígenos comunes entre extractos de larvas maduras y de intestinos de B. microplus, por IET, usando antisueros homólogos producidos en conejo, con un peso molecular aparente de 34, 237, 244, 259, 264 y 323 kDa.

Se reconoció la composición histológica del intestino de las hembras utilizadas en el estudio mediante cortes por inclusión en parafina teñidos con Hematoxilina y Eosina. Asimismo, se caracterizó parcialmente la cepa "Zapata" de B. microplus en cuanto a su comportamiento biológico en cultivo controlado.

Los resultados del presente estudio han permitido demostrar que existen diferentes proteínas con capacidad antigénica en el intestino de la garrapata B. microplus, algunas similares y otras diferentes a las previamente reportadas, y que es necesario experimentar la utilización de estos antígenos identificados inmunizando bovinos y valorar su capacidad protectora a las infestaciones experimentales con garrapatas B. microplus.

Palabras clave: Boophilus microplus, intestino, antígenos, inmunohistoquímica.

S U M M A R Y

CARLOS RICARDO CRUZ VAZQUEZ: IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF Boophilus microplus TICK GUT SURFACE PROTEINS. ADVISERS: ZEFERINO GARCIA VAZQUEZ AND MA. TERESA QUINTERO MARTINEZ.

The immunological control has demonstrated perspectives as a complementary alternative to prevent the tick Boophilus microplus infestation on cattle; the tick gut has been considered as a source of immunoprotector antigens in several studies.

The objective of this study was to identify and to characterize immunochemically and locate the surface proteins in the tick gut of B. microplus. Semi-engorged females ticks were dissected to obtain the guts, they were macerated and SDS-PAGE gel electrophoresis was performed under non-reduced conditions. The electrophoretic protein pattern showed 18 bands with molecular weights ranging of 17 to 258 kDa; the enzyme immunoassay of the glycoproteins were carried out on the protein pattern and determined that 61% of the total proteins were glycoproteins.

The tick gut proteins were immunoblotted (IB) and exposed to an homologous anti-gut rabbit serum and the antibodies present in the serum were able to identify five proteins with molecular weights of 208, 189, 141, 99 and 89 kDa which were considered antigenic. These proteins were identified on the surface of the tick gut by an "in situ" Indirect Immunofluorescence test.

In addition, six common antigens, with molecular weights of 34, 237, 244, 259, 264 and 323 kDa, were identified among larvae protein extracts and adult tick gut protein extracts by IB.

The histological study on the female tick guts was performed in parafin sections and stained with Hematoxylin and Eosin.

The toxicological and biological characterization of the "Zapata" tick strain was determined by the Larvae Package test and experimental infestation in cattle, respectively.

The results showed that different antigenic proteins exist in the tick gut of B. microplus, some of them were those similar to previously reported whereas some others were different, but is necessary to test these antigens in experimental trials in order to determine the immunological protection conferred by these antigens in the control of tick infestation in cattle.

Keys words: Boophilus microplus, gut, antigens, immunohistochemistry.

C O N T E N I D O

	Página
I. I N T R O D U C C I O N .	
1.1. Antecedentes.	1
1.2. Morfofisiología del aparato digestivo de <u>Boophilus microplus</u> .	6
1.3. La infestación con garrapatas y la respuesta inmune.	14
1.4. Experiencias y avances en la inmunización artificial contra garrapatas.	18
1.4.1. Inmunización en los géneros <u>Rhipicephalus</u> , <u>Amblyomma</u> , <u>Dermacentor</u> , <u>Ixodes</u> , e <u>Hyalomma</u> .	
1.4.2. Inmunización en <u>Boophilus microplus</u> .	
1.5. Justificación.	42
1.6. Hipótesis.	45
1.7. Objetivos y metas.	45
II. M A T E R I A L Y M E T O D O S .	
2.1. Cepa de garrapatas <u>Boophilus microplus</u> .	46
2.1.1. Reproducción del ciclo biológico en condiciones controladas.	
2.1.2. Monitoreo de <u>Babesia</u> spp en la cepa.	
2.1.3. Monitoreo toxicológico en la cepa.	
2.2. Electroforesis.	49
2.2.1. Características generales.	
2.2.2. Tinción de los geles.	
2.2.3. Pesos Moleculares.	
2.3. Determinación de proteína.	51
2.4. Titulación de sueros.	51
2.5. Fase A. Obtención del patrón electroforético de las proteínas de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	
2.5.1. Experimento 1.	52
2.5.1.(a). Obtención de extractos de intestino.	
2.5.1.(b). Electroforesis SDS-PAGE.	

	Página
2.5.1.(c). Controles.	
2.5.2.Experimento 2.	55
2.5.2.(a) Obtención de extractos de intestino.	
2.5.2.(b) Electroforesis SDS-PAGE.	
2.5.3.Experimento 3.	56
2.5.3.(a). Obtención de extractos de intestino.	
2.5.3.(b). Electroforesis SDS-PAGE.	
2.6. Fase B. Identificación de las proteínas asociadas con azúcares del intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	57
2.6.1.(a). Obtención de extractos de intestino.	5
2.6.1.(b). Detección por inmunoensayo enzimático de azúcares en glicoconjugados.	
2.7. Fase C. Detección de antígenos de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), por inmunoelectrotransferencia.	
2.7.1.Experimento 1.	59
2.7.1.(a). Obtención de extractos de intestino.	
2.7.1.(b). Producción de antisueros.	
2.7.1.(c). Inmunoelectrotransferencia.	
2.7.2.Experimento 2.	63
2.7.2.(a). Obtención de extractos de intestino.	
2.7.2.(b). Producción de antisueros.	
2.7.2.(c). Inmunoelectrotransferencia.	
2.8. Fase D. Detección de antígenos comunes entre larvas maduras e intestinos de garrapata <u>B. microplus</u> , por Inmunoelectrotransferencia.	66
2.8.1.(a). Obtención de macerado de larvas.	
2.8.1.(b). Producción de antisueros.	
2.8.1.(c). Inmunoelectrotransferencia.	
2.9. Fase E. Detección de los antígenos de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , mediante inmunohisto- química.	
2.9.1.Experimento 1.	67
2.9.1.(a). Histología del intestino de <u>B. microplus</u>	

	Página
2.9.2. Experimento 2.	69
2.9.2.(a) Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I).	
 III. R E S U L T A D O S.	
3.1. Cepa de garrapatas <u>Boophilus microplus</u> .	71
3.2. Fase A. Obtención del patrón electroforético de las proteínas de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	74
3.3. Fase B. Identificación de las proteínas asociadas con azúcares del intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	83
3.4. Fase C. Detección de antígenos de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitadas (4 a 6 mm de largo), por inmunoelectrotransferencia.	85
3.5. Fase D. Detección de antígenos comunes entre larvas maduras e intestinos de garrapata <u>B. microplus</u> , por inmunoelectrotransferencia.	90
3.6. Fase E. Detección de los antígenos de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , mediante inmunohistoquímica.	96
 IV. D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S.	
	106
 V. R E F E R E N C I A S.	
	123

LISTA DE FIGURAS

No.	Página
1. SDS-PAGE de un extracto de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	75
2. SDS-PAGE de un extracto de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), en gel al 8% en condiciones no reductoras y tinción de Nitrato de Plata.	76
3. SDS-PAGE de un extracto de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), en gel al 8% en condiciones no reductoras y tinción con Azul de Comassie.	77
4. Patrón electroforético de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), utilizando un macerado completo.	79
5. Patrón electroforético de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), utilizando un macerado sin contenido intestinal.	81
6. Detección por inmunoensayo enzimático en membrana, de azúcares en glicoconjugados en un extracto de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	84
7. Inmunoelectrotransferencia de un extracto intestinal de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	86
8. Inmunoelectrotransferencia de un extracto intestinal de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	89
9. Inmunoelectrotransferencia de un extracto de larvas maduras de <u>B. microplus</u> .	91
10. Inmunoelectrotransferencia de un extracto de intestinos de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).	94
11. Corte histológico de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo). Ciego intestinal 10X.	98
12. Corte histológico de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo). Ciego intestinal 40X.	99

	Página
13. Corte histológico de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo) 10X.	100
14. Corte histológico de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), 40X.	101
15 a 20. Inmunofluorescencia Indirecta en cortes histológicos por congelación de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo):	
ciego intestinal (15) e intestino (16), confrontados con el suero anti-intestino homólogo.	103
ciego intestinal (17) e intestino (18), confrontados con el suero anti-proteínas de intestino de alto peso molecular.	104
ciego intestinal (19) e intestino (20), confrontados con el suero anti-proteínas de intestino de mediano peso molecular.	105

LISTA DE CUADROS

No.	Página
1. Comportamiento biológico de <u>B. microplus</u> , cepa "Zapata", en condiciones controladas.	72
2. <u>B. microplus</u> : relación de largo del cuerpo-edad en fase parásita en cultivo controlado en bovino susceptible.	72
3. Relación de las proteínas identificadas en el patrón electroforético de un extracto intestinal (macerado completo) de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), detectadas con tinción de Nitrato de Plata en un gel SDS-PAGE al 8%, en condiciones no reductoras.	80
4. Relación de las proteínas identificadas en el patrón electroforético de un extracto intestinal (macerado sin contenido intestinal) de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), detectadas con tinción de Nitrato de Plata en un gel SDS-PAGE al 8%, en condiciones no reductoras.	82
5. Comparación de los antígenos detectados por I.E.T. en un extracto intestinal de garrapata <u>B. microplus</u> semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), con sueros de conejo anti-intestino homólogo, anti-glóbulos rojos de bovino y anti-suero completo de bovino.	87
6. Comparación de los antígenos detectados por I.E.T. en un macerado de larvas maduras de garrapata <u>B. microplus</u> , con los sueros de conejo anti-PAPM, anti-LAPM, anti-PMPM y anti-LMPM.	92
7. Comparación de los antígenos detectados por I.E.T. en un extracto de intestino de garrapata <u>B. microplus</u> , semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), con los sueros de conejo anti-PAPM, anti-LAPM, anti-PMPM y anti-LMPM.	95

I. I N T R O D U C C I O N .

1.1. Antecedentes.

En las regiones tropicales y subtropicales del mundo, se presentan condiciones ecológicas propicias para el desarrollo de numerosos parásitos que afectan a los animales domésticos, tales como: protozoarios, helmintos y artrópodos. En este último grupo, las garrapatas se caracterizan por poseer una amplia distribución e importancia económica en las actividades pecuarias y en la salud pública (53).

Los problemas generados por estos ectoparásitos varían entre regiones dependiendo de diversos factores, entre los cuales destacan las especies de garrapatas presentes, los agentes patógenos transmitidos por éstas y la población de hospederos involucrados, que en función de sus interrelaciones y aunado a elementos externos como son el control sanitario y los de índole socioeconómico, generan una problemática particular en cada región (91).

La garrapata del ganado, Boophilus microplus, representa al ectoparásito de mayor importancia en la ganadería bovina del norte, centro y sur de América, de grandes regiones de Australia, de Asia y ciertas áreas de Africa (91, 112, 136). En México, este ectoparásito se encuentra presente en aproximadamente el 53 % del territorio nacional. Dentro de su

área de distribución se ubican las principales regiones ganaderas del país (110).

Los problemas originados por la infestación de la garrapata Boophilus microplus en el ganado bovino son importantes . Este ectoparásito causa graves daños por sí solo al tener hábitos hematófagos estrictos, perforando y dañando la piel del hospedero, sustrayendo nutrientes y causando un malestar generalizado cuya intensidad depende del grado de infestación y de la susceptibilidad del hospedero. Por otra parte, Boophilus microplus puede actuar como vector de diversos agentes patógenos entre los que destacan por su importancia sanitaria, Babesia spp, que provoca la babesiosis, Anaplasma spp, causante de la anaplasmosis y Borrelia theileri, agente etiológico de la borreliosis, la epidemiología de los agentes causales de estas enfermedades está casi siempre en relación directa con la del vector; además, las picaduras de esta garrapata pueden ser puerta de entrada a problemas secundarios de salud (49, 109, 112, 122).

Por lo dicho anteriormente, la infestación por garrapata puede acarrear diversos problemas de salud al ganado, que finalmente, tienen una repercusión en la producción y por tanto, en la economía. En este último aspecto, esta parasitosis provoca mermas no sólo en el valor de la producción expresado en carne, leche y otros productos. Al respecto, en un estudio realizado bajo condiciones controladas se determinó que una hembra ingurgitada de Boophilus microplus produce una reducción de hasta 1.5 g en

la ganancia de peso en el ganado (115). Además, incide en los costos que implica la aplicación de programas de prevención y control del ectoparásito, especialmente el de tipo químico, y en los gastos sanitarios que se derivan de las infestaciones graves y de las enfermedades que transmite esta garrapata al ganado. Todos estos son costos que resultan difíciles de estimar pero que generalmente son elevados; además, bajo ciertas circunstancias, la oportunidad de comercialización puede verse afectada (91, 122, 136).

Las medidas de prevención y control ejercidas sobre las infestaciones por garrapatas Boophilus microplus, se han llevado a cabo de diferentes formas, sobresaliendo el uso de compuestos químicos con propiedades acaricidas. A través del tiempo, se han aplicado en las diferentes regiones geográficas afectadas por este ectoparásito, compuestos químicos principalmente de los siguientes grupos: arsenicales, organoclorados, organofosforados, amidinas y piretroides sintéticos, así como las ivermectinas. Sin embargo, algunos compuestos han sido retirados del mercado a causa de su alta toxicidad y daño al ambiente, como los arsenicales y los organoclorados, y otros, debido generalmente a que su uso indiscriminado, ha provocado la aparición del fenómeno de la resistencia en diversas poblaciones de garrapata Boophilus microplus (5, 81, 82, 136).

El futuro del control químico a las infestaciones con garrapatas, que representa la medida de primera elección en

esta tarea, no es promisorio, no sólo por la presencia de la resistencia a los compuestos, sino también por otras razones, como son: el costo de aplicación que es elevado y que limita el acceso y la periodicidad de su uso en muchas situaciones, además, la presencia de residuos tóxicos de los compuestos en la carne y otros productos del ganado lo que implica altos costos en la comercialización, especialmente de canales y cortes de carne por los exámenes a que deben de ser sometidos para verificar su estado al respecto. Finalmente, el daño al ambiente producido al utilizar algunos acaricidas rutinariamente, esto sin menoscabo de los problemas de salud pública asociados a su uso (67, 132, 136).

Otras alternativas de prevención y control han sido sugeridas y utilizadas desde hace varios años, medidas eficaces pero que requieren de condiciones tecnológicas más elaboradas para su aplicación, tales como el manejo de pastizales, la rotación de potreros y el uso de depredadores naturales de las garrapatas, entre otros (112).

Desde hace más de cinco décadas, se ha recomendado el uso de ganado Bos indicus, el cual ha demostrado que es más tolerante a la garrapata que el ganado Bos taurus, tanto por sus características fenotípicas como por su capacidad de desarrollar una respuesta inmune más eficiente después de una primoinfestación (100, 123, 124). Al parecer, esta alternativa es la más recomendable para fortalecer un programa de control basado en acaricidas, aunque habrá de tenerse en cuenta las limitantes productivas, como lo son la

menor producción de carne y leche, que implicaría el uso de este ganado y sus cruzas con Bos taurus (46, 126).

La situación antes descrita, ha provocado que en los últimos años se hayan buscado otras alternativas para la prevención y control a las infestaciones por garrapatas, en especial de Boophilus microplus, al respecto, sobresalen los trabajos enfocados al control de origen inmunológico. Este tipo de control representa una alternativa adicional a otros métodos como son el biológico y el químico; sus perspectivas de aplicación en el momento en que se alcance su desarrollo definitivo, incluirían características tales, como promover una respuesta inmune más eficiente en el ganado en contra de la infestación por garrapatas, con lo cual la introducción de razas europeas en zonas infestadas podría ser más viable. Por otra parte, los tratamientos acaricidas se podrían programar con intervalos de tiempo más amplios y así reducir los costos y prolongar la vida útil del compuesto al reducir la presión de selección y abatir las poblaciones de garrapatas; además, se disminuirían los riesgos por la presencia de residuos tóxicos de acaricidas en los productos animales, el ambiental y el de salud pública que implica su uso (39, 67, 136).

1.2. Morfofisiología del aparato digestivo de Boophilus microplus.

En las garrapatas, el proceso de alimentación es considerado como el evento fisiológico de mayor importancia, no sólo por el significado que el mismo guarda en la economía del parásito sino también por la interrelación que este proceso tiene con el hospedero y que de hecho representa el punto medular de la relación hospedero parásito.

Como en todos los ácaros, en las garrapatas el gnatosoma representa el conjunto de partes bucales encargadas de manejar el alimento, es asimismo, el responsable de la fijación del parásito a la piel del hospedero (57, 112).

En la garrapata Boophilus microplus, el gnatosoma está compuesto de un par de quelíceros, primer par de apéndices, transformados en órganos cortadores muy eficientes, están formados por dos artejos y los dedos de éstos son móviles y cortadores, el externo se encuentra volteado hacia afuera y en ambos dedos los dientes son externos; con los quelíceros la garrapata logra penetrar con facilidad el estrato córneo de la piel del hospedero, cortando del centro hacia afuera (53, 57).

Los pedipalpos, segundo par de apéndices, se encuentran lateralmente, pero sus coxas se fusionan una con la otra en la región ventral y hacia arriba con una proyección del margen anterior del idiosoma, constituyendo la base del gnatosoma que es la que unifica a los demás elementos que

conforman esta estructura; los otros cuatro artejos de los pedipalpos son libres y existe la idea de que funcionan como órganos quimiorreceptores (53, 57).

Las proyecciones de las coxas de los pedipalpos, han formado durante su evolución, una estructura larga, ventral, como lengüeta rígida, que es el hipostoma. Este órgano se ubica en la porción ventral del gnatosoma entre los dos pedipalpos y está constituido por dos piezas unidas hacia la línea media; el hipostoma es aplanado dorsoventralmente y está provisto de fuertes dientes dirigidos hacia atrás y dispuestos en hileras longitudinales, termina en una punta redondeada cuya superficie presenta numerosos dientecillos que conforman la denominada corónula. El hipostoma es el órgano de fijación de la garrapata al hospedero (57, 83).

La abertura bucal se encuentra conformada por un surco ubicado en la cara superior del hipostoma que se encuentra recubierto por una membrana y por las membranas externas de los quelíceros hacia el dorso; inmediatamente hacia el extremo posterior se encuentra el lóbulo labral, que separa la cavidad faríngea del salivario, siendo este último el conducto por donde pasa la saliva una vez que es secretada por las glándulas salivales y el cual puede servir también como reservorio salival. Existen dos glándulas salivales que se extienden a ambos lados del cuerpo desde las escápulas del escudo en la porción anterior y hacia la región posterior llegan hasta detrás de las coxas del cuarto par de patas, son

glándulas de aspecto racimoso y cuyos conductos principales desembocan hacia adelante en el salivario (57, 83).

.La composición de la saliva es compleja ya que incluye diversos componentes además de las enzimas digestivas que realizan la digestión extracorporal, éstas son principalmente las siguientes: a) una sustancia anestésica que impide que el hospedero se percate del ataque de la garrapata en el momento mismo de realizarse éste; b) una sustancia que sirve como cemento para sellar perfectamente el lugar de penetración de las partes bucales en la piel del hospedero, impidiendo la entrada de aire y facilitando con esto, tanto la succión de sangre, como la segura fijación de la garrapata al tejido por un tiempo más o menos largo; c) una sustancia anticoagulante, que facilita la fluidez de la sangre succionada. Adicionalmente, se reconoce la presencia de prostaglandina E2 que parece favorecer el proceso alimenticio al provocar cambios vasculares alrededor del sitio de fijación de la garrapata; d) una sustancia histolítica, que licúa a los integrantes celulares epidérmicos y dérmicos que son lesionados por la penetración y que también son succionados con la sangre; e) un grupo de sustancias o agentes anti-inmunes, tales como inactivadores del Complemento, bradiquinina, anafilotoxina, histamina y sustancias que impiden la agregación de neutrófilos y la activación de linfocitos T . Las glándulas salivales actúan también como órganos osmoreguladores que eliminan gran cantidad de agua durante el proceso de alimentación, manteniendo un adecuado

balance iónico en la garrapata. Finalmente, por ser una secreción compleja y ajena al hospedero, algunos de sus componentes proteicos pueden actuar como antígenos en la relación hospedero-parásito, esto explica en parte la reacción inflamatoria presente en el sitio de alimentación (57, 83, 95, 133).

La cavidad bucal se continúa con la faringe, éste es un órgano fusiforme desarrollado específicamente para la succión, y como tal, es propiamente el encargado de bombear sangre y líquidos tisulares del hospedero. La faringe presenta sus paredes firmemente esclerosadas y unidas estrechamente a una membrana, se rodea de un paquete muscular bien desarrollado que le permite ejecutar sus funciones (16, 83).

Después de la faringe, se encuentra un esófago corto y tubular, el cual posee un epitelio simple que no tiene funciones secretoras, además, tiene una capa muscular que le rodea. En el punto de unión con el estómago se localiza una pequeña válvula que regula el paso de alimento y que se denomina válvula proventricular o cardias (16, 83).

El estómago es un saco pequeño a partir del cual se originan hacia ambos lados los ciegos intestinales, comunmente llamados intestinos, que ocupan la mayor parte de la cavidad interna de la garrapata. En los Ixodidos se mencionan siete largos pares de ciegos que se entrecruzan en la cavidad. El intestino se conecta con el saco rectal a través del intestino delgado, estructura tubular de pequeña

dimensión que se extiende desde el extremo posterior del estómago hacia el centro del vientre, se repliega dorsalmente y junto con los tubos de Malpigio penetra en la porción anteroventral del saco rectal. Esta última estructura se abre a la altura del centro del vientre al recto, el cual desciende ventralmente y se abre a través de la apertura anal, que se localiza en la placa del mismo nombre (16, 83).

El estómago y los intestinos se encuentran rodeados por una membrana que los relaciona con la cavidad corporal, después se encuentra una capa muscular que les permite realizar movimientos de tipo peristáltico con los cuales el alimento se desplaza a lo largo de estas estructuras en tanto se va llevando a cabo el proceso digestivo propio de este nivel corporal (83).

La pared interna del intestino se encuentra revestida de una capa de células epiteliales que descansa en una lámina basal; las características de estas células y sus funciones varían de acuerdo con el estado evolutivo de las garrapatas. Sin embargo, en términos generales, se reconocen en los Ixodidos tres tipos de células en el epitelio intestinal: las de reserva o indiferenciadas, las secretoras y las digestivas. Existe la hipótesis de que las células indiferenciadas dan origen a los otros tipos de células de acuerdo a las necesidades fisiológicas del parásito (16). En el caso de Boophilus microplus esta hipótesis ha sido confirmada (3).

Como en otros ácaros, las garrapatas ixodidas, incluyendo a B. microplus, se caracterizan por cubrir en tres fases su proceso digestivo, las cuales son: la externa, la intraintestinal y la intracelular (16, 83).

La primera fase de la digestión o externa, ocurre a partir de la cavidad oral en donde por el efecto lítico de la saliva, se digieren parcialmente leucocitos y sangre completa del hospedero. La segunda fase, o intraintestinal, se lleva a cabo en el lumen del intestino en donde las células secretoras vierten sus productos para realizar la hemólisis del alimento y la lisis completa de otros elementos que le acompañan. La tercera fase, o intracelular, es llevada a cabo por las células digestivas, las cuales por medio de un proceso de pinocitosis engloban el contenido intestinal y ya dentro de las células realizan la digestión final del mismo y la asimilación consecuente de ese material (16).

En los estudios realizados en la garrapata Boophilus microplus, se han identificado ciertas características propias acerca de el proceso digestivo a nivel del intestino. Al respecto, se ha reportado la presencia de cinco tipos de células en el epitelio intestinal, las indiferenciadas, las secretoras tipo 1, las secretoras tipo 2, las digestivas en serie y las células basofílicas (3).

Las células de origen, como su nombre lo indica, son el punto de partida para diferenciar a los otros tipos de células de acuerdo a las necesidades fisiológicas del parásito. Estas células se encuentran usualmente en larvas,

sin embargo, en ninfas y adultos jóvenes son muy numerosas, estas células son indiferenciadas (3).

Las células secretoras tipo 1, se encuentran en forma temprana y madura, y contienen glicoproteínas además de hemolisinas, existen en ninfas pero pueden aparecer en adultos hacia el final del ingurgitamiento. Las células secretoras tipo 2, en su estado maduro vierten su secreción hacia el final de la etapa de ingurgitamiento de la hembra, en los machos no existen. Esta secreción se denomina coloidal y parece ser un mucopolisacárido con acción anticoagulante (3).

Las células digestivas están presentes en el epitelio intestinal en diferentes estados de desarrollo, el temprano, con pequeñas vacuolas digestivas; el intermedio, con vacuolas que contienen hemoglobina y otros componentes sanguíneos. Esos dos tipos de células se hallan en ninfas y adultos jóvenes (3).

En garrapatas adultas en proceso de ingurgitación se distinguen dos tipos de células que provienen de las ya descritas, las denominadas maduras 1, llevan en su interior hemoglobina y leucocitos, responsables de la digestión rápida durante el crecimiento con alimentación lenta; y las maduras 2, que llevan sólo hemoglobina, estas células realizan la digestión rápida en la fase final del ingurgitamiento. Todas las células digestivas contienen enzimas lisosomales (3).

Las células basofílicas se encuentran sólo en los especímenes adultos y son adyacentes a las células

digestivas. Al parecer juegan un papel importante en el transporte de materiales digeridos, agua e iones a la hemolinfa (3).

El material no digerido pasa por movimientos peristálticos al intestino delgado, esta estructura parece no estar relacionada con la digestión aún cuando contiene un epitelio parecido al del resto del intestino (16).

El aparato digestivo de Boophilus microplus, en particular el intestino, resulta ser un sitio anatómico y funcional muy importante en la relación hospedero-parásito, principalmente debido a que es el primer punto de contacto entre los tejidos de la garrapata y los componentes de la respuesta inmune del hospedero, por otra parte, son también las células intestinales el sitio de contacto y desarrollo del protozooario Babesia spp, y finalmente, en el intestino se puede llevar a cabo de alguna forma el proceso de detoxificación de ciertos acaricidas (3).

1.3. La infestación con garrapatas y la respuesta inmune.

Los mecanismos inmunológicos que interactúan en una relación hospedero-parásito han sido estudiados en modelos experimentales diversos, principalmente cuyes y conejos. Restricciones económicas han impedido realizar trabajos amplios en bovinos y otros animales domésticos, a pesar de ello, la información generada es muy valiosa y permite extrapolar observaciones a los modelos naturales. Sin embargo, es un hecho que el fenómeno inmunológico en la infestación con garrapatas no está completamente definido y que existen todavía vacíos de información que provocan contradicciones y confusiones al estudiar y describir la respuesta inmune en los diferentes modelos experimentales (28, 63).

Durante la infestación con garrapatas, éstas establecen una amplia relación con su hospedero, la cual se lleva a cabo en sitios localizados en donde la larva se fija en la piel a través de su aparato bucal, aquí las glándulas salivales secretan enzimas digestivas, inhibidores de la coagulación y otras sustancias activas que proveen elementos para mantener una relación inmunológica a su favor con el hospedero, estas sustancias incluyen anticoagulantes, inactivadores del Complemento, bradiquinina, anafilotoxina, histamina y sustancias que impiden la agregación de neutrófilos y la activación de linfocitos T , en condiciones particulares

pueden existir también agentes antiinflamatorios (95, 96, 133).

La saliva también presenta algunos antígenos, los cuales han sido identificados intradérmicamente alrededor de los sitios de alimentación del parásito (12, 137). Existen antígenos salivales capaces de inducir la producción de anticuerpos circulantes detectados por diferentes pruebas inmunológicas, esto ha sido reportado por ejemplo en cuyes con Amblyomma americanum, Dermacentor andersoni y Rhipicephalus sanguineus (29, 132), en conejos con Dermacentor variabilis, Amblyomma americanum, e Ixodes ricinus (1, 24, 132) y en bovinos con Boophilus microplus y Rhipicephalus appendiculatus (93, 143); asimismo, existen investigaciones que indican que la respuesta inmune celular también está presente a este nivel (135).

Se ha sugerido que en el modelo cuye-Dermacentor andersoni, las células presentadoras de antígeno a nivel de piel (células de Langerhans y macrófagos tisulares), estimulan a los linfocitos T, los que a través de la Interleucina 2, activan a los linfocitos B para producir anticuerpos del tipo IgG e IgE que se unen a basófilos y neutrófilos. Al momento de la reinfestación, los linfocitos T producen factores quimiotácticos para basófilos, neutrófilos y eosinófilos y al reaccionar los antígenos salivales con la IgG e IgE unidos específicamente a las membranas de basófilos y neutrófilos, ocurre la degranulación de estas células con la consiguiente liberación de mediadores farmacológicamente

activos tales como serotonina e histamina, que interfieren con el proceso de alimentación del parásito. El papel del Sistema del Complemento a través de la vía clásica, es también considerado importante en la reacción inmunológica en contra de las garrapatas (12, 80, 131, 148).

Esta reacción sucede alrededor de los sitios de fijación del parásito, en donde existe un fuerte proceso inflamatorio con acumulo de basófilos; la reacción sugiere que se trata de un fenómeno de hipersensibilidad retardada, conocido como hipersensibilidad basofílica cutánea (8, 10, 11, 30). Este tipo de reacción también ha sido reportada en infestaciones con Rhipicephalus spp y Amblyomma spp, entre otros casos (31, 76, 116).

Los mecanismos efectores de la respuesta inmune adquirida incluyen, principalmente, inmunidad mediada por células, anticuerpos circulantes, anticuerpos homocitotrópicos, Complemento y otras moléculas bioactivas generadas en el proceso inflamatorio/inmune (133).

El efecto de la respuesta inmune en las garrapatas se observa por el desprendimiento de larvas y/o el paso a un segundo estadio en condiciones de desnutrición severa de los parásitos que afectan su supervivencia y desarrollo (130, 135).

La presencia de anticuerpos se ha asociado con protección a la infestación, sin embargo este hecho no es consistente, por otra parte, la transferencia pasiva de inmunidad humoral y de inmunidad celular de animales

resistentes a susceptibles en diferentes modelos de garrapata-hospedero, no ha brindado resultados satisfactorios en cuanto a protección a la infestación (23, 29, 63, 101, 127, 130, 135).

En el modelo bovino-Boophilus microplus, la respuesta inmune naturalmente adquirida no ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, existen investigaciones que permiten afirmar que ésta es similar a la descrita en el cuye, únicamente que el proceso termina en una respuesta de hipersensibilidad inmediata. Esta consiste en el desarrollo de una rápida reacción en los sitios de alimentación de la larva, hay degranulación de células cebadas y acumulación de eosinófilos en la zona, los niveles de histamina son altos y se produce un desprendimiento de larvas en corto tiempo, éste fenómeno inmune aunado a la reacción cutánea inherente causa que la remoción mecánica de larvas, por el lamido y rascado, sea mayor (64, 105, 143, 144); sin embargo, algunos elementos activos de la saliva pueden causar un fuerte efecto inmunosupresor, siendo éste un hecho importante en la relación hospedero-parásito (58)

1.4. Experiencias y avances en la inmunización artificial contra garrapatas.

El conocer la respuesta inmune a la infestación con garrapata tuvo como parte de sus objetivos el explorar las posibilidades de proteger artificialmente a los hospederos de estos ectoparásitos, mas aún cuando se corroboró la idea de que la inmunidad adquirida naturalmente era poco efectiva y de desarrollo lento aún utilizando animales Bos indicus, y que la inmunización pasiva tampoco mostró resultados alentadores (67).

Los primeros trabajos con respecto a provocar una respuesta inmune artificial, se remontan a 1939, en que Trager protegió parcialmente a cuyes contra la infestación de larvas de Dermacentor variabilis, utilizando un extracto somático completo de larvas (121), sin embargo, es hasta varios años más tarde, cuando se retoma la idea y se inician trabajos con ese objetivo los cuales muchas veces corrieron paralelos a los del estudio de la respuesta inmune descritos anteriormente.

La inmunización artificial ha pretendido promover en el hospedero una respuesta inmune dirigida específicamente a ciertos antígenos con la idea de que la misma fuera de características protectoras a la infestación con garrapata. Estas características protectoras no incluyen la prevención de la infestación como tal, mas sí el poder lograr un abatimiento en el número de ectoparásitos que logran cerrar

su etapa de vida parasítica, y además de ello, incidir en la capacidad reproductiva y la viabilidad de las larvas de las garrapatas que llegan a finalizar ese ciclo.

Inicialmente se pensó en la posibilidad de utilizar como material antigénico, en los experimentos de inmunoprofilaxis, a aquéllos presentes en las glándulas salivales, para semejar el proceso natural de adquisición de inmunidad. Posteriormente se pensó en otras alternativas, como el uso de extractos crudos completos de larvas y adultos, al uso de órganos internos y de órganos reproductores e intestino, bajo diversos procesamientos. A través de los años, se han obtenido resultados a veces buenos, a veces contradictorios y en otras ocasiones malos, en el uso de dichos elementos.

Cabe señalar que los parámetros más comunmente utilizados para evaluar el efecto de la respuesta inmune artificial han sido el conteo de garrapatas (larvas, ninfas y adultos) que llegan a finalizar su fase de vida parasítica o una etapa de ella, tras una o más infestaciones experimentales o naturales, así como el peso de las hembras repletas, su apariencia física en general, el peso de las masas ovígeras producidas y la eclosión y viabilidad de las larvas, utilizando siempre un grupo control como referencia. Las mediciones indirectas tales como la presencia y niveles de anticuerpos circulantes o de respuesta inmune celular, también se han utilizado, así como la correlación de dichos niveles con los parámetros de conteo ya mencionados.

Es frecuente que los investigadores califiquen sus resultados sin apoyarse en parámetros numéricos precisos, o bien éstos se manejan subjetivamente para justificar los resultados, en conclusión, no existe un criterio uniformado para expresar los resultados que permita hacer comparaciones objetivas.

A lo largo del capítulo de introducción de este escrito, se referirán experimentos en los que se reportan resultados de protección, resistencia o inmunoprotección a la infestación natural, controlada o experimental, con o sin intervención de una acción de inmunización artificial; los valores numéricos o los criterios no numéricos, se refieren siempre a la protección manifestada o medida por los parámetros de conteo ya mencionados o por las pruebas indirectas de tipo inmunológico.

A continuación se revisarán los principales resultados obtenidos en diferentes modelos de garrapata-hospedero, haciendo especial énfasis en el caso de Boophilus microplus-bovino, modelo en el que se han logrado mayores avances.

1.4.1. Inmunización en los géneros: Rhipicephalus spp, Amblyomma spp, Dermacentor spp, Ixodes spp e Hyalomma spp.

Como se mencionó anteriormente, se ha buscado inducir inmunidad hacia la infestación con garrapatas de diferentes formas, una de ellas ha sido la exposición experimental controlada con larvas, reconociéndose por ejemplo, que el ganado Bos indicus desarrolla una respuesta inmune más eficiente que el ganado Bos taurus, esto particularmente en Rhipicephalus appendiculatus y Rhipicephalus evertsi (93). La exposición controlada también ha sido reportada en cuyes-Rhipicephalus appendiculatus (111). El desarrollo de una respuesta inmune inducida por la infestación repetida con ninfas de R. appendiculatus y R. evertsi, también ha sido documentada, y como en el caso de la infestación con larvas, la protección se manifiesta por desprendimiento de ninfas y bajo peso en las mismas, evidentemente, este es un fenómeno natural que se induce siendo su desarrollo individualizado y su comportamiento en cuanto a protección se refiere, es muy variable (34, 79); existe evidencia de que esta respuesta inmune puede darse para diferentes estadios de desarrollo en R. appendiculatus (125).

La exposición experimental controlada también ha sido documentada en el caso de larvas de Amblyomma americanum (134). En un estudio se logró identificar antígenos relevantes involucrados en la inducción de este fenómeno (18). Por otra parte, experimentos con Dermacentor andersoni

indican la existencia de este fenómeno en cuyes (10); sin embargo, se ha observado que la protección puede estar ausente a pesar de existir una reacción dérmica inflamatoria en los sitios de fijación del parásito (75).

En el caso de Hyalomma anatolicum, se ha demostrado también el desarrollo de una respuesta inmune de tipo protector tras la exposición controlada e intermitente con larvas en ganado europeo encastado de Bos indicus (77).

El nivel de infestación parece estar relacionado con la resistencia generada en el modelo conejo-Ixodes ricinus, pero el efecto inmunosupresor de los elementos activos de la saliva de la garrapata puede afectar este hecho a favor del ectoparásito (107).

Debido a que la respuesta inmune natural se induce por la presencia de antígenos salivales en el hospedero, este material ha sido ampliamente utilizado en experimentos de inmunoprofilaxis.

En infestaciones naturales, se ha detectado la presencia de antígenos salivales por microscopía en los sitios de fijación de las larvas, y la concentración de antígenos salivales por medio de pruebas inmunológicas, concluyendo que ambos varían de acuerdo con el estado evolutivo de la garrapata (76, 111).

En un trabajo con R. appendiculatus, se logró identificar por inmunoelectrotransferencia varios antígenos de origen salival con pesos moleculares entre los 16 y los 120 kDa (111). Por otra parte, la inmunización de conejos y

cabras con antígenos de glándulas salivales de la garrapata R. appendiculatus, logró una buena protección manifestada por la reducción del número de garrapatas (60).

Otros investigadores inocularon antígenos de glándulas salivales de garrapatas adultas de R. appendiculatus en conejos, exponiéndolas posteriormente a infestaciones con larvas, ninfas y adultos; estos antígenos adicionados de adyuvante incompleto de Freund indujeron una buena protección y presencia de anticuerpos específicos detectados por pruebas serológicas, en especial para el estado de larva y el de adulto (84).

Se han utilizado extractos de glándulas salivales de hembras de Amblyomma americanum parcialmente repletas para inmunizar cuyes, encontrando un buen grado de rechazo de garrapatas en la infestación experimental verificada 17 días después de la inmunización (32).

En otro trabajo con A. americanum, se logró identificar, por la técnica de inmunolectrotransferencia, al menos tres antígenos de origen salival, importantes en la inducción de inmunidad en conejos, estas proteínas tuvieron un peso molecular de 39, 40 y 41 kDa (27).

Se han estudiado los antígenos de A. americanum que son reconocidos en infestaciones repetidas en borregos, determinando por medio de la técnica de Inmunolectrotransferencia, que dos antígenos, de 35.5 y 29 kDa, de origen salival son los responsables de la protección observada (18).

En el caso de Amblyomma hebraeum, se ha identificado la composición de varias proteínas y su valor antigénico en saliva de diferentes estadios de desarrollo de la garrapata, concluyendo que es más compleja antigénicamente la secreción salival de garrapatas pequeñas que la de los adultos (37). Por otra parte, se sugiere la presencia de antígenos compartidos en diferentes estados de desarrollo de A. americanum (26); adicionalmente en otro trabajo se afirma que pueden existir antígenos de origen salival que sean comunes entre diferentes géneros de garrapatas, por lo menos entre Amblyomma americanum, Dermacentor variabilis y Boophilus microplus (27).

Los antígenos salivales han sido también utilizados en el modelo Dermacentor andersoni-cuye. En una investigación se inmunizaron cuyes con un extracto de glándulas salivales de hembras semirepletas y se demostró protección a la infestación experimental disminuyendo significativamente el número de larvas (128). Otros investigadores han reportado también el aislamiento y caracterización de antígenos salivales de hembras de D. andersoni (47).

En otro estudio se logró desarrollar un método para obtener la toxina causante de la parálisis en perros por el piquete de Ixodes holocyclus y producir un toxoide a partir de la saliva de dicha garrapata con características inmunoprotectoras (114).

Como resultado de varias investigaciones, se ha reportado la identificación y caracterización inmunoquímica

de un antígeno de Ixodes ricinus con un peso molecular de 25 kDa, el cual, en conejos, ha demostrado ser inmunogénico y que brinda una buena protección a la infestación experimental. Esta proteína se localiza en el integumento de ninfas alimentadas, aunque también ha sido detectada en otros estadios pero en cantidades pequeñas. Este antígeno utilizado como inmunógeno manifiesta su capacidad protectora al producir altos niveles de anticuerpos que se relacionan positivamente con una reducción del peso de las hembras ingurgitadas, del peso de los huevos y de la eclosión de larvas. Los autores documentan la posibilidad de que proteínas similares se encuentren en otros géneros de garrapatas (103).

En un estudio se inmunizó ganado europeo encastado de Bos indicus utilizando antígenos derivados de extractos de glándulas salivales de Hyalomma anatolicum, uno de esos antígenos, denominado SG Ag-1, adicionado con adyuvante incompleto de Freund, fue el que demostró ser más inmunogénico mediante su evaluación con pruebas serológicas de doble difusión y aglutinación capilar en tubo (17).

Como ya se ha mencionado anteriormente, también se han utilizado en los experimentos de inmunoprofilaxis otros materiales diferentes a la saliva y glándulas salivales, principalmente extractos completos de diferentes estadios de desarrollo de la garrapata, así como órganos internos, órganos reproductores e intestino de las mismas. Al respecto, se ha mencionado la posibilidad de que existan antígenos

comunes entre los tres estadios de desarrollo de Rhipicephalus appendiculatus y que éstos sean inmunoprotectores (111, 125).

En experimentos realizados con R. appendiculatus en conejos, se identificaron, aislaron y caracterizaron inmunoquímicamente antígenos de intestino reconocidos por IgG de conejo infestado varias veces con la garrapata; esto permitió detectar una proteína de alto peso molecular, mayor de 500 kDa, con características inmunogénicas, que al ser utilizada como vacuna produce reducción del potencial reproductivo de la garrapata, además de inducir, cuando se inyecta intradérmicamente en conejos, respuestas de hipersensibilidad inmediata y retardada (78).

La inmunización de ganado con una fracción semipurificada de antígenos solubilizados de membrana de intestino de R. appendiculatus y la posterior infestación experimental con los diferentes estadios demostraron una buena protección manifestada por bajo peso de las garrapatas y deficiencias para ingurgitar (38%), sin embargo, la mayor causa de mortalidad fue por el incremento del lamido del ganado como resultado de la reacción dérmica aumentada (40).

En un trabajo con R. zambeziensis se inmunizó a conejos con extractos crudos de adultos logrando un efecto de protección manifestado por los bajos pesos de ingurgitamiento y trastornos en la oviposición. Estudios histológicos revelaron que las garrapatas presentaron un severo daño en el intestino (43).

Se han llevado a cabo otros experimentos con ninfas de R. appendiculatus en cuye y ganado bovino, utilizando un homogenizado crudo de ninfas y tres fracciones del homogenizado obtenidas por cromatografía de gel permeable, la fracción 2 redujo un 66% el promedio de peso de ingurgitamiento de adultos en cuyes; sin embargo, los bovinos inoculados con la fracción 2 no tuvieron una mejor respuesta de protección que los inmunizados con las otras fracciones de material antigénico (94).

Otros investigadores combinaron varias estrategias para proteger a conejos de la infestación por R. appendiculatus, se utilizó la infestación controlada previa a una inmunización con antígenos solubilizados de membrana de intestino, comparando esto con la resistencia generada por una a tres infestaciones controladas o con la sola inmunización. Los resultados obtenidos no mostraron que la combinación elevara la protección a la infestación experimental (41).

En el caso de R. sanguineus, se ha experimentado con la inmunización artificial debido a que la inmunidad natural es muy deficiente; así, se ha utilizado un extracto crudo de garrapatas adultas sin alimentar, logrando una buena protección en cuye y hamster pero no en perro; de acuerdo con los investigadores, posiblemente el uso de material antigénico más purificado pudiera brindar mejores resultados en cuanto a protección, en el perro (20).

Cuando se inmunizaron cuyes y conejos con extractos completos de ninfas sin alimentar de A. variegatum y de A. hebraeum se encontró que estos antígenos producen anticuerpos relacionados positivamente con la protección a la infestación con adultos, además, se logró obtener un 60% de reducción en el desarrollo de larvas y ninfas (54).

El uso de una fracción proveniente de células del borde de cepillo de intestinos de A. americanum parcialmente alimentadas, al usarla como vacuna en cuyes, permitió obtener una buena protección manifestada por provocar un 82% de garrapatas muertas con daño en el intestino (129).

Para inducir inmunidad artificial se ha utilizado un extracto somático completo de larvas de Dermacentor variabilis y los cuyes inoculados intracutáneamente se protegieron en forma parcial (121).

La inmunización de bovinos y cuyes con extractos de intestino, órganos reproductores y órganos internos de D. andersoni adultos previamente alimentados en bovinos, durante cinco días, demostró que este material antigénico puede inducir una respuesta inmune de características protectoras pues hubo una disminución del número total de garrapatas recuperadas (9).

En ratas que se inmunizaron con extractos somáticos de intestino de D. variabilis adulto sin alimentar, la protección inducida se manifestó por una reducción de peso de las garrapatas, alargó el periodo de oviposición y disminuyó la producción de huevos (2).

La inmunización de cuyes con extracto somático de larvas de Ixodes holocyclus ha logrado una protección en la cual entre el 38 y el 68% de las larvas fueron rechazadas en la infestación experimental (134).

El estudio de la respuesta inmune inducida en conejos inmunizados con extractos completos de garrapata semirepleta de Hyalomma anatolicum, a través del uso del inmunoensayo enzimático (ELISA), doble difusión, precipitación de anticuerpos y del índice de estimulación de linfocitos, permitió observar que tanto la inmunidad humoral como la celular se activa y estimulan positivamente al sistema inmune de los conejos vacunados (74).

1.4.2. Inmunización en el modelo Boophilus microplus.

En este modelo, la inmunidad adquirida naturalmente utiliza un mecanismo inmunológico caracterizado por una respuesta de hipersensibilidad inmediata que viene a generarse a partir de la inoculación de antígenos salivales durante el proceso de alimentación de la larva. Este fenómeno inmune afecta precisamente a las larvas pudiendo causar su desprendimiento, el efecto que este hecho tiene en el desarrollo posterior de la larva es menor y su repercusión en los parámetros reproductivos es prácticamente nulo (58, 136).

Para la inmunización artificial se trabajó inicialmente en dos alternativas, ambas relacionadas con el mecanismo natural antes descrito, éstas fueron, la exposición

controlada con larvas (100, 123), que mostró que la inmunidad adquirida en esta forma es de lento desarrollo, baja eficiencia y de comportamiento inconsistente, estas observaciones dieron pauta a la búsqueda de otras alternativas.

La segunda opción, se refirió al uso de glándulas salivales y antígenos de origen salival, ésta representaba la alternativa natural a seguir. Diversos experimentos se llevaron a cabo y al menos dos antígenos se purificaron de saliva (140, 142), sin embargo, estudios posteriores indicaron que los antígenos purificados de saliva no inducían una respuesta inmune protectora (66). Se experimentó también con glándulas salivales como extracto completo, estos elementos inducen producción de anticuerpos circulantes que en un principio se correlacionó positivamente con protección a la infestación (22).

Los extractos de glándulas salivales y las membranas de las mismas inducen una producción de anticuerpos y de respuesta inmune celular detectados por pruebas de ELISA y por ensayo de blastogénesis de linfocitos, respectivamente, que se pueden correlacionar positivamente con protección (86).

El papel de la saliva como estimulador de la inmunidad artificial sigue siendo cuestionado por algunos investigadores en el caso de B. microplus, pero en otros modelos, particularmente de dos o más hospederos, se continúa experimentando con ellos; sin embargo, se piensa que el bajo

valor inmunoprotector de la saliva se puede explicar por la diversidad de elementos inmunoevasores de los componentes de la misma (19, 96, 133) y por la dificultad de promover por vacunación una respuesta inmune adecuada ya que la alcanzada generalmente es menor que la que se logra en exposiciones naturales (66).

Otras alternativas han sido investigadas, en particular la referente al uso de otros elementos con potencialidad inmunogénica y con los cuales, en condiciones naturales, el hospedero no tiene posibilidades de tener contacto, esta alternativa consistió en proponer el uso de antígenos internos como blanco de la respuesta inmune (44). Estos antígenos pertenecen al grupo denominado "ocultos" al sistema inmune del hospedero durante infestaciones naturales (136).

El uso de antígenos internos ya había sido reportado en mosquitos, por varios autores (7, 106). En garrapatas también existían antecedentes al respecto (9, 121).

Una investigación desarrollada con Dermacentor andersoni-cuyes y bovinos, demostró que el uso de órganos internos, órganos reproductores e intestino, como material antigénico, tenía efectos en parámetros importantes tales como peso de las garrapatas, producción de huevos y larvas generadas a partir de éstos (9).

Un trabajo posterior con Boophilus microplus - bovino, utilizando extractos crudos de garrapatas de 18 a 20 días de edad, en diversos experimentos de inmunoprofilaxis, permitió corroborar el hecho de que se estimula con ellos una

respuesta inmune protectora a la infestación experimental, esta protección llegó a disminuir la población de garrapatas hasta en un 70% en bovinos sin previo contacto con el ectoparásito y hasta en un 90% en casos de reinfestaciones. Los niveles de anticuerpos detectados por difusión en gel y radioinmunoensayo, no correlacionaron positivamente con los niveles de protección observados (59). En un trabajo sucesivo, se demostró la presencia de IgG1 y albúmina bovina en hemolinfa de garrapatas alimentadas en bovinos vacunados y no vacunados (120).

En trabajos posteriores, se logró especificar que el daño al ectoparásito se presentaba en el intestino de los adultos y que esto podía provocar problemas de sobrevivencia a la garrapata e incluso la muerte, como consecuencia de esto, la oviposición se redujo así como la eclosión de larvas. Se propuso, por observaciones realizadas "in vitro", el papel activo del Sistema del Complemento en el mecanismo efector inmunitario. Se ha sugerido que el comportamiento del mecanismo inmunológico involucrado no fue semejante al presente en la respuesta inmune adquirida naturalmente (4, 59, 65).

La investigación continuó utilizando una suspensión de extracto crudo de órganos internos de garrapatas semirepletas (4 a 6 mm de largo); mediante el uso de diferentes técnicas como la extracción con detergente, la cromatografía y el isoelectroenfoco y tras realizar la evaluación de los diversos materiales antigénicos obtenidos por estos procesos,

se logró identificar una fracción semi-purificada con características protectoras que se situó en un punto isoeléctrico de 5.1 a 5.6 y en un rango de peso molecular entre los 205 y los 79 kDa (138).

La inmunización experimental en bovinos con material antigénico obtenido de intestino de hembras de 14 a 17 días de edad, demostró hasta un 87% de protección a la infestación con garrapatas, observándose daño en los adultos, además hubo una reducción del 95% en la oviposición y eclosión de las larvas; por medio de ELISA se correlacionaron positivamente los niveles de anticuerpos y la protección conferida (87). En un trabajo sucesivo se determinó que el material antigénico estaba asociado a la membrana del intestino y se elaboraron vacunas con este material que proporcionaron una protección del 91% a la infestación experimental, además, los niveles de anticuerpos detectados por ELISA se relacionaron positivamente con la protección inducida por la vacunación (88).

La solubilización de las membranas del intestino empleando detergente y la inmunización de bovinos con diferente material antigénico originado del tratamiento mencionado, permitió obtener niveles de protección del 56 al 78% (145).

Los trabajos continuaron a partir del material parcialmente purificado que fue obtenido en experimentos anteriores (138); lográndose aislar un antígeno asociado a la membrana del intestino que ya purificado se denominó Bm86.

Este antígeno se encuentra en escasa proporción pero es altamente inmunogénico, algunas de sus características son que su peso molecular aparente es de 89 kDa, que tiene un punto isoeléctrico de 5.1 a 5.6 y que presenta afinidad a la lectina de germen de trigo (141).

Este antígeno nativo Bm86, utilizado en experimentos de inmunoprofilaxis en bovinos, logró inducir una buena protección a la infestación experimental con garrapatas, redujo 65% el número de garrapatas que sobrevivieron e ingurgitaron, redujo el peso promedio de las hembras que ingurgitaron en un 33%, se observó un promedio del 86% de garrapatas vivas con daños visibles, la oviposición disminuyó un 54% y la eclosión de larvas para una siguiente generación se redujo hasta un 92% (141).

Por otra parte, se obtuvo la secuenciación y estructura química de los péptidos que componen el Bm86, que es una glicoproteína. Además, se determinó por medio de Inmunofluorescencia Indirecta, que el antígeno Bm86 se localiza en la superficie de las células digestivas del intestino interviniendo en la endocitosis de estas células y dicha función es interferida por la acción de los anticuerpos (141).

El siguiente paso fue producir una proteína recombinante del Bm86. Para ello se realizó un estudio de las librerías del cDNA de hembras semirepletas y se aisló el fragmento de cDNA que codifica para el Bm86 y éste se clonó en E. coli (92).

La localización de la actividad antígeno - anticuerpo se presenta a nivel de las células del intestino, la interacción del antígeno Bm86 con el sistema inmune del hospedero genera principalmente una respuesta de tipo humoral (IgG) con apoyo no indispensable del Sistema del Complemento, de esta forma, el daño a la garrapata se presenta en las células intestinales, provocando su ruptura o lisis (66). En un estudio posterior, el antígeno Recombinante-Bm86 se detectó con la técnica de inmuno-oro, localizándose predominantemente en las microvellosidades de las células digestivas; pero se halló escasamente en las estructuras encargadas de la pinocitosis alimenticia (48).

El antígeno Bm86 recombinante (rec-Bm86), fue utilizado en experimentos de inmunoprofilaxis, observándose resultados menos eficientes en cuanto a protección que con la proteína nativa, ésta es glicosilada y el rec-Bm86 no, probablemente esto provoca problemas en la presentación de epitopos protectores asociados a carbohidratos (139). Por esta razón, el antígeno recombinante fue solubilizado y se controló el plegamiento del mismo; por otra parte, el gene que codifica para el Bm86 fue expresado en una línea celular de Spodoptera usando un baculovirus recombinante, esperando que por tratarse de células de un insecto el plegamiento de la proteína fuera más similar al de la nativa (67, 97).

El comportamiento del nuevo rec-Bm86 plegado fue similar en términos generales al observado con el rec-Bm86 de baculovirus y al Bm86 nativo. Sus valores de protección

fueron: reducción en el número de garrapatas 27%, reducción del promedio de peso por hembra ingurgitada 33%, reducción de la oviposición 78% y reducción de larvas para la siguiente generación 91% (67). El antígeno rec-Bm86 plegado ha sido detectado por inmunohistoquímica en la superficie de las células digestivas, aunque en las pruebas el antígeno glicosilado puede reconocer otras estructuras con proteínas glicosiladas similarmente (48). Este grupo de investigadores están utilizando el antígeno rec-Bm86 plegado en pruebas de campo con base a dos inoculaciones con adyuvante comercial, no especificado, a intervalos de 4 semanas, la necesidad de revacunaciones estará determinada por las elevaciones poblacionales de garrapatas en la zona de que se trate (67). Esta etapa de la investigación presenta nuevos retos pues involucra no sólo a la vacunación en sí, sino además elementos que en condiciones de laboratorio e infestaciones controladas no se han manejado.

Los autores de la investigación señalan la necesidad de conocer la actividad del antígeno bajo condiciones de campo y su interacción global con otros elementos tales como la frecuencia de baños, el manejo de pastizales y la raza de los bovinos a que se aplique. Los mismos investigadores afirman que el posible uso de éste y de otros antígenos de B. microplus obtenidos por diferentes procedimientos, incluidos los de tecnología del DNA recombinante, con el fin de proteger al ganado bovino representa un elemento más, de

indudable valor, en el combate integral de este problema (39, 67, 139).

En otro estudio, se llevó a cabo la producción de anticuerpos monoclonales (mAc) contra antígenos de membrana de intestino de B. microplus, los antígenos se solubilizaron con Triton X-100 y se precipitaron con el mAc denominado QU13. Con el precipitado se inmunizó ganado con la intención de verificar la presencia de antígenos protectores; el inóculo logró proteger en la siguiente forma: redujo la oviposición 99% y el porcentaje de garrapatas con daños aparentes fue del 64%, la protección se relacionó positivamente con los niveles de anticuerpos detectados por ELISA. Se determinó que el material antigénico está compuesto por una proteína de más de 200 kDa y por otras con pesos de 80, 74, 62, 57 y menos de 30 kDa (71).

En un trabajo posterior, la especificidad de los antígenos detectados con el mAc QU13 fue examinada mediante inmunohistoquímica, estos antígenos se detectaron especialmente en las microvellosidades del intestino de garrapatas adultas, pero también en otras estructuras como en la superficie de los túbulos de Malpigio y en intestinos seccionados de larvas. Este estudio sugiere la existencia de epitopos comunes en las microvellosidades de las superficies secretoras (73).

Estudios realizados con antígenos de intestino bioquímicamente modificados con metaperiodato, brindaron evidencia preliminar de que los antígenos de membrana de

intestino pueden ser carbohidratos o bien depender de un carbohidrato para su especificidad (72).

Otros trabajos, sugieren que algunos antígenos protectores pueden estar presentes en diferentes estadios evolutivos de la garrapata, no sólo en los adultos. Así, en investigaciones realizadas con extractos de larvas sometidos a diversos tratamientos para obtener material antigénico (soluble y de membrana), y con antígenos de intestino de adultos, proveen evidencia de que existen antígenos comunes; se compararon los niveles de producción de anticuerpos por ELISA, ensayo de blastogénesis de linfocitos y reacciones dérmicas entre diferentes antígenos de larvas y de intestinos de adultos, asimismo se vacunó y desafió a los bovinos. Todo ello bajo la hipótesis de que altos niveles de anticuerpos se correlacionan positivamente con altos niveles de protección a la infestación con garrapatas, hecho que los autores demuestran (86, 89, 146). Los resultados obtenidos no dejan de ser controvertidos a juicio de otros investigadores (139). Sin embargo, la inmunidad adquirida varía considerablemente entre individuos vacunados y no vacunados dependiendo si son expuestos a infestaciones naturales o experimentales (147).

Se ha tratado de demostrar la presencia de antígenos comunes en B. microplus, entre un extracto obtenido de membranas de huevos e intestinos, observándose la existencia de antígenos comunes sin que los de membrana de huevo fueran inmunoprotectores. Los autores mencionan que sus evidencias

experimentales indican que los antígenos inmunoprotectores aparecen como tales a partir del estado larval (68).

Se ha demostrado que el suero de bovinos previamente infestados con B. microplus puede detectar, por medio del ensayo de inmunoelectrotransferencia, antígenos comunes entre extractos de glándulas salivales, intestino, embriones y larvas, además de que todos estos extractos son capaces de inducir una respuesta inmune humoral (36).

La revisión de literatura nos muestra que la investigación en este modelo ha recaído principalmente en dos grupos de trabajo, sin embargo, existen algunos reportes con información sobre el tema con resultados similares a los ya descritos. En 1986, se estudiaron las reacciones dérmicas presentes en ganado y en conejos al inocular extractos completos de tejidos de hembras repletas de B. microplus, las cuales fueron restringidas a los sitios de inoculación y variaron en intensidad (70). En 1987, otros investigadores estudiaron el patrón de desarrollo de larvas de B. microplus en ganado inmunizado con un extracto completo de larvas, encontrando diferencias en el mismo (113), y en 1993, se inmunizaron bovinos con extractos de hembra adulta y con extractos de larvas, encontrando una buena protección a la infestación experimental manifestada por el bajo peso de garrapatas adultas y de los huevos, además de la mortalidad de garrapatas (90).

Adicionalmente, un grupo de investigadores ha clonado el antígeno Bm86 de B. microplus, en el hongo Pichia pastoris.

En el estudio se reportan resultados similares, en cuanto a la capacidad inmunoprotectora del rec-Bm86, a los obtenidos por un grupo de investigadores australianos (102).

Las experiencias acumuladas por los investigadores consultados, han demostrado que la alternativa de inmunizar y proteger al ganado bovino contra la infestación con Boophilus microplus, a partir de diferentes preparados antigénicos es factible.

Por otra parte, se han definido algunas particularidades de este fenómeno, que entre otras son: a) Que las fracciones antigénicas están asociadas a la membrana del intestino; b) Que dichas fracciones son proteínas asociadas a carbohidratos; c) Que existen amplias posibilidades de que otras fracciones proteicas del intestino puedan comportarse como antigénicas e inmunoprotectoras; d) Que las fracciones asociadas a membrana se localizan en la superficie de la misma; e) Que la reacción antígeno-anticuerpo sucede a nivel de las células digestivas y f) Que los trabajos citados en este documento, no son definitivos en lo que se refiere a la investigación acerca del desarrollo de una vacuna anti-garrapata.

Por los antecedentes existentes, cabe la posibilidad de intentar la identificación de otras fracciones presentes en el intestino de Boophilus microplus, para tener elementos científicos en cuanto a la abundancia y ciertas características de las mismas que puedan considerarse como punto de partida para subsecuentes trabajos con el objeto de

evaluar su capacidad antigénica e inmunoprotectora ya sea como fracción única o como parte de una combinación de fracciones.

1.5. Justificación.

El problema de la infestación por la garrapata del ganado bovino Boophilus microplus y los efectos subsecuentes en la salud animal y en la economía pecuaria nacional son considerables, los medios utilizados para ejercer el control del mismo se han enfocado principalmente a la aplicación de compuestos químicos con propiedades acaricidas, de diversas familias y por diferentes vías de administración, lo cual con el paso del tiempo y su inadecuado manejo en cuanto a dosificación e intervalos de aplicación, entre otros factores, han provocado la aparición del fenómeno de resistencia hacia algunos compuestos acaricidas en diversas poblaciones de garrapata Boophilus microplus, con lo cual resulta evidente que la estrategia en el control a la infestación por este ectoparásito se ha complicado.

Ante tal situación, la aplicación de medidas de control de tipo biológico e inmunológico, deben de ser consideradas como elementos activos que coadyuven en el propósito de alcanzar el objetivo de establecer las medidas que conduzcan al establecimiento de un control integral en este grave problema de salud animal.

La inmunización como una alternativa en el control de la infestación por garrapatas en los animales domésticos, especialmente en el ganado bovino, ha recibido particular atención en los últimos tiempos debido a las ventajas que su

uso podría tener en el control integral de esta importante ectoparasitosis.

Los estudios de la respuesta inmune adquirida en infestaciones naturales han permitido tener las bases científicas para planear y llevar a cabo diversos experimentos de inmunoprofilaxis en diferentes modelos de animales y garrapatas.

La garrapata de los bovinos, Boophilus microplus, es el modelo más estudiado en la actualidad, conociéndose de manera detallada diversos aspectos de la respuesta inmune adquirida natural y artificialmente. Los resultados de las investigaciones realizadas en este modelo son alentadores pero no concluyentes, aún para el grupo principal de investigadores que las generó. La evaluación de campo y la posible combinación de varios antígenos son elementos en espera de experimentarse y analizarse.

Al respecto, diversas proteínas de superficie de intestino de la garrapata Boophilus microplus, han sido utilizadas para llevar a cabo investigaciones enfocadas a su uso como posibles agentes inmunoprofilácticos; a la fecha se han reportado en la literatura algunas proteínas con características antigénicas, pero esto no limita las perspectivas que puede tener el identificar otras proteínas del intestino y conocer algunas de sus características, lo cual puede brindar elementos complementarios en la búsqueda de una vacuna anti-garrapata.

El desarrollo de este trabajo en México es incipiente, pero debido a que la realidad del país no escapa a la que se vive en otras regiones geográficas del mundo, afectadas por B. microplus, es necesario desarrollar trabajos de investigación que permitan generar infraestructura tecnológica y científica que apoyen las acciones tendientes a encontrar una vacuna anti-garrapata.

El presente trabajo de investigación representa un primer esfuerzo en la tarea antes mencionada y tuvo como objetivo general el identificar y definir algunas características de varias proteínas de superficie del intestino de la garrapata Boophilus microplus.

1.6. Hipótesis.

Pueden existir varias proteínas, aún no identificadas, en la superficie del intestino de la garrapata Boophilus microplus, con características antigénicas.

1.7. Objetivos y metas.

Objetivos.

1) Realizar la identificación y localización de varias proteínas de superficie del intestino de la garrapata Boophilus microplus.

2) Caracterizar inmunoquímicamente varias proteínas de superficie del intestino de la garrapata Boophilus microplus.

Metas.

1) Caracterizar, al menos, una proteína de superficie de intestino de la garrapata Boophilus microplus.

II. MATERIAL Y METODOS .

2.1. GARRAPATAS Boophilus microplus.

2.1.1. Reproducción del ciclo biológico en condiciones controladas.

Se utilizaron garrapatas Boophilus microplus, de la cepa "Zapata" (Tick Research Laboratory, McAllen, Texas, ARS), libre de Babesia spp y sensible a compuestos acaricidas del grupo de los organofosforados y de los piretroides.

La cepa se mantuvo por pase en bovinos jóvenes de la raza Holstein, de aproximadamente 90 Kg. de peso, originarios de una zona libre de garrapata Boophilus microplus (Querétaro, Qro.). Los animales se alojaron en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del INIFAP-SAGDR (CENID-PAVET), localizadas en Jiutepec, Mor. Al arribo de cada animal utilizado para este fin, se aplicó un tratamiento en contra de parásitos internos y externos, y se dejó 20 días alojado en un corral individual para su adaptación ambiental.

Se realizó para cada ocasión, una infestación libre con 10,000 larvas maduras (7 a 10 días de edad) de Boophilus microplus cepa "Zapata", distribuidas en el dorso del animal (42).

A partir de este momento, el bovino se mantuvo alojado en una corraleta individual con yugo localizada en la zona de corrales de aislamiento del CENID-PAVET.

Se llevó a cabo la supervisión diaria de la infestación y se registraron los diferentes eventos sucedidos en el desarrollo de la misma. A partir del día 21 post-infestación, se colectaron hembras ingurgitadas. Estas se llevaron al laboratorio, se lavaron con agua destilada, se colocaron en cajas de Petri de plástico, nuevas (25 hembras por caja), se identificaron y se incubaron a 28 C y 90 % de humedad relativa (H.R.) en una incubadora de baja temperatura (Fisher Scientific, Co.) para esperar la oviposición; una vez que sucedió esto, se colectaron masas ovígeras que se depositaron en viales con 500 mg de huevos y se incubaron a 28 C y 90% de H.R. en una incubadora de baja temperatura (Fisher Scientific, Co.) para esperar la eclosión y maduración de las larvas, quedando así lista una nueva generación de garrapatas para ser utilizada en una siguiente infestación (55).

Una vez terminada la colecta de hembras ingurgitadas, el bovino fue tratado con un baño ixodicida y se retiró del área de aislamiento.

Para el presente estudio, se colectaron, en forma manual, hembras adultas semirepletas de 4 a 6 mm de largo, las mismas se lavaron con agua destilada, se depositaron en cajas de Petri desechables y se procesaron de acuerdo al protocolo indicado en cada experimento .

2.1.2. Monitoreo de Babesia spp en la cepa.

La cepa "Zapata" de garrapatas Boophilus microplus, libre de Babesia spp, fue monitoreada, en cada infestación, para verificar que se mantuviera libre de dicho hemoparásito, esto se realizó mediante la técnica del examen de hemolinfa de garrapata (108). Por otra parte, a los bovinos se les practicó la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), para Babesia spp, previo a la infestación (56).

2.1.3. Monitoreo toxicológico en la cepa.

Se llevó a cabo el monitoreo toxicológico de la cepa "Zapata" de garrapatas B. microplus, por una sola ocasión y con el objetivo de verificar su situación en este aspecto, utilizando la técnica de Paquete de Larvas, para un compuesto organofosforado (Coumaphós) y para un compuesto piretroide (Deltametrina), siguiendo la metodología recomendada al respecto, por la FAO (42), considerándose sensible cuando la mortalidad de larvas fue mayor del 90% a las concentraciones comerciales recomendadas para ambos productos.

2.2. ELECTROFORESIS.

2.2.1. Características generales.

Se llevaron a cabo electroforesis en geles de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con Duodecil-Sulfato de Sodio (SDS-PAGE), utilizando un sistema de corrimiento en amortiguador discontinuo de Tris-Glicina-SDS, pH 7.2 , de acuerdo con lo descrito por Laemmli (69).

El gel iniciador se preparó a una concentración del 4% ; el gel resolutivo se utilizó en concentraciones del 8% y 10%, en los primeros experimentos, posteriormente sólo se preparó al 8 % (52).

Se utilizó una cámara de electroforesis vertical (Tall Mighty Small, Hoefer SE280) con una longitud del gel de 11 cms, el grosor de las placas de gel fue de .75 y de 1.5 mm, de acuerdo con las necesidades de cada experimento.

Para llevar a cabo el corrimiento se contó con una fuente de poder de corriente alterna (Hoefer PS1500), las corridas se realizaron a diferentes velocidades, generalmente a 65 V, en el gel iniciador y de 130 V, en el resolutivo.

Las muestras que se sometieron a electroforesis SDS-PAGE, se procesaron de acuerdo con el protocolo indicado para cada experimento; el amortiguador de muestra se preparó de acuerdo a lo indicado por Hames (51), tanto para condiciones no reductoras (Tris-Glicina-SDS) como para condiciones

reductoras (Tris - Glicina - SDS - 2 - mercaptoetanol), invariablemente se utilizaron lotes frescos del mismo.

2.2.2. Tinción de los Geles.

Una vez realizadas las electroforesis SDS-PAGE, se tiñeron con Azul de Comassie y con Nitrato de Plata (52).

2.2.3. Pesos Moleculares.

Se utilizó en la electroforesis SDS-PAGE, un marcador de peso molecular preteñido (Sigma Chemical, Co.), compuesto por tres proteínas conocidas (subunidades), que fueron: B galactosidasa de E. coli (P.M. 116 kDa), Piruvato Kinasa de músculo de pollo (P.M. 58 kDa) y Triosafosfato isomerasa de músculo de conejo (P.M. 26.6 kDa).

Para conocer el peso molecular aparente de las proteínas observadas en los diferentes experimentos se determinó inicialmente la pendiente de una curva de referencia con base al logaritmo base 10 versus movilidad relativa de los marcadores citados, a partir de esta curva, se despejó la variable peso molecular para cada proteína observada (51); estos cálculos se realizaron con el programa Cricket Graph en una computadora Macintosh.

2.3. DETERMINACION DE PROTEINA.

La concentración de proteína de las muestras utilizadas en los diferentes experimentos, fue determinada por el método de Lowry (45); los patrones para calibrar la curva de referencia se realizaron con albúmina sérica bovina fracción V (Sigma Chemical, Co.). Los cálculos al respecto se llevaron a cabo con el programa Harvard Graphics en una computadora PC-IBM.

2.4. TITULACION DE SUEROS.

Los sueros de conejo utilizados en los diferentes experimentos de la investigación, se titularon por la técnica de Dot blot (118, 119), con algunas particularidades.

Se colocaron 2 ul de antígeno, el mismo que se usó para producir los anticuerpos presentes en el suero a titular, en una porción de papel de nitrocelulosa (0.45 u) y se bloqueó con leche descremada al 1% (Svelty 1%, Nestle) preparada en Solución Amortiguadora de Fosfatos-SAF- (Na_2HPO_4 , 8.1 mM; KH_2PO_4 , 1.47 mM; KCl , 2.68 mM; NaCl 150 mM) pH 7.2, por 15 minutos. Después se lavó con SAF y se prepararon seis diluciones dobles seriadas a partir de 1:100 del suero a titular, dejándose a incubar 30 minutos a temperatura ambiente y agitación suave.

Posteriormente se realizaron tres lavados con SAF-Tween 0.01% (v/v) y se incubaron, por 30 minutos a temperatura ambiente y

agitación suave, con un suero policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical, Co.) a una dilución de 1:20000 (recomendada por el fabricante). Al finalizar este paso se realizaron cinco lavados con SAF-Tween y se procedió a evidenciar la reacción inmunológica con la aplicación del sustrato, Bromocloro Indolil Fosfato-Nitroazul Tetrasolium (BCIF-NAT) premezclado (Sigma Chemical, Co.), la cual fue evidente en aproximadamente 5 minutos, los papeles de nitrocelulosa se retiraron del sustrato y se dejaron secar a temperatura ambiente.

El título de los sueros se eligió bajo un criterio subjetivo de calificación visual cuando la mancha de color morado fue nítida y repetible.

2.5. FASE A.

OBJETIVO: Obtención del patrón electroforético de las proteínas de intestino de garrapata B. microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).

2.5.1. Experimento 1.

Los intestinos fueron procesados en cuatro diferentes formas con objeto de observar su comportamiento electroforético y elegir aquel proceso que mostrara mejor resolución y manejo más simple.

2.5.1.(a) Obtención de extractos de intestino.

Se tomaron garrapatas Boophilus microplus, hembras semirepletas de 4 a 6 mm de largo, provenientes del cultivo en bovino; se fijaron en parafina y se disectaron para obtener intestinos, los cuales fueron depositados en SAF fría pH 7.2 , adicionada de 10mM. de EDTA disódico (SAF-EDTA).

Los cuatro diferentes procesos a que se sometieron los intestinos fueron:

Proceso 1. Los intestinos obtenidos anteriormente, se maceraron en mortero frío, adicionado de SAF-EDTA en cantidad necesaria, el macerado se depositó en viales de poliestireno y se congeló a - 70 C.

Proceso 2. Los intestinos se procesaron como se indicó en el punto anterior y posteriormente el macerado se sometió a centrifugación en frío (4 C) a 600 g por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, éste se depositó en viales de poliestireno y se congeló a - 70 C.

Proceso 3. Los intestinos obtenidos por disección se maceraron en mortero frío como ya fue descrito, el macerado se centrifugó en frío a 600 g durante 10 minutos y el sobrenadante se volvió a centrifugar en frío a 1,200 g por 20 minutos, se separó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con SAF-EDTA, el mismo se depositó en viales de poliestireno y se congeló a - 70 C.

Proceso 4. Se llevó a cabo la metodología descrita anteriormente (proceso 3), el sobrenadante producto de la

segunda centrifugación se volvió a someter a este proceso, ahora a 14,000 g por 2 minutos, recuperándose únicamente el sedimento, el mismo se resuspendió con SAF-EDTA y se congeló a - 70 C.

2.5.1.(b) Electroforesis SDS-PAGE.

Se realizaron electroforesis SDS-PAGE (69), para ello se utilizaron las muestras provenientes de los procesos descritos anteriormente; se calculó previamente la concentración de proteína de cada muestra por el método de Lowry (45), ajustando la concentración de proteína a 5 mg/ml.

Las muestras se prepararon bajo condiciones reductoras y no reductoras (51) y se usaron geles resolutivos al 8 % y al 10 %; la tinción de los geles se realizó con Azul Comassie y con Nitrato de Plata (52).

2.5.1.(c) Controles.

Se utilizaron como controles del corrimiento, muestras en diluciones adecuadas, de sangre completa de bovino, debido a la presencia de componentes sanguíneos en el contenido intestinal de las garrapatas.

2.5.2. Experimento 2.

El macerado completo de intestinos fue sometido a electroforesis SDS-PAGE, para identificar el patrón electroforético de sus proteínas.

2.5.2.(a) Obtención de extractos de intestino.

Para este experimento se obtuvieron intestinos de garrapatas B. microplus por disección y se prepararon de acuerdo con el proceso 1, descrito en el inciso 2.5.1.(a), es decir, macerado completo de intestinos en SAF-EDTA.

2.5.2.(b) Electroforesis SDS-PAGE.

Las muestras de macerado completo de intestino se prepararon para SDS-PAGE (69) bajo condiciones no reductoras (51), utilizando un gel iniciador al 4 % y uno resolutivo al 8 % (52); se calculó la concentración de proteína de las muestras por el método de Lowry (45) y se ajustó la misma a 5 mg/ml.

Asimismo, se tuvo un carril control con sangre completa de bovino; se utilizó un marcador de peso molecular preteñido. La tinción de los geles se realizó con Nitrato de Plata (52).

2.5.3. Experimento 3.

El macerado de intestinos sin contenido intestinal fue sometido a electroforesis SDS-PAGE, para identificar el patrón electroforético de sus proteínas.

2.5.3.(a) Obtención de extractos de intestino.

Se obtuvieron intestinos por disección como ya fue descrito anteriormente, éstos se depositaron en SAF-EDTA y se les desalojó de manera mecánica, por tracción suave, el contenido intestinal, el intestino se depositó en SAF-EDTA recién preparada. Posteriormente, se maceraron en mortero frío y se congelaron en viales de poliestireno a - 70 C.

Previo a la electroforesis, se calculó la concentración de proteína por el método de Lowry (45) y se ajustó la misma a 5 mg/ml.

2.5.3.(b) Electroforesis SDS-PAGE.

Las muestras se sometieron a electroforesis SDS-PAGE (69), con un gel resolutivo al 8 % (52), preparando las mismas bajo condiciones no reductoras (51). En el mismo gel se corrió un marcador de peso molecular preteñido. La tinción de los geles se realizó con Nitrato de Plata (52).

2.6. FASE B.

OBJETIVO: Identificación de las proteínas asociadas con azúcares del intestino de garrapata B. microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).

2.6.1.(a) Obtención de extractos de intestino.

Se obtuvieron intestinos por disección y se procesaron de acuerdo con lo descrito en el inciso 2.5.3.(a).

2.6.1.(b) Detección por inmunoensayo enzimático de azúcares en glicoconjugados.

El ensayo consistió en la detección de glicoconjugados en una membrana de nitrocelulosa, para ello las proteínas debieron de ser primero sometidas a SDS-PAGE y electrotransferidas a la membrana.

En esta forma, las muestras de intestinos preparadas en condiciones no reductoras (51), se sometieron a electroforesis SDS-PAGE (69), en un gel resolutivo al 8 % (52). En el mismo gel se corrieron un marcador de peso molecular preteñido y como control de glicoproteína, transferrina, en una concentración de 1 mg/ml, la cual fue proporcionada en el paquete comercial (DIG Glycan Detection Kit, Boehringer Mannheim Biochemica), que se utilizó como apoyo al desarrollo de esta fase de la investigación.

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a electrotransferir las proteínas de intestino y el control a una membrana de nitrocelulosa (0.45 u), utilizando un amortiguador de transferencia de tris, 25 mM - glicina, 192 mM - metanol, 20% (33, 118). La electrotransferencia se llevó a cabo a 150 mA por 22 horas.

La membrana con las proteínas inmovilizadas, se lavó con Solución Amortiguadora de Fosfatos (Fosfato de potasio, 50 mM; NaCl, 150 mM) pH 6.5, y se oxidó con metaperiodato de sodio, 10 mM/l (proporcionado en el paquete), en amortiguador de acetato de sodio (Acetato de sodio 100 mM) pH 5.5 ajustado con ácido acético; después se lavó tres veces en Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 6.5, y se incubó con 1 ul de digoxigenina (proporcionada en el paquete) disuelta en 5 ml de amortiguador de acetato de sodio pH 5.5, por una hora, a temperatura ambiente para marcar las glicoproteínas oxidadas.

Posteriormente, se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con amortiguador tris salino -ATS- (Tris-HCl, 0.05 mM; NaCl, 150 mM) pH 7.5, y se incubó por 30 minutos en solución de bloqueo (proporcionada en el paquete), repitiéndose después los tres lavados con ATS. A continuación la membrana se incubó por una hora con un suero policlonal de ovino anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina (proporcionado en el paquete), 10 ul del conjugado en 10 ml de ATS. Finalizado este tiempo, se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno con ATS y se aplicó el sustrato, BCIF-NAT, premezclado (Sigma Chemical, Co.), a la membrana para

evidenciar la reacción, consistente en la aparición de bandas de coloración morada.

Después de dos horas, se detuvo la reacción lavando la membrana con agua bidestilada, se dejó secar a temperatura ambiente y se fotografió para, posteriormente, calcular los pesos moleculares aparentes de las bandas observadas de acuerdo con lo descrito en el inciso 2.2.3.

2.7. FASE C.

OBJETIVO: Detección de antígenos de intestino de garrapata B. microplus, semi-ingurgitadas (4 a 6 mm de largo), por Inmunoelectrotransferencia.

2.7.1. Experimento 1.

El macerado de intestinos sin contenido intestinal se sometió a Inmunoelectrotransferencia, para detectar los antígenos de intestino.

2.7.1.(a) Obtención de extractos de intestino.

Se obtuvieron intestinos por disección y se procesaron de acuerdo con lo descrito en el inciso 2.5.3.(a).

2.7.1.(b) Producción de antisueros.

Para esta etapa del trabajo, se llevó a cabo la producción de los siguientes antisueros:

(C1) suero de conejo anti-intestino de B. microplus homólogo.

Se inocularon dos conejos de raza Nueva Zelanda, jóvenes de aproximadamente 2.5 kg de peso, con un macerado de intestinos obtenido como se indicó anteriormente. Al macerado se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (45), y se ajustó la misma a 1 mg/ml.

El esquema de inmunización practicado fue el siguiente: La primera inoculación (día 0), se aplicó macerado, 1 ml, adicionado de Adyuvante Completo de Freund, 1 ml; 2a. inoculación (día 7), macerado, 1 ml, adicionado de 1 ml de Adyuvante Incompleto de Freund; 3a. inoculación (día 14), macerado; 1 ml, adicionado de 1 ml de SAF.

Todos los inóculos se aplicaron por vía subcutánea en 4 diferentes puntos del cuerpo del animal, utilizando equipo nuevo estéril. La dosis de macerado aplicado a cada animal fue de 1 mg/ml en cada una de las tres inoculaciones, y se utilizaron preparados frescos.

El día 28 posterior a la primera inoculación, los conejos se sangraron por punción cardiaca con equipo vacutainer nuevo, posteriormente se separó el suero.

Este suero se sometió a una cromatografía de inmunoadfinidad (52), en Sepharosa 4B (Sigma Chemical, Co.), sensibilizada con sangre completa de bovino hemolizada, con

objeto de separar del suero de conejo posibles anticuerpos en contra de componentes sanguíneos del bovino, que pudieran haber estado presentes en el macerado de intestinos que se inoculó. Posteriormente, el suero se tituló mediante la técnica de Dot blot (descrita en el inciso 2.4.), y se almacenó en viales de poliestireno a - 20 C.

(C2) suero de conejo anti-glóbulos rojos de bovino.

Se inocularon dos conejos de raza Nueva Zelanda, jóvenes de aproximadamente 2.5 kg de peso, con glóbulos rojos de un bovino sano de raza Holstein que nunca había tenido contacto con garrapatas y libre de Babesia spp, esto último verificado por frotis de sangre e IFI (56).

Se procedió a realizar un esquema de inmunización similar al descrito anteriormente para el suero anti-intestinos (C1).

Se colectó sangre de los conejos el día 28 posterior a la primera inoculación por punción cardiaca, con equipo vacutainer nuevo, se separó el suero y éste se tituló por la técnica de Dot blot (descrita en el inciso 2.4.), se almacenó en viales de poliestireno y se congeló a - 20 C.

(C3) suero de conejo anti-suero completo de bovino.

En este caso, se procedió a la compra del antisuero en una casa comercial (anti whole serum bovine, Sigma Chemical, Co.), el mismo se tituló también por la técnica de Dot blot (descrita en el inciso 2.4.), se almacenó en viales de poliestireno y se congeló a - 20 C.

2.7.1.(c) Inmunoelectrotransferencia (IET).

Para esta parte del experimento, se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE (69), de acuerdo con lo descrito en los incisos 2.5.3.(a) y (b).

El gel obtenido, sin haberse teñido, se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa (0.45u), utilizando un amortiguador de tris-glicina-metanol (33, 118), la transferencia se verificó a 150 mA por espacio de 22 horas.

La membrana se bloqueó en leche descremada al 1 %, por 30 minutos, después se lavó con SAF-Tween y se dejó secar a temperatura ambiente.

La membrana se recortó en tiras de aproximadamente 3 mm de ancho y se colocaron en una caja de incubación de 10 canales; se incubaron por una hora a temperatura ambiente y agitación suave, dos tiras por antisuero, C1, C2 y C3, preparados momentos antes a las diluciones determinadas por el Dot blot. Posteriormente se lavaron tres veces en SAF-Tween y se incubaron por una hora a temperatura ambiente y agitación suave con un suero policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical, Co.) a una dilución de 1:20000 (recomendada por el fabricante).

Al finalizar este tiempo, se realizaron tres lavados con SAF-Tween y se aplicó el sustrato, BCIF-NAT, premezclado (Sigma Chemical, Co.), a las tiras de membrana para evidenciar la reacción inmunológica, consistente en la aparición de

bandas de color morado, ésta se hizo manifiesta en aproximadamente 5 minutos, se retiraron del incubador y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente.

Mas tarde, se fotografiaron y se llevó a cabo el cálculo de los pesos moleculares aparentes de la forma en que fue descrita en el inciso 2.2.3.

Como control de la electroforesis, se separó y se tiñó una porción del gel, asimismo, para verificar la calidad de la electrotransferencia, se tiñó el gel una vez terminada la misma, en ambas ocasiones se utilizó tinción de Nitrato de Plata (52).

2.7.2. Experimento 2.

Se procesó el macerado de intestinos sin contenido intestinal para someterlo a Inmunolectrotransferencia y verificar los resultados del experimento 1, de esta fase, y aumentar la concentración de los antígenos detectados.

2.7.2.(a) Obtención de extractos de intestino.

Se obtuvieron intestinos por disección y se procesaron de acuerdo con lo descrito en el inciso 2.5.3.(a).

2.7.2.(b) Producción de antisueros.

Para esta etapa del trabajo, se produjeron antisueros en contra de las proteínas, antígenos, detectados por IET en el

experimento anterior (2.7.1.); para esto se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE (69), como se describió en el inciso 2.5.3.(b), utilizando un peine de un sólo carril ciego y un gel de espesor 1.5 mm, depositando una muestra de intestinos en concentración de 5 mg/ml, determinada previamente por el método de Lowry (45).

Al finalizar el corrimiento se separó y se tiñó una porción del gel con Azul Comassie (52), y de acuerdo con la posición de las bandas en relación al patrón electroforético de la muestra, se dividió el gel en tres porciones, la primera conteniendo bandas de alto peso molecular > 140 kDa, la segunda con bandas de mediano peso molecular en un rango de los 140 a los 50 kDa y la tercera con bandas por abajo de los 50 kDa, que se desechó debido a que las proteínas importantes detectadas en IET se hallaban arriba de dicho peso.

Cada una de las porciones del gel, contenían las proteínas de alto peso molecular (PAPM) y otra con las de mediano peso molecular (PMPM), se fraccionaron en pequeñas porciones y posteriormente se trituraron pasándolas a través de dos jeringas desechables unidas por un emulsificador metálico estéril, adicionándole la cantidad necesaria de SAF para hacer una adecuada suspensión y obtener un volumen final de 2 ml.

Se inocularon dos conejos de raza Nueva Zelanda, jóvenes de aproximadamente 2.5 kg de peso, para cada preparado (PAPM Y PMPM). El esquema de inmunización practicado en esta

ocasión fue similar al descrito en el inciso 2.7.1.(b), la dosis de preparado que se aplicó a cada animal fue de 1 mg/ml de proteína, en cada una de las tres inoculaciones realizadas.

Los conejos se sangraron de acuerdo con lo descrito en el inciso 2.7.1.(b), se obtuvieron las muestras sanguíneas y se separaron los sueros, que se identificaron como anti-PAPM y anti-PMPM; los mismos se titularon por la técnica de Dot blot (descrita en el inciso 2.4.), y después se almacenaron en viales de poliestireno a - 20 C.

2.7.2.(c) Inmunoelectrotransferencia.

Se realizó la IET de acuerdo con lo descrito en el inciso 2.7.1.(c). En el presente ensayo únicamente cambió el hecho de que las tiras de membrana se incubaron con los sueros anti-PAPM y anti-PMPM, a las diluciones determinadas por el Dot blot respectivo. Como control se utilizó un corrimiento de suero bovino hemolizado, que se electrotransfirió y se enfrentó a los sueros citados.

2.8. FASE D.

OBJETIVO: Detección de antígenos comunes entre larvas maduras e intestinos de garrapata B. microplus, por Inmuno-electro-transferencia.

2.8.1.(a) Obtención de macerado de larvas.

Se tomaron 500 mg. de larvas maduras de B. microplus cepa "Zapata", obtenidas del cultivo en bovino, las mismas se congelaron a - 20 C y después se maceraron en mortero frío adicionadas de SAF pH 7.2 fría; al macerado se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (45), y se ajustó a 5 mg/ml. La muestra obtenida se almacenó en viales de poliestireno y se congeló a - 20 C.

2.8.1.(b) Producción de antisueros.

Para esta etapa, se siguió el procedimiento descrito en el inciso 2.7.2.(b), con la variante de que la muestra utilizada fue el macerado de larvas obtenido en el inciso 2.8.1.(a).

En este caso, los sueros producidos se identificaron como anti-larvas de alto peso molecular (LAPM) y anti-larvas de mediano peso molecular (LMPM).

2.8.1.(c) Inmunoelectrotransferencia.

Se realizó la IET de acuerdo con lo descrito en el inciso 2.7.1.(c). En el presente ensayo, las variantes fueron las siguientes: la muestra sometida a electroforesis SDS-PAGE y electrotransferida, fue un macerado de larvas obtenido como se indicó en el inciso 2.8.1.(a), éste se incubó con los sueros anti-LAPM y anti-LMPM, y con los sueros anti-PAPM y anti-PMPM.

Por otra parte, se electrotransfirió también una muestra de macerado de intestinos obtenidos como se describió en el inciso 2.5.3.(a), y se incubó con los sueros mencionados anteriormente.

2.9. FASE E.

OBJETIVO: Detección de los antígenos de intestino de garrapata B. microplus mediante inmunohistoquímica.

2.9.1. Experimento 1.

Reconocer la estructura histológica del intestino de la garrapata B. microplus, hembra semi-ingurgitada de 4 a 6 mm de largo.

2.9.1.(a) Histología del intestino de B. microplus.

Se tomaron garrapatas semirepletas de 4 a 6 mm de largo del cultivo en bovino, se lavaron con agua destilada y se procesaron para realizar su inclusión en parafina, en glicol metacrilato y por congelación. Por otra parte, otras garrapatas fueron fijadas en una placa de cera y se procedió a disectar piezas grandes de intestino, las cuales se procesaron en la misma forma para su inclusión.

En el caso de la inclusión en parafina (IP), los especímenes se fijaron en solución acuosa de Bouin's por 24 horas (3), después se deshidrataron y aclararon por pasos de gradiente en etanol-aceite de cedro (35) y posteriormente se realizó su inclusión en paraplast regular (Sigma Chemical, Co.).

Para la inclusión en glicol metacrilato (GMA), se fijaron los especímenes en solución de Karnovsky a 4 C por 24 horas (21) , después se procesaron de acuerdo con lo indicado por el paquete comercial utilizado para este fin (GMA-LM Kit, Sigma Chemical, Co.).

En el caso de la inclusión por congelación (IC), los especímenes se refrigeraron durante dos horas y posteriormente se fijaron en una cápsula de gelatina al 12% , después, se procedió a congelarlos mediante su paso de - 4 C a - 20 C (6).

Los cortes se realizaron en microtomo de rotación (American Optical, Co.) con navajas de acero inoxidable para

los especímenes de IP y GMA, cortes longitudinales de 4u y 1u, respectivamente; en el caso de IC, se realizaron cortes longitudinales de 6u, en microtomo de congelación-criostato (American Optical, Co). Todos los cortes se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (15).

2.9.2. Experimento 2.

Detección de antígenos en cortes histológicos por Inmunofluorescencia Indirecta.

2.9.2.(a). Inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.).

Para llevar a cabo esta prueba, se realizaron cortes histológicos longitudinales de 6u por congelación, como ya fue descrito en el inciso 2.9.1.(a), tanto de garrapatas como de piezas intestinales.

La prueba de IFI, se verificó de acuerdo con lo indicado por Kawamura (62), con algunas modificaciones.

Las preparaciones histológicas se fijaron con etanol al 100 % por cinco minutos, después de secarse a temperatura ambiente se incubaron con el suero a probar por treinta minutos en cámara húmeda a 37 C. Los sueros probados fueron el anti-intestino homólogo (C1), el anti-proteínas de intestino de alto peso molecular (PAPM) y el anti-proteínas de intestino de mediano peso molecular (PMPM). Los títulos de

los sueros, con los que se realizaron las pruebas, se determinaron previamente después de varios ensayos.

Posteriormente, las preparaciones se sometieron a tres lavados en SAF pH 7.2 de cinco minutos cada uno; luego de secarse a temperatura ambiente, se incubaron con un conjugado de anti-IgG de conejo marcada con fluoresceína (Sigma Chemical, Co.), a 37 C en cámara húmeda durante treinta minutos. Al finalizar este tiempo se llevaron a cabo tres lavados de cinco minutos cada uno en SAF pH 7.2, se dejaron secar a temperatura ambiente, se montaron con glicerina tamponada pH 9.5 y se observaron en microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss), con lámpara de luz ultravioleta de tungsteno (HBO250), utilizando un filtro de barrera que permite detectar la emisión a 520 nm y un filtro de excitación que permite el paso de la luz a 490 nm.

Para montar la prueba, se tuvo un suero de conejo control negativo y uno positivo, determinado este último con el suero C1, después de ensayar la dilución idónea del mismo para considerarlo como positivo.

El conjugado se tituló previamente por la misma prueba inmunohistoquímica a partir de la dilución 1:160 y se determinó que la dilución de 1:80, fue la más apropiada para realizar esta prueba.

En cada prueba invariablemente se consideró un corte histológico confrontado a un suero de conejo control negativo y otro sólo con conjugado.

III. RESULTADOS.

3.1. GARRAPATAS Boophilus microplus.

Reproducción del ciclo biológico en condiciones controladas.

El cultivo de la cepa "Zapata" de garrapatas Boophilus microplus, se llevó a cabo por pase en bovinos susceptibles. En el cuadro No. 1, se puede observar el comportamiento biológico de esta cepa, los datos se recolectaron de 12 infestaciones controladas.

La duración de la fase de vida parásita se situó en un rango de 21 a 22 días, considerándose como promedio los 21.5 días; la duración de la fase de vida no parásita tuvo un rango de 39 a 48 días. El total del ciclo biológico en condiciones controladas fue de 60 a 70 días.

Para el presente estudio, se colectaron garrapatas adultas de 4 a 6 mm de largo, hembras semi-ingurgitadas. En el cuadro No. 2, se puede observar la relación del largo del cuerpo y la edad de la garrapata en días de vida en fase parásita, generalmente el tamaño requerido para este estudio se alcanzó entre el día 19 y 20 de edad en fase parásita.

CUADRO No. 1. COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE <u>Boophilus microplus</u> CEPA "ZAPATA", EN CONDICIONES CONTROLADAS.	
EVENTO	RANGO
FASE PARASITA	21 A 22 DIAS.
FASE NO PARASITA*	39 A 48 DIAS.
PREOVIPOSICION	2 A 4 DIAS.
OVIPOSICION	15 A 17 DIAS.
ECLOSION DE LARVAS	15 A 17 DIAS.
MADURACION	7 A 10 DIAS.
DURACION DEL CICLO	60 A 70 DIAS.

* en el laboratorio (28 C y 90 % de H.R).

CUADRO No. 2. <u>Boophilus microplus</u> : RELACION DE LARGO DEL CUERPO-EDAD EN FASE PARASITA EN CULTIVO CONTROLADO EN BOVINO SUCEPTIBLE.	
DIAS DE EDAD	LARGO DEL CUERPO(mm)
16	2.5
17	3.0
18	3.5
19	4 a 5
20	5 a 6
21 o más	7 a 12

Monitoreo de Babesia spp en la cepa.

La cepa "Zapata", se mantuvo durante el tiempo que llevó el estudio, libre de Babesia spp, hecho verificado en cada infestación tanto por la prueba de hemolinfa de garrapata como por I.F.I., en suero del bovino.

Monitoreo toxicológico en la cepa.

El monitoreo toxicológico indicó que la cepa "Zapata" se conservó sensible a los compuestos acaricidas a los que fue expuesta.

Para el caso de los organofosforados, se realizó el monitoreo con el compuesto Coumaphós, obteniéndose una Dosis Letal 90% de 0.02000 % de ingrediente activo ; en el caso de los piretroides, se utilizó Deltametrina, en donde la Dosis Letal 90%, fue de 0.02500 % de ingrediente activo.

3.2. FASE A : Obtención del patrón electroforético de las proteínas de intestino de garrapata B. microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).

Experimento 1.

Mediante cuatro procesos diferentes, se obtuvieron extractos de intestino de garrapata para someterse a electroforesis SDS-PAGE, bajo las condiciones previamente descritas. Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias apreciables entre los corrimientos electroforéticos obtenidos bajo estos cuatro procesos (Figura No.1).

La presentación de bandas es más uniforme y consistente en geles al 8 %, trabajando las muestras en condiciones no reductoras (Figura No.2).

La tinción de Nitrato de Plata resultó ser más eficiente que la de Azul de Comassie, para detectar las bandas de los corrimientos electroforéticos referidos (Figura No.3).

Al compararse el control utilizado en este experimento, con los corrimientos de extracto intestinal, se observó la existencia de algunas bandas comunes (Figura No.2).

Los resultados de este experimento sirvieron de guía para planear el segundo experimento de esta fase del estudio.

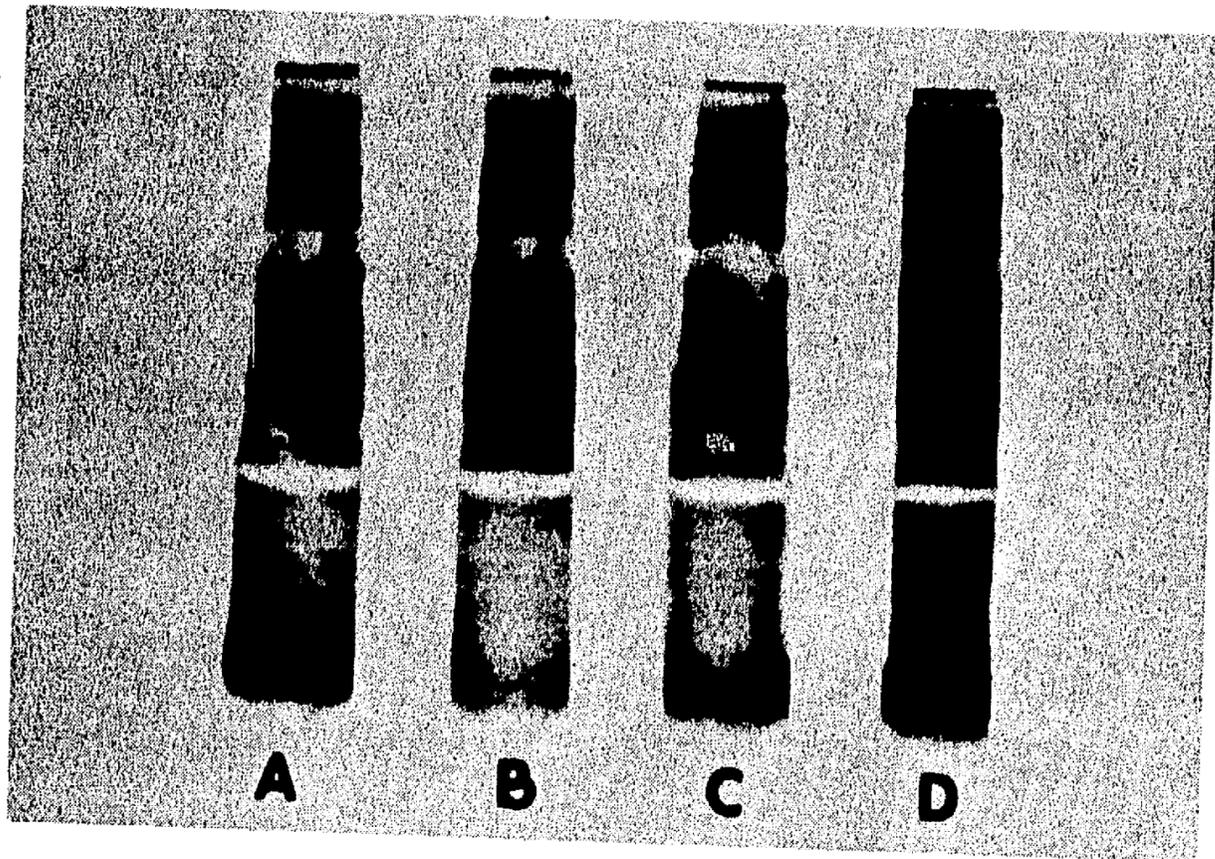


FIGURA No.1. SDS-PAGE de extracto de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo). Carril A: macerado total (Proceso 1), Carril B: primer sobrenadante (Proceso 2), Carril C: segundo sedimento (Proceso 3), Carril D: tercer sedimento (Proceso 4). Gel al 10% en condiciones no reductoras, tinción de Nitrato de Plata.

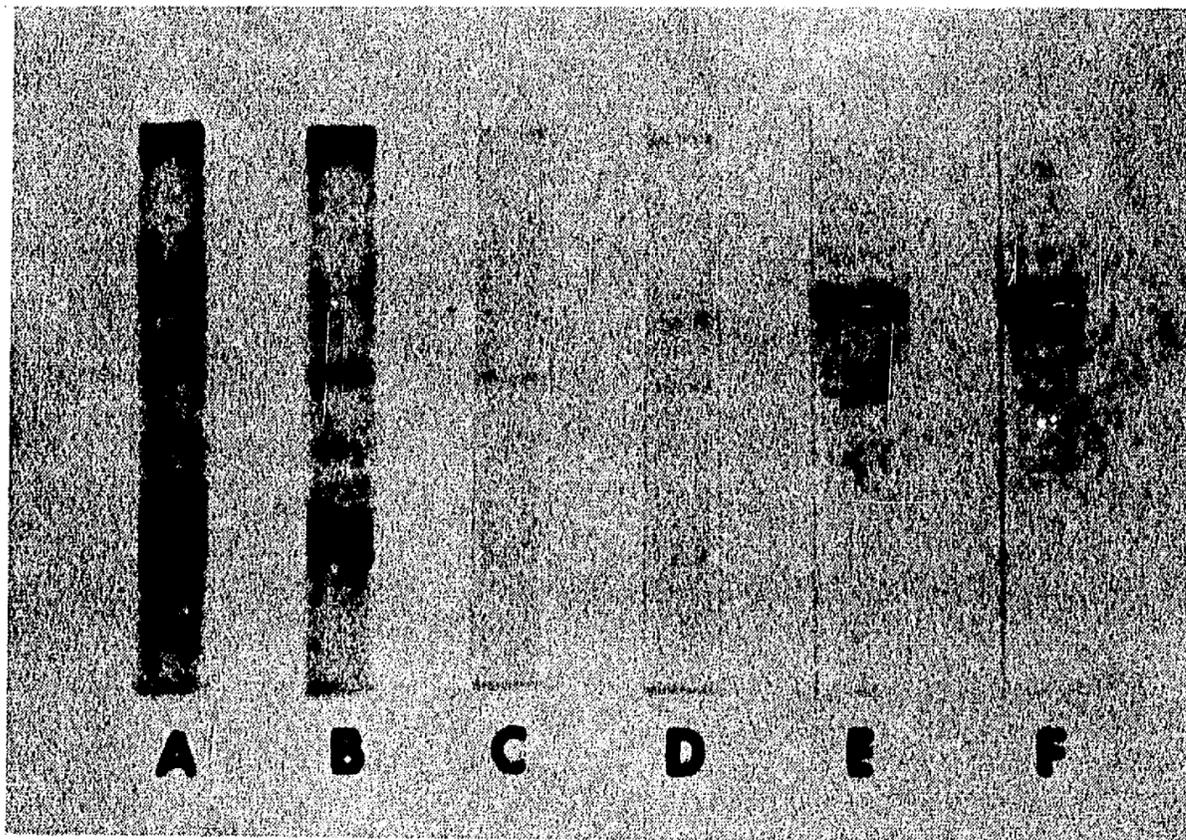


FIGURA No. 2. SDS-PAGE de extracto de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), en gel al 8% en condiciones no reductoras y tinción de Nitrato de Plata.
Carriles A, B, C y D: muestran los procesos 1 a 4, respectivamente, descritos en el experimento 1 (Figura No.1).
Carriles E y F: sangre completa de bovino.

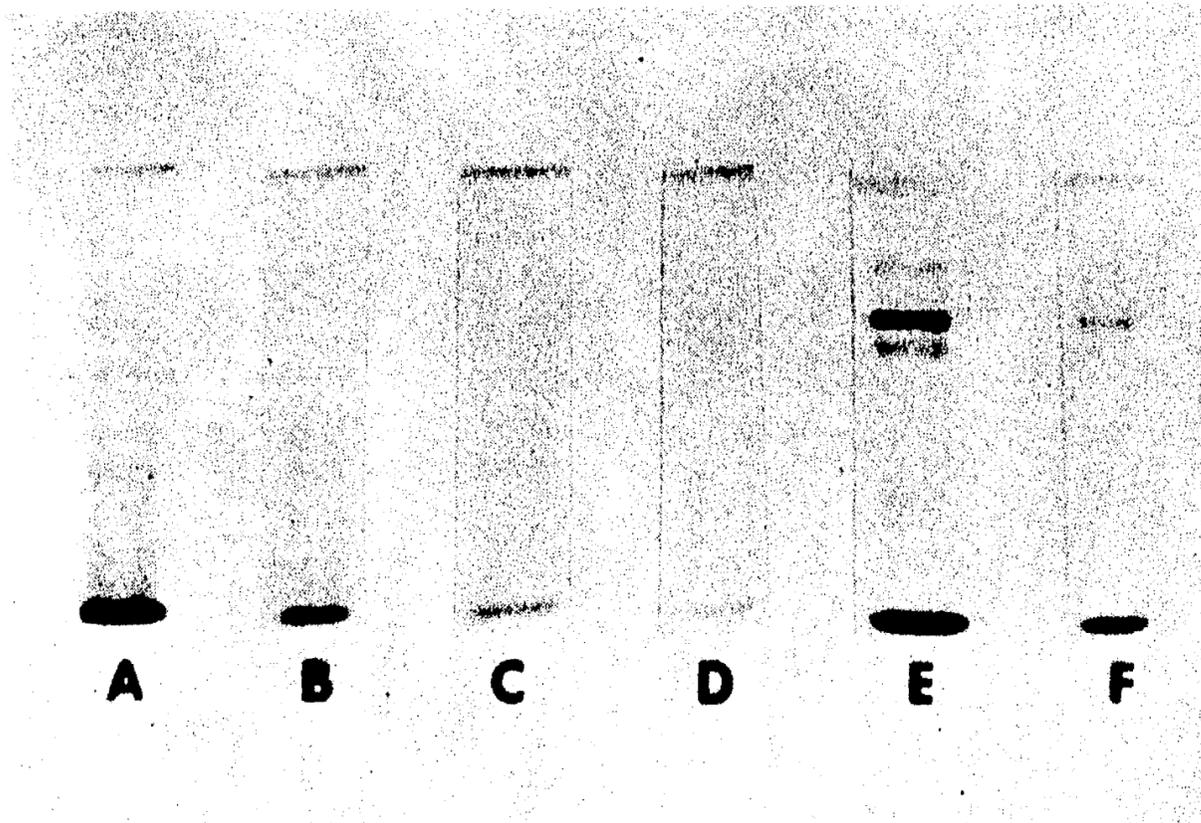


FIGURA No. 3. SDS-PAGE de extracto de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), gel al 8% en condiciones no reductoras y tinción con Azul de Comassie.

Carriles A, B, C y D: muestran los procesos 1 a 4, respectivamente, descritos en el experimento 1 (Figura No.2). Carriles E y F: sangre completa de bovino.

Experimento 2.

Se obtuvo un patrón electroforético de extracto de intestinos (macerado completo), en un gel resolutivo al 8 % y detectado con tinción de Nitrato de Plata, y se identificaron 12 bandas (Figura No.4), con pesos moleculares en un rango de los 27 a los 195 kDa (Cuadro No.3).

Al comparar el control de sangre completa de bovino con el patrón, como era de esperarse, se encontraron 5 bandas comunes bien definidas.

Los resultados de este experimento, mostraron la necesidad de eliminar en alguna forma el contenido intestinal, por lo cual se planeó realizar el tercer experimento de esta fase del estudio.

Experimento 3.

En el patrón electroforético obtenido en este experimento, se identificaron 18 bandas (Figura No.5), con pesos moleculares en un rango de 17 a 258 kDa (Cuadro No.4).

Debido a la eliminación prácticamente total del contenido intestinal y a la repetibilidad del corrimiento mostrada en los múltiples ensayos realizados, la metodología y el patrón electroforético obtenido con ella, se consideraron como definitivos para las siguientes fases del estudio.

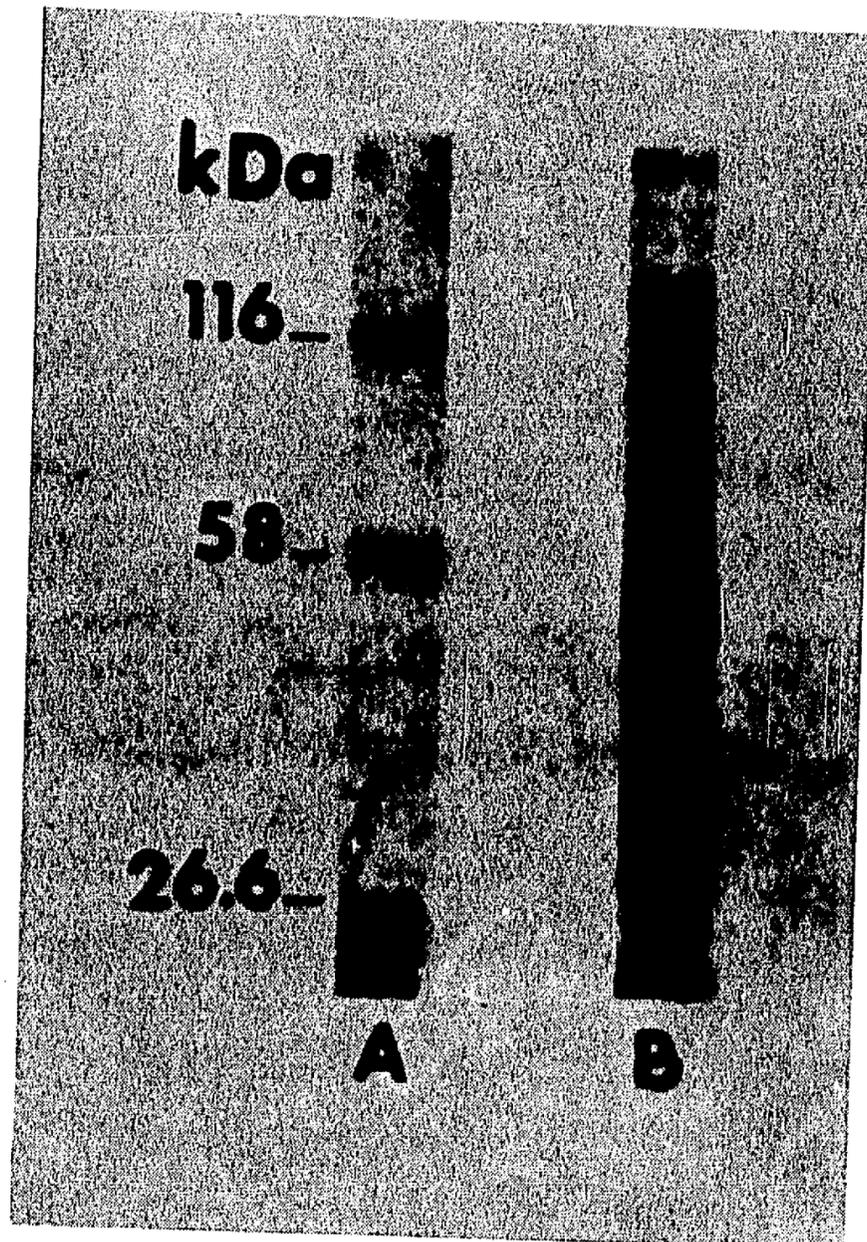


FIGURA No. 4. Patrón electroforético de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), utilizando un macerado completo. Carril A: marcador de peso molecular. Carril B: patrón electroforético teñido con Nitrato de Plata. Gel al 8% en condiciones no reductoras.

CUADRO No.3. Relación de las proteínas identificadas en el patrón electroforético de un extracto intestinal (macerado completo) de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), detectadas con tinción de Nitrato de Plata en un gel SDS-PAGE al 8%, en condiciones no reductoras.

Pesos moleculares (kDa)
195
153
129
107
98
87
75
70
52
49
37
27

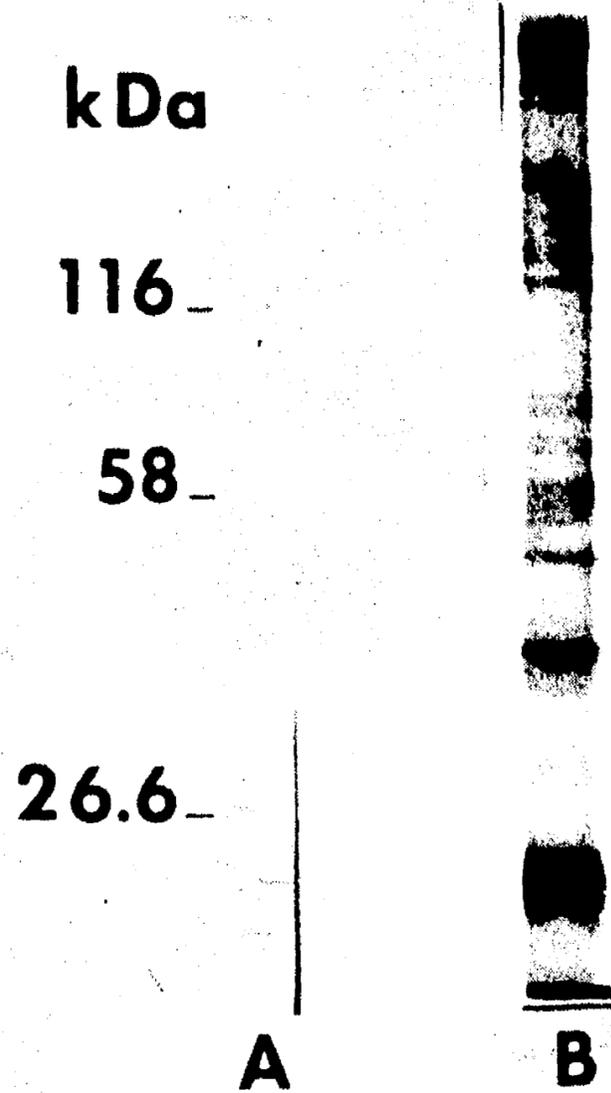


FIGURA No. 5. Patrón electroforético de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), utilizando un macerado sin contenido intestinal. Carril A: marcador de peso molecular. Carril B: patrón electroforético teñido con Nitrato de Plata. Gel al 8% en condiciones no reductoras.

CUADRO No.4. Relación de las proteínas identificadas en el patrón electroforético de un extracto intestinal (macerado sin contenido intestinal) de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), detectadas con tinción de Nitrato de Plata en un gel SDS-PAGE al 8%, en condiciones no reductoras.

Pesos moleculares (kDa)
258
207
149
138
103
77
73
69
67
61
59
56
51
40
30
27
25
17

3.3. FASE B : Identificación de las proteínas asociadas con azúcares del intestino de garrapata B. microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).

El inmunoensayo enzimático practicado en este experimento, permitió identificar que las proteínas del patrón electroforético de extracto de intestino que tienen un peso molecular por arriba de los 58 kDa, se encuentran asociadas con azúcares en glicoconjugados.

En la Figura No.6, se puede apreciar en tres carriles (B, C y D) el corrimiento del extracto intestinal que fue electrotransferido a la membrana de nitrocelulosa y el resultado del inmunoensayo, en donde se observan tres manchones definidos en cada carril situados en similar posición, pero existe reacción positiva en todo el carril arriba de los 58 kDa. En el carril E, el control de glicoconjugado, que fue la transferrina, se muestra con gran claridad.

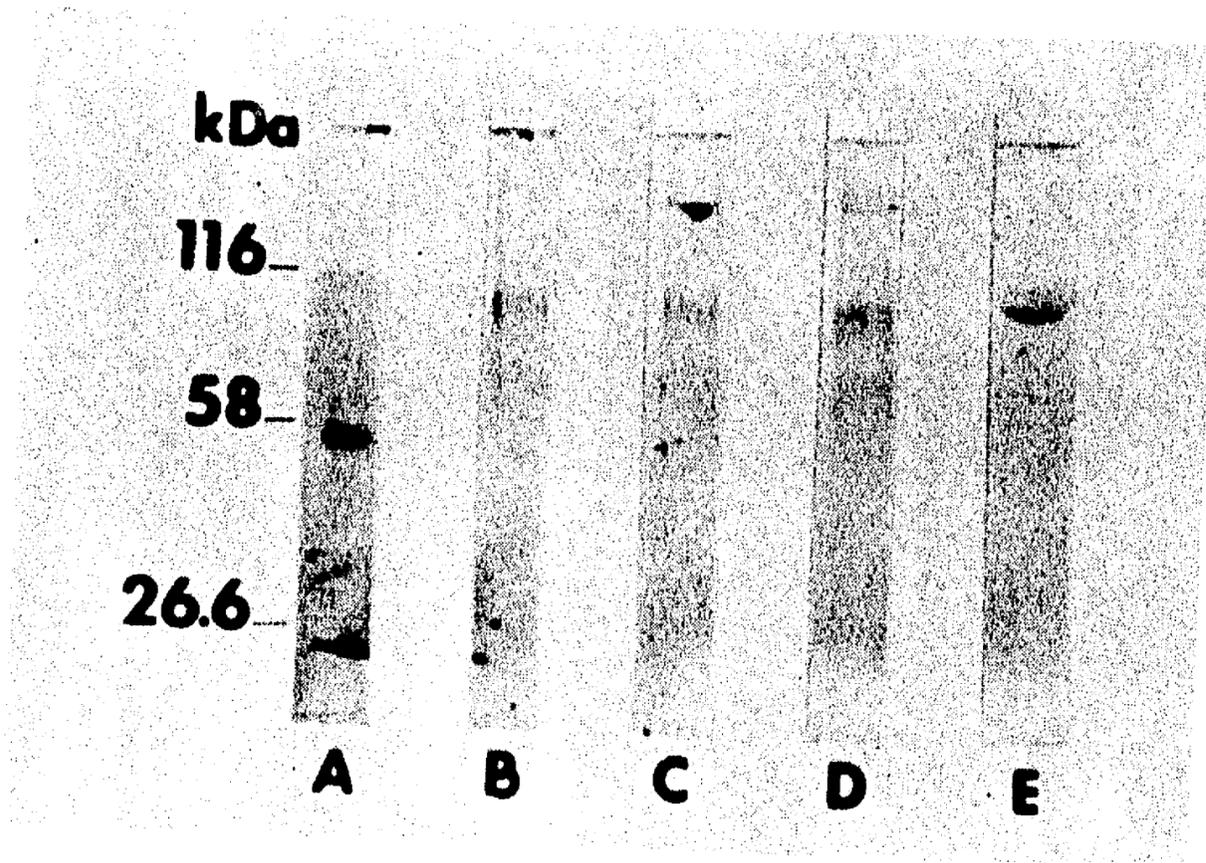


FIGURA No.6. Detección por inmunoensayo enzimático en membrana, de azúcares en glicoconjugados en un extracto de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo). Carril A: marcador de peso molecular. Carriles B, C y D: extracto de intestino. Carril E: transferrina (control).

3.4. FASE C: Detección de antígenos de intestino de garrapata B. microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), por Inmunoelectrotransferencia.

Experimento 1.

Los resultados obtenidos en la I.E.T., se muestran en la Figura No.7. En el carril A, se observan los marcadores de peso molecular; en el carril B, se encuentra el extracto de intestino que se confrontó con el suero de conejo anti-intestino homólogo, en cuyo caso el suero reconoció seis proteínas con un peso molecular de 208, 189, 168, 141, 99 y 89 kDa, respectivamente.

En el carril C, se observa el extracto de intestino confrontado con el suero de conejo anti-glóbulos rojos de bovino, en donde el suero identificó únicamente dos bandas, con pesos moleculares de 168 y 51 kDa.

En el carril D, el extracto de intestino confrontado con el suero de conejo anti-suero completo de bovino, permitió reconocer tres proteínas, de 168, 59 y 51 kDa, respectivamente.

Los carriles C y D, representan los controles para detectar posibles componentes de origen bovino; en el carril B, se reconocieron cinco proteínas que se consideran antigénicas, como se muestra en el Cuadro No.5.

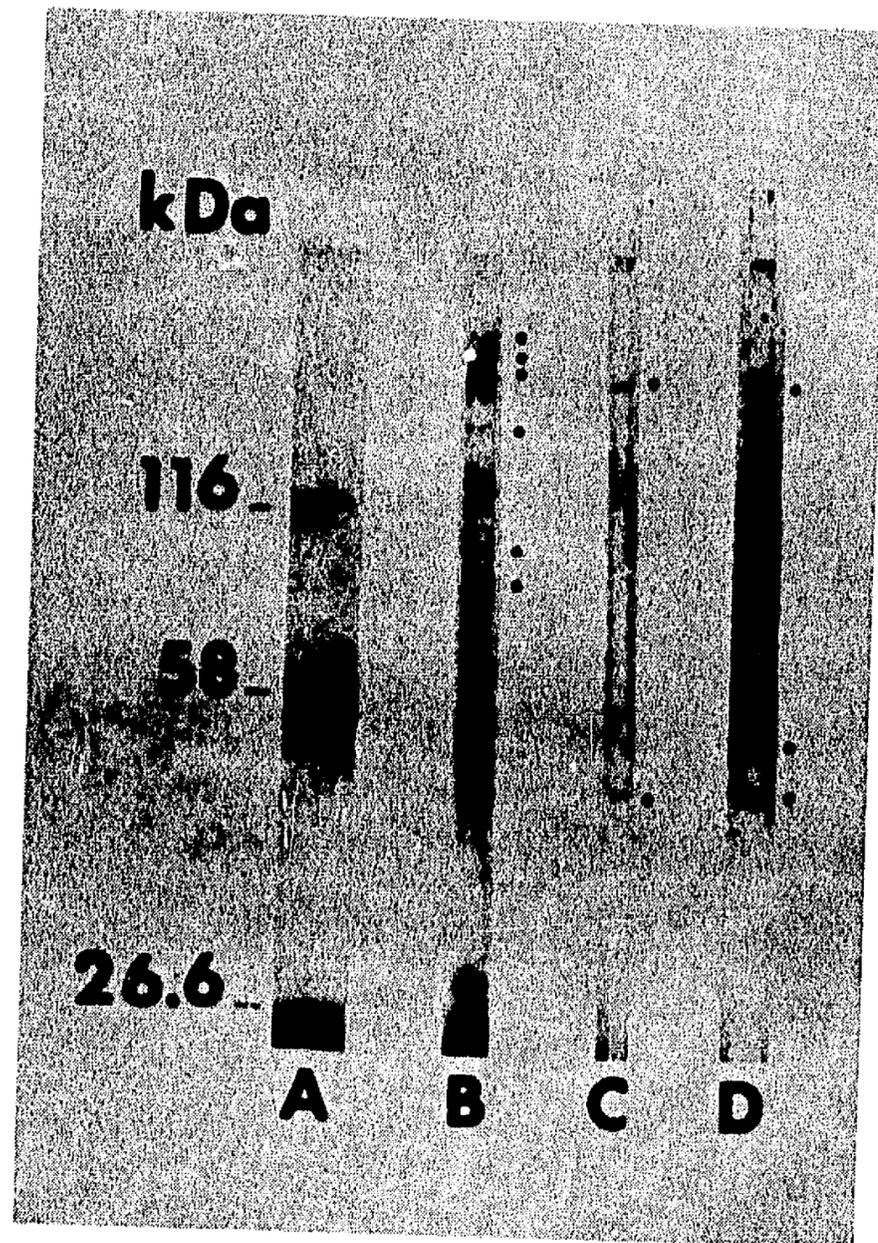


FIGURA No. 7. Inmunoelectrotransferencia de un extracto intestinal de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitadas (4 a 6 mm de largo). Carril A: marcador de peso molecular. Carril B: extracto intestinal confrontado con el suero anti-intestino homólogo. Carril C: extracto intestinal confrontado con el suero anti-glóbulos rojos de bovino. Carril D: extracto intestinal confrontado con el suero anti-suero completo de bovino.

CUADRO No. 5. Comparación de los antígenos detectados por I.E.T. en un extracto intestinal de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), con sueros de conejo anti-intestino homólogo, anti-glóbulos rojos de bovino y anti-suero completo de bovino.

Pesos moleculares (kDa)		
anti-intestino	anti-G.R.B.	anti-S.C.B.
208		
189		
168	168	168
141		
99		
89		
		59
	51	51

* G.R.B.= glóbulos rojos de bovino.
S.C.B.= suero completo de bovino.

Experimento 2.

En la Figura No.8, se observan los resultados de este experimento. En el carril A, los marcadores de peso molecular; en el carril B, el extracto de intestino que se enfrentó al suero anti-PAPM, muestra la presencia de 18 bandas con un rango de peso molecular de 41 a 387 kDa ; en el carril C, al confrontar el extracto intestinal con el suero anti-PMPM, se detectaron nueve bandas con pesos moleculares entre 50 y 162 kDa.

Fue posible identificar en los carriles B y C, la presencia de bandas en posición y peso molecular similares a las descritas como antigénicas en el Cuadro No.3, lo cual representa el objetivo principal del experimento, dado que se pensaba que ésta podía ser una forma de aumentar la presencia de las proteínas antigénicas detectadas por I.E.T. en el experimento anterior de esta fase del estudio.

En el corrimiento de control con suero bovino hemolizado, no se observó la presencia de bandas al realizarse la I.E.T.

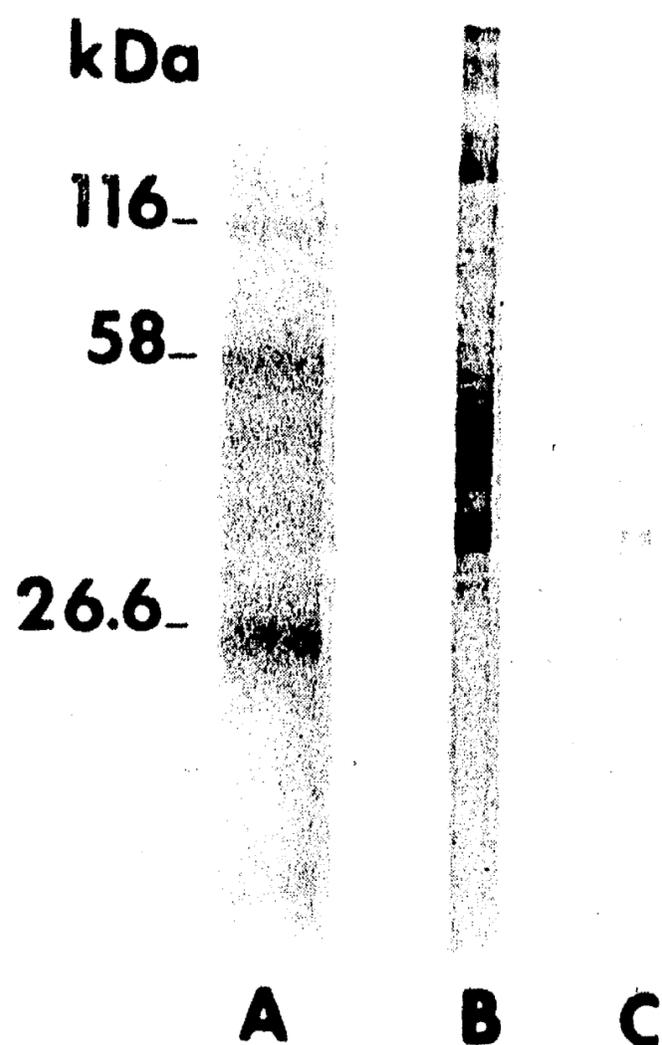


FIGURA No. 8. Inmunoelectrotransferencia de un extracto intestinal de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo).

Carril A: marcador de peso molecular. Carril B: extracto intestinal confrontado con el suero anti-proteínas de intestino de alto peso molecular (PAPM). Carril C: extracto intestinal confrontado con el suero anti-proteínas de intestino de mediano peso molecular (PMPM).

3.5. FASE D: Detección de antígenos comunes entre larvas maduras e intestinos de garrapata B. microplus, por Inmunoelectrotransferencia.

La primera parte del experimento, que consistió en confrontar un corrimiento electroforético de macerado de larvas maduras con sueros anti-larvas y con sueros anti-intestino de B. microplus, se muestran en la Figura No.9.

En el carril A, se encuentran los marcadores de peso molecular; en el carril B, se observa el resultado de enfrentar el extracto con el suero anti-PAPM de intestino, en donde se detectaron tres bandas con peso molecular de 259, 237 y 34 kDa ; en el carril C, con el suero anti-LAPM , se observaron cinco bandas con peso molecular en un rango de 3 a 221 kDa ; en el carril D, con el suero anti-PMPM de intestino, se detectaron unicamente dos bandas con peso molecular de 259 y 237 kDa , finalmente en el carril E, con el suero anti-LMPM, fue posible identificar cinco bandas con un rango de peso molecular de 3 a 116 kDa.

En el Cuadro No.6 , se puede observar una comparación de las bandas identificadas en los cuatro carriles, aquí se muestran más claramente las bandas que corresponden a antígenos comunes, como son la banda de 34 kDa que aparece en el carril B y en el carril C de la I.E.T. (Figura No.9). Por otra parte, se observan también dos bandas, de 259 y 237 kDa, que reconoce el extracto de larvas en los carriles B y D de la I.E.T. (Figura No.9).

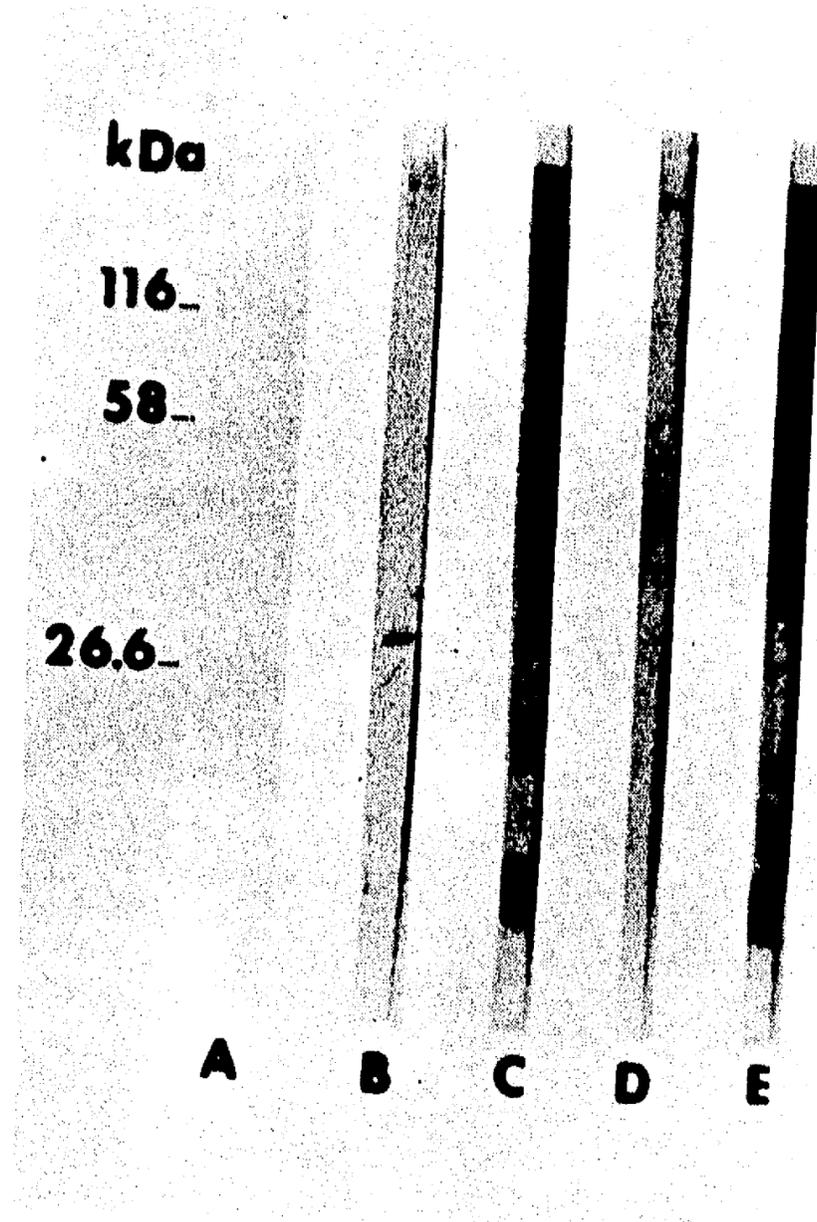


FIGURA No. 9. Inmunoelectrotransferencia de un extracto de larvas maduras de Boophilus microplus. Carril A: marcador de peso molecular. Carril B: extracto de larvas confrontado con el suero anti-proteínas de intestino de alto peso molecular (PAPM). Carril C: macerado de larvas confrontado con el suero anti-larvas de alto peso molecular (LAPM). Carril D: macerado de larvas confrontado con el suero anti-proteínas de intestino de mediano peso molecular (PMPM). Carril E: macerado de larvas confrontado con el suero anti-larvas de mediano peso molecular (LMPM).

CUADRO No. 6. Comparación de los antígenos detectados por I.E.T., en un macerado de larvas maduras de garrapata <u>B. microplus</u> , con los sueros de conejo anti-PAPM, anti-LAPM, anti-PMPM y anti-LMPM.			
suero PAPM	suero LAPM	suero PMPM	suero LMPM
Peso molecular		(kDa).	
259		259	
237		237	
	221		
	116		116
	89		
			77
			68
34	34		
			12
	3		3

- * PAPM= proteínas de intestino de alto peso molecular.
 LAPM= larvas de alto peso molecular.
 PMPM= proteínas de intestino de mediano peso molecular.
 LMPM= larvas de mediano peso molecular.

Los resultados de la segunda parte de este experimento, que consistió en confrontar un corrimiento de extracto intestinal con los sueros de conejo anti-intestino homólogos y anti-larvas de B. microplus, se muestran en la Figura No.10.

El carril A, con los marcadores de peso molecular; en el carril B, el extracto con el suero anti-PAPM, muestra 18 bandas con pesos moleculares en un rango de 41 a 387 kDa ; en el carril C, con el suero anti-LAPM, se detectó una sola banda con peso molecular de 323 kDa ; en el carril D, con el suero anti-PMPM, se identificaron 9 bandas con un peso molecular en un rango de 50 a 162 kDa, y en el carril E, con el suero anti-LMPM, se observaron dos bandas con peso molecular de 264 y 244 kDa, respectivamente.

En el Cuadro No.7, se muestra una descripción comparativa de las bandas identificadas en los cuatro carriles, debido a que las bandas comunes fueron de alto peso molecular, en el cuadro no se incluyen en detalle todas las bandas de los carriles B y D.

Los antígenos comunes detectados fueron uno de 323 kDa identificado en los carriles B y C, y otros dos de 264 y 244 kDa, respectivamente, identificados en los carriles B y E.

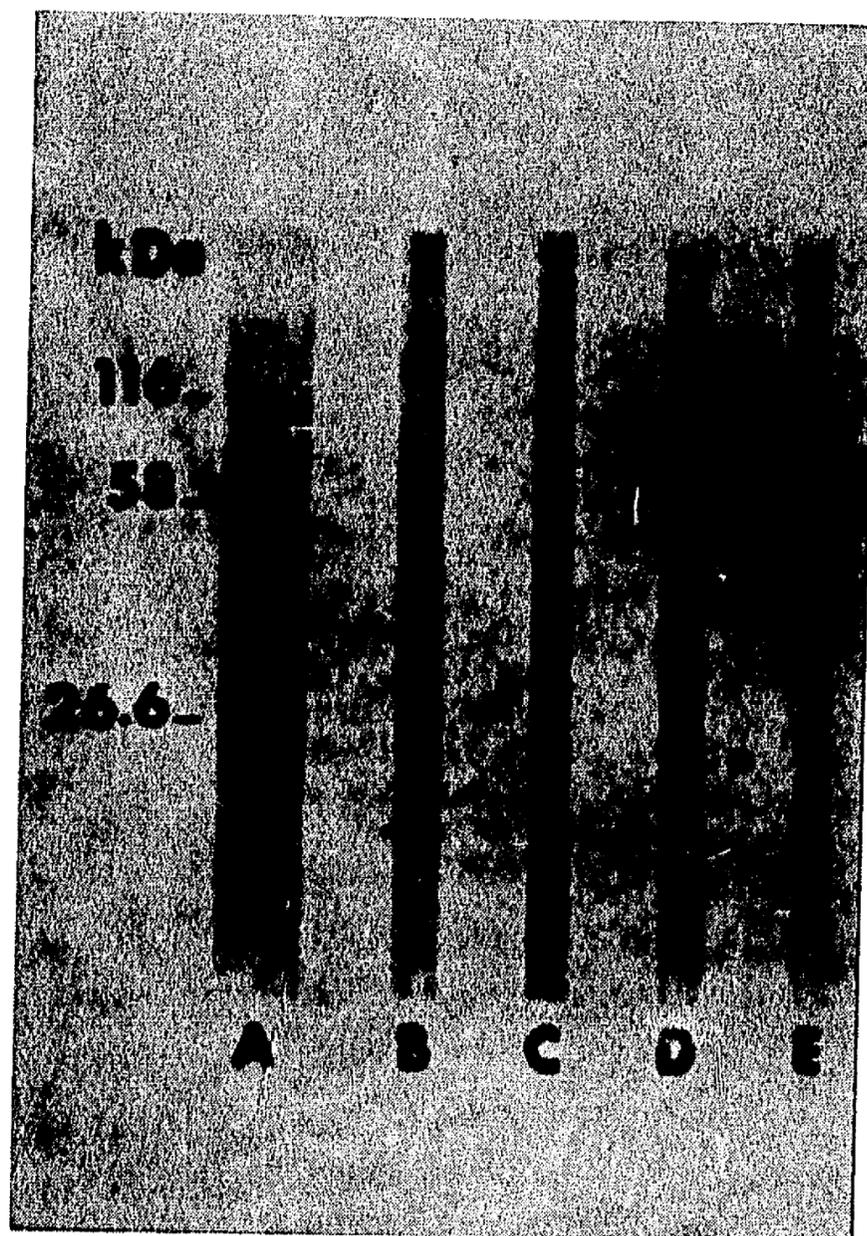


FIGURA No. 10. Inmunoelectrotransferencia de un extracto de intestinos de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo). Carril A: marcador de peso molecular. Carril B: extracto intestinal confrontado con el suero anti-proteínas de intestino de alto peso molecular (PAPM). Carril C: extracto intestinal confrontado con el suero anti-larvas de alto peso molecular (LAPM). Carril D: extracto intestinal confrontado con el suero anti-proteínas de intestinos de mediano peso molecular (PMPM). Carril: E: extracto intestinal confrontado con el suero anti-larvas de mediano peso molecular (LMPM).

CUADRO No.7. Comparación de los antígenos detectados por I.E.T., en un extracto de intestino de garrapata B. microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), con los sueros de conejo anti-PAPM, anti-LAPM, anti-PMPM y anti-LMPM.

suero PAPM	suero LAPM	suero PMPM	suero LMPM
Peso molecular (kDa)			
387			
323	323		
264			264
244			244
177			
162		162	
156		156	

- * PAPM= proteínas de intestino de alto peso molecular.
 LAPM= larvas de alto peso molecular.
 PMPM= proteínas de intestino de mediano peso molecular.
 LMPM= larvas de mediano peso molecular.

3.6. FASE E : Detección de los potenciales antígenos de intestino de garrapata B. microplus, mediante inmunohistoquímica.

Experimento 1.

Las estructuras histológicas del intestino de B. microplus estudiada en el presente experimento, se muestran en las Figuras No.11 a 14, en ellas, es posible identificar los componentes histológicos correspondientes a la etapa fisiológica de los especímenes estudiados, es evidente que los cortes de garrapatas completas brindan menos detalle que los cortes de intestino.

En este experimento se procesaron las muestras mediante tres técnicas histológicas, I.P., G.M.A. e I.C. La técnica de inclusión por parafina (IP) fue la que se adaptó mejor a las necesidades del estudio ya que, entre otras cosas, mostró ser menos elaborada que la GMA, además de ser más económica y brindar mejores resultados en cuanto a calidad de los cortes que la IC e incluso que la GMA. La totalidad de figuras que se describen a continuación fueron elaboradas en base a cortes longitudinales por inclusión en parafina, teñidos con Hematoxilina y Eosina.

En la Figura No.11, se muestra un ciego intestinal con aumento 10X, en donde se identifican las siguientes estructuras: lumen (lu), membrana basal (mb) y el epitelio intestinal con una capa de células digestivas (cd).

En la Figura No.12, en un aumento mayor (40X), se muestra un ciego intestinal donde se identifican el lumen

(lu), la membrana basal (mb) y el epitelio intestinal con células digestivas iniciales (cdi).

En la Figura No.13, se observa un corte de intestino con aumento 10X, en donde se identifican las siguientes estructuras: lumen (lu), células basofílicas (cb), células digestivas tardías (cdt) y células digestivas maduras 1 (cdm1).

En la Figura No.14, con un aumento mayor (40X), se muestra el corte intestinal donde se observan células digestivas iniciales (cdi), células basofílicas (cb) y células digestivas maduras 1 (cdm1).

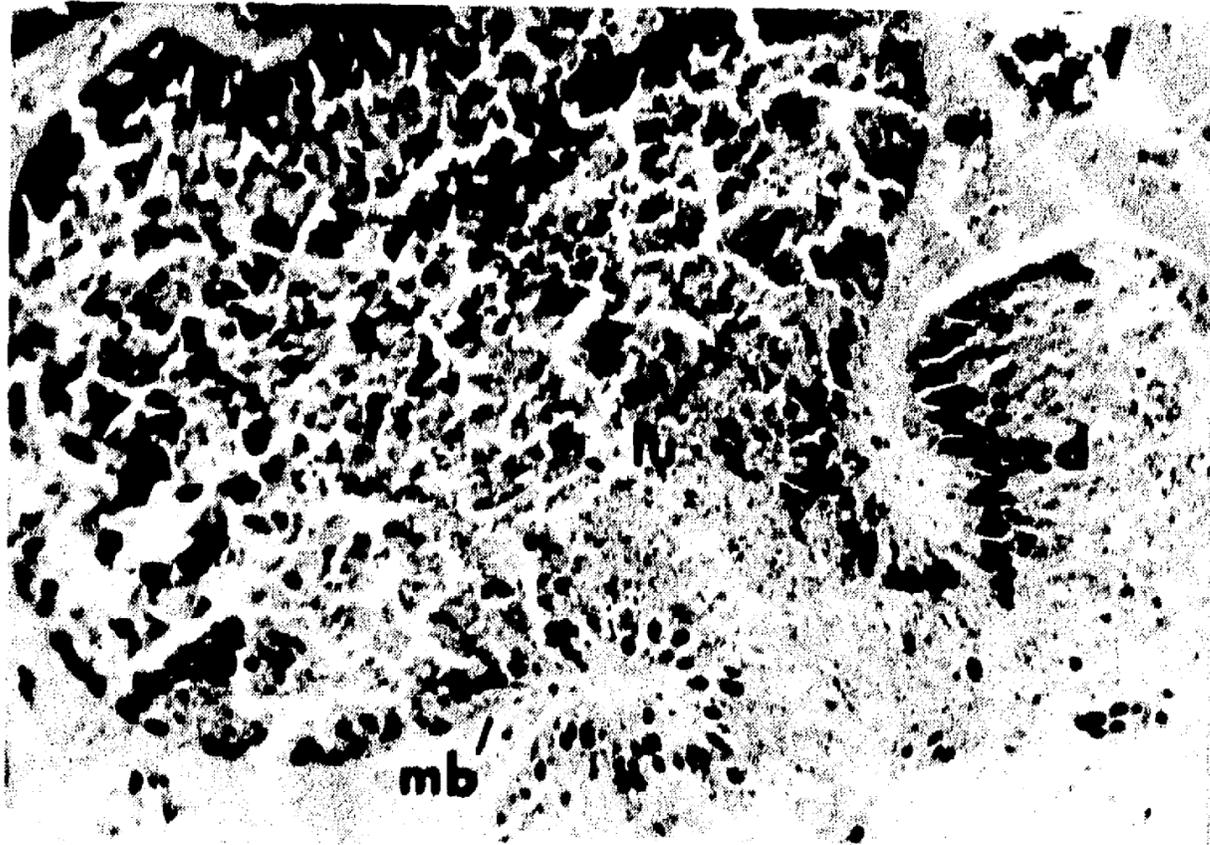


FIGURA No. 11. Corte histológico de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo). Ciego intestinal en donde se identifican el lumen (lu), la membrana basal (mb) y el epitelio intestinal con una capa de células digestivas (cd). Corte longitudinal en Parafina, tinción de Hematoxilina y Eosina (Aumento 10X).

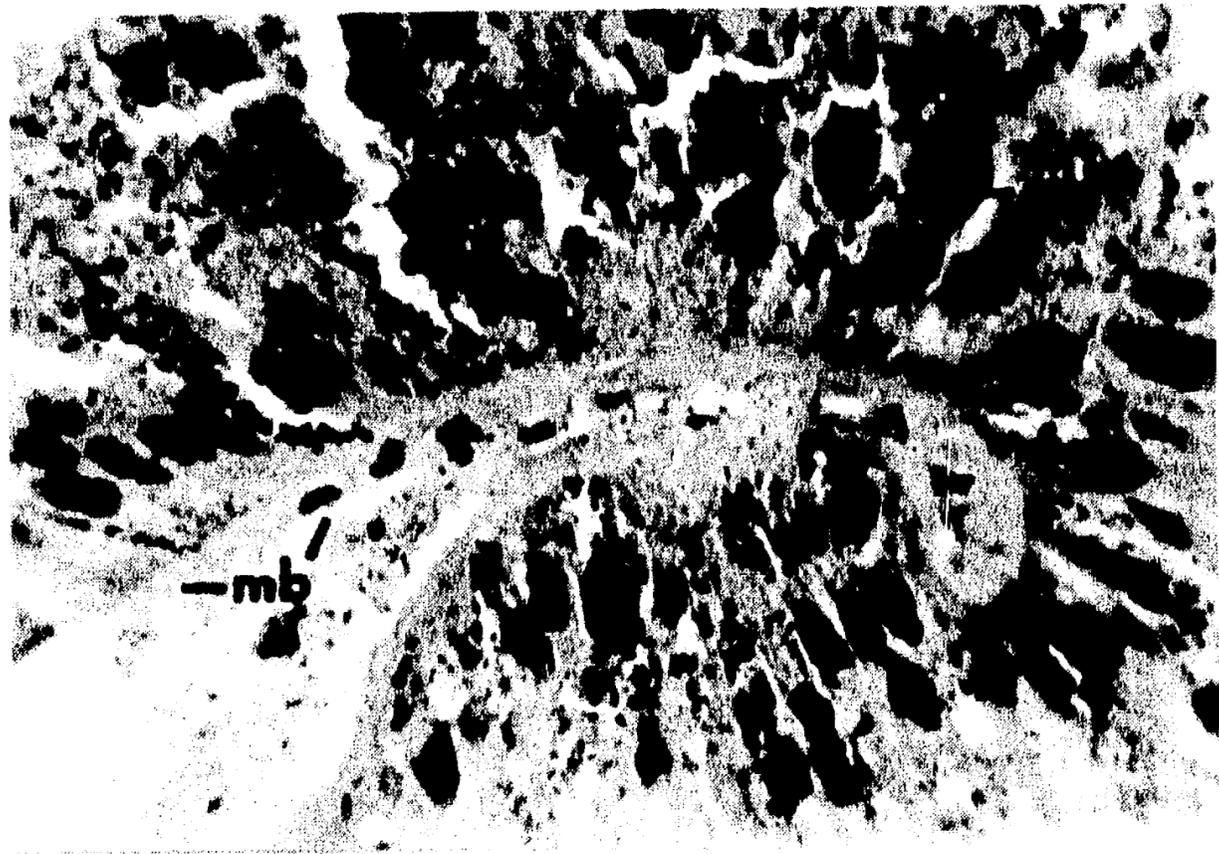


FIGURA No. 12. Corte histológico de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo). Ciego intestinal donde se identifican el lumen (lu), la membrana basal (mb) y el epitelio de células digestivas iniciales (cdi). Corte longitudinal en Parafina, tinción de Hematoxilina y Eosina (Aumento 40X).

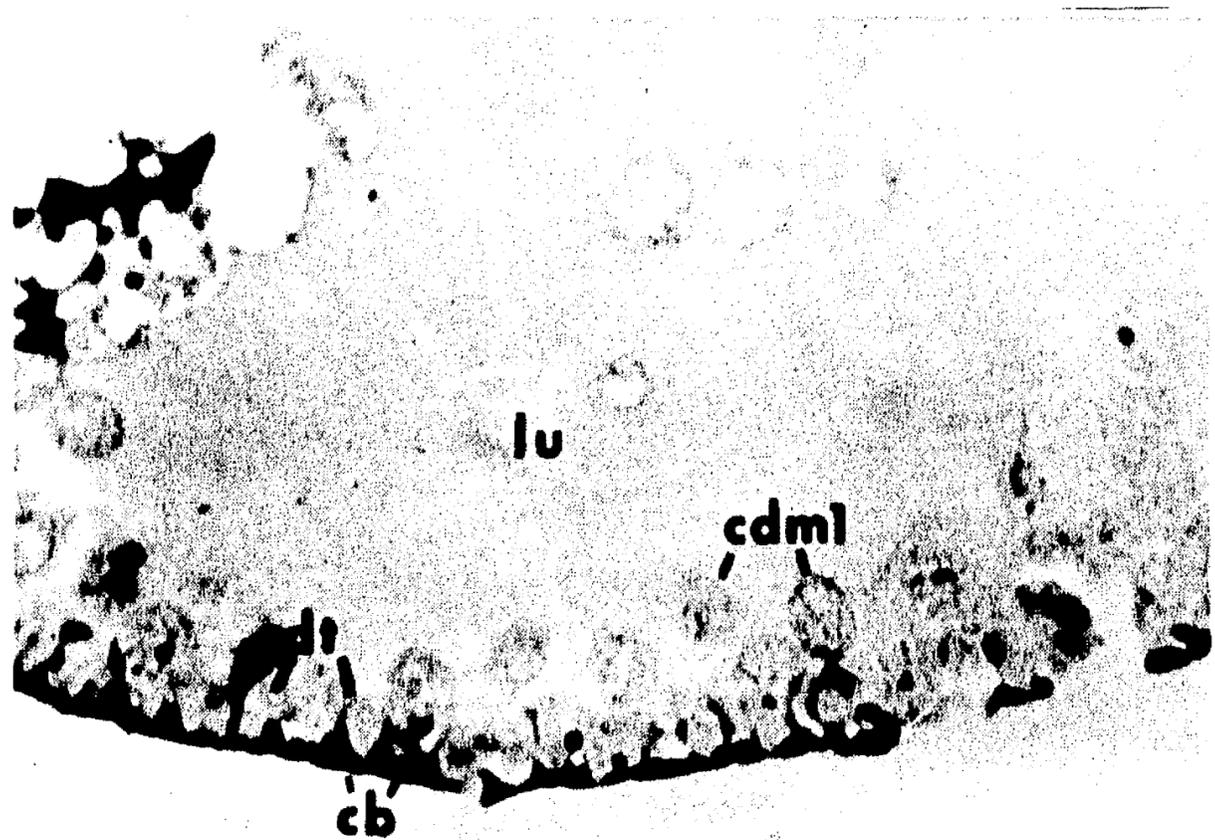


FIGURA No. 13. Corte histológico de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo): lumen (lu), células basofílicas (cb), células digestivas tardías (cdt), células digestivas maduras 1 (cdm1). Corte longitudinal en Parafina, tinción de Hematoxilina y Eosina (Aumento 10X).

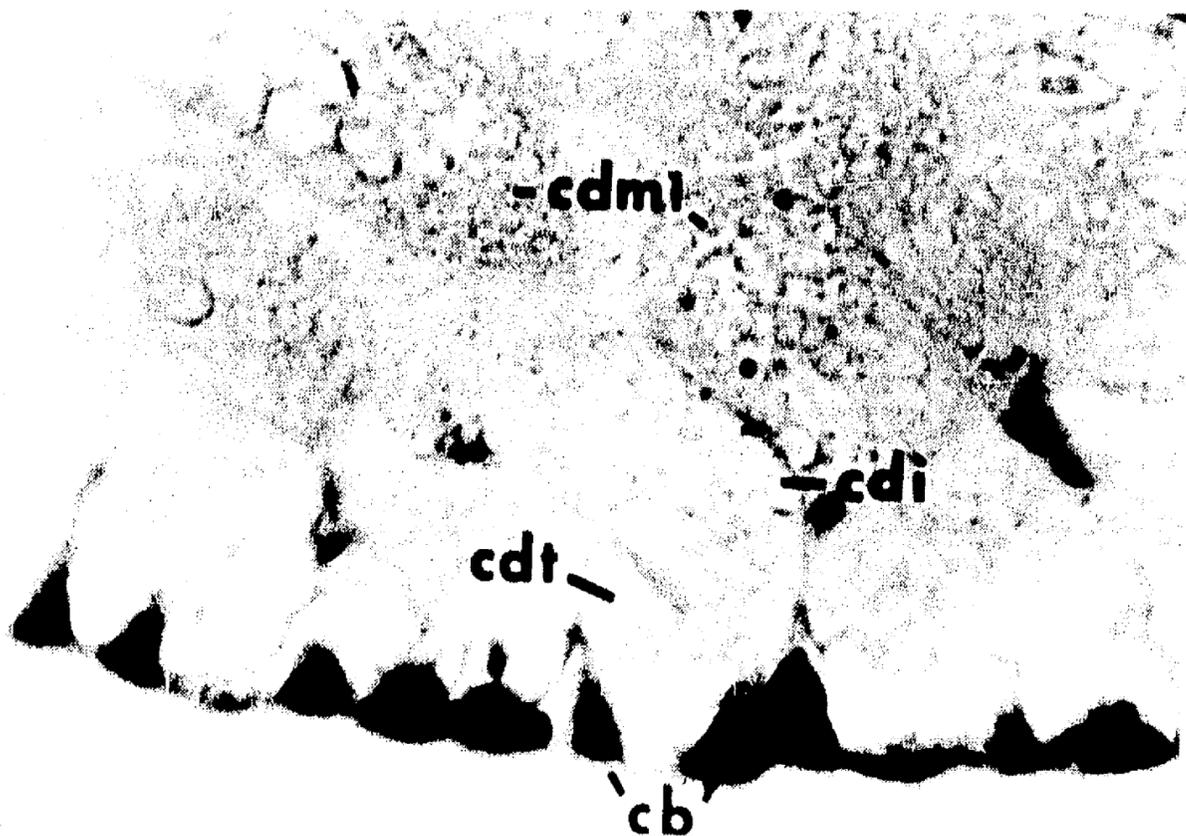


FIGURA No. 14. Corte histológico de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo): células digestivas iniciales (cdi), células basofílicas (cb), células digestivas maduras 1 (cdm1), células digestivas tardías (cdt).
Corte longitudinal en Parafina, tinción de Hematoxilina y Eosina (Aumento 40X).

Experimento 2.

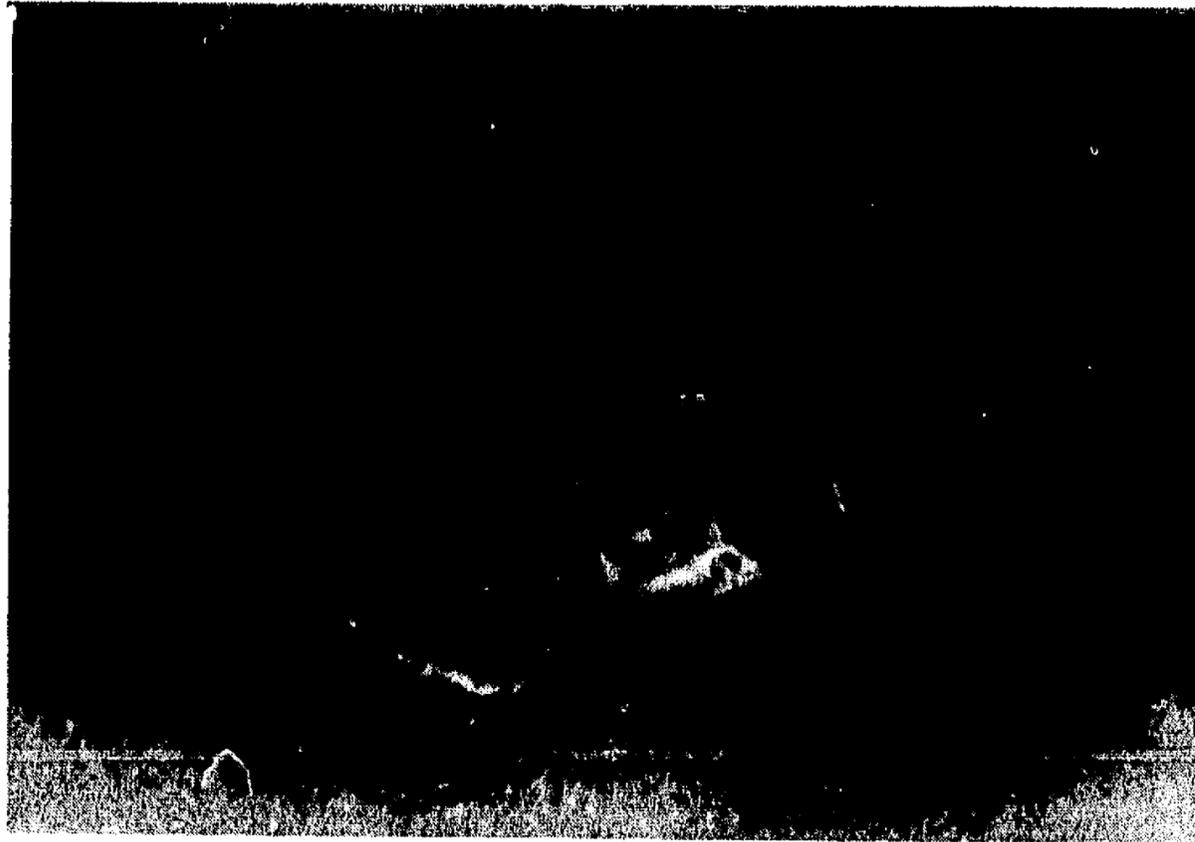
Los resultados de la Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I), en los cortes histológicos longitudinales por congelación realizados en este experimento, se pueden observar en las Figuras No. 15 a 20.

Los sueros se trabajaron a las diluciones de 1:1000 en el caso del suero anti-intestino homólogo y para los sueros anti-PAPM y anti-PMPM, se utilizó la dilución de 1:300.

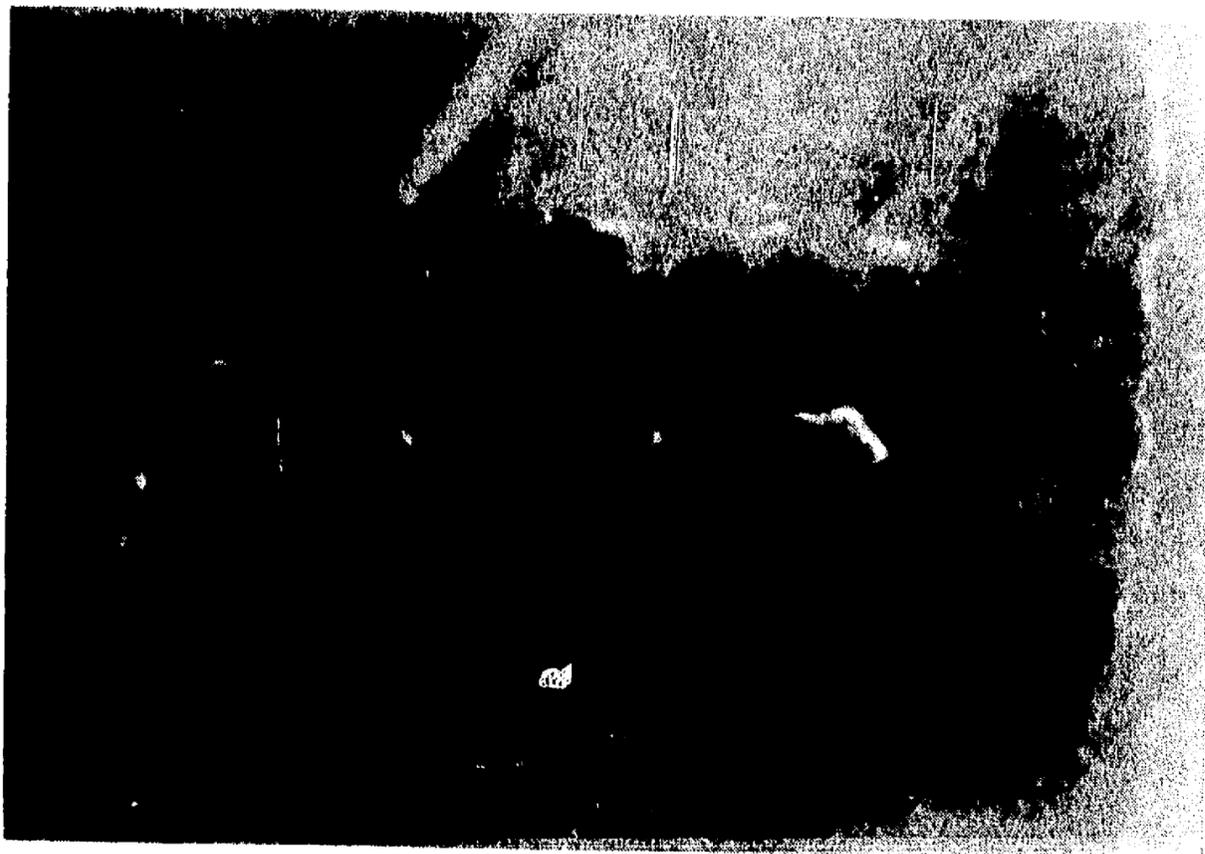
En todos los casos resulta evidente que la reacción inmunológica muestra fluorescencia definida en la superficie del tejido intestinal, tanto para los cortes de garrapata (ciego intestinal) como para las piezas de intestino. Estas observaciones permiten confirmar que los anticuerpos presentes en los antisueros reconocen antígenos en la superficie del intestino. En los cortes confrontados al suero de conejo control negativo, no se observó ninguna señal de fluorescencia.

En las Figura No. 15 y 16, se observa el corte de ciego intestinal y de intestino, respectivamente, confrontados con el suero anti-intestino homólogo.

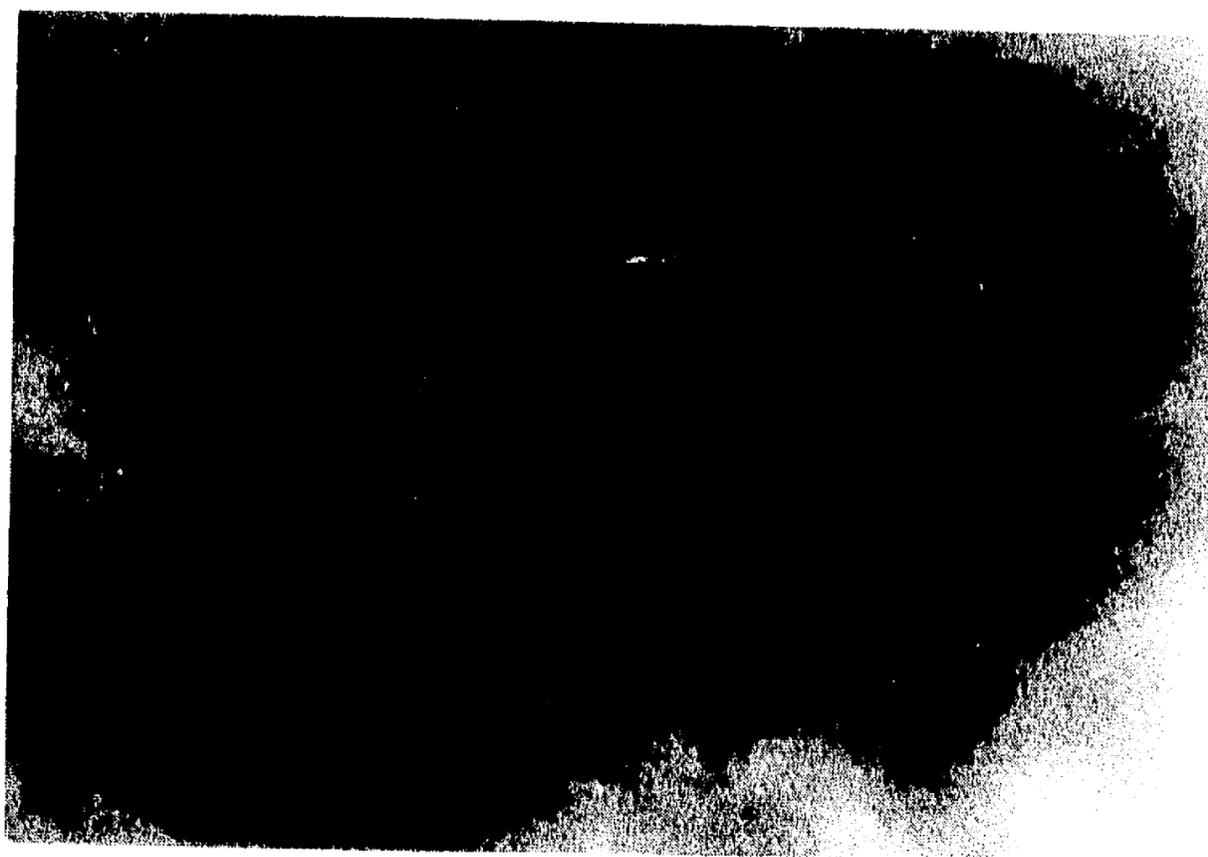
En las Figuras No. 17 y 18, se muestra el ciego intestinal y el intestino, respectivamente, confrontados con el suero anti-PAPM, y en las Figuras No. 19 y 20, similares cortes confrontados con el suero anti-PMPM.



FIGURAS No.15 y 16. Inmunofluorescencia Indirecta en cortes histológicos por congelación de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo) : ciego intestinal (Fig.15) e intestino (Fig.16), confrontados con el suero anti-intestino homólogo. Corte longitudinal (Aumento 10X).



FIGURAS No.17 y 18. Inmunofluorescencia Indirecta en cortes histológicos por congelación de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo) : ciego intestinal (Fig.17) e intestino (Fig.18), confrontados con el suero anti-proteínas de intestino de alto peso molecular (PAPM). Corte longitudinal (Aumento 10X).



FIGURAS No.19 y 20. Inmunofluorescencia Indirecta en cortes histológicos por congelación de intestino de garrapata Boophilus microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo) : ciego intestinal (Fig.19) e intestino (Fig.20), confrontados con el suero anti-proteínas de intestino de mediano peso molecular (PMPM). Corte longitudinal (Aumento 10X).

IV. D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S.

El cultivo controlado de garrapata Boophilus microplus, se ha llevado a cabo de manera rutinaria en diversos centros de investigación, desde hace varios años y para diversos fines, el hecho de que se trate de una garrapata de un sólo hospedero ha facilitado esta labor (42).

Diferentes autores han publicado los parámetros que bajo condiciones normales son de esperarse en el cultivo controlado de B. microplus, tanto para la fase de vida parásita, como para la no parásita (42, 83, 112). Sin embargo, es conocido que existen diversos factores que pueden modificar ligeramente los parámetros esperados (99).

En el presente estudio, el comportamiento biológico de la cepa "Zapata" de B. microplus, se mantuvo constante en las 12 infestaciones realizadas. La duración de la fase de vida parásita, que fue de 21.5 días en promedio, coincide con lo reportado por Roberts (98) con 21.3 días y con lo indicado por Hernández (55) con 21 días, así como con los promedios de otros autores (14, 83). Los valores de los otros sucesos biológicos del cultivo controlado, que comprenden la fase de vida no parásita en el laboratorio, tuvieron una duración de 39 a 48 días, rango similar al observado en otros estudios (55, 83).

En la fase de vida parásita de B. microplus, el desarrollo de los especímenes se puede ver afectado por diversas causas, tales como la raza y edad del hospedero,

idiosincrasia y factores ambientales, entre otros, (98); sin embargo, se ha observado que existe una relación estrecha entre la edad, en días, del parásito en esta fase de su vida y el tamaño alcanzado, expresado en el largo del cuerpo (99).

En el presente estudio se registró el largo del cuerpo de especímenes de B. microplus, a partir del día 16 de edad en fase parásita, los resultados obtenidos, como se observa en el Cuadro No. 2, coinciden con los rangos reportados en los trabajos de Roberts (99, 100). Así, el tamaño de 4 a 6 mm de largo, requerido para el estudio, se alcanzó entre los 19 y 20 días de edad y debido al desarrollo heterogéneo de los parásitos en el hospedero, es posible recuperar del bovino especímenes de estas características por 3 a 4 días más, aunque en menor proporción.

La inmunización artificial es una alternativa para el control de las garrapatas que ha cobrado relevancia en los últimos años (39, 85). Diversos extractos antigénicos provenientes de órganos internos, en especial de intestino, se han utilizado como inmunógenos en animales de laboratorio y en ganado bovino (28, 85, 129). Antígenos de larvas, extractos intestinales y anticuerpos anti-intestinos como ligandos, han sido experimentados para intentar proteger al ganado en contra de las infestaciones por garrapata B. microplus así como de R. appendiculatus y de A. americanum, principalmente (68, 85).

Algunas fracciones antigénicas provenientes de extractos intestinales de las garrapatas mencionadas anteriormente, con

capacidad inmunoprotectora en animales de laboratorio y/o ganado bovino han sido identificadas en los últimos años (40, 87, 94, 129, 138).

Los antígenos intestinales representan una alternativa de control inmunológico viable, debido entre otras cosas, al acceso directo que los anticuerpos protectores tienen al introducirse en la garrapata cuando éstas se alimentan, pudiendo ejercer su acción directamente en las células intestinales, además de que dichos anticuerpos pueden cruzar intactos el epitelio del intestino y llegar a otras estructuras de la garrapata y reaccionar con ellas (104, 120). Este fenómeno se ha comprobado no sólo en garrapata sino también en otros insectos hematófagos como Haematobia irritans (13, 104).

Por otra parte, los antígenos intestinales, no generan respuestas inmunoevasoras en la garrapata debido a que los mismos nunca han tenido relación inmunológica con el parásito en condiciones de infestaciones naturales (136).

En la Fase A del presente estudio, particularmente en el experimento 1, se obtuvieron extractos de intestino de B. microplus, bajo cuatro diferentes procesos con la finalidad de observar su comportamiento electroforético y elegir aquél que mostrara ser el de mejor resolución. Además, se buscaron procedimientos más prácticos que permitieran conservar el paquete de proteínas de los extractos en su forma nativa.

Los resultados obtenidos en este experimento, mostraron que los cuatro procesos tienden a dar corrimientos

electroforéticos muy similares en geles al 8% y bajo condiciones no reductoras como se mostró en la Figura No.1. Esto permitió demostrar que un proceso sencillo, como lo fue el 1 (macerado completo), puede servir igual que los otros experimentados y conservar adecuadamente el perfil de proteínas del extracto intestinal. En otros estudios se ha observado también, que extractos crudos de intestinos se comportan de similar forma que extractos semipurificados por centrifugación (40, 94).

En este mismo experimento, fue posible detectar la presencia de proteínas comunes entre los extractos de intestino y el control de sangre completa de bovino (Figura No.2), situación que era de esperarse pues se trataba de extractos completos de intestino y su contenido que es de origen bovino.

Asimismo, se constató que las proteínas del extracto intestinal en los cuatro procesos, se encuentran en escasa cantidad, motivo por el cuál la tinción de los geles con Azul de Comassie (con sensibilidad 1 a 2 ug por banda), una tinción de primera elección, se mostró poco eficiente para evidenciar la presencia de las bandas y fue necesario optar por una tinción de mayor sensibilidad como la de Nitrato de Plata (Figura No.3), que es capaz de detectar de 1 a 10 ng por banda (52). La escasa cantidad de proteína de intestino en los extractos crudos y semipurificados del mismo, ya han sido reportados por otros investigadores (87, 129, 138).

En el experimento 2 de la Fase A, se trabajó con un macerado completo de intestinos en condiciones no reductoras para preservar la integridad de las proteínas del mismo (51), de esta manera, se identificó el patrón electroforético que se mostró en la Figura No.4, en donde se observó la presencia de 12 proteínas con un rango de peso molecular aparente de 27 a 195 kDa (Cuadro No.3). Este rango es muy similar al observado en el trabajo de Willadsen y colaboradores en 1988 (138), quien usó un extracto crudo semipurificado de órganos internos de B. microplus; sin embargo, este patrón se consideró aún preliminar para las necesidades del presente estudio, debido a que el macerado incluía el contenido intestinal y por ello mostró bandas comunes con el control de sangre completa de bovino.

En el experimento 3, de la Fase A, se identificó el patrón electroforético de intestino de B. microplus, semi-ingurgitada (4 a 6 mm de largo), que se consideró como el definitivo para el estudio, el mismo mostró 18 bandas (Figura No.5), con un rango de peso molecular de 17 a 258 kDa (Cuadro No.4). Estos resultados fueron parecidos a los reportados en B. microplus, en donde se observó la presencia de proteínas en un rango de 79 a 205 kDa (138), y a los patrones descritos en A. americanum, de rango 14.5 a 330 kDa en condiciones reductoras (18) y de rango 30 a 114 kDa en condiciones no reductoras (129).

Las glicoproteínas pueden actuar como receptores solubles o de membrana en los tejidos de la garrapata y jugar

un papel importante en la relación del parásito con el organismo del hospedero o bien actuar en interacción con lectinas de los agentes infecciosos que transmiten estos artrópodos (50, 61). Las glicoproteínas del intestino de garrapata pueden también ser importantes epitopos en una respuesta inmune por anticuerpos del hospedero (38).

En el presente estudio (Fase B), se demostró que en el patrón electroforético de proteínas de intestino de B. microplus, el 61 % de las mismas, aquéllas por arriba de 58 kDa, se encuentran asociadas con azúcares, es decir, son glicoproteínas, coincidiendo estos resultados con las observaciones hechas previamente por otros autores (71, 129, 141).

En A. americanum, algunos antígenos derivados de intestino que son reconocidos como inmunoprotectores en cuyes, fueron modificados con glicanos tipo N, pero algunos de ellos también se modificaron con glicanos tipo O (129). Por otra parte, antígenos de intestino de B. microplus con capacidad inmunoprotectora en ganado, han sido descritos como glicoproteínas (141), o como dependientes de un carbohidrato para su especificidad (71).

En la Fase C del presente estudio, el análisis de las proteínas de intestino de garrapata por I.E.T., permitió identificar cinco proteínas antigénicas (Figura No.7), con pesos moleculares de 89, 99, 141, 189 y 208 kDa (Cuadro No.5). El hecho de someter el suero anti-intestino homólogo a una cromatografía de inmuoafinidad, como fue descrito en su

oportunidad, representó una medida para que se tuviera la seguridad de identificar exclusivamente proteínas de intestino de garrapata, asimismo, el uso de los sueros anti-glóbulos rojos de bovino y anti-suero completo de bovino, proporcionó el control para asegurar el mismo objetivo, así, las proteínas con peso molecular de 51, 59 y 168 kDa, fueron consideradas como de origen bovino.

La técnica de I.E.T., ha sido utilizada en diferentes estudios para identificar antígenos, su alta sensibilidad permite realizar inmunodetecciones de proteínas en baja concentración, hasta 1 ng (33).

Mediante I.E.T., fueron identificadas cuatro proteínas de intestino de hembras adultas de R. appendiculatus, con pesos moleculares entre los 16 y 35 kDa, utilizando suero hiperinmune específico originado en cuyes, para la inmunodetección (111).

También con el uso de I.E.T., en el caso de A. americanum, fueron reconocidos 28 antígenos de intestino provenientes de hembras adultas sin alimentar, utilizando condiciones reductoras para la muestra y un suero hiperinmune de ovino (18). Por otra parte, en el mismo parásito se identificaron 12 antígenos de intestino de hembras adultas sin alimentar, con pesos moleculares entre 64 y 157 kDa, que se detectaron con suero policlonal de cuyes inmunizados con antígeno homólogo (129).

En B. microplus, ha sido identificado un antígeno de 89 kDa con alta capacidad antigénica e inmunoprotectora en

ganado, que se encuentra en escasa proporción en el intestino de garrapatas semirepletas(141).

Por otra parte, también en B. microplus, pero usando anticuerpos monoclonales (QU13), fueron identificados algunos antígenos de intestino de hembras semi-ingurgitadas, con pesos moleculares de 200, 80, 74, 62, 57 y menos de 30 kDa, los cuales confirieron inmunoprotección en ganado (72).

Las proteínas identificadas en el presente estudio, se ubican en el rango de peso molecular en el que algunos autores, ya mencionados, encontraron fracciones antigénicas importantes, y al igual que en otros estudios, se observa que estas proteínas antigénicas se encuentran en escasa proporción.

En el segundo experimento de la Fase C, del presente estudio, se logró identificar, también por I.E.T., la presencia de proteínas en posición y peso molecular similares a las descritas como antigénicas anteriormente (Cuadro No.5), lo cual sirvió para verificar los resultados obtenidos en el experimento 1 de esta Fase del estudio. De manera adicional, con el experimento se pretendía aumentar la cantidad de las proteínas importantes, dado que es posible realizar el aislamiento de proteínas de esta forma (52), y se intentó experimentar la viabilidad de esta metodología en el estudio.

Sin embargo, este aspecto adicional no tuvo los resultados esperados, no hubo mayor cantidad de las proteínas y sí aparecieron algunas bandas extras. Este hecho se puede explicar, de manera general, a que el sistema inmune de los

conejos en que se produjeron los antisueros utilizados en la I.E.T., reconocieron de manera no esperada el antígeno que se les inoculó, debido probablemente a que la presentación de las proteínas (antígeno) no fue similar a la forma en que se le presentaron cuando se inoculó el antígeno nativo a conejos, en el experimento 1 (Fase C).

Es conocido el hecho de que la presentación del antígeno influye en la producción de anticuerpos y en la afinidad de los mismos con el antígeno nativo (117). Estas observaciones deberán de ser consideradas en futuros experimentos.

La presencia de antígenos comunes entre diferentes estadios de desarrollo en garrapatas ixodidas, ha sido documentado en diferentes estudios, asimismo la existencia de antígenos específicos de estadio (25, 26, 94, 111).

En el caso de B. microplus, los antígenos de intestino de hembras semirepletas con capacidad inmunoprotectora, se han considerado como de estado específico, ya que aparentemente sólo se expresan en una etapa de vida parásita (64).

Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado la existencia de antígenos comunes entre extractos de larvas maduras y de intestinos de hembras adultas semirepletas (89), comparando extractos crudos de larvas o semipurificados, por cromatografía de inmunoafinidad usando como ligandos inmunoglobulinas provenientes de ganado inmunizado con extractos homólogos, y extractos de intestinos evaluados en experimentos anteriores (146).

En la Fase D del presente estudio, mediante el uso de I.E.T., se identificaron tres antígenos comunes, presentes en el macerado de larvas y reconocido por el suero anti-PAPM de intestino (Cuadro No.6); además de otros tres antígenos comunes presentes en el extracto de intestinos y reconocidos, uno por el suero anti-LAPM, dos más por el suero anti-LMPM (Cuadro No.7).

Estos resultados brindan evidencia de que efectivamente existen proteínas comunes entre larvas e intestinos de B. microplus, que inicialmente se pueden considerar como antigénicos.

El valor potencial como inmunógenos de diferentes extractos de larvas ha sido demostrado y también el hecho de que se comportan prácticamente igual que las vacunas de intestino de hembras semi-ingurgitadas, con lo cual se ha corroborado la presencia de antígenos comunes en los diferentes estadios evaluados, aunque no se han caracterizado dichos antígenos (89, 146). Un estudio reciente indica la existencia de antígenos comunes en diferentes tejidos de B. microplus, reconocidos por suero hiperinmune de bovinos infestados artificialmente (36).

El intestino de las garrapatas resulta ser un tejido muy importante para diversos sucesos fisiológicos dentro de la economía del parásito, además del papel protagónico que tiene en la relación hospedero-parásito y en el desarrollo de hemoparásitos y otros agentes infecciosos (16).

La composición histológica del intestino ha sido estudiada en diversas garrapatas ixodidas y argasidas, así como la relación que esta composición tiene con el proceso digestivo (16), B. microplus, garrapata ixodida de un solo hospedero, se incluye en estos estudios (3).

Las observaciones realizadas en el experimento 1 de la Fase E del presente estudio, han permitido identificar los principales componentes histológicos del intestino de B. microplus, cepa "Zapata", en una etapa particular de su desarrollo en vida parásita, correspondiente a los 19 a 20 días de edad (4 a 6 mm de largo). Estos fueron la membrana basal, algunas células digestivas en serie (iniciales, tardías y maduras 1) y las células basofílicas.

La totalidad de estas observaciones coinciden con las hechas por otros autores (3), lo cual hace pensar que al menos en este nivel existen similitudes entre cepas de B. microplus de ubicación geográfica diferente.

Los resultados observados en el experimento 2 de esta Fase E, mostraron que mediante la prueba de I.F.I., fue posible detectar la localización de los antígenos de intestino de garrapata identificados mediante I.E.T. (Fase C), en la superficie del tejido intestinal. El suero anti-intestino homólogo, fue el que demostró una reacción inmunológica más clara, seguramente debido a una inmunofinidad más alta.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha demostrado la localización de diversos antígenos de origen intestinal en

dicho tejido; así, en el caso de B. microplus, el antígeno Bm86 ha sido detectado por I.F.I. en la superficie de las células digestivas , además, a través de la técnica de inmuno-oro, se definió que este antígeno se encuentra especialmente en las microvellosidades de dichas células digestivas (48, 141).

Los antígenos detectados con el anticuerpo monoclonal QU13, se han localizado en las microvellosidades del intestino de garrapatas adultas de B. microplus, pero también en otras estructuras del ectoparásito (73).

Algunos antígenos identificados en A. americanum, se han localizado también en la superficie del intestino (129).

Los resultados obtenidos en esta última Fase del presente estudio coinciden con los reportados por otros investigadores y corroboran el origen de los antígenos identificados en la Fase C del estudio.

En términos generales, los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten respaldar la hipótesis de que existen varias proteínas de superficie de intestino de B. microplus, con características antigénicas.

Algunos autores también han tenido esta idea al afirmar que un sólo antígeno puede no ser suficiente para generar una respuesta inmune efectiva para realmente controlar la infestación por garrapata en condiciones de campo (85).

A pesar de los avances logrados en la búsqueda de una vacuna anti-garrapata, en el caso de B. microplus, es necesario señalar que los trabajos de investigación

publicados generalmente están escritos de tal forma que algunos detalles metodológicos tienden a ser confusos y poco reproducibles, además de que los resultados en ocasiones son imprecisos y de difícil interpretación, asimismo, estas comunicaciones escritas aparecen en lapsos de tiempo poco acordes al avance real de las investigaciones. Estos hechos tienen una razón, la búsqueda de una vacuna anti-garrapata se ha convertido, para los principales grupos de investigación involucrados (de origen australiano), en un asunto de intereses corporativos con la industria farmacéutica que ha financiado sus trabajos con la finalidad de obtener, patentar y comercializar el biológico. Este hecho se ha corroborado al conocerse que un grupo de investigadores (de origen cubano), en un lapso de tiempo corto, han desarrollado un biológico muy parecido al elaborado por el grupo australiano; evidentemente la falta de originalidad en este desarrollo tecnológico se explica por el gran interés de comercializar este producto a la brevedad posible.

En esta carrera tecnológica se ha dejado de lado el interés científico como tal, motivo por el cual es frecuente que los investigadores no contesten la correspondencia que personas interesadas en el tema les envían y que en presentaciones orales, en diversos foros, se eludan ciertas preguntas arguyendo que por motivos comerciales (secreto industrial), no es posible aclarar las dudas planteadas. Estos hechos han sido una vivencia personal de quien los relata en este escrito.

Este llamado de atención se hace con la idea de dejar constancia que de acuerdo a un criterio personal, nunca debe de perderse el sentido de la filosofía del trabajo científico, a pesar de que otros intereses puedan intervenir en el desarrollo de una investigación.

Los trabajos de investigación enfocados a la búsqueda de una vacuna anti-garrapata pasan por una etapa de consolidación científica, los logros alcanzados, el conocimiento generado y las experiencias de los investigadores, proporcionan elementos para llegar, en un mediano plazo, al objetivo deseado. Muchas dudas y retos quedan a la vista de los diferentes grupos de investigación interesados en esta área, particularmente el hecho de la actividad de los biólogos en condiciones de campo, en donde se enfrenta la estrategia inmunológica, planteada y desarrollada en el laboratorio, a las condiciones de interrelación con diversos elementos que conforman la triada epidemiológica de las infestaciones con garrapata. De ahí que aún quede mucho por experimentar y conocer no sólo de los antígenos ya reportados sino también de los nuevos y de las posibles combinaciones de diferentes antígenos de diverso origen en un inmunógeno.

Las conclusiones del presente estudio son: se ha logrado definir que el perfil de proteínas del intestino de la garrapata B. microplus, se puede estudiar a partir de un proceso sencillo que conserva en forma nativa a las

proteínas, las cuales se encuentran en escasa proporción. Además, dichas proteínas están en un alto porcentaje asociadas a carbohidratos, como glicoproteínas.

Se han identificado cinco proteínas mediante I.E.T., que se consideran como potencialmente antigénicas, y que guardan similares características inmunoquímicas que las observadas en el patrón electroforético. Este hecho debe de considerarse para experimentos futuros dado que ambas, la escases de proteína en los extractos y su asociación con azúcares, son elementos importantes en los procesos de aislamiento y purificación así como en los de la evaluación de sus características inmunoprotectoras en ganado bovino; el uso de técnicas modernas como la del DNA recombinante, pueden ayudar a manipular de forma más sencilla los aspectos mencionados anteriormente.

La localización "in situ" de los antígenos detectados en el estudio, viene a sumarse a las características intrínsecas de los mismos y dan certeza a las afirmaciones hechas con anterioridad en este escrito.

La posibilidad de investigar el uso de antígenos comunes entre larvas e intestinos, puede ser un elemento adicional en la búsqueda de un agente inmunoprofiláctico que debe tenerse en cuenta en futuros experimentos. Al respecto, la aportación que se realizó en esta oportunidad no debe soslayarse puesto que la evidencia experimental existe, como aquí se ha demostrado.

La posible similitud entre cepas de garrapatas de diferente origen geográfico es otro elemento que debe ser considerado de manera más formal. Las observaciones realizadas en el presente trabajo representan un antecedente importante en este aspecto.

La cepa "Zapata" de garrapatas B. microplus, se comportó biológicamente de manera excepcional; la caracterización parcial de su ciclo de vida reportada en este estudio, debe de ser preámbulo para realizar una más elaborada dado que esta cepa se puede considerar de referencia para futuros estudios en inmunología de B. microplus, en ganado bovino en México.

El presente estudio ha permitido demostrar que existen varias proteínas antigénicas en el intestino de la garrapata Boophilus microplus, algunas similares y otras diferentes a las previamente reportadas en la literatura, y que es necesario experimentar la utilización de estos antígenos identificados, inmunizando bovinos, y valorar su capacidad protectora a las infestaciones experimentales con garrapatas B. microplus.

Debido a la escasa cantidad detectada, de los antígenos identificados a través de las metodologías usadas en este estudio, es importante considerar la utilización en el futuro de técnicas de la ingeniería genética a través del DNA recombinante, para obtener en forma purificada y en grandes cantidades estos antígenos con el objetivo de realizar

experimentos de inmunoprofilaxis en bovinos utilizando un
diseño y número de animales experimentales apropiado.

V. REFERENCIAS.

1. Ackerman, S., Clare, F.B., McGill, T.W. and Sonenshine, D.E.: Passage of host serum components, including antibody across the digestive tract of Dermacentor variabilis. J. Parasitol., 67:737-740 (1981).
2. Ackerman, S., Floyd, M. and Sonenshine, D.E.: Artificial immunity to Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae): Vaccination using tick antigens. J. Med. Entomol., 17:391-397 (1980).
3. Agbede, R.I.S. and Kemp, D.H.: Digestion in the cattle tick Boophilus microplus: Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. Int. J. Parasitol., 15:147-157 (1985).
4. Agbede, R.I.S. and Kemp, D.H.: Immunization of cattle against Boophilus microplus using extracts derived from adult female ticks: Histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. Int. J. Parasitol., 16:35-41 (1986).
5. Aguirre, E.J., Sobrino, A.L., Santamaría, V., Aburto, A.S., Román, S.E., Hernández, C.M., Ortiz, E.M. y Ortiz, N.A.: Resistencia de garrapatas en México. Memorias Primer Seminario Internacional de Parasitología Animal. Cuernavaca, Morelos, México. 1986. 281-306. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, D.F. (1988).

6. Ageyi, A.D., Herbert, I.V. and Runham, N.W.: Histochemical localization of acid phosphatase and non-specific esterase in the midguts of two species of tick, Boophilus microplus and Rhipicephalus appendiculatus, as determined by light microscopy. Parasitol. Res., 77:629-634 (1991).
7. Alger, N.E. and Cabrera, J.: An increase in death rate of Anopheles stephensis fed on rabbits immunized with mosquito antigen. J. Econ. Entomol., 65:165-168 (1972).
8. Allen, J.R.: Tick resistance: Basophil in skin reactions of resistant guinea pig. Int. J. Parasitol., 3:195-200 (1973).
9. Allen, J.R. and Humphreys, S.J.: Immunization of guinea pigs and cattle against ticks. Nature, 280:491-493 (1979).
10. Allen, J.R. and Kemp, D.H.: Observations on the behavior of Dermacentor andersoni larvae infesting normal and tick resistant guinea pigs. Parasitology, 84:195-204 (1982).
11. Allen, J.R., Khalil, H.M., and Graham, J.E.: The location of tick salivary antigens, complement and immunoglobulin in the skin of guinea pigs infested with Dermacentor andersoni larvae. Immunology, 38:467-472 (1979).
12. Allen, J.R., Khalil, H.M. and Wikel, S.K.: Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick resistant guinea pigs. J. Immunol., 122:563-565 (1979).
13. Allingham, P.G., Kerling, R.L., Tellam, R.L., Briscoe, S.J. and Standfast, H.A.: Passage of host immunoglobulin across the midgut epithelium into haemolymph of blood-fed buffalo

- flies Haematobia irritans exigua. J. Insect Physiol., 38:9-17 (1992).
14. Alvarado, R.V. e González, J.C.: A postura e a viabilidade do Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae), em condicoes do laboratorio. Rev. Lat. Amer. Microbiol., 21:31-36 (1979).
15. Backer, F.J. and Silvertone, R.E.: Introduction to Medical Laboratory Technology. Butterworths Co. London, U.K., 1976.
16. Balashov, Y.S.: Blood sucking ticks (Ixodoidea) - vectors of diseases of man and animals. Misc. Public. Entomol. Soc. Am., 8:161-376 (1972).
17. Banerjee, D.P., Momin, R.R. and Samantaray, S.: Immunization of cattle (Bos indicus X Bos taurus) against Hyalomma anatolicum anatolicum using antigens derived from tick salivary gland extracts. Int. J. Parasitol., 20:969-972 (1990).
18. Barriga, O.O., Andujar, F., Sahibi, H. and Andrzejewski, W.J.: Antigens of Amblyomma americanum ticks recognized by repeatedly infested sheep. J. Parasitol., 77:710-716 (1991).
19. Barriga, O.O., Da Silva, S.S. and Azevedo, J.S.: Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with Boophilus microplus. J. Parasitol., 79:710-715 (1993).
20. Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Mukai, L.S. and Rosa, P.C.S.: Immunization of dogs, hamster and guinea pigs against

- Rhipicephalus sanguineus using crude unfed adult tick extracts. Vet. Parasitol., 52:79-90 (1994).
21. Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W. and McNeil, J.H.: Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycolmethacrylate, glass knives and simple stains. Stain Tech., 51:71-97 (1976).
22. Brossard, M.: Immunological relations between bovines and ticks, particularly between bovines and Boophilus microplus. Acta Trop., 33:15-36 (1976).
23. Brossard, M.: Rabbits infested with the adults of Ixodes ricinus L.: Passive transfer of resistance with immune serum. Bull. Soc. Pathol. Exotique, 70:289-294 (1977).
24. Brossard, M. and Girardin, P.: Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult Ixodes ricinus L.: Humoral factors influence feeding and egg laying. Experientia, 35:1395-1396 (1979).
25. Brossard, M., Rutti, B., and Haug, T.: Immunological relationships between host and ixodid ticks, Parasite-Host Associations: Coexistence or conflict?. Edited by: Toft, C.A., Aeschlimann, A. and Bolis, L., 177-220, Oxford University Press, U.K., 1991.
26. Brown, S.J.: Western Blot analysis of Amblyomma americanum - derived stage - specific and shared antigens using serum from guinea pigs expressing resistance. Vet. Parasitol., 28:163-171 (1988).

27. Brown, S.J.: Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. II. Description of rabbit-acquired immunity of Amblyomma americanum ticks and identification of potential tick antigens by Western Blot analysis. Vet. Parasitol., 28:245-259 (1988).
28. Brown, S.J.: Highlights of contemporary research on host immune responses to ticks. Vet. Parasitol., 28:321-334 (1988).
29. Brown, S.J. and Askenase, P.W.: Cutaneous basophil response and immune resistance of guinea pigs to ticks: Passive transfer with peritoneal exudate cells of serum. J. Immunol., 127:2163-2167 (1981).
30. Brown, S.J., Barker, R.W. and Askenase, P.W.: Bovine resistance to Amblyomma americanum ticks: An acquired immune response characterized by cutaneous basophil infiltrates. Vet. Parasitol., 16:147-165 (1984).
31. Brown, S.J., Galli, S.J., Gleich, G.J. and Askenase, P.W.: Ablation of immunity to Amblyomma americanum by anti-basophil serum: Cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. J. Immunol., 129:790-796 (1982).
32. Brown, S.J., Shapiro, S.Z. and Askenase, P.W.: Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. I. Immunization of guinea pigs with Amblyomma americanum derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein

antigen with guinea pig anti-tick antibodies. J. Immunol., 133:3319-3325 (1984).

33. Burnette, N.W.: "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem., 112:195-203 (1981).

34. Clarke, F.C., Els, D.A., Heller-Haupt, A., Rechav, Y. and Varma, M.G.R.: Expression of acquired immunity to immature stages of the tick Rhipicephalus evertsi evertsi by rabbits and guinea pigs. Med. Vet. Entomol., 3:35-39 (1989).

35. Culling, C.F.A.: Handbook of Histopathological Techniques. Butterworths, Co. London. 1957.

36. Da-Silva, V.I., Shozo, O.L. and Masuda, O.: Serum of Boophilus microplus infested cattle reacts with different tick tissues. Vet. Parasitol., 52:71-78 (1994).

37. Dharampaul, S., Kaufman, W.R. and Belosevic, M.: Differential recognition of saliva antigens from the ixodid tick Amblyomma hebraeum (Acari: Ixodidae) by sera from infested and immunized rabbits. J. Med. Entomol., 30:262-266 (1993).

38. Dusbábek, F., Grubhoffer, L. and Kohnová, P.: Immunology of feeding of adult argasid ticks on birds, Modern Acarology, Vol. 1. Edited by: Dusbábek, F. and Bukva, V., 89-94, Academia Prague and SPB Academic Publ. The Hague, 1991.

39. Elvin, C.M. and Kemp, D.H.: Generic approaches to obtaining efficacious antigens from vector arthropods. Int. J. Parasitol., 24:67-79 (1994).
40. Essuman, S., Dipeolu, O.O. and Odhiambo, T.R.: Immunization of cattle with a semi-purified fraction of solubilized membrane-bound antigens extracted from the midgut of the tick Rhipicephalus appendiculatus. Exp. Appl. Acarol., 13:65-73 (1991).
41. Essuman, S., Hassanali, A., Nyindo, M. and Ole-Sitayo, E.N.: Augmentation of host naturally acquired immunity by solubilized membrane-bound midgut proteins of the tick Rhipicephalus appendiculatus. J. Parasitol., 78:466-470 (1992).
42. F.A.O.: El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual Práctico de Campo. Vol. I: Control de las garrapatas. F.A.O., Roma, Italia, 1987.
43. Fivaz, B.H., Rencken, I., Cross, R., Terry, S. and Hendry, D.: Specificity and effects of host resistance on the African tick Rhipicephalus zambeziensis (Acarina: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol., 13:223-232 (1991).
44. Galun, R.: Research into alternative arthropod control measures against livestock pest (part 1). Proceedings of the 1975 Workshop of the Ecology and Control of External Parasites of Economic Importance on Bovines in Latin American. Cali, Colombia. 155-161. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia. (1978).

45. Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H.: Methods in Immunology. W.A. Benjamin, Inc., U.S.A., 1977.
46. George, J.E.: Naturally acquired immunity as an element in strategies for the control of ticks in livestock. Insect Sci. Applic., 13:515-524 (1992).
47. Gordon, J.R. and Allen, J.R.: Isolation and characterization of salivary antigens from the female tick Dermacentor andersoni. Parasite Immunol., 9:337-352 (1987).
48. Gough, J.M. and Kemp, D.H.: Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick Boophilus microplus. J. Parasitol., 79:900-907 (1993).
49. Guglielmone, A.A.: Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Proceedings of the 9th. International Veterinary Hemoparasite Disease Conference. Mérida, Yucatan, México. 1993. 21. VHRW, México. (1993).
50. Grubhoffer, L., Uhlir, J. and Volf, P.: Functional and structural identification of a new lectin activity of Borrelia recurrentis spirochetes. Comparative Biochem. Physiol., 105B:535-540 (1993).
51. Hames, B.D.: An introduction to polyacrilamide gel electrophoresis, Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. Edited by Hames, B.D. and Rickwood, D., 1-59, I.R.L. Press, Oxford, 1985.

52. Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A., 1989.
53. Harwood, R.F. and James, M.T.: Entomología Médica y Veterinaria. Limusa. México, 1987.
54. Heller-Haupt, A., Varma, M.G.R., Trinder, P.K.E. and Rechav, Y.: Nymphal ticks as an antigen source for immunization of animals against adults of African Amblyomma ticks. Med. Sci. Res., 17:661-663 (1989).
55. Hernández, O.R.: Efecto de la Ivermectina sobre diferentes estadios de garrapatas Boophilus microplus en bovinos infestados artificialmente. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1985.
56. Hernández, O.R.: Estudios sobre el efecto de cuatro aislamientos de Babesia bigemina en bovinos y garrapatas. Tesis de Maestría en Ciencias. Fac. de Ciencias Agrop. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Mor., 1990.
57. Hoffman, A.: Morfología y sistemática de las garrapatas, Memorias Artrópodos transmisores de enfermedades, México, 1991. 26-37, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México, D.F. (1991).
58. Inokuma, H., Kerlin, R.L., Kemp, D.H. and Willadsen, P.: Effects of cattle tick (Boophilus microplus) infestation on the bovine immune system. Vet. Parasitol., 47:107-118 (1993).

59. Johnston, L.A.Y., Kemp, D.H. and Pearson, R.D.: Immunization of cattle against Boophilus microplus using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity in tick populations. Int. J. Parasitol., 16:27-34 (1986).
60. Jongejans, F., Pegram, R.G., Zivkovic, D., Hensen, A.J., Mwase, E.J., Thielmans, M.J.C., Cosse, A., Niewold, T.A., El Said, A. and Uilenberg, G.: Monitoring of naturally acquired and artificially induced immunity to Amblyomma variegatum and Rhipicephalus appendiculatus ticks under field and laboratory conditions. Exp. Appl. Acarol., 7:181-191 (1989).
61. Kaufman, W.R.: Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. Parasitol. Today, 5:47-56 (1989).
62. Kawamura, A.: Fluorescent Antibody Techniques and their Applications. 2th. ed. University of Tokyo Press and University Park Press, Tokyo and London, 1977.
63. Kemp, D.H.: Respuesta inmune adquirida a garrapatas ixodidas. Memorias 2o. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos, México. 1991, 35-44. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D.F. (1993).
64. Kemp, D.H., Agbede, R.I.S., Johnston, L.A.Y. and Gough, J.M.: Immunization of cattle against Boophilus microplus using extracts derived from adult female ticks: Effects of induced immunity on tick populations. Int. J. Parasitol., 16:115-120 (1986).

65. Kemp,D.H., Koudstaal,D., Roberts,J.A. and Kerr,J.D.: Boophilus microplus: The effect of host resistance on larval attachments and growth. Parasitology, 73:123-136 (1976).
66. Kemp,D.H., Pearson,R.D., Gough,J.M. and Willadsen,P.: Vaccination against Boophilus microplus: Localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. Exp. Appl. Acarol., 7:43-58 (1989).
67. Kemp,D.H., Willadsen,P. and Cobon,G.S.: Desarrollo de una vacuna contra Boophilus microplus, la garrapata tropical del ganado. Memorias 2o. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos, México. 1991. 45-56. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D.F. (1993).
68. Kimaro,E.E. and Opdebeeck,J.P.: Tick infestations on cattle vaccinated with extracts from the eggs and gut of Boophilus microplus. Vet. Parasitol., 52:61-70 (1994).
69. Laemmli,U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685 (1970).
70. Lata,K., Srivastava,P.S., Sinha,S.R.P. and Murtaza,M.: Dermal reactions in cattle and rabbits to the inoculation of whole tissue extracts of engorged female Boophilus microplus ticks. Indian J. Parasitol., 10:259-264 (1986).
71. Lee,R.P., Jackson,L.A. and Opdebeeck,J.P.: Immune responses of cattle to biochemical modified antigens from

the midgut of the cattle tick Boophilus microplus. Parasite Immunol., 13:661-672 (1991).

72. Lee, R.P. and Opdebeeck, J.P.: Isolation of protective antigens from the gut of Boophilus microplus using monoclonal antibodies. Immunology, 72:121-126 (1991).

73. Lee, R.P. and Opdebeeck, J.P.: Localization of antigens in the organs of Boophilus microplus using monoclonal antibodies. Int. J. Parasitol. (In press 1994).

74. Manohar, G.S. and Banerjee, D.P.: Immune responses in rabbits immunized against the tick, Hyalomma anatolicum anatolicum. Indian J. Anim. Sci., 62:505-512 (1992).

75. Mbow, M.L., Christe, M., Rutti, B. and Brossard, M.: Absence of acquired resistance to nymphal Ixodes ricinus ticks in BALB/C mice developing cutaneous reactions. J. Parasitol., 80:81-87 (1994).

76. McLaren, D.J., Worms, M.J. and Askenase, P.W.: Cutaneous basophil associated resistance to ectoparasites (ticks). Electron microscopy of Rhipicephalus appendiculatus larval feeding sites actively sensitized guinea pigs and recipients of immune serum. J. Pathol., 139:291-308 (1983).

77. Momin, R.R., Banerjee, D.P. and Samantaray, S.: Attempted immunization of crossbred calves (Bos taurus X Bos indicus) by repeated natural attachment of ticks Hyalomma anatolicum anatolicum Koch (1884). Trop. Anim. Health Prod., 23:227-231 (1991).

78. Mongi, A.O. and Aganyo, C.A.: Rhipicephalus appendiculatus: Immunochemical isolation, identification and characterization of tick gut antigens recognized by IgGs derived from rabbits repeatedly infested with ticks. Insect Sci. Appl., 11:907-916 (1990).
79. Newson, R.M. and Chiera, J.W.: Development of resistance in calves to nymphs of Rhipicephalus appendiculatus (Acarina: Ixodidae) during test feeds. Exp. Appl. Acarol., 6:19-27 (1989).
80. Nithiuthai, S. and Allen, J.R.: Effects of ultraviolet irradiation on the acquisition and expression of tick resistance in guinea pigs. Immunology, 51:153-159 (1984).
81. Nolan, J.: Acaricide resistance in single and multi-host ticks and strategies for control. Parasitology, 32:145-153 (1990).
82. Nolan, J., Wilson, J.T., Green, P.E. and Bird, P.E.: Synthetic pyrethroid resistance in field samples of the cattle tick (Boophilus microplus). Aust. Vet. J., 66:179-182 (1989).
83. Nuñez, J.L., Muñoz, C.M. y Moltedo, H.L.: Boophilus microplus. La Garrapata del Ganado Vacuno. Hemisferio Sur, Argentina, 1982.
84. Nyindo, M., Essuman, S. and Dhadialla, T.S.: Immunization against ticks: Use of salivary gland antigens and infestations with Rhipicephalus appendiculatus

- (Acari: Ixodidae) in rabbits. J. Med. Entomol., 26:430-434 (1989).
85. Opdebeeck, J.P.: Vaccines against blood-sucking arthropods. Vet. Parasitol., 54:205-222 (1994).
86. Opdebeeck, J.P. and Daly, K.E.: Immune responses of infested and vaccinated Hereford cattle to antigens of the cattle tick, Boophilus microplus. Vet. Immunol. Immunopathol., 25:99-108 (1990). ◆
87. Opdebeeck, J.P., Wong, J.Y.M., Jackson, L.A. and Dobson, C.: Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle tick, Boophilus microplus. Immunology, 63:363-367 (1988).
88. Opdebeeck, J.P., Wong, J.Y.M., Jackson, L.A. and Dobson, C.: Hereford cattle immunized and protected against Boophilus microplus with soluble and membrane associated antigens from the midgut of ticks. Parasite Immunol., 10:405-410 (1988).
89. Opdebeeck, J.P., Wong, G.Y.M. and Dobson, C.: Hereford cattle protected against Boophilus microplus with antigens purified by immunoaffinity chromatography from larval and adult ticks. Immunology, 67:388-393 (1989).
90. Panda, D.N., Ansari, M.Z. and Sahai, B.N.: Immunization of cattle with Boophilus microplus adult female and larval extracts: Feeding, survival and reproductive behaviour of ticks on immunized cattle. Indian J. Anim. Sci., 63:123-127 (1993).
91. Quiroz, R.H.: Situación actual de la problemática de las garrapatas. Memorias 2o. Seminario Internacional de

Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos, México. 1991. 3-18.
Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México,
D.F. (1993).

92. Rand, K.N., Moore, T., Skriskantha, A., Spring, K.,
Tellam, R., Willadsen, P. and Cobon, G.S.: Cloning and
expression of a protective antigen from the cattle tick
Boophilus microplus. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)., 86:9657-
9661 (1989).

93. Rechav, Y.: Resistance of Brahman and Hereford cattle to
African ticks with reference to serum gamma globulin levels
and blood composition. Exp. Appl. Acarol., 3:219-232 (1987).

94. Rechav, Y., Spickett, A.A., Dauth, J., Tembo, S.D.,
Clarke, F.C., Heller-Haupt, A. and Trider, P.K.E.: Immunization
of guinea pigs and cattle against adult Rhipicephalus
appendiculatus ticks using semipurified nymphal homogenates
and adult gut homogenate. Immunology, 75:700-706 (1992).

95. Ribeiro, J.M.C.: Role of saliva in blood-feeding by
arthropods. Annu. Rev. Entomol., 32:463-478 (1987).

96. Ribeiro, J.M.C.: Role of saliva in tick-host
interactions. Exp. Appl. Acarol., 7:15-20 (1989).

97. Richardson, M.A., Smith, D.R.J., Kemp, D.H. and
Tellam, R.L.: Native and baculovirus-expressed forms of the
immunoprotective protein Bm86 from Boophilus microplus are
anchored to the cell membrane by glycosyl-phosphatidyl
inositol linkage. Insect Mol. Biol., 1:139-147 (1993).

98. Roberts, J.A.: Acquisition by host of resistance to the cattle tick, Boophilus microplus (Canestrini). J. Parasitol., 54:657-662 (1968a).
99. Roberts, J.A.: Resistance of cattle to the tick Boophilus microplus (Canestrini). I. Development of ticks on Bos taurus. J. Parasitol., 54:663-666 (1968b).
100. Roberts, J.A.: Resistance of cattle to the tick Boophilus microplus (Canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. J. Parasitol., 54:667-673 (1968c).
101. Roberts, J.A. and Kerr, J.D.: Boophilus microplus: Passive transfer of resistance in cattle. J. Parasitol., 62:485-488 (1976).
102. Rodriguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., Falcón, V., Sánchez, G., Bringas, R., Cordovés, C., Valdés, M., Leonart, R., Herrera, L. and Fuente De la, J.: High level expression of the Boophilus microplus Bm86 antigen in the yeast Pichia pastoris forming highly immunogenic particles for cattle. J. Biotech., (In press 1994).
103. Rutti, B. and Brossard, M.: Repetitive detection by immunoblotting of an integumental 25 Kd antigen in Ixodes ricinus and corresponding 20 Kd antigen in Rhipicephalus appendiculatus with sera of pluriinfested mice and rabbits. Parasitol. Res., 75:325-329 (1989).
104. Sauer, J.R., McSwain, J.L. and Essenberg, R.C.: Cell membrane receptors and regulation of cell function in ticks

- and blood-sucking insects. Int. J. Parasitol., 24:33-52 (1994).
105. Schleger,A.V., Lincoln,D.T., McKenna,R.V., Kemp,D.H. and Roberts,J.A.: Boophilus microplus: Cellular responses to larval attachments and their relationship to host resistance. Aust. J. Biol. Sci., 29:499-512 (1976).
106. Schlein,Y. and Lewis,C.T.: Lesions in haematophagous flies after feeding on rabbits immunized with fly tissues. Physiol. Entomol., 1:55-59 (1976).
107. Schorderet,S. and Brossard,M.: Changes in immunity to Ixodes ricinus by rabbits infested at different levels. Med. Vet. Entomol., 7:186-192 (1993).
108. Smith,R.D.: Ciclo biológico de Babesia en la garrapata, Ciencia Veterinaria, Vol. 2. Editado por: Moreno,Ch.R. 234-264. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1978).
109. Smith,R.D., Miranpuri,G.S., Adams,J.H. and Ahrens,E.H.: Borrelia theileri: Isolation from ticks (Boophilus microplus) and tick-borne transmission between splenectomized calves. Am J. Vet. Res., 46:1396-1398 (1985).
110. Solís,S.S.: Epidemiología de las garrapatas Boophilus spp. y Amblyomma spp. en México. Memorias 2o. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos, México. 1991. 19-30. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D.F. (1993).

111. Shapiro, S.Z., Voigt, W.P. and Fujisaki, K.: Tick antigens recognized by serum from guinea pigs resistant to infestation with the tick Rhipicephalus appendiculatus. J. Parasitol., 72:454-463 (1986).
112. Soulsby, E.J.L.: Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos. 7a. ed. Interamericana, México, D.F., 1987.
113. Srivastava, P.S., Lata, K., Sisha, S.R.P., Prasad, S. and Murtaza, M.: Experimental studies on the pattern of development of Boophilus microplus larval ticks on cattle immunized with homologous tick tissue antigen. Riv. Parassitol., 4:201-206 (1987).
114. Stone, B.F., Commins, M.A. and Kemp, D.H.: Artificial feeding of the Australian paralysis Ixodes holocyclus and collection of paralyzing toxin. Int. J. Parasitol., 13:447-454 (1983).
115. Sutherst, R.W., Maywald, G.F., Kerr, J.D. and Stegeman, D.A.: The effect of the cattle tick (Boophilus microplus) on the growth of Bos indicus X Bos taurus steers. Aust. J. Agric. Res., 34:317-327 (1983).
116. Theis, J.H. and Budwiser, P.D.: Rhipicephalus sanguineus: Sequential histopathology at the host-arthropod interface. Exp. Parasitol., 36:77-105 (1974).
117. Tizard, I.: Veterinary Immunology: An Introduction. 4th. ed. W.B. Saunders Co. U.S.A., 1992.

118. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)., 76:4350-4354 (1979).
119. Towbin, H. and Gordon, J.: Immunoblotting and dot immunoblotting-current status and outlook. J. Immunol. Methods, 72:313-340 (1984).
120. Tracey-Patte, P.D., Kemp, D.H. and Johnston, L.A.Y.: Boophilus microplus: Passage of bovine immunoglobulins and albumina across the gut of cattle ticks feeding on normal or vaccinated cattle. Res. Vet. Sci., 43:287-290 (1987).
121. Trager, W.: Acquired immunity to ticks. J. Parasitol., 25:57-81 (1939).
122. Vega, M.C.: Actualidad e importancia de las enfermedades causadas por los hemoparásitos. Memorias 2o. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos, México. 1991. 144-152. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D.F. (1993).
123. Wagland, B.M.: Host resistance to cattle tick (Boophilus microplus) in Brahman (Bos indicus) cattle. I. Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20,000 larvae. Aust. J. Agric. Res., 26:1073-1080 (1975).
124. Wagland, B.M.: Host resistance to cattle tick (Boophilus microplus) in Brahman (Bos indicus) cattle. II. The dynamics of resistance in previously unexposed and exposed cattle.

III. Growth on previously unexposed animals. Aust. J. Agric. Res., 29:395-409 (1978).

125. Walker, A.R., Fletcher, J.D. and Todd, I.: Resistance between stages of the tick Rhipicephalus appendiculatus (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol., 27:955-961 (1990).

126. Wharton, R.H. and Norris, K.R.: Control of parasitic arthropods. Vet. Parasitol., 6:135-161 (1980).

127. Whelen, A.C. and Wikel, S.K.: Acquired resistance of guinea pigs to Dermacentor andersoni mediated by humoral factors. J. Parasitol., 79:908-917 (1993).

128. Wikel, S.K.: The induction of host resistance to tick infestation with salivary gland antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30:284-288 (1981).

129. Wikel, S.K.: Immunological control of hematophagous arthropod vector: Utilization of novel antigens. Vet. Parasitol., 29:235-264 (1988).

130. Wikel, S.K. and Allen, J.R.: Acquired resistance to ticks. I. Passive transfer of resistance. Immunology, 30:311-316 (1976).

131. Wikel, S.K. and Allen, J.R.: Acquired resistance to ticks. III. Cobra venom factor and their resistance response. Immunology, 32:457-465 (1976).

132. Wikel, S.K., Ramachandra, R.N. and Bergman, D.R.: Immunological strategies for expression of vector arthropods: Novel approaches in vector control. Bull. Soc. Vector Ecol., 17:10-19 (1992).

133. Wikel, S.K., Ramachandra, R.N. and Bergman, D.R.: Tick-induced modulation of the host immune response. Int. J. Parasitol., 24:59-66 (1994).
134. Wikel, S.K. and Whelen, J.R.: Ixodid-host immune interaction. Identification and characterization of relevant antigens and tick induced host immunosuppression. Vet. Parasitol., 20:149-174 (1986).
135. Willadsen, P.: Immunity to ticks. Adv. Parasitol., 18:293-313 (1980).
136. Willadsen, P. and Kemp, D.H.: Vaccination with "concealed" antigens for the tick control. Parasitol. Today, 4:196-198 (1988).
137. Willadsen, P. and McKenna, R.V.: Binding of antigens to tissues: The example of Boophilus microplus and bovine skin. Int. J. Parasitol., 13:593-598 (1983).
138. Willadsen, P., McKenna, R.V. and Riding, G.A.: Isolation from the cattle tick, Boophilus microplus, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. Int. J. Parasitol., 18:183-189 (1988).
139. Willadsen, P. and McKenna, R.V.: Vaccination with "concealed" antigens: Myth or reality?. Parasite Immunol., 13:605-616 ((1991)).
140. Willadsen, P. and Riding, G.A.: Characterization of a proteolytic enzyme inhibitor with allergenic activity.

Multiple functions of a parasite-derived protein. Biochem. J., 177:41-47 (1979).

141. Willadsen, P., Riding, G.A., McKenna, R.V., Kemp, D.H., Tellam, R.L., Nielsen, J.N., Lahnstein, J., Cobon, G.S. and Gough, J.M.: Immunologic control of a parasitic arthropod: Identification of a protective antigen from Boophilus microplus. J. Immunol., 143:1346-1351 (1989).

142. Willadsen, P. and Williams, P.G.: Isolation and partial characterization of an antigen from the cattle tick, Boophilus microplus. Immunochemistry, 13:591-597 (1976).

143. Willadsen, P., Williams, P.G., Roberts, J.A. and Kerr, J.D.: Responses of cattle to allergens from Boophilus microplus. Int. J. Parasitol., 8:89-95 (1978).

144. Willadsen, P., Wood, G.M. and Riding, G.A.: The relation between histamine concentration, histamine sensitivity and the resistance of cattle to the tick, Boophilus microplus. Z. Parasitenkd., 59:87-94 (1979).

145. Wong, J.Y.M. and Opdebeeck, J.P.: Protective efficacy of antigens solubilized from gut membranes of the cattle tick, Boophilus microplus. Immunology, 66:149-155 (1989).

146. Wong, J.Y.M. and Opdebeeck, J.P.: Larval membrane antigens protected Hereford cattle against infestation with Boophilus microplus. Parasite Immunol., 12:75-84 (1990).

147. Wong, J.Y.M. and Opdebeeck, J.P.: Immunity in vaccinated cattle exposed to experimental and natural infestations with Boophilus microplus. Int. J. Parasitol., 23:689-692 (1993).

148. Worms, M.S., Askenase, P.W. and Brown, S.J.: Requirements for host Fc. receptors and IgG antibodies in host immunoresponses against Rhipicephalus appendiculatus. Vet. Parasitol., 28:153-161 (1988).