



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**“Caracterización inmunoquímica de un péptido recombinante de  
Subolesin y evaluación de su potencial inmunogénico contra la  
garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”**

**TESIS**

**Que para optar por el grado de Doctor en Ciencias**

**PRESENTA**

**Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**Dr. Rodrigo Rosario Cruz**

Unidad Académica de Ciencias Naturales, UAGro

**COMITÉ TUTORAL:**

**Dr. Héctor Quiroz Romero**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Dr. Moisés Martínez Velázquez**

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de  
Jalisco, A.C.

**Ciudad de México**

**Junio 2016.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.



**inifap**

Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias



Fundación  
Produce de Guerrero, A.C.

**“Caracterización inmunoquímica de un péptido recombinante de Subolesin y evaluación de su potencial inmunogénico contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”**

**TESIS**

**Que para optar por el grado de Doctor en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**Dr. Rodrigo Rosario Cruz**

Unidad de Investigación en Biotecnología Salud y Ambiente (BIOSA-UAGro) de la Unidad Académica de Ciencias Naturales, UAGro.

**COMITÉ TUTORAL:**

**Dr. Héctor Quiroz Romero**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

**Dr. Moisés Martínez Velázquez**

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis de Doctorado a todas las personas que creyeron en mí....

La primera de ellas es mi madre, quien con sus consejos, ayuda y atención logró encaminarme por la senda del éxito, esta tesis es un logro más, resultado de todo su apoyo y toda su confianza. Con cariño y gran admiración para ti:

Laura Quintanilla

Algo muy especial para mí es la familia, a quienes les agradezco todas sus atenciones. Siempre han estado ahí cuando los necesito, en las buenas y en las malas. Por brindarme siempre su ayuda en todo momento de mi vida. Con mucho cariño para:

Dania Lagunes, Raúl Sotres, Sabino Cruz

A una persona que llego a mi vida cuando más la pedía, que llego a completar mi felicidad, un incentivo a superarme día con día. Una mujer con gran corazón y lindos sentimientos, que sé que cuento con todo su apoyo y toda tu confianza. Gracias por estar:

Ninna

Dedicación especial para las dos personas más importantes que han pasado por mi vida, que gracias a ellos he llegado a donde estoy, que siempre los llevo en mi corazón y que sé que desde donde están disfrutan este éxito tanto como yo. Son ellos mi inspiración y mi motivación a ser mejor persona. Los amo con mi vida:

José Guadalupe Quintanilla Muñiz †

Amparo Martínez Ortiz †

## AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este espacio para agradecer la ayuda y el apoyo de todas aquellas personas que han contribuido de una u otra forma a que este trabajo haya llegado hasta el final:

Primeramente, quiero agradecer a la máxima casa de estudios, que me brindó la oportunidad de cursar el programa de Doctorado y obtener una formación sólida a lo largo de este tiempo. La Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Darles las gracias a mis tres directores, por la confianza depositada en mí y su gran ayuda en la elaboración de este trabajo. Al Dr. Rodrigo Rosario Cruz, Dr. Moisés Martínez Velázquez y Dr. Héctor Quiroz Romero.

A los miembros del jurado: Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz, Dr. Julio Vicente Figueroa Millán, Dra. Guadalupe Prado Ochoa y Dra. María Dolores Correa Beltrán. Por sus comentarios, sugerencias y aportaciones para la mejora de este documento de tesis.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de beca otorgado para sustentar mis estudios durante el Doctorado. A la Universidad Autónoma de Guerrero y la Fundación Produce Guerrero por el recurso financiero para desarrollar el presente proyecto.

Al CENID-PAVET, INIFAP por todas las facilidades para el desarrollo de esta investigación. Al personal de la Unidad de Artropodología por el apoyo, las atenciones y la paciencia para terminar el proceso.

A todos mis amigos y amigas que siempre están cuando los necesito para ofrecerme su ayuda y amistad incondicional. ¡Los quiero locos!

Gracias a todos.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener un péptido recombinante, mediante el análisis *in silico* del gen *subolesin*, con el fin de predecir la región más inmunogénica de la secuencia del gen previamente publicado en el GenBank. Una vez que se identificó la región de interés, se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para lograr la amplificación por PCR de un fragmento de 303 pb. El producto de amplificación fue clonado y expresado en el vector pET101/D-TOPO<sup>®</sup> y analizado mediante electroforesis en geles de acrilamida y Western Blot, detectándose un péptido de 15 kDa. Finalmente, se purificó por cromatografía de afinidad por medio de columnas Ni-NTA spin (Qiagen<sup>®</sup>) y se adyuvó con Montanide ISA 50 V (Seppic<sup>®</sup>, Paris, France) para el ensayo de inmunización. Se utilizaron 4 bovinos machos de 6 meses de edad, cruce de razas europeas, provenientes de una zona libre de garrapatas. Los animales se dividieron en 2 grupos de 2 cada uno, el primer grupo fue inmunizado con 2 dosis de 100 µg del péptido recombinante subolesin más adyuvante en la semana 1 y 5, y el segundo grupo recibió solución salina/adyuvante (testigo). Quince días después de la segunda inmunización, fueron infestados artificialmente con 250 mg de larvas de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de 30 días de edad para evaluación de parámetros. Las garrapatas se observaron periódicamente y una vez que completaron su repleción fueron colectadas, pesadas y depositadas en cajas Petri dentro de incubadoras con humedad relativa de 80% y temperatura de 27°C para permitir la oviposición y eclosión a las 2 y 5 semanas respectivamente. Se tomaron muestras de sangre semanalmente, para medir el nivel de anticuerpos mediante ELISA indirecto. Los resultados en el número de garrapatas colectadas y en el porcentaje de eclosión mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), obteniendo 79% y 30% de reducción respectivamente. Los niveles de anticuerpos se incrementaron considerablemente a partir de la segunda inmunización. Se concluye que la predicción de la región más inmunogénica de este gen, permite dirigir la respuesta inmune contra los epítomos contenidos en esta parte de la secuencia y de esta manera incrementar la eficacia en el control de las infestaciones por *R. microplus*.

**Palabras clave:** Subolesin, péptido recombinante, inmunización, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## ABSTRACT

The aim of this study was to obtain a recombinant peptide, by using an *in silico* analysis of the *subolesin* gene sequence published in GenBank in order to predict the most immunogenic region to be immunochemically analyzed. Specific oligonucleotides were designed to achieve a PCR amplification product of 303 bp size. The amplification product was cloned into the pET101/D-TOPO<sup>®</sup> vector and its expressed product analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting, detecting a peptide of approximately 15 kDa. Finally, the recombinant peptide were purified by affinity chromatography (Qiagen<sup>®</sup>) using Ni-NTA spin columns and the peptide adjuvantation was made with Montanide ISA 50 V (Seppic<sup>®</sup>, Paris, France) for the immunization trial in calves. Four crossbred, 6 months old males, obtained from a tick-free region were used. The animals were divided into two groups of two bovines each. The first group was immunized with two doses (week 1, 5) of the immunogen containing 100 µg of purified recombinant peptide formulated as described above, and the second group was the control and received saline solution/adjuvant. Fifteen days after the second immunization, calves were infested with 250 mg of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae ticks of 30 days of age at the time of infestation for data collection and evaluation. Ticks were monitored daily and adult female ticks dropping off from calves were collected, counted and weighted and assessed for oviposition and egg hatching at week 2 and 5 respectively. Blood samples were obtained weekly, in order to evaluate the antibody production in serum by indirect ELISA. The immunogenic response effect produced in calves on the final number of adult female ticks and effect on egg hatching from these ticks were statistically significant ( $p < 0.05$ ), obtaining a reduction of 79% and 30% respectively. The antibody production were higher after the second immunization of calves. From the results obtained in this study, it is concluded that the bioinformatics prediction of the most immunogenic region for the *subolesin* product gene, allows for most efficiently direct the immune response against the epitopes contained in this part of the protein sequence, thus increasing the efficacy of the immunological control of *R. microplus* infestations.

**Key words:** Subolesin, recombinant peptide, immunization, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>I. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
1.1 Garrapatas y su importancia .....	3
1.2 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	4
1.3 Clasificación taxonómica .....	5
1.4 Distribución geográfica .....	6
1.5 Ciclo biológico .....	8
1.6 Importancia económica .....	9
1.7 Control de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	10
1.8 Resistencia de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	13
1.9 Control inmunológico .....	15
1.10 Desarrollo de vacunas contra garrapatas .....	17
1.11 Subolesin .....	21
1.12 Akirinas .....	24
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	27
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	29
4.1 Objetivo general .....	29
4.2 Objetivos específicos .....	29
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	30
5.1 Cepa de referencia .....	30
5.2 Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del gen <i>subolesin</i> .....	30
5.3 Amplificación del fragmento del gen <i>subolesin</i> .....	32
5.3.1 Diseño de oligonucleótidos .....	32
5.3.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA .....	32
5.3.3 Amplificación mediante la técnica de PCR .....	33
5.4 Clonación del inserto en el vector pET101/D-TOPO® .....	34



5.5 Purificación de plásmido y secuenciación.....	34
5.6 Inducción del péptido recombinante .....	35
5.7 Síntesis del péptido recombinante .....	36
5.7.1 Gel de acrilamida SDS-PAGE.....	36
5.7.2 Western blot.....	36
5.7.3 Purificación del péptido recombinante .....	37
<b>VI. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>39</b>
6.1 Bovinos .....	39
6.2 Garrapatas .....	40
6.3 Protocolo de inmunización .....	40
6.4 Infestación con larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	40
6.5 Determinación de la cinética de anticuerpos por ELISA indirecto....	41
6.6 Análisis de los resultados .....	42
6.7 Análisis estadístico .....	43
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
7.1 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>subolesin</i> .....	44
7.2 Predicción de la región antigénica del gen <i>subolesin</i> .....	46
7.3 Hidrofobicidad .....	47
7.4 Epítomos de células B .....	48
7.5 Amplificación por PCR del fragmento del gen <i>subolesin</i> .....	51
7.6 Clonación y secuenciación del fragmento amplificado por PCR .....	52
7.7 Expresión del péptido recombinante.....	54
7.7.1 Análisis de proteínas.....	54
7.7.2 Western blot.....	55
7.8 Purificación y preparación del péptido recombinante.....	56
7.9 Evaluación del efecto inmunológico sobre las garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	57
7.10 Determinación de la cinética de anticuerpos mediante ELISA indirecto .....	58

<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>61</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>67</b>
<b>XI.</b>	<b>APÉNDICES</b> .....	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888).	4
2.	Clasificación filogenética de las subfamilias de garrapatas.	6
3.	Situación actual de la campaña contra la garrapata <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en México.	7
4.	Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .	8
5.	Programa de PCR para amplificar el fragmento del gen <i>subolesin</i> .	33
6.	Alineamiento múltiple de las secuencias reportadas en México que codifican para la proteína Subolesin de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .	45
7.	Predicción de antigenicidad en la secuencia que codifica para la proteína Subolesin, utilizando el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar.	46
8.	Secuencia de aminoácidos deducida a partir del amplicón de 303 pb, seleccionado para la síntesis de oligonucleótidos.	47
9.	Predicción de regiones hidrofóbicas del péptido subolesin con el programa ProtScale.	48

10.	Predicción de los epítomos lineales de células B dentro de la secuencia del péptido subolesin.	49
11.	Modelo 3D obtenido por el método I-Tasser.	50
12.	Predicción de los epítomos conformacionales dentro de la secuencia del péptido subolesin.	51
13.	Electroforesis de gel de agarosa 1% para el fragmento del gen <i>subolesin</i> .	52
14.	Alineamiento de la secuencia obtenida de la clona recombinante con la secuencia reportada en el GenBank Santa Luisa (DQ159965.1), que codifica para la proteína Subolesin de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .	53
15.	Electroforesis de gel de acrilamida SDS-PAGE 15% para la expresión del péptido recombinante subolesin.	54
16.	El anticuerpo anti-His detecta el péptido recombinante subolesin mediante inmunoelectrotransferencia.	55
17.	Electroforesis de gel de acrilamida SDS-PAGE 15% para la purificación del péptido recombinante subolesin.	56
18.	Cinética de la producción de anticuerpos obtenida mediante la prueba de ELISA indirecto.	60

## LISTA DE CUADROS

1. Porcentaje de reducción en los parámetros reproductivos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 58

## ABREVIATURAS

<b>Anti-6His</b>	Anticuerpo-cola de 6 Histidinas
<b>µg/ml</b>	Microgramos por mililitro
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>°C</b>	Grados Celcius
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>A</b>	Adenina
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>dsRNA</b>	Ácido ribonucleico de doble cadena
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>C</b>	Citocina
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido trifosfato
<b>D.O.</b>	Densidad Óptica
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>g</b>	gramo
<b>G</b>	Guanina
<b>hr</b>	Hora
<b>iRNA</b>	RNA de interferencia
<b>IBT</b>	Instituto de Biotecnología
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	Kilo bases
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>kDa</b>	Kilo Daltones
<b>LB</b>	Luria Bertani

<b>LAC</b>	D-Lactosa
<b>Ni-NTA</b>	Níquel-Ácido nitrilotriacético
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>mg</b>	Miligramo
<b>min</b>	Minutos
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>ml</b>	Mililitro
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>RT-PCR</b>	Transcriptasa Reversa – Reacción en cadena de la polimerasa
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>s</b>	Segundo
<b>T</b>	Timina
<b>u</b>	Unidades
<b>v</b>	Volts
<b>UV</b>	Ultravioleta

## INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son los ectoparásitos de mayor importancia económica a escala mundial, debido a los efectos directos en la producción, su amplia distribución y la participación que tienen en la transmisión de patógenos. Son hematófagos obligados de animales salvajes, domésticos y humanos (de la Fuente *et al.*, 2008). La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se ha convertido en una de las plagas que más pérdidas económicas causan a la ganadería bovina de zonas tropicales y subtropicales del mundo entero, tanto por su efecto hematófago como por las enfermedades que transmiten (de la Fuente y Kocan, 2006).

Durante muchos años, la estrategia más utilizada para el control de garrapatas en bovinos ha sido la aplicación de ixodicidas (Taylor, 2001; Ostfeld *et al.*, 2006), aunque el uso de estos químicos ha sido eficaz cuando se utilizan correctamente, presentan ciertas limitaciones como son la contaminación ambiental y los residuos en los productos lácteos y cárnicos (George *et al.* 2004), sin olvidar que el mayor inconveniente asociado al control químico se debe principalmente a que favorecen el desarrollo de garrapatas resistentes (George, 2008). En la actualidad el aumento de poblaciones de garrapatas resistentes se ha convertido en un grave problema de carácter mundial que no se debe dejar pasar por alto ya que innovar y fabricar un nuevo producto de salud animal lleva un proceso largo y económicamente elevado (Li *et al.*, 2007). Se ha estimado que descubrir y desarrollar un nuevo ixodicida tiene un costo aproximado de 100 millones de dólares con una vida media de 10 años (Graf *et al.*, 2004).



El problema de resistencia ha motivado el interés por el desarrollo de vacunas contra garrapatas de importancia como una alternativa para evitar la parasitación y a la vez bloquear la transmisión de enfermedades que estos artrópodos transmiten a sus hospederos. Al respecto se han identificado algunas proteínas como candidatos potenciales a vacunas, sin embargo, muy pocos han sido evaluados como antígenos recombinantes en experimentos de inmunización (de la Fuente y Kocan, 2003).

Los avances en la biología de garrapatas de la familia *Ixodidae* para caracterizar los genomas de las diferentes especies (Hill *et al.*, 2005; Ullmann *et al.*, 2005), abre nuevas posibilidades en la búsqueda, identificación y descubrimiento de nuevos antígenos protectores contra garrapatas que sean propuestos como candidatos vacunales y que puedan contribuir a controlar múltiples especies de garrapatas, así como reducir la transmisión de agentes patógenos (de la Fuente *et al.*, 2006b). Por otro lado, actualmente existen herramientas basadas en la biología molecular, como técnicas de genómica, proteómica y de bioinformática que permiten predecir las regiones, péptidos o epítomos más eficientes en la protección, y que pueden ser incluidos en el desarrollo de un inmunógeno (Mosqueda *et al.*, 2012). Un inmunógeno que genere anticuerpos específicos, que confiera protección y que sea eficaz en el control de garrapatas, será un componente indispensable en el establecimiento de programas de control.

El uso de vacunas contra garrapatas, promete ser una alternativa de control viable en un futuro cercano, que evite la selección de garrapatas resistentes, contribuya a mejorar la producción y la salud animal en hatos ganaderos y que sean nobles con el medio ambiente.

## I. Marco teórico

### 1.1 Garrapatas y su importancia

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, que se encuentran distribuidas por todo el mundo, desde el Ártico hasta las regiones tropicales. Transmiten patógenos que afectan a los animales y a los humanos, provocando un impacto mundial. Las enfermedades transmitidas por garrapatas comprenden: Borreliosis, Anaplasmosis, Coxielosis, Francisellosis, Rickettsiosis, Theileriosis, Erliquiosis y Babesiosis, así como enfermedades virales como la encefalitis transmitida por garrapatas. Se consideran responsables de más de 100,000 casos de enfermedades en humanos. A nivel mundial, ocupan el segundo lugar después de los mosquitos en importancia como vectores transmisores de enfermedades en humanos y el primero como vector de patógenos que afectan a la ganadería bovina (Peter *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2008).

El control de las infestaciones por garrapatas que afectan a la salud animal y humana, es importante para la erradicación de enfermedades transmitidas por estos vectores, además de la importancia que tienen en la ganadería, dado que provocan la pérdida de peso en los animales y la reducción de la producción de leche. No obstante, el control de las infestaciones por garrapatas es difícil ya que estos parásitos se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta (Domínguez *et al.*, 2010).

## 1.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La garrapata *Boophilus microplus*, reclasificada como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Barker y Murrell, 2004), es el ectoparásito hematófago más importante que existe en el ganado bovino a nivel mundial, aunque también se puede encontrar en diversos hospederos, entre ellos: búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres (de la Fuente y Kocan, 2006) (Figura 1). En la industria ganadera bovina una carga alta de garrapatas en los animales se refleja en la disminución en la producción de carne y leche, daños en la piel, toxicosis, aumento en gastos por tratamientos garrapaticidas, transmisión de enfermedades como babesiosis (causada por los parásitos protozoarios *Babesia bigemina* y *B. bovis*) y la anaplasmosis (causada por *Anaplasma marginale*) (Rajput *et al.*, 2006). Otro factor a considerar es la limitación de la comercialización y movilización de animales infestados en zonas libres de garrapatas, limitando la exportación de ganado (Mejía *et al.*, 2004; Rosario-Cruz y Domínguez, 2006; González, 2007), lo que implica un costo estimado de 2.5 billones de dólares anuales (Lew-Tabor *et al.*, 2014).

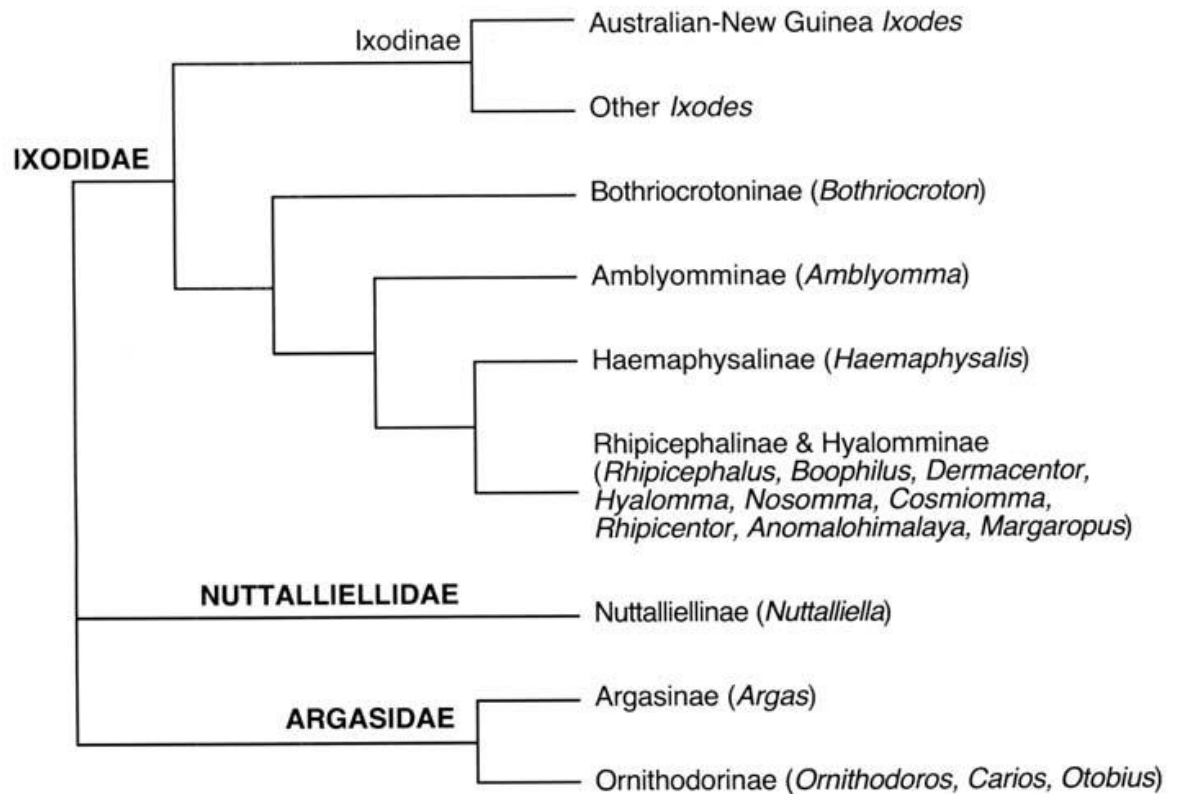


**Figura 1.** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888). Imágenes adquiridas mediante lupa estereoscópica. 1) Macho adulto sin alimentar. 2) Hembra adulta sin alimentar.

### 1.3 Clasificación taxonómica

Las herramientas moleculares actuales han permitido grandes avances científicos en el entendimiento de las relaciones filogenéticas de las garrapatas. Sin embargo, no existe unanimidad sobre los cambios propuestos en la sistemática de estos artrópodos, por lo que algunas reubicaciones taxonómicas no son completamente aceptadas. En este sentido, los especialistas hacen uso de caracteres que comprenden forma (morfología) y función (aspectos tales como biología, ecología y comportamiento) (Betancourt, 2010). Entre las nuevas relaciones filogenéticas establecidas, el género *Boophilus* (Curtice, 1891), se ha convertido en subgénero del género *Rhipicephalus* (Koch, 1844), por ser este último parafilético con respecto al primero. Con base en esto las especies de garrapatas que pertenecían al género *Boophilus* han sido reclasificadas como un subgénero del género *Rhipicephalus* a partir de evidencias moleculares, morfológicas, biogeográficas y de interacción con los hospederos (Murrell *et al.*, 2000; Murrell y Barker, 2003).

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (phylum: Arthropoda, subphylum: Chelicerata, clase: Arachnida, subclase: Acari, orden: Ixodida) (Murrell y Barker, 2003) forma parte de la familia *Ixodidae*, una de las tres familias del orden Ixodida que comprende alrededor de 820 especies. Además de la familia *Ixodidae* (garrapatas duras), existe la familia *Argasidae* (garrapatas blandas) y la familia *Nuttalliellidae* representada por el género monoespecífico *Nuttalliella*, que posee características intermedias de las dos familias principales (Klompen *et al.*, 1996; Cordero *et al.*, 1999; Barker y Murrell, 2004) (Figura 2).



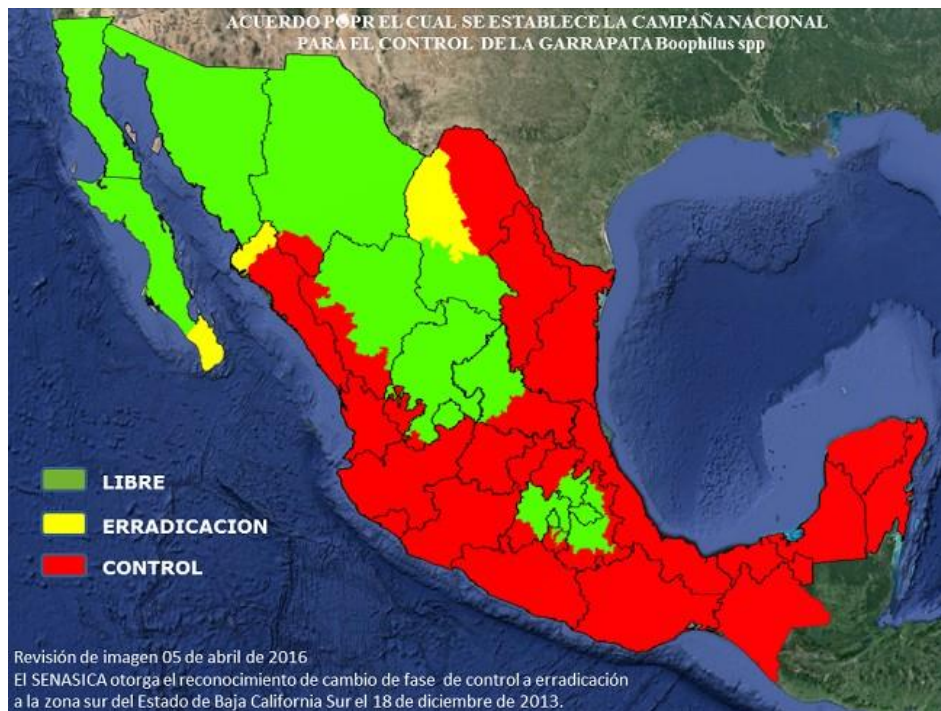
**Figura 2.** Clasificación filogenética de las subfamilias de garrapatas (Barker y Murrell, 2004).

#### 1.4 Distribución Geográfica

La distribución geográfica de *R. microplus* se encuentra entre los paralelos 32 del hemisferio Norte y Sur en la regiones tropicales y subtropicales del mundo (Hernández, 2006; Alonso-Díaz *et al.*, 2007). Esta garrapata es endémica de la India, gran parte de Asia tropical y subtropical, el noreste de Australia, Madagascar, el sureste de África, el Caribe, México y varios países en América Central y del Sur. Estuvo presente en los estados del sur de Estados Unidos: Virginia, Kentucky, Missouri, Kansas, Arizona, Nuevo México y Nevada, pero

actualmente se considera erradicada (George, 1996; Bram *et al.*, 2002), aunque algunas veces se le puede encontrar en Texas o California en la zona de cuarentena que sirve como área de amortiguamiento en la frontera con México (Lohmeyer *et al.*, 2011).

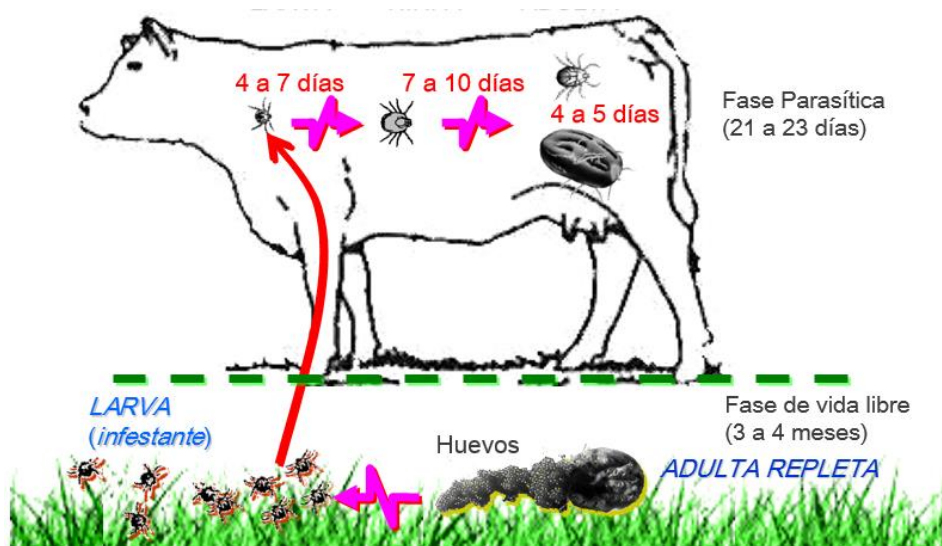
En México algunos de los estados que presentan mayor frecuencia e incidencia de garrapatas en el ganado son: Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Guerrero, Chiapas, Oaxaca y Jalisco, ya que presentan las condiciones climáticas favorables de trópico húmedo, que les permite desarrollar su ciclo biológico, aunado a que en estos estados se concentra la mayor población de ganado en el país. ([www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx)), (Figura 3).



**Figura 3.** Situación actual de la campaña contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México (2016).

## 1.5 Ciclo Biológico

La garrapata *R. microplus* requiere un solo hospedero para desarrollar su ciclo evolutivo que consta de cuatro estadios: huevo, larva hexápoda o pinolillo, ninfa octópoda y adulto. El ciclo se divide en 2 fases: fase no parasítica o de vida libre, que inicia cuando la garrapata adulta hembra ingurgitada se desprende del bovino y busca un lugar apropiado para ovipositar. La hembra pone de 2000-3000 huevos aproximadamente. Los huevos son incubados para transformarse en larvas que migran posteriormente a la vegetación en busca de un hospedero susceptible. Esta fase puede durar de 90-120 días dependiendo de las condiciones ambientales. La fase parasítica inicia cuando la larva se sube a su hospedero y se fija en la piel del animal. Durante esta fase la larva muda para transformarse en ninfa y posteriormente a adulto donde se realiza el dimorfismo sexual. Se lleva a cabo la cópula y la hembra queda grávida. En 12-24 horas la hembra queda repleta de sangre y se desprende de su hospedero para continuar con la fase no parasítica. La duración del ciclo parasítico es de 21-23 días (Benavides y Romero, 2002; Quiroz, 2005) (Figura 4).



**Figura 4.** Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## 1.6 Importancia Económica

La garrapata *R. microplus* es la especie de mayor importancia económica y sanitaria en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Estrada-Peña *et al.*, 2009). Este tipo de garrapatas ocasionan bajos rendimientos en los sistemas de producción bovina. El impacto económico negativo de *R. microplus* en las explotaciones ganaderas se debe a los efectos directos como el daño en la piel a causa de la picadura en el sitio de fijación, anemias, baja condición física, decremento en la producción, disminución de la fertilidad y altos costos para el control (Jonsson *et al.*, 2000; Jonsson, 2006).

En el caso de las vacas productoras de leche, los abscesos que ocasionan las garrapatas generalmente están involucrados en el daño y la pérdida de uno o más cuartos de la glándula mamaria, generando pérdidas en la producción láctea (Taylor, 2001). Una garrapata succiona de 0.5 a 3 ml de sangre durante su vida parasítica, estimando que por cada hembra repleta de *R. microplus* se pierden 8.9 ml de leche (Nolan *et al.*, 1989).

Por otra parte, la irritación causada por la picadura tiene un efecto depresivo sobre la producción de carne, reduciendo la ganancia de peso de 0.28 a 0.8 kg. por garrapata por año en animales en crecimiento (Sutherst *et al.*, 1983). En el ganado de engorda, cada garrapata adulta ingurgitada ha demostrado reducir la ganancia de peso diaria en 0.6 g, del cual el 65% se atribuye a la inapetencia inducida por la infestación del hospedero. En México y Australia se ha estimado que las pérdidas de peso vivo ocasionadas por *R. microplus* son de 40 a 60 kg al año en zonas enzoóticas (Jonsson *et al.*, 2000; Jonsson, 2006).

En cuanto a las pérdidas indirectas, *R. microplus* tiene una gran capacidad vectorial ya que es transmisor de patógenos que causan la babesiosis (*B. bovis* y *B. bigemina*) y la Anaplasmosis (*A. marginale*), dos enfermedades de gran



repercusión económica y sanitaria para la ganadería bovina ya que producen mortalidad y disminución en los parámetros productivos (Jonsson *et al.* 2008).

En México, la garrapata *R. microplus* se encuentra distribuida aproximadamente en el 53% del territorio nacional, por lo que se considera un problema importante, ya que la ganadería bovina constituye una de las principales actividades del sector agropecuario, siendo las exportaciones de ganado en pie su principal rubro. Para la ganadería mexicana, que se desarrolla principalmente en el norte del país, la exportación de ganado en pie a los Estados Unidos, es la actividad económica más importante, y significa un negocio que genera divisas por el orden de los 700 millones de dólares anuales (González, 2007).

### **1.7 Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Existen diferentes métodos de control para tratar de reducir las infestaciones por *R. microplus* como son: el control cultural, el biológico y el químico.

El control cultural se basa en el uso de buenas prácticas de manejo como la quema de los pastos, ampliamente utilizado en la época seca y está condicionado a la recuperación del pasto al comienzo de la época de lluvias. Este método puede combinarse con la rotación de potreros y la modificación del hábitat con el cultivo de especies forrajeras que tienen un efecto antigarrapata, como la gramínea *Melinis minutiflora*, el zacate gordura (*Chloris gayana kunth*), que debido a las vellosidades de sus hojas, provoca que las larvas pierden su orientación y permanecen más tiempo bajo los rayos directos del sol; sin embargo, no se tiene establecido un método de control cultural que sea altamente efectivo (Urquhart *et al.*, 2001; Fernández-Ruvalcaba *et al.*, 2003).

El control biológico se basa en el empleo de enemigos naturales de las garrapatas como los hongos entomopatógenos, los cuales se introducen por la cutícula de la garrapata y se replican dentro de ella, formando micelios (Frazzon *et al.*, 2000). De los géneros y especies de hongos estudiados, *Metarhizium anisopliae* demostró tener mayor patogenicidad; éste ha sido evaluado ampliamente para el control de garrapatas *R. microplus*, ya sea, sobre el animal o aplicado en pasturas (García, 2006; Fernández, 2009). Por otra parte, la literatura menciona que algunos depredadores o enemigos naturales de las garrapatas son las hormigas de los géneros *Solenopsis germinata*, *S. saevissima*, *Camponotus rengira* y *Ectatomma quadridens* (Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Estas hormigas afectan principalmente los estadios de vida libre de las garrapatas, pero no a las larvas ni a los huevos, teniendo poca relevancia como método efectivo de control (Fernandes *et al.*, 2012).

Otro método de control contra *R. microplus* es la selección de razas con resistencia innata a las garrapatas, característica genéticamente estable, elevada en la raza *Bos indicus* y baja en las razas europeas *Bos taurus*, por lo cual se utiliza el cruzamiento de razas europeas con razas índicas (Urquhart *et al.*, 2001; Jonsson, 2006).

El control químico, es el método más utilizado para combatir a la garrapata; desde la década de los 50's el uso de acaricidas o ixodicidas ha sido el tratamiento de elección por el efecto rápido y eficaz en las garrapatas que se encuentran sobre los bovinos (Duncan, 1991; Pruett, 1999).

En México, como en otras partes del mundo, se utilizan los ixodicidas mediante aspersión o inmersión para el control de *R. microplus* (Almazán *et al.*, 2007). Las diversas familias químicas que se han utilizado incluyen: arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y análogos,

formamidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazolonas y recientemente los inhibidores del desarrollo como el fluazurón (Rosario-Cruz y Domínguez, 2006).

La aplicación de ixodicidas se realiza a intervalos específicos, dependiendo de la región, especie de garrapata y eficacia residual del ixodicida (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2007), por ello este tipo de control ha resultado parcialmente exitoso (Graf *et al.*, 2004), ya que también presenta serias desventajas tales como los elevados costos, la contaminación de los productos lácteos y cárnicos, los efectos nocivos en el medio ambiente, así como las repercusiones a salud humana y salud animal (Bram *et al.*, 2002; George *et al.*, 2004).

Desafortunadamente uno de los principales problemas que enfrenta el control químico es que el uso continuo de los ixodicidas ha traído consigo la selección de poblaciones de garrapatas resistentes (George, 2008), a tal grado que actualmente se han detectado cepas de garrapatas con resistencia múltiple (Domínguez *et al.*, 2010).

### **1.8 Resistencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Las pérdidas ocasionadas por *R. microplus* se ve agravada por la generación de resistencia a los ixodicidas de uso habitual para el control de las poblaciones de garrapatas. La resistencia se define como la capacidad adquirida por individuos de una población parásita de sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal (FAO, 2003).

El desarrollo de la resistencia es un proceso evolutivo que aparece por selección genética (Rosario-Cruz *et al.*, 2009). Diversas especies de insectos y artrópodos han logrado sobrevivir de manera natural a condiciones adversas, mediante un proceso de adaptación gradual que les ha permitido mantenerse en los ecosistemas. Cuando un ixodicida es utilizado intensivamente, ocasiona una fuerte presión de selección que elimina a los individuos susceptibles siendo el agente de selección más importante (Lee *et al.*, 1999).

La velocidad con que se desarrolla la resistencia en una población depende principalmente de la frecuencia inicial de los genes que confieren resistencia, la intensidad de selección, el grado de dominancia del gen y la capacidad de ser heredados a las siguientes generaciones (Stone, 1972). En una población de garrapatas, antes de administrar un ixodicida, los alelos que confieren la resistencia son escasos, por esta razón, la mayoría de garrapatas en la población son susceptibles. Una vez que se utiliza el ixodicida, los individuos que sobreviven presentan una ventaja: sobreviven al tratamiento, se reproducen y dan origen a una nueva generación de garrapatas también resistentes. A medida que se realizan nuevas aplicaciones de ixodicidas, la fracción susceptible de la población muere y la fracción resistente se incrementa en la población. Consecuentemente, el incremento en el número de individuos resistentes se refleja en la disminución de la eficacia del producto garrapaticida, debido a que cada tratamiento sucesivo

es un proceso de selección en la población de garrapatas resistentes (Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

A nivel de campo, el primer hallazgo de resistencia a algún ixodicida es que el producto comienza a presentar deficiencias, cuando se utiliza bajo las indicaciones apropiadas de aplicación (FAO, 2003). El primer reporte de resistencia en garrapatas *R. microplus* en México se realizó en mayo de 1981, en una muestra del municipio de Tuxpan, Veracruz que presentó resistencia a los organofosforados. Posteriormente, en agosto de 1993, se detectaron los primeros hallazgos de resistencia a productos piretroides, en Soto la Marina, Tamaulipas y Emiliano Zapata, Tabasco (Ortíz *et al.*, 1994). A principios del año 2001 se detectó el primer caso de resistencia a amitraz en garrapatas *R. microplus* del estado de Tabasco (Fragoso y Soberanes, 2001).

La resistencia múltiple a los ixodicidas en el territorio mexicano continúa extendiéndose a razón de la presión que se ha ejercido mediante su empleo, y hoy en día se han diagnosticado poblaciones de garrapatas resistentes a organofosforados, piretroides, amidinas (Rosario-Cruz *et al.*, 2009), fipronil (Miller *et al.*, 2008), y recientemente a las lactonas macrocíclicas, específicamente a las ivermectinas (Perez-Cogollo *et al.*, 2010).

## 1.9 Control Inmunológico

El incremento del problema de la resistencia a ixodicidas ha propiciado que el control químico sea cada vez más complicado y costoso. Lo anterior ha motivado el interés por el desarrollo de vacunas contra garrapatas como una alternativa para evitar la parasitación de este artrópodo y a la vez bloquear la transmisión de enfermedades que estos parásitos transmiten a sus hospederos (Willadsen y Kemp, 1988; Cobon y Willadsen, 1990; de la Fuente, 2000; García-García *et al.*, 2000). El control inmunológico tiene como perspectiva una protección de mayor duración y hasta la fecha no se han observado problemas de índole ambiental (de la Fuente y Kocan, 2003; Imamura *et al.*, 2005; Mulenga y Azad, 2005; Titus *et al.*, 2006; Prevot *et al.*, 2007).

El control inmunológico se basa principalmente en el uso de proteínas internas del artrópodo como antígenos; el caso más estudiado sin duda ha sido el antígeno Bm86 localizado específicamente en la superficie de las células intestinales de la garrapata *R. microplus* (Willadsen y Kemp, 1988; García-García *et al.*, 2000). El mecanismo de acción en la inmunización contra garrapatas consiste concretamente en la producción de inmunoglobulinas dirigidas contra antígenos localizados en el intestino del artrópodo. Como consecuencia, todos los procesos digestivos se deterioran a causa del daño en la pared intestinal, ocasionando que las garrapatas presenten inanición, disminución del peso, infertilidad, baja sobrevivencia y desprendimiento del hospedero (Nutall *et al.*, 2006; Hope *et al.*, 2010).

Para el desarrollo de vacunas contra garrapatas, se han utilizado dos estrategias, el uso de antígenos expuestos y antígenos ocultos; los primeros son proteínas sintetizadas en las glándulas salivales de las garrapatas, que se exponen al sistema inmune del hospedero durante la infestación o adherencia; estos antígenos son tomados por las células dendríticas para ser presentados a

los linfocitos T y posteriormente producir una respuesta inmune mediada por células principalmente. Sin embargo, durante la infestación por garrapatas se establece una estrecha relación parásito-hospedero en el sitio donde las larvas se fijan con su aparato bucal, compuesto por palpos (sensores de CO<sub>2</sub>), quelíceros (órganos de desgarrar) e hipostoma (órgano de succión), por el que las glándulas salivales secretan sustancias inhibitoras de la coagulación e inactivadores de los procesos inmunológicos con el fin de formar el canal de alimentación. Este tipo de antígenos reducen pero no previenen la infestación por garrapatas después de repetidas exposiciones (Labuda *et al.* 2006; Nutall *et al.*, 2006).

Los antígenos ocultos son aquellos no expuestos al sistema inmune del hospedero, y por lo tanto, requieren varias inmunizaciones para mantener un título de anticuerpos adecuado; éstos se encuentran en la pared intestinal de las garrapatas e interactúan con inmunoglobulinas específicas tomadas de la sangre del hospedero (Willadsen *et al.*, 1989; Nutall *et al.*, 2006). La identificación de antígenos ocultos se ha logrado mediante la evaluación de proteínas derivadas de extractos crudos utilizadas para inmunizar animales sometidos posteriormente a infestaciones experimentales con larvas de garrapatas (Wang y Nuttall, 1999; Almazán *et al.*, 2007).

Debido a los efectos de los ixodicidas sobre el medio ambiente, la salud pública y la selección de garrapatas resistentes, el control inmunológico se ha convertido en una de las alternativas más prometedoras para combatir a estos artrópodos (Almazán *et al.*, 2007). Tiene ventajas como ser de fácil aplicación, ser amigables con el medio ambiente, no contaminan los productos destinados al consumo humano (carne y leche), representan un costo-beneficio comparado con los ixodicidas por la disminución de tratamientos a mediano y largo plazo, y porque la resistencia a la vacunación no ha sido reportada en la actualidad en comparación con los ixodicidas (de la Fuente y Kocan, 2003; Nuttall *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007c).

## 1.10 Desarrollo de vacunas contra garrapatas

En el desarrollo de vacunas contra garrapatas, se han utilizado diferentes estrategias como la identificación de proteínas específicas mediante mapeo inmunológico (Wang y Nuttall, 1999) e identificación de proteínas de las glándulas salivales e intestino de garrapatas (de la Fuente y Kocan, 2003). El control de las infestaciones por garrapatas a través de vacunas que contienen antígenos específicos es factible ya que éstos producen protección inmunológica en los animales, pues afectan las funciones vitales de los artrópodos (Willadsen, 2001, 2006; Merino *et al.*, 2011).

El origen de las vacunas data de los años 80's, cuando se realizaron algunos estudios inmunizando animales con proteínas derivadas de extractos crudos de hembras semirepletas, los cuales demostraban tener un efecto protector contra garrapatas. Sin embargo, se necesitaba el aislamiento e identificación de los antígenos responsables que conferían esta protección para ser separados y obtenidos puramente (Kemp *et al.*, 1986; Willadsen *et al.*, 1988). En los últimos años se ha visto un énfasis en la identificación de antígenos para el control inmunológico de garrapatas. Se han identificado proteínas en las glándulas salivales de *Dermacentor andersoni* que fueron utilizadas para inmunizar cobayos por diferentes vías, con adyuvante y sin adyuvante, induciendo una respuesta inmune en los animales, que disminuyó el peso y la fertilidad de las garrapatas (Wikel, 1981). Una proteína de 20 kDa identificada en las glándulas salivales de *Amblyomma americanum* asociada al cemento, mostró ser la responsable de la protección en cobayos inmunizados, cuando fueron desafiados con garrapatas (Brown *et al.*, 1984). En *Haemaphysalis longicornis* se encontró una proteína de 29 kDa similar a colágeno denominada p29, posiblemente relacionada a la formación de cemento en el sitio de la lesión; la inmunización de conejos con esta proteína recombinante confirió una reducción del 40 y 56% en la ingurgitación y mortalidad de larvas y ninfas, respectivamente (Mulenga *et al.*, 1999). Otro



antígeno de glándulas salivales relacionado al cemento y a las funciones de adherencia y alimentación de garrapatas es el p64, identificado en *Rhipicephalus appendiculatus*; el cual indujo una disminución de la sobrevivencia de garrapatas en cobayos infestados con ninfas y adultos en 48 y 70% respectivamente (de la Fuente y Kocan, 2003). El antígeno Iris (serpin), expresado en glándulas salivales de *Ixodes ricinus* fue evaluado en conejos infestados con ninfas y adultos, obteniendo una disminución de 30% en la ganancia de peso de las hembras adultas (Prevot *et al.*, 2007).

El desarrollo de vacunas contra *R. (Boophilus) spp.* de un solo hospedero ha proporcionado nuevas posibilidades para la identificación de antígenos protectores para inmunización contra infestaciones por garrapatas (Willadsen, 1997; Willadsen y Jongejan, 1999; de la Fuente *et al.*, 1999, de la Fuente, 2000; de Vos *et al.*, 2001). El sitio más perjudicado de la garrapata utilizando la vacunación con dichas proteínas, fue el intestino; mediante histopatología se observaron daños irreversibles, tanto en células epiteliales como en membrana basal del intestino, afectando severamente el sistema digestivo y la capacidad reproductiva del artrópodo (Kemp *et al.*, 1986; Agbede y Kemp, 1986; Willadsen *et al.*, 1988).

La proteína de mayor interés localizada en extractos crudos de garrapatas hembras fue identificada en el intestino; como una glicoproteína de membrana, purificada y caracterizada como el antígeno Bm86. La inmunización con esta proteína, produce la disminución de garrapatas ingurgitadas, deficiente postura de huevos y la afectación de la sobrevivencia larval de nueva generación (Willadsen *et al.*, 1989).

La proteína Bm86 aislada de la membrana plasmática de células epiteliales del intestino de garrapatas *R. microplus* fue clonada mediante tecnología de DNA recombinante y expresada en *E. coli* en Australia (Kemp *et al.*, 1986; Willadsen, 1989; Willadsen y Mckenna, 1991; de la Fuente *et al.*, 1999) y posteriormente en

Cuba con el sistema de expresión en levaduras *Pichia pastoris* en el que se obtuvieron niveles más altos en cuanto a la pureza de la proteína (Rodríguez *et al.*, 1994; Canales *et al.*, 1997; Canales *et al.*, 2009a). Las primeras vacunas utilizadas para el control de garrapatas fueron registradas entre 1993 y 1997, con los nombres comerciales TICKGARD® (Hoechst Animal Health, Australia) y GAVAC® (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba) en Australia y Cuba, respectivamente (de la Fuente y Kocan, 2003; de la Fuente *et al.*, 2007a; Kopp, 2009).

Las diferentes formas en las que el sistema inmunológico de los animales puede actuar contra las garrapatas, cuando se ha utilizado Bm86 como antígeno, se basa en tres etapas fundamentales que son: unión de las inmunoglobulinas a las células digestivas o células blanco, fijación del complemento produciendo lisis celular y opsonización para el ataque por fagocitos, y finalmente, la inhibición de la endocitosis de células digestivas como consecuencia de la unión de los anticuerpos (Tizard, 2002; Hope *et al.*, 2010).

En Latinoamérica se han desarrollado programas de vacunación en bovinos con el antígeno Bm86. Países como México, Cuba, Argentina, Colombia y Brasil utilizan el control inmunológico para contrarrestar los efectos ocasionados por las garrapatas. En México, la vacunación con Gavac® se ha implementado desde hace 10 años aproximadamente. Sin embargo, su uso ha tenido limitaciones debido a variaciones en la eficacia y al hecho de que no protegen contra *Amblyomma* spp., factores importantes por los cuales no ha sido totalmente aceptada, perdiendo interés por parte de la industria privada y dificultando la comercialización ya que compite con la venta de ixodicidas (de la Fuente y Kocan, 2006; de la Fuente *et al.*, 2007a).

Se han llevado a cabo diversos ensayos experimentales y de campo evaluando el efecto de Bm86 contra *R. microplus* y los resultados siempre han mostrado capacidad protectora (de la Fuente *et al.*, 1999; de Vos *et al.*, 2001; Canales *et al.*,

2009a, Almazán *et al.*, 2010), aunque también es importante destacar que han sido variables contra las diferentes cepas de *R. microplus* (de la Fuente *et al.*, 1999).

Los avances obtenidos con la proteína Bm86 como método efectivo de control, motivó la búsqueda de nuevas estrategias para mejorar la eficacia de la proteína, y así fue como Patarroyo *et al.*, (2002) mediante técnicas de bioinformática, diseñaron tres péptidos sintéticos derivados de diferentes regiones de la secuencia que codifica para Bm86, que fueran capaces de inducir una respuesta inmune protectora en contra de garrapatas *R. microplus* cuando eran inoculados en bovinos. De los tres péptidos, el que tuvo mejor respuesta fue llamado SBm7462, arrojando resultados interesantes y afectando los diferentes parámetros productivos de las garrapatas, como el número y peso de hembras repletas, la oviposición y la eclosión, por lo que se logró una eficacia general de la vacunación del 81%.

El estudio de vacunas contra garrapatas se ha incrementado debido a la utilización de técnicas de biología molecular e ingeniería genética para identificar antígenos protectores. Tal es el caso de la inmunización con bibliotecas de expresión de DNA complementario (cDNA-ELI) en combinación con análisis de secuencias, que en sus inicios fue propuesta para detectar antígenos protectores contra leishmaniasis (Melby *et al.* 2000). Para generar una biblioteca de cDNA se requiere hacer la extracción de RNA del organismo de interés y mediante una variante de PCR llamada RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction; Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), es sintetizado el cDNA que será amplificado y posteriormente clonado en un vector de expresión; el vector posteriormente es aplicado a un hospedero donde se lleva a cabo la expresión de proteínas y con ello la inducción de la respuesta inmune en contra del agente en estudio (Kofta y Wedrychowicz, 2001).

## 1.11 Subolesin

La proteína 4D8, posteriormente llamada Subolesin (del Latín *suboles*: descendencia, progenie) fue descubierto en la garrapata *Ixodes scapularis* mediante el uso de la inmunización con una biblioteca de DNA complementario, en combinación con el análisis de las secuencias de etiquetas de expresión, que se utilizan para el descubrimiento de genes, detectar cuales se transcriben y determinar la secuencia. El modelo de ratón fue utilizado para llevar a cabo las infestaciones por garrapatas. Subolesin es una proteína intracelular que se encuentra presente en los diferentes estadios de la garrapata y en varios órganos como el intestino, las glándulas salivales y los ovarios (Almazán *et al.*, 2003; Almazán *et al.*, 2005a; de la Fuente *et al.*, 2006b). El hallazgo fue confirmado mediante el tamizado de interferencia de RNA (iRNA) en *I. scapularis* y la función de este gen fue confirmada por estudios de iRNA en diferentes especies de garrapatas como *I. scapularis*, *A. americanum*, *R. sanguineus*, *Dermacentor variabilis*, *D. marginatus* y *R. microplus* (de la Fuente *et al.* 2005), donde se observó que el silenciamiento de este gen produce degeneración de intestinos, glándulas salivales y sistema reproductor de hembras y machos tratados con RNA de doble cadena (dsRNA). Estos estudios demostraron el papel de Subolesin en la modulación de la alimentación y reproducción de las garrapatas, ocasionando una reducción en la progenie (de la Fuente *et al.* 2006b).

La interferencia de RNA (iRNA) es el proceso mediante el cual se introducen cadenas cortas dsRNA para silenciar la expresión de genes, ya sea por inducir la degradación de una secuencia específica de RNA mensajero (mRNA) o por inhibir su translocación hacia el citosol y por ende la expresión de la proteína. El silenciamiento de un gen en particular provee un medio para evaluar los efectos de la pérdida de la función del mismo (de la Fuente *et al.*, 2007b).

En garrapatas, el mecanismo de acción aún no está muy claro; sin embargo, existe la teoría de que los dsRNA de 21 a 23 nucleótidos son transportados al interior de la célula mediante proteínas de membrana similares a Sid-1. Esta proteína está presente en una gran variedad de vertebrados e invertebrados y su función fundamental como canal de transporte de dsRNA le permite atravesar la membrana e introducirse a la célula (Feinberg y Hunter, 2003). Una vez dentro de las células son procesados por enzimas llamadas DICER (ribonucleasa miembro de la familia RNase III presente en el citoplasma celular) que rompen el dsRNA en pequeños fragmentos también llamados microRNA, que se unen a un complejo de proteínas denominado RISC (del inglés RNA-Induced Silencing Complex) para reconocer la secuencia blanco del mRNA, permitiendo de esta manera la degradación y a su vez el silenciamiento de la función específica (de la Fuente *et al.*, 2007b).

Subolesin, es eficaz como un antígeno protector, y es estructural y funcionalmente ortólogo de las akirinas en insectos y vertebrados. Las akirinas son proteínas evolutivamente conservadas que regulan la expresión genética y, por lo tanto, intervienen en múltiples procesos celulares, como la digestión, la respuesta inmunitaria, la reproducción y el desarrollo (Almazán *et al.*, 2005a; Almazán *et al.*, 2005b; de la Fuente *et al.*, 2006a; de la Fuente *et al.*, 2006b; Nijhof *et al.*, 2007; Kocan *et al.*, 2009). Por ello, recientemente se han desarrollado vacunas que contienen el antígeno subolesin y que inducen una protección inmunológica frente a las infestaciones de garrapatas en hospederos vertebrados.

La proteína Subolesin está conservada en diferentes especies de artrópodos, brindando así un candidato para la producción de una vacuna capaz de proteger frente a la infestación con diferentes vectores hematófagos y patógenos que afectan al hombre y los animales. Esta proteína ha demostrado su efectividad como vacuna frente a la infestación con diferentes vectores hematófagos y la

disminución de la infección con patógenos transmitidos por garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2006b; Canales *et al.*, 2009b).

Los experimentos de vacunación con antígenos recombinantes ortólogos de subolesin de garrapata o de mosquito han permitido encontrar epítomos conservados de subolesin en el ortólogo de *Aedes albopictus*. Además, se ha podido medir el efecto de la inhibición de subolesin utilizando iRNA en *I. scapularis*, *A. americanum* y *R. sanguineus*. El silenciamiento del gen mostró una reducción de la fertilidad y supervivencia de las garrapatas, mientras que en mosquitos *Anopheles atroparvus*, *A. caspius*, y *Culex pipiens* alimentados con suero anti-subolesin de *A. albopictus* se observó una disminución en la sobrevivencia de 11% a 29% (Canales *et al.*, 2009b).

En un experimento de inmunización en ratones y conejos que fueron sometidos posteriormente a la infestación por larvas y ninfas de *I. scapularis*, *A. americanum* y *D. variabilis*, se observó un porcentaje de efectividad mayor al 50% contra las diferentes especies de garrapatas (Almazán *et al.*, 2005b), mientras que en ovinos infestados con *I. scapularis* adultas se obtuvo un 58% de reducción en la alimentación, 22-49% en la oviposición y una eficacia general de 33-71% (Almazán *et al.*, 2005b). Posteriormente se comprobó la efectividad de subolesin en el control de la transmisión de patógenos en bovinos inmunizados y posteriormente desafiados con *A. marginale*, así como en ratones inmunizados e infectados con *A. phagocytophilum*; en ambos experimentos, se encontró una disminución significativa de los patógenos (de la Fuente *et al.*, 2006b).

Algunos ensayos controlados para evaluar el efecto de subolesin contra infestaciones por garrapatas *R. microplus* y *R. annulatus* en bovinos, arrojaron resultados del 51% y 60%, de eficacia, respectivamente (Almazán *et al.*, 2010). Posteriormente, se realizó otro ensayo en bovinos inmunizados con subolesin e infestados artificialmente con *R. microplus* y se reportó una reducción de

garrapatas hembras adultas del 47%, una reducción de la oviposición del 18%, y una eficacia general de la vacunación de 60% (Merino *et al.*, 2013).

Subolesin es considerado como un candidato vacunal de importancia (de la Fuente *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2007b; de la Fuente, 2007c; Almazán *et al.*, 2010; Merino *et al.*, 2013; Shakya *et al.*, 2014), ya que la vacunación de los animales, genera una protección cruzada frente a diversas especies de vectores hematófagos (ixódidos, mosquitos y ácaros), sugiriendo la posibilidad de usar subolesin como un antígeno para el desarrollo de una vacuna universal frente a estos organismos. La identificación de epítomos protectores conservados en órtologos de subolesin de diversos artrópodos contribuirá al desarrollo de una vacuna de importancia mundial.

### **1.12 Akirinas**

Las akirinas constituyen a un grupo de proteínas evolutivamente conservadas en insectos y vertebrados. Se han descrito más de ocho familias de akirinas en vertebrados (Macqueen *et al.*, 2010); sin embargo la mayoría presentan únicamente dos tipos estrechamente relacionadas y homólogas: la akirina 1 y la akirina 2 (Goto *et al.*, 2008). En esta familia de proteínas se agrupan genes que están altamente conservados a lo largo de la evolución de organismos multicelulares. En la mosca de la fruta *Drosophila*, se han descrito varias moléculas de la familia NF- $\kappa$ B (factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de células B): *relish*, *dorsal* y *dif* involucradas en la inmunomodulación. En mamíferos se han descrito las subunidades RelB, c-Rel, p65, p50 y p52. También se han encontrado homólogos en plantas e incluso en levaduras (Friedrich *et al.*, 2001).

Para el caso de insectos y garrapatas, se ha identificado solo un gen, el cual se sabe que es evolutivamente conservado, funcionalmente cercano a la akirina 2 de

los mamíferos y que actúa como un factor transcripcional de genes implicados en varios procesos biológicos importantes para la alimentación y la reproducción (Goto *et al.*, 2008; Galindo *et al.*, 2009).

Los factores de transcripción son proteínas muy especializadas que reconocen secuencias específicas de DNA en la región reguladora de todos los genes. La unión de estos factores a esta región promotora regula, positiva o negativamente, la expresión y la subsecuente producción de la proteína o RNA funcional codificado por el gen en cuestión. Hay distintos tipos de factores transcripcionales, pero pueden dividirse en constitutivos e inducibles. En términos generales los constitutivos son aquellos que regulan la expresión basal de los genes que codifican para todas las proteínas estructurales o de mantenimiento, es decir, las enzimas y los componentes proteicos presentes en todas las células y que son fundamentales para la función celular en general. Los factores de transcripción inducibles son aquellos que regulan la expresión de genes que solamente se utilizan en ciertos tipos celulares o en ciertos momentos de la vida de la célula (Sen y Packer, 1996).

El mecanismo de acción sugerido para las akirinas de insectos y garrapatas, está ligado al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que es un factor nuclear capaz de unirse al enhancer  $\kappa$  (región reguladora) del promotor de la cadena pesada de los genes que codifican para las inmunoglobulinas (Sen y Baltimore, 1986). Se sabe que se expresa de manera constitutiva en prácticamente todas las células del sistema inmune, se localiza de manera basal en el citoplasma en un estado inactivo y necesita un estímulo específico para traslocarse al compartimiento nuclear. Sólo en las células B y sus progenitoras se encuentra el NF- $\kappa$ B constitutivamente en el núcleo (Gilmore, 2006). Este factor regula la transcripción de una gran variedad de genes, en particular aquellos involucrados en la respuesta inmune y control de la proliferación celular (Livolsi *et al.*, 2001).



En prácticamente todos los organismos en los que ha sido caracterizado, NF- $\kappa$ B participa principalmente en la modulación de la respuesta inmune a distintos niveles. En *Drosophila*, por ejemplo, se ha encontrado que induce la transcripción de genes con actividad bactericida o fungicida (González-Crespo y Levine, 1994). En mamíferos tiene participación importante en la inflamación, la respuesta al estrés, la diferenciación y la activación de células inmunes. La variedad de señales que pueden activar NF- $\kappa$ B es reflejo de la cantidad de eventos con que ha sido relacionado. Los mejor caracterizados son aquellos que involucran citocinas inflamatorias como Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), los estímulos mitogénicos como ésteres de forbol (PMA), los relacionados con agentes infecciosos como lipopolisacárido bacteriano (LPS, un constituyente de la membrana externa de bacterias gramnegativas) y la expresión de antígenos virales (Li y Karin, 1999).

Subolesin y akirina afectan a la expresión de la transducción de señales y a genes de respuesta innata, así como a reguladores transcripcionales positivos y negativos (de la Fuente *et al.*, 2006b; Macqueen y Johnston, 2009; Galindo *et al.*, 2009; Goto *et al.*, 2008). Estas proteínas interactúan con NF- $\kappa$ B y otras proteínas reguladoras, se unen al DNA o remodelan la cromatina para regular la expresión genética (Goto *et al.*, 2008; de la Fuente *et al.*, 2008; Galindo *et al.*, 2009; Nowak *et al.*, 2012). La amplia función de Subolesin y akirina como factores de transcripción explica el profundo efecto del silenciamiento de genes mediante interferencia de RNA en la fisiología de las garrapatas, así como en la fisiología de los insectos y en el desarrollo, y la expresión de genes en las garrapatas (de la Fuente y Kocan, 2006; de la Fuente *et al.*, 2008; de la Fuente *et al.*, 2006c; Kocan *et al.*, 2009).

## II. Justificación

La garrapata *R. microplus* se ha convertido en una de las plagas que más pérdidas económicas causan a la ganadería bovina de zonas tropicales y subtropicales, tanto por su efecto hematófago como por las enfermedades que transmiten. Actualmente, el control de las infestaciones por garrapatas se realiza mediante una serie de medidas que integran diversos métodos de control. Un componente principal de estos métodos consiste en la aplicación de ixodicidas. Sin embargo, la aplicación de estos químicos ha mostrado una eficacia limitada en la reducción de las infestaciones y a menudo estas medidas se acompañan de serios efectos adversos, tales como la selección de garrapatas resistentes, la contaminación ambiental y la contaminación de los productos derivados para el consumo humano. Esta problemática hace necesaria la utilización de métodos alternativos de control, como la inmunización con antígenos recombinantes.

Subolesin es una proteína altamente conservada en artrópodos, involucrada en la modulación de la alimentación y reproducción de garrapatas de la familia *Ixodidae*. En estudios preliminares se ha demostrado un efecto protector contra infestaciones por garrapatas y en la disminución de la transmisión de patógenos. Sin embargo, se requieren herramientas basadas en la biología molecular, utilizando técnicas de genómica, proteómica y de bioinformática, para determinar las regiones, péptidos o epítomos que puedan ser usados como inmunógenos que generen anticuerpos específicos, que confieran protección, y finalmente que incrementen la efectividad si se utilizan en programas de control de garrapatas.

### III. Hipótesis

- 1) El péptido recombinante subolesin tiene mayor capacidad inmunogénica que la proteína de la que fue derivado.
  
- 2) Las garrapatas *R. microplus* que se alimentan de bovinos inmunizados con el péptido recombinante subolesin, presentan una disminución en el número de garrapatas y en los porcentajes de oviposición y eclosión.

## IV. Objetivos

### 4.1 Objetivo General

Obtener un péptido recombinante derivado del gen *subolesin* que pueda ser utilizado como antígeno protector y evaluar su potencial contra la infestación por garrapatas *R. microplus*.

### 4.2 Objetivos específicos

- 1) Diseñar un péptido recombinante de Subolesin mediante programas de bioinformática.
- 2) Amplificar, clonar y expresar en un vector de expresión, el fragmento inmunogénico codificado por el gen *Subolesin*.
- 3) Evaluar el efecto de la inmunización en bovinos con el péptido recombinante subolesin sobre el número de garrapatas repletas, el peso, la oviposición y la eclosión de *R. microplus*.
- 4) Evaluar la respuesta inmune humoral en los bovinos inmunizados con el péptido recombinante subolesin y su relación con la infestación de garrapatas *R. microplus*.

## V. Materiales y métodos

El presente estudio fue realizado en la Unidad de Artropodología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) en Parasitología Veterinaria (PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, No. 8534. Col. Progreso. C.P. 62550. Jiutepec, Morelos.

### 5.1 Cepa de referencia

Se utilizó la cepa de garrapatas *R. microplus* “Media Joya”, perteneciente al germoplasma del CENID-PAVET, INIFAP, y mantenida en condiciones controladas desde el 2001. Esta cepa fue aislada en el municipio de Tapalpa, Jalisco, México.

### 5.2 Análisis *in silico* de la secuencia del gen *subolesin*

Se llevó a cabo la búsqueda de las secuencias reportadas para el gen *subolesin* (*R. microplus*) en México y se utilizó la secuencia que corresponde a la cepa de garrapatas “Santa Luisa” (DQ159965.1), obtenida en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). El análisis de alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con el programa CLUSTAL W, disponible en el sitio <http://www.genome.jp/tools/clustalw/> para identificar el grado de similitud y localización de zonas conservadas.

Posteriormente, la secuencia seleccionada se analizó mediante el algoritmo disponible en el programa CLC Main Workbench 5.7, con el fin de predecir las regiones del gen con mayor capacidad antigénica (Kolaskar-Tongaonkar, 1990).

Los análisis de hidrofobicidad (Kyte y Doolittle, 1982) se realizaron utilizando la herramienta Protscale disponible en el sitio web [www.expasy.org/protscale/](http://www.expasy.org/protscale/). La predicción de epítomos lineales de células B se realizó con diferentes algoritmos bioinformáticos disponibles en la red, buscando dentro de la secuencia de aminoácidos características de un epítomo B como:

- 1.- Hidrofilicidad: usando el algoritmo del programa BCEpred ([www.imtech.res.in/raghava/bcepred/bcepred\\_submission.html](http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/bcepred_submission.html)) (Saha y Raghava, 2004).
- 2.- Antigenicidad: usando el algoritmo del programa Antigenic ([www.emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic](http://www.emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic)) (Rice *et al.*, 2000).
- 3.- Epítomo B lineal: usando el algoritmo de los programas ABCpred ([www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC\\_submission.html](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)) (Saha y Raghava, 2004) e IEDB/bcell (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) (Larsen *et al.*, 2006).

Se llevó a cabo la predicción de la estructura 3D de la secuencia de aminoácidos utilizando el método I-Tasser por sus siglas en inglés “Iterative Threading ASSEmbly Refinement” (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Zhang, 2007, 2008). Este programa bioinformático predice las estructuras tridimensionales a partir de secuencias aminoacídicas. Detecta modelos del PDB (Protein Data Bank) a través de una técnica llamada reconocimiento de plegamiento.

La predicción de epítomos conformacionales se realizó mediante el programa IEDB/ellipro (<http://tools.immuneepitope.org/ellipro/>) (Ponomarenko *et al.*, 2008). Este método se basa en las propiedades geométricas de la estructura de proteínas a partir de una base de datos que se utiliza generalmente para la predicción de los distintos tipos de interacciones proteína-proteína.

### **5.3 Amplificación del fragmento del gen *subolesin***

#### **5.3.1 Diseño de oligonucleótidos**

Con base en la identificación de la región de interés, se realizó el diseño de oligonucleótidos para el fragmento del gen que codifica para el péptido Subolesin (Rozen y Skaletsky, 2000), mediante el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) disponible en la red (Koressaar y Remm, 2007).

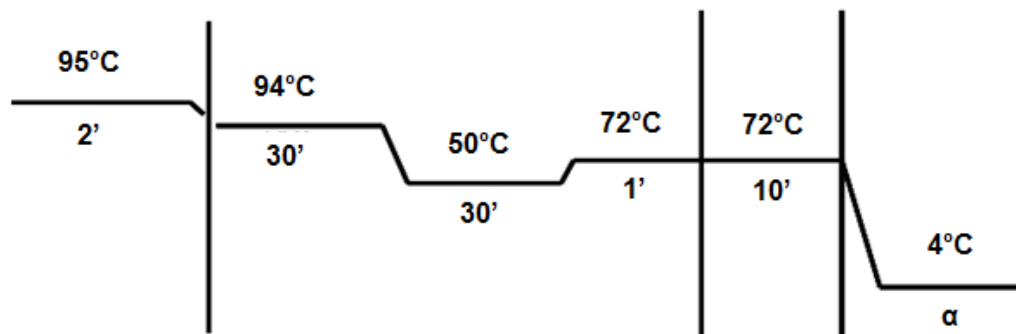
En el apéndice 1 se muestran las consideraciones de importancia que se tuvieron para llevar a cabo el diseño de los oligonucleótidos específicos.

#### **5.3.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA**

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de 100 mg de larvas de garrapatas *R. microplus* de 15 días de edad sin alimentar (cepa “Media Joya”), las cuales fueron pulverizadas en un mortero previamente congelado a -80°C. El aislamiento de RNA se realizó utilizando el reactivo *TriReagent* (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el precipitado final se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.). La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 5 µg de RNA total de larvas de garrapatas, utilizando el kit RACE cDNA (Invitrogen, Carlsbad CA), mediante la técnica de RT-PCR y utilizarlo como plantilla en las reacciones de amplificación por PCR, junto con los oligonucleótidos específicos.

### 5.3.3 Amplificación mediante la técnica de PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos de microcentrífuga de pared delgada usando reacciones de 25  $\mu$ l. Las condiciones finales se llevaron a cabo utilizando 20 pmol de cada uno de los oligonucleótidos, 10 mM de dNTP's, 3 mM de  $MgCl_2$ , 2.5  $\mu$ l (1x) de amortiguador para PCR, 0.5 U de Pfu Ultra (Thermo Fisher Scientific), y 1  $\mu$ l de muestra de cDNA de larvas de garrapatas *R. microplus* (cepa "Media Joya"), que se utilizó como plantilla para realizar la amplificación del fragmento de interés del gen *subolesin*. Se estandarizaron las condiciones experimentalmente y se utilizó un Termociclador Biometra (Gottingen, Germany) programado en el primer ciclo a 95°C por 2 minutos seguido de 39 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C de desnaturalización, 50°C por 30 segundos de alineamiento y un minuto de extensión a 72°C, incluyendo un paso adicional de extensión a 72°C de 10 minutos (Figura 5). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Invitrogen, Carlsbad CA), para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados por comparación con un marcador de peso molecular de 1 Kb plus DNA Ladder® y visualizados por exposición en un transiluminador Gel Logic 1500 (Imaging System).



**Figura 5.** Programa de PCR para amplificar el fragmento del gen *subolesin*.



#### **5.4 Clonación del inserto en el vector pET101/D-TOPO®**

La clonación del producto de PCR se llevó a cabo en el vector comercial pET101/D-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una reacción de ligación, utilizando el producto de PCR previamente amplificado, con el plásmido pET101/D-TOPO®; enseguida se hizo la transformación en células competentes TOP10 de *E. coli*. Se visualizaron las colonias bacterianas de las células TOP10, se seleccionaron 5 colonias y se verificó que las clonas contenían el inserto mediante ensayos de PCR de colonia, utilizando los oligonucleótidos correspondientes para amplificar el fragmento de interés del gen *subolesin*, y finalmente se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con Sybr® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA) a luz UV en un transiluminador Gel Logic 1500 (Imaging System).

En el apéndice 2 se muestra el mapa del vector de expresión pET101/D-TOPO®, el cual fue utilizado para el desarrollo de esta investigación. En el apéndice número 3 se presentan los reactivos para la clonación del inserto del gen *subolesin* en el vector.

#### **5.5 Purificación de plásmido y secuenciación**

La extracción y purificación del DNA plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina, utilizando el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System®, siguiendo las indicaciones del fabricante, con fines de secuenciación. Se mandaron a secuenciar 5 clonas positivas seleccionadas en los ensayos de PCR de colonia para confirmar que los resultados correspondían con la secuencia de interés, para ello se realizaron alineamientos mediante el programa CLUSTAL W disponible en el sitio <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>, y la búsqueda de las mismas para corroborar la existencia en el banco de genes,

mediante el software BLAST disponible en el sitio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Las muestras fueron procesadas por la unidad de secuenciación, del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

## 5.6 Inducción del péptido recombinante

Se utilizaron 3  $\mu$ l de DNA (pET101-*subolesin*) para la transformación de células competentes BL21 Star (DE3). La mezcla se incubó durante 30 minutos, y posteriormente se sometieron a choque térmico de las células a 42°C durante 30 segundos en baño María; se cultivó en 250  $\mu$ l de medio SOC (2% Tryptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glucosa), incubándose en agitación a 200rpm y 37°C durante una hora. Posteriormente se cultivaron en cajas Petri con medio sólido Luria Bertani (LB) y ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se visualizaron las colonias crecidas de las células BL21, y se seleccionaron algunas clonas para verificar que las mismas contenían el inserto mediante ensayos de PCR de colonia, utilizando los oligonucleótidos correspondientes para amplificar el fragmento de interés.

Las células competentes *E. coli* BL21 Star (DE3) fueron inoculadas en medio líquido Luria Bertani (LB) y ampicilina (50  $\mu$ g/ml) e incubadas a 37°C y 200 rpm, hasta que la densidad óptica fue de OD<sub>600</sub>= 0.5. Una vez que el crecimiento del cultivo se encontró en este intervalo, se agregó isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma St. Louis MO, USA) a una concentración de 1mM y se incubó durante 5 horas (37°C, 200 rpm), para inducir la expresión del péptido recombinante. Finalmente, la pastilla celular fue colectada por centrifugación y se mantuvo a -20°C, para ser analizada posteriormente en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

## **5.7 Síntesis del péptido recombinante**

### **5.7.1 Gel de acrilamida SDS-PAGE**

Se reconstituyeron las pastillas celulares con el amortiguador de lisis SDS-PAGE 1X (SDS 10%, 2 $\beta$  Mercaptoetanol 10mM, glicerol 100%, 0.2 M Tris-HCl 6.8, azul de bromofenol 0.05%) en una proporción de 1:1. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras se colocaron en baño María a 90°C durante 5 minutos. Posteriormente se analizaron en un gel SDS-PAGE al 15%, siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970). Fue necesario agregar en el gel muestras control con la finalidad de demostrar confiabilidad en los resultados obtenidos y ayudando a identificar visualmente el péptido en estudio. Estos controles fueron cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) en ausencia de inductor (IPTG). La tinción se llevó a cabo con azul de Coomassie durante 50 minutos, posteriormente fue desteñido con metanol durante 12 horas y se lavó con agua destilada. Se utilizó un marcador de peso molecular de proteínas (6–200 kDa) Broad Range<sup>®</sup>, Bio-Rad.

### **5.7.2 Western blot**

Después de la separación en el gel de acrilamida SDS-PAGE 15%, se visualizaron las proteínas y se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, durante 2 horas a 100v. Se utilizó un marcador de peso molecular pre-teñido para proteínas (10–180 kDa) Fermentas Page Regular<sup>®</sup>.

La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche al 5% en Tris-amortiguador salino (TBS) pH 8.0 más 0.05% de Tween 20 (Sigma St. Louis MO, USA), durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C toda la noche. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T (0.05%). Se agregó el anticuerpo anti-His conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen,

Carlsbad, CA) a una dilución 1:2000, para detectar la proteína recombinante de fusión. Finalmente, el revelado se desarrolló con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato en conjunto con cloruro de nitroazul de tetrazolium (BCIP/NBT) Alkaline Phosphatase® durante 15 minutos y la reacción se detuvo con agua destilada.

### **5.7.3 Purificación del péptido recombinante**

Las pastillas celulares almacenadas a -20°C, se recuperaron en 10 ml de Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 y se sonicaron a 6 pulsos de 1 minuto con descansos de un minuto y medio entre cada pulso para liberar las proteínas, el procedimiento se realizó en hielo para evitar la desnaturalización del péptido. Una vez que terminó la sonicación, se purificaron las proteínas mediante cromatografía de afinidad por medio de columnas con afinidad a níquel de 1 ml. Ni-NTA spin (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La inclusión de una etiqueta de poli-histidina en el péptido recombinante permitió ser reconocida por cromatografía de afinidad y purificar el péptido. Posteriormente se corrió un gel SDS-PAGE al 15% con las muestras purificadas para estimar el grado de purificación.

Finalmente, el péptido recombinante se mezcló con adyuvante Montanide ISA 50 V2 (Seppic®, Paris, France). Este adyuvante es una emulsión de aceite mineral (del tipo agua en aceite) el cual tiene la característica de inducir una fuerte respuesta inmune humoral y de larga duración.

Para realizar la mezcla péptido/adyuvante se prepararon dosis de 2 ml. para el ensayo de inmunización de la siguiente forma:

100 µg de péptido/ 1 ml. de PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

1 ml. de adyuvante Montanide ISA 50 V2 (Seppic<sup>®</sup>, Paris, France).

En el apéndice número 5 se muestran imágenes de cómo se realizó la preparación del péptido recombinante subolesin para el ensayo de inmunización en bovinos.

## VI. Diseño experimental

El ensayo de inmunización fue realizado en el área de infestaderos del CENID-PAVET, INIFAP ubicado en Jiutepec, Morelos. El municipio de Jiutepec se ubica geográficamente entre los paralelos 18° 53' de latitud norte y 99° 10' de longitud oeste del Meridiano de Greenwich, a una altura de 1.350 metros sobre el nivel del mar. El clima que predomina, es subtropical caluroso con lluvias en verano. Su temperatura promedio es de 21.2°C, su variante media máxima es 31.4°C, su máxima absoluta es de 39.8°C y la mínima media baja es 10.8°C (INEGI, 1995). Este lugar cuenta con las condiciones climatológicas idóneas para el desarrollo del ciclo biológico de garrapatas *R. (Boophilus) spp.*

### 6.1 Bovinos

Se utilizaron 4 bovinos machos de 6 meses de edad con un peso promedio de 180 kg. para infestarlos con garrapatas *R. microplus*. Los bovinos fueron adquiridos de una zona libre de garrapatas y con antecedentes de no haber sido tratados con ixodicidas. Los animales eran cruza de razas europeas (Limousin por Simmental), los cuales se mantuvieron en los corrales del CENID-PAVET, INIFAP durante las inmunizaciones. La alimentación consistió en una dieta de engorda a base de sorgo, soya, minerales, melaza y fibra por la mañana y pacas forrajeras por las tardes. El agua era proporcionada a libre acceso.

## **6.2 Garrapatas**

Las larvas de *R. microplus* utilizadas en este ensayo provenían de una cepa susceptible a ixodicidas que fue colectada en Tapalpa, Jalisco, México y fue caracterizada en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, SENASICA SAGARPA y mantenida en condiciones controladas en la Unidad de Artropodología del CENID-PAVET, INIFAP.

## **6.3 Protocolo de inmunización**

Los bovinos fueron inmunizados de la siguiente manera: Dos animales fueron tratados con solución salina más adyuvante y dos animales inmunizados con el péptido recombinante subolesin. Se administraron 2 dosis de 100 µg de antígeno recombinante cada una más adyuvante Montanide (ISA 50 V2, Seppic®) o solo adyuvante, en un volumen final de 2 ml por dosis. Las inmunizaciones se realizaron en la semana 1 y 5, vía subcutánea mediante jeringas de 5 ml con agujas de calibre 18.

## **6.4 Infestación con larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Se utilizaron larvas de garrapatas *R. microplus* de la cepa de referencia “Media Joya”. La infestación se realizó 15 días después de la segunda inmunización con 250 mg de larvas de garrapatas de 30 días de edad. Las larvas se colocaron en el dorso de cada bovino. Las garrapatas alimentadas de los bovinos inmunizados con solución salina más adyuvante fungieron como grupo testigo, y las alimentadas con el péptido recombinante subolesin como grupo tratado.

Las garrapatas se observaron periódicamente y una vez que completaron su repleción fueron colectadas, pesadas y depositadas en cajas Petri dentro de incubadoras con humedad relativa de 80% y temperatura de 27°C para permitir la oviposición y eclosión a las 2 y 5 semanas, respectivamente.

### **6.5 Determinación de la cinética de anticuerpos por ELISA indirecto**

Se obtuvieron muestras de sangre de los bovinos durante 11 semanas. Las muestras fueron colectadas en tubos sin anticoagulante y el suero se obtuvo por centrifugación a 6000 rpm y almacenado a -20°C hasta su uso. La cinética de anticuerpos se determinaron mediante ELISA indirecto de acuerdo al siguiente protocolo: Se utilizó 1 µg/pozo del péptido purificado para cubrir la placa de ELISA y se incubó a 4°C durante toda la noche. Los sueros fueron diluidos 1:100 en solución salina amortiguada con fosfatos y adicionada con tween 20 al 0.05% (PBS-T 0.05%), con un pH de 7.2 y 5% de leche descremada. La placa fue incubada con el suero diluido durante 1 hora a 37°C y posteriormente incubada con el conjugado (IgG de ratón anti-bovino acoplado a fosfatasa), 1 hora a 37°C. La reacción de color se desarrolló con p-Nitrofenil-fosfato (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) y la densidad óptica se determinó en un lector de ELISA a 405 nm. Los anticuerpos fueron considerados positivos cuando el valor de la absorbancia fue de al menos dos veces el valor del suero preinmune.



## 6.6 Análisis de los resultados

Los parámetros evaluados en garrapatas *R. microplus* fueron: a) El número de garrapatas hembras repletas, b) El peso de las garrapatas repletas, c) El peso de la masa de huevos y d) la tasa de eclosión. Se calcularon los datos porcentuales de cada una de las variables de acuerdo con la metodología descrita por de la Fuente *et al.* (1999).

Las fórmulas utilizadas para analizar los resultados obtenidos en los parámetros reproductivos de garrapatas *R. microplus* fueron las siguientes:

- 1) **Efecto sobre el número de hembras repletas (GA)** =  $100 [(1-NGV/NGC)]$ , donde NGV es el número de garrapatas hembras repletas en el grupo tratado y NGC es el número de garrapatas hembras repletas en el grupo testigo.
- 2) **Efecto sobre el peso de hembras repletas (PG)** =  $100 [1-(PGV/PGC)]$ , donde PGV es el promedio de peso de hembras repletas en el grupo tratado y PGC es el promedio del peso de hembras repletas en el grupo testigo.
- 3) **Efecto sobre la oviposición (PO)** =  $100 [1-(POGV/POGC)]$ , donde POGV es el promedio del peso de la masa de huevos en el grupo tratado y POGC es el promedio del peso de la masa de huevos en el grupo testigo.
- 4) **Efecto sobre la eclosión (EF)** =  $100 [1-(PPLOV/PPLOC)]$ , donde PPLOV es el porcentaje de la tasa de eclosión en el grupo tratado y PPLOC es el porcentaje de la tasa de eclosión en el grupo testigo.

## 6.7 Análisis estadístico

Se consideró como unidad experimental en este estudio a las garrapatas *R. microplus*. La prueba de *t-student* para varianzas desiguales ( $p < 0.05$ ), se utilizó para comparar los resultados del número de garrapatas hembras repletas, el peso de las garrapatas repletas, el peso de la masa de huevos y la tasa de eclosión entre los grupos experimentales.

## VII. Resultados

### 7.1 Análisis *in silico* del gen *subolesin*

Se llevó a cabo la búsqueda de las secuencias reportadas para garrapatas en México que codifican para la proteína Subolesin en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Se identificaron 12 secuencias descritas para la garrapata *R. microplus*: San Alfonso (JX193829.1), Mora (JX193828.1), Santa Luisa (DQ159965.1), Muñoz (DQ159964.1), CEPICH (DQ159963.1), Tabasco (JX193840.1), Guerrero (JX193833.1), Nayarit (JX193836.1), Quintana Roo (JX193832.1), Susceptible (DQ159966.1), Tamaulipas (JX193831.1), Veracruz (JX193834.1).

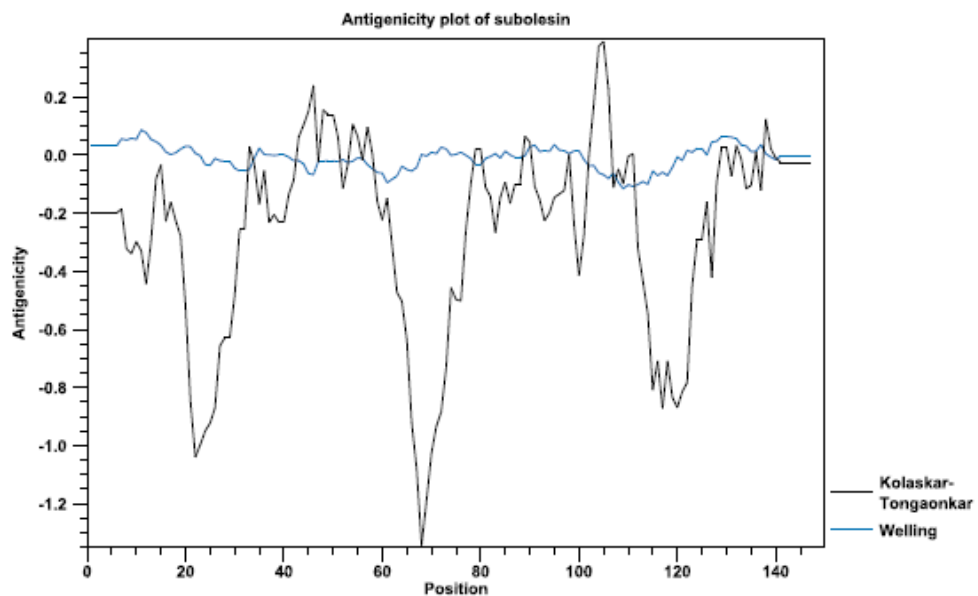
Una vez que se identificaron las secuencias correspondientes a poblaciones de garrapatas de México, mediante el programa CLUSTAL W se realizó el análisis de alineamiento múltiple, para identificar el grado de similitud y localización de zonas conservadas entre las secuencias (Figura 6).

San Alfonso	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Mora	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Santa Luisa	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Muñoz	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
CEPICH	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Tabasco	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Guerrero	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Nayarit	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Quintana roo	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Susceptible	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Tamaulipas	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA
Veracruz	MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSFPGDVPPKLTSEEIAA *****
San Alfonso	NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Mora	NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Santa Luisa	NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Muñoz	NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
CEPICH	NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Tabasco	NIREEMRRLQRRKQLCFQGRDPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Guerrero	NIREEMRRLQRRKQLCFQGRDPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Nayarit	NIREEMRRLQRRKQLCFQGRDPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Quintana roo	NIREEMRRLQRRKQLCFQGRDPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Susceptible	NIREEMRRLQRRKQLCFQGRDPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Tamaulipas	NIREEMRRLQRRKQLCFQGRDPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK
Veracruz	NIREEMRRLQRRKQLCFQGRDPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMKEREK *****
San Alfonso	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Mora	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Santa Luisa	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Muñoz	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
CEPICH	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Tabasco	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Guerrero	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Nayarit	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Quintana roo	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Susceptible	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Tamaulipas	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
Veracruz	IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ *****

**Figura 6.** Alineamiento múltiple de las secuencias reportadas en México que codifican para la proteína Subolesin de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Lo sombreado en azul representa mutaciones en aminoácidos. Al realizar la comparación, se detectó un 99% de identidad a nivel de aminoácidos.

## 7.2 Predicción de la región antigénica del gen *subolesin*

De acuerdo a los resultados obtenidos del alineamiento múltiple, se seleccionó la secuencia Santa Luisa (DQ159965.1), para llevar a cabo la predicción de las regiones antigénicas de la proteína Subolesin utilizando el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar (Figura 7) mediante el programa CLC Main Workbench 5.7, y se determinó la secuencia de un fragmento de 303 pb (Figura 8), el cual se utilizó para el diseño de los oligonucleótidos.



**Figura 7.** Predicción de antigenicidad de la secuencia que codifica para la proteína Subolesin, utilizando el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar.

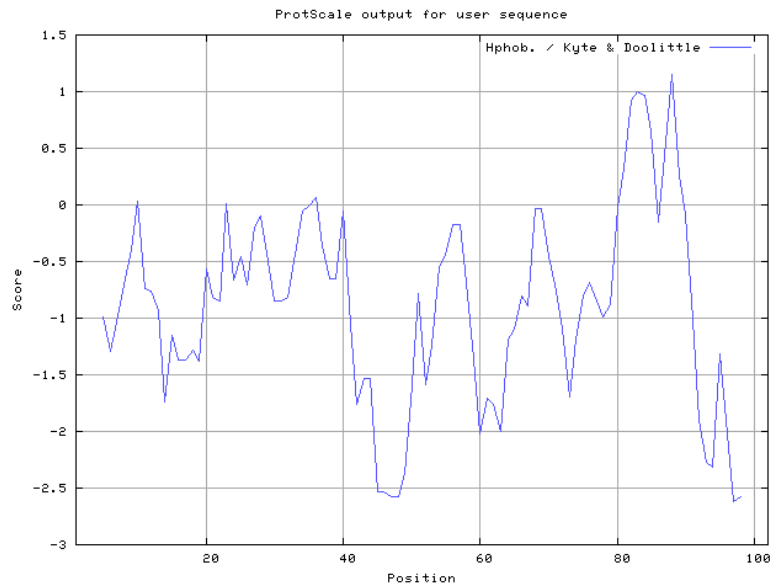
```
MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSP  
PPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAANIREEMRRL  
QRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTF  
RQVGLICERMMKERESKIREEYDHVLSTKLAEQYD  
TFVKFTYDQ
```

**Figura 8.** Secuencia de aminoácidos deducida (flanqueada en color rojo), a partir del amplicón de 303 pb, seleccionado para la síntesis de oligonucleótidos. El gen corresponde a los 147 aminoácidos contenidos en la secuencia de 441 nucleótidos.

### 7.3 Hidrofobicidad

El análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos del péptido subolesin, se basó en el estudio de los parámetros fisicoquímicos de cada residuo, para predecir la localización dentro de la célula. De acuerdo al algoritmo Kyte y Doolittle, mediante el programa ProtScale, los resultados predicen que los aminoácidos del péptido subolesin están conformados principalmente por residuos hidrofílicos en la región expuesta al espacio extracelular.

En la figura 9 se muestra la gráfica del análisis de hidrofobicidad para el péptido subolesin, donde se observan valores por debajo de 1.6, lo cual indica de acuerdo a la composición fisicoquímica de cada residuo que no hay presencia de aminoácidos hidrofóbicos.



**Figura 9.** Predicción de regiones hidrofóbicas del péptido subolesin con el programa ProtScale.

#### 7.4 Epítomos de células B

Los criterios para la identificación de los epítomos lineales fueron:

- La predicción del epítomo por al menos 3 diferentes algoritmos.
- Valores altos de predicción considerados de la siguiente manera:

ABCpred: >0.80

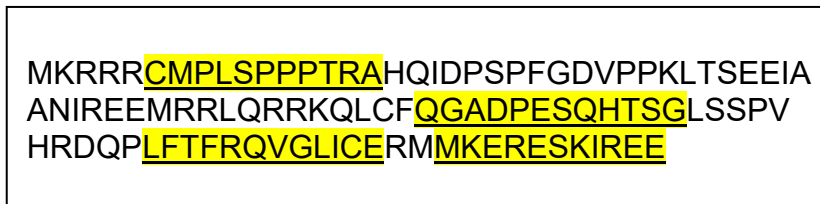
BCEpred:

- Hidrofilicidad > 1
- Antigenicidad > 1

Antigenic: >1

IEDB/bcell: >1

De acuerdo a los resultados arrojados por los diferentes algoritmos bioinformáticos, se caracterizó un péptido aislado que podría ser útil para inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por un artrópodo hematófago. En la figura 10, la predicción del péptido comprende al menos cuatro epítomos lineales de células B dentro de la secuencia que cumplen con los valores establecidos dentro del criterio de identificación. El primero está constituido por 11 aminoácidos (residuo 6-16), el segundo por 12 aminoácidos (residuo 56-67), el tercero por 12 aminoácidos (residuo 78-89) y el cuarto por 11 aminoácidos (residuo 92-102).



MKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIA  
ANIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPV  
HRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESKIREE

**Figura 10.** Predicción de los epítomos lineales de células B dentro de la secuencia del péptido subolesin. En color amarillo se muestran 4 epítomos lineales predichos en los diferentes algoritmos bioinformáticos que podrían ser útiles para inducir una respuesta inmune protectora.

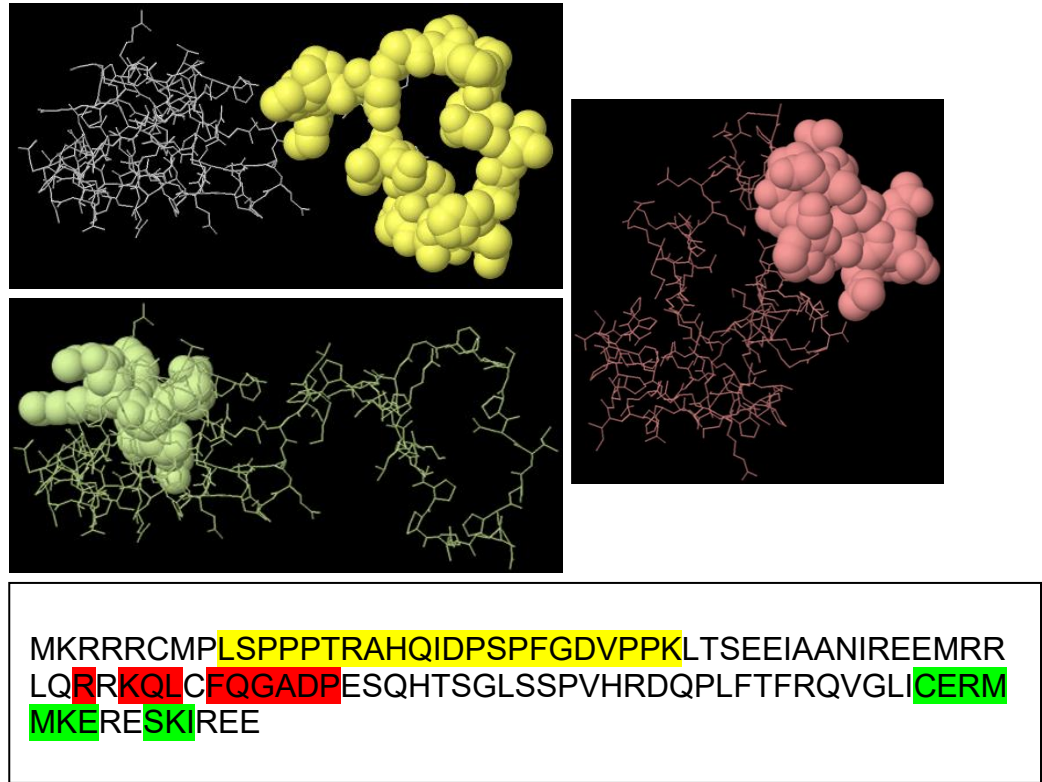
La predicción de la estructura 3D del péptido Subolesin se realizó mediante el método I-Tasser. Las estructuras completas se construyen a partir de re-arreglo de los fragmentos estructurales de los otros modelos detectados en el PDB. El modelo obtenido con mayor probabilidad de plegamiento se muestra en la figura 11.





**Figura 11.** Modelo 3D obtenido por el método I-Tasser. Corresponde al péptido subolesin, donde se puede apreciar en color magenta las hélices alfa, en color azul las láminas beta y en color gris los giros beta dentro de la cadena peptídica.

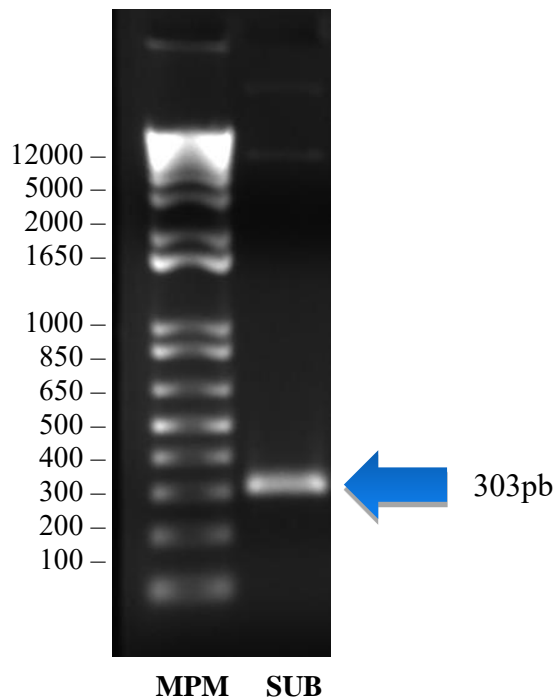
En cuanto a los resultados obtenidos utilizando el programa IEDB/ellipro, se realizó la predicción y visualización de epítomos conformacionales dentro de la secuencia determinada. En la figura 12 se muestran 3 posibles epítomos conformacionales predichos en la secuencia del péptido subolesin. El primero está constituido por 22 aminoácidos (residuo 9-30), el segundo por 10 aminoácidos (residuo 49, 51-53, 55-60) y el tercero por 10 aminoácidos (residuo 88-94, 97-99).



**Figura 12.** Predicción de los epítomos conformacionales dentro de la secuencia del péptido subolesin. Se identificaron 3 posibles epítomos utilizando el programa IEDB/ellipro, que se muestran en color amarillo, rojo y verde.

### 7.5 Amplificación por PCR del fragmento del gen *subolesin*

Se realizó el ensayo de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos obtenidos a partir del análisis *in silico* del gen *subolesin*. Una vez realizada la amplificación por PCR, se sometió el producto a electroforesis en geles de agarosa 1%. En la figura 13 se observa el producto de PCR con el tamaño esperado para el fragmento del gen *subolesin*, de 303 pares de bases.



**Figura 13.** Electroforesis de gel de agarosa 1% para el fragmento del gen *subolesin*. Carril 1) marcador de peso molecular de 1 Kb Plus. Carril 2) producto de PCR del fragmento del gen *subolesin*, con tamaño de 303 pb. La flecha en azul indica el tamaño del amplicón.

### 7.6 Clonación y secuenciación del fragmento amplificado por PCR

El producto de PCR fue clonado en el vector pET101/D-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para comprobar la presencia del inserto en el vector, se seleccionaron 5 colonias recombinantes aleatoriamente para efectuar un PCR de colonia y corroborar cuales eran clonas positivas (pET101-subolesin). Los plásmidos purificados de las 5 colonias fueron enviados a secuenciar en ambas direcciones y los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el programa CLUSTAL W. La clona elegida para

realizar los ensayos de expresión tuvo una identidad de 100% con respecto a la secuencia de interés de la proteína Subolesin (Figura 14).

```

pET101-Sub      ATGAAGCGACGCCGATGTATGCCTCTGTCCCCGCCTCCTACAAGGGCGCACCAGATCGAT
Santa Luisa     ATGAAGCGACGCCGATGTATGCCTCTGTCCCCGCCTCCTACAAGGGCGCACCAGATCGAT
                *****

pET101-Sub      CCCTCGCCCTTCGGAGACGTGCCACCAAAGTTGACTTCAGAGGAGATAGCAGCCAACATC
Santa Luisa     CCCTCGCCCTTCGGAGACGTGCCACCAAAGTTGACTTCAGAGGAGATAGCAGCCAACATC
                *****

pET101-Sub      CGTGAGGAGATGCGACGGCTACAACGGCGCAAGCAGCTCTGTTTCCAGGGCGCTGACCCT
Santa Luisa     CGTGAGGAGATGCGACGGCTACAACGGCGCAAGCAGCTCTGTTTCCAGGGCGCTGACCCT
                *****

pET101-Sub      GAATCCCAGCATAACCAGTGGTCTCTCGTCACCAGTGCATCGAGACCAGCCCCTGTTCACG
Santa Luisa     GAATCCCAGCATAACCAGTGGTCTCTCGTCACCAGTGCATCGAGACCAGCCCCTGTTCACG
                *****

pET101-Sub      TTCCGCCAGGTTGGGCTCATTTGCGAACGAATGATGAAGGAGCGAGAGCAAGATACGG
Santa Luisa     TTCCGCCAGGTTGGGCTCATTTGCGAACGAATGATGAAGGAGCGAGAGCAAGATACGG
                *****

pET101-Sub      GAGGAG
Santa Luisa     GAGGAG
                *****

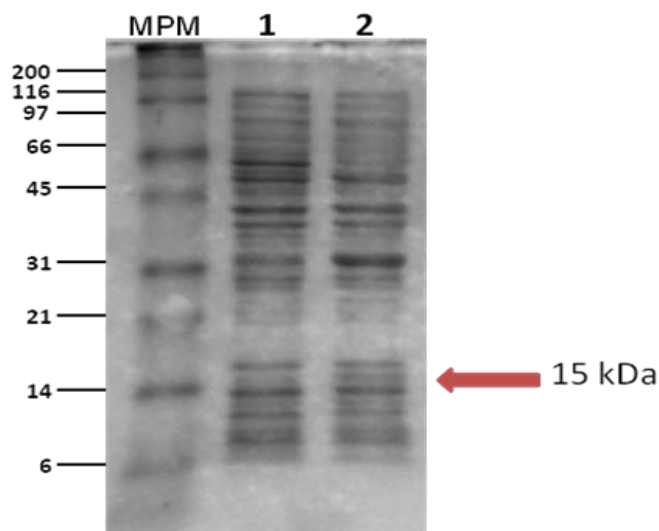
```

**Figura 14.** Alineamiento de la secuencia obtenida de la colonia recombinante con la secuencia reportada en el GenBank Santa Luisa (DQ159965), que codifica para la proteína Subolesin de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Al realizar el alineamiento de secuencias, se detectó un 100% de identidad en nucleótidos.

## 7.7 Expresión del péptido recombinante

### 7.7.1 Análisis de proteínas

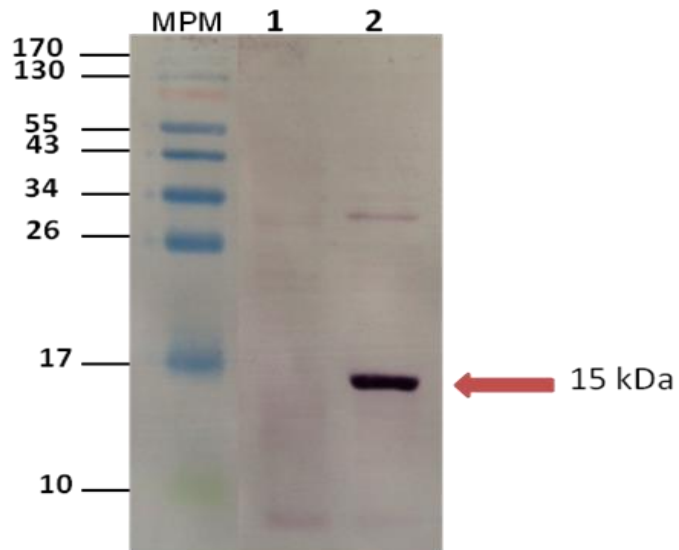
Una vez que se comprobó la presencia del amplicón en el vector (construcción) y se detectó la homología de 100% para subolesin, se realizó la inducción de la síntesis del péptido recombinante con IPTG, y posteriormente los extractos de proteínas se analizaron en geles de acrilamida SDS-PAGE 15%, en los cuales se observó el péptido inducido con un tamaño aproximado de 15 kDa. (Figura 15). En el mismo gel se alcanza a observar una banda más intensa equivalente a 2 veces el tamaño esperado. La posible explicación a este fenómeno, es que ésta proteína es capaz de unirse a sí misma para formar dímeros, esto significa que está representada por dos moléculas de proteínas unidas.



**Figura 15.** Electroforesis de gel de acrilamida SDS-PAGE 15% para la expresión del péptido recombinante subolesin. Carril 1) lisado total de *E. coli* no inducido (control negativo). Carril 2) lisado total de *E. coli* inducido con IPTG. MPM - marcador de peso molecular. La flecha roja indica el peso molecular del péptido recombinante.

### 7.7.2 Western blot

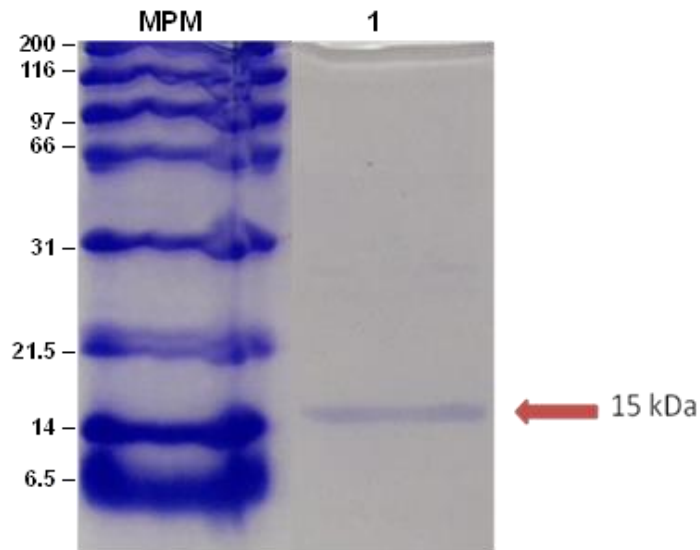
Una vez identificado el peso molecular del péptido, se realizó la inmunoelectrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para detectar el péptido recombinante subolesin, mediante un anticuerpo monoclonal dirigido contra la etiqueta de poli-histidina acoplado a fosfatasa alcalina y el uso del reactivo BCIP/NBT. El péptido identificado se muestra como una banda teñida de color púrpura en la membrana de nitrocelulosa correspondiente al peso molecular esperado de 15 kDa. aproximadamente (Figura 16). De igual forma, se muestra un posible dímero equivalente a 2 veces el tamaño esperado.



**Figura 16.** El anticuerpo anti-His detecta el péptido recombinante subolesin mediante inmunoelectrotransferencia. Carril 1) Lisado total de *E. coli* sin inductor (control negativo). Carril 2) Péptido recombinante subolesin. MPM - marcador de peso molecular. La flecha en color rojo indica el peso molecular del péptido recombinante.

## 7.8 Purificación y preparación del péptido recombinante

Una vez que se purificó el péptido recombinante por cromatografía de afinidad por medio de columnas con afinidad a níquel, la fracción eluida fue analizada en geles de acrilamida SDS-PAGE 15% para garantizar la pureza del péptido. La pureza del péptido recombinante fue calculada en  $\geq 95\%$  (Figura 17). Finalmente, el péptido purificado se mezcló con el adyuvante comercial Montanide ISA 50 V2 1:1 (v/v) en una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , con el fin de aplicarlo de manera subcutánea en los bovinos utilizados en el ensayo de inmunización para demostrar la capacidad de generar una respuesta inmune efectiva.



**Figura 17.** Electroforesis de gel de acrilamida SDS-PAGE 15% para la purificación del péptido recombinante subolesin. Carril 1) Péptido recombinante subolesin con  $\geq 95\%$  de pureza. MPM - marcador de peso molecular. La flecha en color rojo indica el peso molecular del péptido purificado.

## **7.9 Evaluación del efecto inmunológico sobre las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Mediante la prueba estadística *t-student* ( $p < 0.05$ ) y las fórmulas utilizadas para la evaluación del efecto de la inmunización, se observan diferencias estadísticamente significativas en dos de los cuatro parámetros reproductivos de la garrapata *R. microplus*.

De acuerdo con los porcentajes de reducción de *R. microplus* obtenidos en el grupo tratado y el grupo testigo, se puede notar que los resultados difieren entre sí (cuadro 1). Se obtuvo un menor número de garrapatas hembras repletas colectadas al final del ciclo en los bovinos inmunizados con el péptido recombinante subolesin ( $p < 0.05$ ), a diferencia de los resultados obtenidos en el grupo testigo, donde se colectaron en mayor cantidad. El porcentaje de reducción sobre el número de garrapatas adultas fue de 79%.

Para el caso del efecto sobre el peso de hembras repletas, no existió diferencia alguna en los resultados obtenidos. El peso promedio por garrapata en el grupo testigo y el tratado fue muy similar; sin efecto alguno en el porcentaje final.

En lo que corresponde al efecto sobre la oviposición, destaca también que no hubo algún resultado favorable al obtener la masa de huevos entre los 2 grupos. El promedio de huevos por garrapata fue el adecuado considerando que ovipositan entre el 40 y el 60% de su peso vivo. No existió efecto en el porcentaje final.

En el efecto sobre la tasa de eclosión, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ), mostrando una reducción considerable en la nueva generación de larvas de garrapatas.



**Cuadro 1.** Porcentajes de reducción en los parámetros reproductivos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

	<b>Grupo Testigo</b>	<b>Grupo Tratado</b>	<b>Porcentaje de Reducción</b>
<b>Número de garrapatas</b>	1303±221	273±133*	79%
<b>Peso de garrapatas (mg)</b>	273±28	302±7	--
<b>Oviposición (mg)</b>	126±11	145±6	--
<b>Eclosión (%)</b>	0.63±0.05	0.44±0.01*	30%

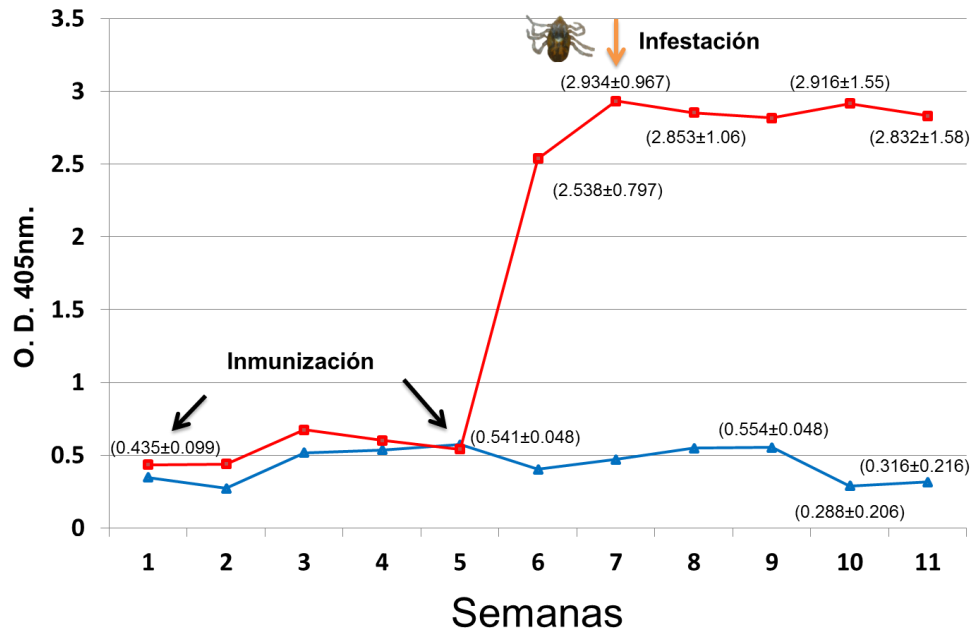
El porcentaje de reducción fue calculado con respecto al grupo testigo. Se muestra la media  $\pm$  la desviación estándar por número de hembras repletas, peso, oviposición y eclosión. \*Señala diferencias estadísticamente significativas, según la prueba *t-student* ( $p < 0.05$ ).

### **7.10 Determinación de la cinética de anticuerpos mediante ELISA indirecto**

Para obtener los niveles de anticuerpos se realizó la prueba de ELISA indirecto de los sueros obtenidos de los bovinos durante 11 semanas. Tal como se muestra en la figura 18, antes de realizar la primera inmunización los valores de absorbancia se mantuvieron constantes y similares en ambos grupos. Después de la primera inmunización (semana 1) y hasta la semana 5, el comportamiento fue

similar en la producción de anticuerpos. La segunda inmunización se realizó en la semana 5 y posteriormente se muestra un incremento considerable para la semana 6, aumentando los valores de absorbancia a más del doble con respecto a los bovinos no inmunizados con el péptido recombinante. Estos resultados fueron contundentes y la producción de anticuerpos se mantuvo incrementando, hasta la semana 7, cuando se realizó la infestación con larvas de garrapatas *R. microplus*. Después de la infestación y hasta el final del experimento (semana 11), el nivel de anticuerpos en los bovinos inmunizados con el péptido recombinante subolesin se mantuvo constante y alto en comparación con los animales inmunizados únicamente con adyuvante.

En la figura 18 se muestra la gráfica de la cinética de la producción de anticuerpos obtenida durante el ensayo de inmunización, y en el apéndice 6, los promedios de los valores de absorbancia (Densidad óptica, 405 nm), obtenidos en la prueba de ELISA indirecto durante las 11 semanas.



**Figura 18.** Cinética de la producción de anticuerpos obtenida mediante la prueba de ELISA indirecto. En la gráfica se observa el promedio  $\pm$  Desviación Estándar de los niveles de anticuerpos para los bovinos inmunizados con adyuvante (línea azul) y para los bovinos inmunizados con el péptido recombinante subolesin (línea roja). Las flechas negras indican las semanas donde se realizó la inmunización y la flecha naranja la infestación.

## VIII. Discusión

La búsqueda de alternativas para el control de las garrapatas se ha realizado por décadas (Sonenshine *et al.*, 2006), en las explotaciones ganaderas donde *R. microplus* es el ectoparásito de mayor importancia. La posibilidad de controlar las infestaciones de garrapata mediante la inmunización de hospederos con antígenos de garrapata fue una realidad con el desarrollo de vacunas que redujeron las infestaciones de *R. (Boophilus) spp* en rumiantes (de la Fuente y Kocan, 2003; de la Fuente y Kocan, 2006; Nuttall *et al.*, 2006; Willadsen, 2006).

Las vacunas desarrolladas frente a artrópodos se basan en la inducción en el hospedero de anticuerpos específicos de antígenos que resulten dañinos para el vector artrópodo durante su alimentación (Almeida y Billingsley, 2002; de la Fuente *et al.*, 2007a; de la Fuente *et al.*, 1999; Lal *et al.*, 2001; Milleron *et al.*, 2004; Suneja *et al.*, 2003; Titus *et al.*, 2006; Valenzuela *et al.*, 2001; Willadsen, 2004). Actualmente existen en el mercado dos vacunas comerciales (Gavac<sup>®</sup> y TickGard<sup>®</sup>) que se desarrollaron a partir del antígeno Bm86, aislado de las células del epitelio intestinal y clonado por tecnología de DNA recombinante, las cuales reducen las infestaciones por este ectoparásito en animales de interés ganadero. Este antígeno ha demostrado ser de gran utilidad porque el efecto inmunogénico protector se refleja en la reducción de las funciones vitales de las garrapatas *R. (Boophilus) spp*. Sin embargo Bm86 tiene variación en la eficacia entre cepas de campo de garrapatas *R. microplus* (García-García *et al.*, 2000).

Patarroyo, (2002) propuso que para aumentar la eficacia de la vacuna contra garrapatas *R. microplus* utilizando el antígeno Bm86, es necesario utilizar herramientas bioinformáticas para predecir ciertas propiedades moleculares, bioquímicas e inmunológicas de la proteína. Para esto, diseñó 3 péptidos sintéticos, de acuerdo a sus características y composición antigénica, para incrementar la capacidad inmunológica de la proteína en ensayos de inmunización.

Por lo tanto, la predicción de la región más inmunogénica de este gen, permite dirigir la respuesta inmune contra los epítomos contenidos en esta parte de la secuencia y de esta manera incrementar el potencial protector si se utiliza como inmunógeno, para el desarrollo de una vacuna más efectiva. De acuerdo a esto, el péptido denominado SBm7462 fue el que tuvo una mayor capacidad protectora con 81% de efectividad en contra de infestaciones por garrapatas *R. microplus* (Patarroyo *et al.*, 2002). Este resultado está por encima del promedio de lo ya reportado utilizando la proteína completa de Bm86, que tiene una efectividad de la vacuna de 45% a 86% (Cobon *et al.* 1995; Fragoso *et al.* 1998; de la Fuente *et al.* 1998, 1999; de la Fuente, 2000; García-García *et al.* 2000; de Vos *et al.* 2001; de la Fuente y Kocan 2003, 2006; Canales *et al.* 2009a).

En el presente estudio y con los antecedentes reportados por Patarroyo *et al.*, (2002, 2009) se diseñó un péptido recombinante derivado del gen *subolesin* de acuerdo a sus propiedades de interés, para aumentar la capacidad inmunogénica; Se realizó el análisis *in silico* del gen y se obtuvo la secuencia de un amplicón cuya función putativa corresponde con la secuencia que codifica para la proteína Subolesin. La identidad del amplicón fue de 100% comparada con la secuencia Santa Luisa (DQ159965) de *R. microplus* obtenida de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). La expresión de la proteína recombinante Subolesin utilizando la maquinaria biológica de *E. coli*, ha sido bien estudiada con fines de inmunización. Actualmente se sabe que es una proteína ortóloga y funcional de la akirina de insectos y la akirina 2 de los mamíferos (Goto *et al.*, 2008; Galindo *et al.*, 2009). Subolesin actúa como factor de transcripción por lo que su función afecta a múltiples procesos como la digestión, el desarrollo, la reproducción y la respuesta inmunitaria innata de la garrapata, influyendo en la infección y multiplicación de los patógenos en el vector (Prudencio *et al.*, 2010; Zivkovic *et al.*, 2010; de la Fuente *et al.*, 2011). Por ello, la vacunación con Subolesin, protege frente a las infestaciones por garrapatas, mosquitos y flebótomos (Merino *et al.*, 2011; Moreno-Cid *et al.*, 2001, 2013), por lo que se

consideró un buen candidato para el desarrollo de una vacuna universal, pero no se había analizado la opción de diseñar un péptido recombinante con características específicas que fuera capaz de tener un mayor efecto cuando se utiliza en ensayos de inmunización en comparación con los ya reportados (Almazán *et al.*, 2010; Merino *et al.*, 2013; Shakya *et al.*, 2014).

En el ensayo de inmunización con el péptido subolesin en bovinos, se observó que el nivel de anticuerpos obtenido por ELISA indirecto se elevó significativamente a partir de la segunda inmunización, notándose un incremento considerable a partir de la quinta semana y hasta el final del experimento, confirmándose la capacidad antigénica del péptido, predicha en los análisis bioinformáticos. Estos resultados sugieren que la eficacia en la disminución de la infestación fue debida a la respuesta protectora generada por los anticuerpos, lo que está acorde con resultados similares encontrados por Canales *et al.* (2009b); Almazán *et al.* (2010); Merino *et al.*, (2011; 2013). En este trabajo se observó un comportamiento adecuado después de las inmunizaciones; es decir, después de la segunda inmunización hubo una producción considerable de anticuerpos, la cual se mantuvo así hasta el final del experimento. Esto sugiere que existió una respuesta inmune secundaria más específica a causa del péptido subolesin y dirigida hacia los epítomos contenidos en esta parte de la secuencia.

En los bovinos inmunizados con el péptido recombinante subolesin se redujo significativamente el número de garrapatas *R. microplus* y la tasa de eclosión, pero no existió efecto alguno en cuanto al peso y la oviposición, comparándolo con los parámetros evaluados en los bovinos del grupo testigo. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores (Almazán *et al.*, 2010; Merino *et al.*, 2013), en los cuales la base de este tipo de investigaciones consiste en que la alimentación de artrópodos hematófagos sobre hospederos inmunizados conlleva la ingestión de anticuerpos específicos para antígenos diana, los cuales provocan efectos adversos en su función biológica y reproductiva. Se desconoce el mecanismo

preciso por el cual los anticuerpos anti-subolesin afectan la infestación de garrapatas y a su fertilidad, pero es posible que incluya la reducción de la actividad biológica de subolesin por estar presente en órganos vitales de la garrapata (de la Fuente *et al.* 2011; Moreno-Cid *et al.* 2011).

La identificación de antígenos protectores evolutivamente conservados, tales como subolesin, y el diseño de péptidos antigénicos que comprenden epítomos protectores, como el que se sintetizó en el presente estudio, puede conducir al desarrollo de vacunas con una capacidad inmunogénica más dirigida hacia el control de garrapatas. Sin embargo, a pesar de los recientes esfuerzos para desarrollar vacunas para el control de los artrópodos más importantes que son vectores de patógenos que afectan a la salud animal y humana, como las garrapatas, mosquitos y mosquitos de arena (flebotomos) (de la Fuente *et al.* 2003; Valenzuela *et al.* 2001; Lal *et al.* 2001; Almeida *et al.* 2002; Suneja *et al.* 2003; Milleron *et al.* 2004; Titus *et al.* 2006; Willadsen, 2004), sólo dos vacunas han sido comercializadas para el control de las infestaciones por garrapatas en ganado vacuno (de la Fuente *et al.* 2003; de la Fuente *et al.* 2007a; Willadsen, 2004).

En trabajos previos se ha demostrado el efecto protector de los anticuerpos anti-subolesin en la reducción de la supervivencia, oviposición y/o fertilidad de garrapatas, mosquitos, flebotomos y ácaros rojos de las gallinas (Canales *et al.* 2009b; de la Fuente *et al.* 2011; Moreno-Cid *et al.* 2011; Harrington *et al.* 2009); Sin embargo, los resultados de la presente investigación son los primeros que muestran el efecto de un péptido recombinante diseñado a partir de herramientas bioinformáticas, considerando propiedades específicas para aumentar el efecto protector de subolesin en garrapatas, así como el primer experimento que muestra los efectos de la inmunización contra infestaciones por garrapatas *R. microplus*. La comparación entre los estudios previos que se han llevado a cabo con el antígeno subolesin en diferentes artrópodos, demuestran un efecto

protector y a la vez variable dependiendo de la especie. La protección que ha alcanzado la proteína Subolesin en contra de infestaciones por garrapatas *R. microplus* oscila entre 40 y 60% (Almazán *et al.*, 2010; Merino *et al.*, 2011, 2013; Shakya *et al.*, 2014). En este primer estudio preliminar de inmunización con un péptido recombinante derivado de la proteína Subolesin, considerando propiedades específicas para aumentar el potencial protector cuando se utiliza como inmunógeno, podría alcanzar hasta un 80% de protección, afectando considerablemente la sobrevivencia y en menor escala la tasa de eclosión. Actualmente se sabe que la inmunización con subolesin controla las infestaciones de vectores debido a la alta conservación de las proteínas de garrapatas y mosquitos (Canales *et al.* 2009b; de la Fuente *et al.* 2006; Macqueen y Johnston 2009; Galindo *et al.* 2009; de la Fuente *et al.* 2011; Prudencio *et al.* 2010). Sin embargo, la utilización de diferentes estrategias para diseñar los inmunógenos, podría mejorar la eficacia de las vacunas frente a diferentes especies de vectores.



## IX. Conclusiones

Actualmente, el control de las infestaciones por garrapatas se efectúa mediante una serie de medidas integradas en las cuales actúan diversos métodos de control adaptados a un área geográfica. Un componente principal de estos métodos de control consiste en la aplicación de acaricidas químicos. Sin embargo, la aplicación de acaricidas ha mostrado una eficacia limitada en la reducción de las infestaciones y a menudo estas medidas se acompañan de serios efectos adversos, tales como la selección de garrapatas resistentes a acaricidas, la contaminación del medio ambiente y la contaminación de la carne y la leche con residuos de agentes químicos (Graf, *et al.*, 2004).

Por lo anterior, la búsqueda de nuevos antígenos protectores contra garrapatas ha ido en avance y recientemente se han identificado nuevas proteínas con diferente mecanismo de acción, pero solo algunas han mostrado eficacia en ensayos controlados contra diferentes especies de garrapatas (Almazán *et al.*, 2005b; de la Fuente y Kocan, 2006; Nuttall *et al.*, 2006; Hajdusek *et al.*, 2010).

Se demostró mediante técnicas bioinformáticas, la existencia de epítomos de células B en el péptido derivado de la proteína Subolesin.

Se comprobó que al inmunizar bovinos con el péptido que contiene epítomos de células B se genera una respuesta inmune humoral y que los anticuerpos producidos podrían estar asociados con la interrupción del desarrollo y la reproducción de la garrapata.

## X. Bibliografía

**Agbede RIS, Kemp DH.** 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Histopathology of tick feeding on vaccinated cattle. *Int. J. Parasitol*; 16: 35-41.

**Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, García-García JC, Blouin EF, de la Fuente J.** 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*; 21: 1492-1501.

**Almazán C, Blas-Machado U, Kocan KM, Yoshioka JH, Blouin EF, Mangold AJ, de la Fuente J.** 2005a. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine*; 23: 4403–4416.

**Almazán C, Kocan KM, Blouin EF, de la Fuente J.** 2005b. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*; 23: 5294–5308.

**Almazán C, Gutiérrez JC, Rosario-Cruz R, Naranjo V, de la Fuente J.** 2007. Establecimiento de metodologías para el descubrimiento de antígenos protectores contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Simposium Internacional Garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis*. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tamps. México. p. 72-81.

**Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, de la Fuente J.** 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res*; 106: 471–479.

**Almeida AP, Billingsley PF.** 2002. Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): effects of cell fraction antigens on survival, fecundity, and *Plasmodium berghei* (Eucoccidiida: Plasmodiidae) transmission. J. Med. Entomol; 39: 207-214.

**Alonso-Díaz MA, García L, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Angel-Sahagún C, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H.** 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. Vet. Parasitol; 147: 336-340.

**Barker SC, Murrell A.** 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Parasitol; 129 Suppl:S1536.

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

**Betancourt A.** 2010. Vectores en la salud animal y sus correlaciones con el cambio climático global. Seminario Internacional sobre Cambio Climático Global y Ganadería. Bogotá, Colombia. p. 20-21.

**Bram RA, George JE, Reichard RE, Tabachnick WJ.** 2002. Threat of foreign arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. J. Med. Entomol; 39: 405-416.

**Brown SJ, Shapiro SZ, Askenase PW.** 1984. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. 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.

**Canales M, Enríquez A, Ramos E, Cabrera D, Dandie H, Soto A, Falcón V, Rodríguez M, de la Fuente J.** 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. *Vaccine*; 15: 414-422.

**Canales M, Almazán C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J.** 2009a. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnol*; 9:29.

**Canales M, Naranjo V, Almazán C, Molina R, Tsuruta SA, Szabó MPJ, Manzano-Roman R, Pérez LJM, Kocan KM, Jiménez MI, Lucientes J, Villar M, de la Fuente J.** 2009b. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. *Parasitol. Res*; 105: 97-111.

**Cobon G, Willadsen P.** 1990. Vaccines to prevent cattle tick infestations. *Vaccine*; 50: 901-17.

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

**Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA, Martínez Fernández AR, Sánchez Acedo MC, Hernández Rodríguez S, Navarrete Lopez-Cozar I, Diez Baños P, Quiroz Romero H, Carvalho Varela M.** 1999. *Parasitología Veterinaria*. Mac-Graw-Hill Interamericana. Madrid, Esp. p. 420.

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

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

**de la Fuente J.** 2000. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Ann. New York Acad. Sci*; 916: 617-621.

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

**de la Fuente J, Almazán C, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM.** 2005. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol. Res*; 96: 137–141.

**de la Fuente J, Kocan KM.** 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol*; 28: 275–283.

**de la Fuente J, Almazán C, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM.** 2006a. Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitol. Res*; 100: 85-91.

**de la Fuente J, Almazán C, Blas-Machado U, Naranjo V, Mangold AJ, Blouin EF, Gortazar C, Kocan KM.** 2006b. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood digestion and reproduction. *Vaccine*; 24: 4082–4095.

**de la Fuente J, Almazán C, Naranjo V, Blouin EF, Meyer JM, Kocan KM.** 2006c. Autocidal control of ticks by silencing of a single gene by RNA interference. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 344: 332-338.

**de la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen, P.** 2007a. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim. Health Res. Rev*; 8: 23-28.

**de la Fuente J, Kocan KM, Almazán C, Blouin EF.** 2007b. ARN interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends Parasitol*; 23: 427-432.

**de la Fuente J.** 2007c. Desarrollo de vacunas contra garrapatas. *Symposium Internacional Garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis.* Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tamps. México. 67-71.

**de la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal JM, Kocan KM, Somenshine DE.** 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in human and animals. *Front Biosci*; 13: 6938-6946.

**de la Fuente J, Moreno-Cid JA, Canales M, Villar M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Galindo RC, Almazán C, Blouin EF.** 2011. Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Vet. Parasitol*; 181: 17-22.

**de Vos S, Zeinstra L, Taoufik O, Willadsen P, Jongejan F.** 2001. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp. Appl. Acarol*; 25: 245–261.

**Domínguez García DI, Rosario Cruz R, Almazán C, Saltijeral Oaxaca JA, de la Fuente J.** 2010. *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Trop. Subtrop. Agroecos*; 12: 181-192.

**Duncan IM.** 1991. Tick control on cattle with flumethrin pour-on through a Duncan applicator. *J. S. Afr. Vet. Assoc*; 63: 125-127.

**Estrada-Peña A, Naranjo V, Acevedo-Whitehouse K, Mangold AJ, Kocan KM, de la Fuente J.** 2009. Phylogeographic analysis reveals association of tick borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. *BMC Biol*; 7:57.

**FAO. Salud Animal.** 2003. Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. *Producción y Sanidad Animal* 157. Dirección de Producción y Salud Animal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Roma, Italia. pp. 52.

**Feinberg EH, Hunter CP.** 2003. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*; 301: 1545–1547.

**Fernandes EKK, Bitencourt VREP, Roberts DW.** 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of tick. *Exp Parasitol*; 130: 300-305.

**Fernández-Ruvalcaba M, Cruz VC, Preciado de la TJF, García VZ.** 2003. Evaluación del efecto anti-garrapata de los pastos gordura y llanero sobre la garrapata *Boophilus microplus* en un periodo de cinco años. XXVII Congreso Nacional de Buiatria, Villahermosa, Tab. México.

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

**Fragoso SH, Hoshmand RP, Ortiz EM, Rodríguez M, Redondo M, Herrera L, de la Fuente J.** 1998. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. Vaccine; 16: 1990–1992.

**Fragoso SH, Soberanes CN.** 2001. Control de la resistencia a los ixodicidas a la luz de los conocimientos actuales. XXV Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Ver. México. pp. 40-48.

**Frazzon APG, Vaz JR, Masuda A, Schrank A, Vain-Stein MH.** 2000. In vitro assement of *Metharrizum anisopliae* islates to control the tick *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol; 94: 117-25.

**Friedrich L, Lawton K, Dietrich R, Willits M, Cade R, Ryals J.** 2001. NIM1 overexpression in arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. Mol Plant Microbe Interact; 14: 1114-1124.



**Galindo RC, Doncel-Pérez E, Zivkovic Z, Naranjo V, Gortazar C, Mangold AJ, Martín-Hernando MP, Kocan KM, de la Fuente J.** 2009. Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Dev. Comp. Immunol*; 33: 612-617.

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

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

**George JE.** 1996. The campaign to keep *Boophilus* ticks out of the United States: technical problems and solutions. Paper read at Proceedings of the 100<sup>th</sup> Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association, at Richmond, VA.

**George JE, Pound JM, Davey RB.** 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitol*; 129: 353-366.

**George JE.** 2008. The effects of global change on the threat of exotic arthropods and arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Ann. New York Acad. Sci*; 1149: 249-254.

**Gilmore TD.** 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*; 25: 6680-6684.

**González-Crespo S, Levine M.** 1994. Related target enhancers for dorsal and NF-kappa B signaling pathways. *Science*; 264: 255-258.

**Gonzales Sáenz Pardo JR.** 2007. Importancia de la garrapata *Boophilus* en la exportación de ganado. Simposium Internacional Garrapatas, Babesiosis y anaplasmosis. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tamps. México. p. 30-34.

**Goto A, Matsushita K, Gesellchen V, El Chamy L, Kutteneuler D, Takeuchi O, Hoffmann JA, Akira S, Boutros M, Reichhart JM.** 2008. Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nat. Immunol*; 9: 97-104.

**Graf JF, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini GA, Molento MB, BordinEL, Arantes GJ.** 2004. Tick control: An industry point of view. *Parasitol*; 129: 427- 442.

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

**Harrington D, Canales M, de la Fuente J, de Luna C, Robinson K, Guy J, Sparagano O.** 2009. Immunisation with recombinant proteins subolesin and Bm86 for the control of *Dermanyssus gallinae* in poultry. *Vaccine*; 27: 4056-4063.

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

**Hill CA, Wikel SK.** 2005. The *Ixodes scapularis* Genome Project: an opportunity for advancing tick research. *Trends Parasitol*; 21: 151–153.

**Hope M, Jiang X, Gough J, Cadogan L, Josh P, Jonsson N, Willadsen P.** 2010. Experimental vaccination of sheep and cattle against tick infestation using recombinant 5'-nucleotidase. *Parasite Immunol*; 32: 135-142.

**Imamura S, Vaz ID, Sugino M, Ohashi K, Onuma M.** 2005. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*; 23: 1301-1311.

**INEGI.** 1995. Anuario estadístico del estado de Morelos. Jiutepec, Morelos: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, Gobierno del estado de Morelos.

**Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Albrecht MS, Hungerford J, Ansell J.** 2000. Evaluation of tick-GARD (PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet. Parasitol*; 88: 275-285.

**Jonsson NN.** 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol*; 15: 1-10.

**Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK.** 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet. Parasitol*; 155: 1-9.

**Kemp DH, Agbede RIS, Johnston LAY, Gough GM.** 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Feeding and survival of the parasite on the vaccinated cattle. *Int. J. Parasitol*; 16: 115-120.

**Kocan KM, Zivkovic Z, Blouin EF, Naranjo V, Almazán C, Mitra R, de la Fuente J.** 2009. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC Developmentl. Biol*; 9:42.

**Kofta W, Wedrychowicz H.** 2001. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet. Parasitol*; 100: 3-12.

**Klompen JSH, Black WCIV, Keirans JE, Oliver JH Jr.** 1996. Evolution of ticks. *Annual Rev. of Entomol*; 41:141–161.

**Kolaskar AS, Tongaonkar PC.** 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*; 276:172-174.

**Kopp N, Diaz D, Amacker M, Odongo DO, Beier K, Nitsch C, Bishop RP, Daubenberger CA.** 2009. Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* BM86 homologues. *Vaccine*; 28: 261-269.

**Kyte J, Doolittle R.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol*; 157: 105-132.

**Koressaar T, Remm M.** 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*; 23:1289-1291.

**Labuda M, Trimnell AR, Lickova M, Kazimirova M, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA.** 2006. An antivektor vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog*; 2: 251-259.

**Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.

**Lal AA, Patterson PS, Sacci JB, Vaughan JA, Paul C, Collins WE, Wirtz RA, Azad AF.** 2001. Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 98: 5228-5233.

**Larsen JE, Lund O, Nielsen M,** 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*; 2: 2.

**Lee D, Park Y, Brown MT, Adams ME.**1999. Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Mol. Pharmacol*; 55: 581-593.

**Lew-Tabor AE, Bruyeres AG, Zhang B, Valle MR.** 2014. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks Tick Borne Dis*; 5: 500–510.

**Li N, Karin M.** 1999. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J*; 13: 1137-1143.

**Li AY, Chen AC, Miller RJ, Davey RB, George JE.** 2007. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: *Ixodidae*). *Pest Manag Sci*; 63: 882–889.

**Livolsi A, Busuttil V, Imbert V, Abraham RT, Peyron JF.** 2001. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B. Requirement for p56 LCK and ZAP-70 protein tyrosine kinases. *Eur J Biochem*; 268: 1508-1515.

**Lohmeyer KH, Pound JM, May MA, Kammlah DM, Davey RB.** 2011. Distribution of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Acari: Ixodidae) infestations detected in the United States along the Texas/Mexico border. *J. Med. Entomol*; 48: 770-774.

**Macqueen DJ, Johnston IA.** 2009. Evolution of the multifaceted eukaryotic akirin gene family. *BMC Evol. Biol*; 9: 34.

**Macqueen DJ, Kristjánsson BK, Johnston IA.** 2010. Salmonid genomes have a remarkably expanded akirin family, co-expressed with genes from conserved pathways governing skeletal muscle growth and catabolism. *Physiol. Genomics*; 42: 134-148.

**Mejía EF, García VZ, Rosario CR.** 2004. Control de garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a Piretroides en el municipio de Pichucalco, Chiapas. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatria. Villahermosa, Tab. México.

**Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M.** 2000. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect. Immunol*; 68: 5595-5602.

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

**Merino O, Antunes S, Mosqueda J, Moreno-Cid JA, Pérez de la Lastra JM, Rosario-Cruz R, Rodríguez S, Domingos A, de la Fuente J.** 2013. Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*; 31: 5889-5896.

**Milleron RS, Ribeiro JM, Elnaime D, Soong L, Lanzaro G.** 2004. Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 70: 278-285.

**Miller RJ, Almazán GC, Ortiz EM, Davey RB, George JE.** 2008. A survey for fipronil-and-ivermectin-resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected in northern Mexico and the options for the management of acaricide-resistant ticks with pesticides. VI Seminario Internacional de Parasitología Animal. Boca del Río, Ver. México.

**Moreno-Cid JA, Jiménez M, Cornelie S, Molina R, Alarcón P, Lacroix M-N, Pinal R, Delacour S, Lucientes J, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Villar M, de la Fuente J.** 2011. Characterization of *Aedes albopictus* akirin for the control of mosquito and sand fly infestations. *Vaccine*; 29: 77-82.

**Moreno-Cid JA, Pérez de la Lastra JM, Villar M, Jiménez M, Pinal R, Estrada-Peña A, Molina R, Lucientes J, Gortázar C, de la Fuente J.** 2013. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine*; 31: 1187-1196.

**Mosqueda JJ, Camacho-Nuez M, Falcón A, Ramos JA, Canto G, Aguilar G, Olvera A.** 2012. Estrategias inmunológicas y bioinformáticas para el control de la babesiosis bovina. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3 (Supl 1): 51-59.

**Mulenga A, Sugimoto C, Sako Y, Ohashi K, Musoke A, Shubash M, Onuma M.** 1999. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-Kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect. Immunol*; 67: 1652–1658.

**Mulenga A, Azad AF.** 2005. The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Exp. App. Acarol*; 37: 215-229.

**Murrell A, Campbell NJ, Barker SC.** 2000. Phylogenetic analyses of the Rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Mol. Phylogenet. Evol*; 16: 1-7.

**Murrell A, Barker SC.** 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst. Parasitol*; 56:169-172.

**Nijhof AM, Taoufik A, de la Fuente J, Kocan KM, de Vries E, Jongejan F.** 2007. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Int. J. Parasitol*; 37: 653-662.

**Nolan J, Wilson J, Green PE, Bird PE.** 1989. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick. *J. Aust. Vet*; 66: 179-182.

**Nowak SJ, Aihara H, González K, Nibu Y, Baylies MK.** 2012. Akirin links twist-regulated transcription with the Brahma chromatin remodeling complex during embryogenesis. *PLoS Genet*; 8: e1002547.

**Nuttall PA, Trimnell AR, Kazimirova M, Labuda M.** 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and ticks-borne diseases. *Parasite Immunol*; 28:155-163.



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

**Ortíz EM, Santamaria VM, Fragoso SH.** 1994. Resistencia en garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas en México. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, Gro. México.

**Ostfeld RS, Price A, Hornbostel VL, Benjamin MA, Keesing F.** 2006. Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. *Bioscience*; 56: 383–394.

**Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, Vargas MI, Prates AA, Mendes Dias.** 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet. Immunol. Immunopathol*; 88: 163–172.

**Patarroyo JH, Vargas MI, González CZ, Guzman F, Martins-Filho OA, Afonso LCC, Valente FL, Peconick AP, Marciano AP, Patarroyo AM, Sossai S.** 2009. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462<sup>®</sup> against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol*; 166: 333-339.

**Perez-Cogollo LC, Rodríguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Miller RJ.** 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet. Parasitol*; 168:165-169.

**Peter RJ, Van den Bossche BL, Penzhorn BL, Sharp B.** 2005. Tick, fly, and mosquito control-Lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasitol*; 132: 205-215.

**Ponomarenko JV, Bui H, Li W, Fussedder N, Bourne PE, Sette A, Peters B.** 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinform*; 9: 514.

**Prevot PP, Couvreur B, Denis V, Brossard A, Vanhamme L, Godfroid E.** 2007. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*; 25: 3284-3292.

**Prudencio CR, Pérez de la Lastra JM, Canales M, Villar M, de la Fuente J.** 2010. Mapping protective epitopes in the tick and mosquito subolesin ortholog proteins. *Vaccine*; 28: 5398-5406.

**Pruett JH.** 1999. Immunological control of arthropods ectoparasites - a review. *International J. Parasitol*; 29: 25-32.

**Quiroz RH.** 2005. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos*. Limusa. México, DF. p. 796-802.

**Rajput ZI, Hu SH, Chen WJ, Arijo AG and Xiao CW.** 2006. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*; 7: 912-921.

**Rice P, Longden I, Bleasby A.** 2000. *EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite*. *Trends Gen*; 16: 276-277.

**Rodríguez M, Roger R, Penitech M, Montesinos R, Cremata J, Falcón V, Sánchez G, Bringas R, Cordovés C, Valdés M, Lleonart R, Herrera L, de la Fuente J.** 1994. High level expresión of the *Boophilus microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotech*; 33:135-146.

**Rodríguez-Vivas RI, Trees AJ, Hodgkinson JE, Rosado-Aguilar JA.** 2007. Avances en el conocimiento de la resistencia de *Boophilus microplus* a los ixodídeos en el sureste de México. Simposium internacional Garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Cd. Victoria, Tamps. México. p. 57-59.

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

**Rosario-Cruz R, Almazán C, Miller RJ, Domínguez-García DI, Hernández-Ortiz R, de la Fuente J.** 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Front. Biosci*; 14: 2657-2665.

**Rozen S, Skaletsky HJ.** 2000. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*; 365-386.

**Saha S, Raghava GPS.** 2004. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. En G. Nicosia, V. Cutello, P.J. Bentley y J. Timis (Eds.) ICARIS. LNCS 3239, 197-204.

**Sen R, Baltimore D.** 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*; 47: 921-928.

**Sen CK, Packer L.** 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J*; 10: 709-720.

**Shakya M, Kumar B, Nagar G, de la Fuente J, Ghosh S.** 2014. Subolesin: a candidate vaccine antigen for the control of cattle tick infestations in Indian situation. *Vaccine* 32: 3488-3494.

**Sonenshine DE, Kocan KM, de la Fuente J.** 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends Parasitol*; 22: 550-551.

**Stone BF.** 1972. The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Aust. Vet. J*; 48: 345-50.

**Suneja A, Gulia M, Gakhar SK.** 2003. Blocking of malaria parasite development in mosquito and fecundity reduction by midgut antibodies in *Anopheles stephensi* (Diptera: *Culicidae*). *Arch. Insect. Biochem. Physiol*; 52: 63-70.

**Sutherst RW, Maywald GF, Kerr JD, Siegeman DA.** 1983. The effect of the cattle tick *Boophilus microplus* on the growth of *Bos indicus* x *Bos Taurus* steers. *Aust. J. Agr. Res*; 34: 317-327.

**Taylor MA.** 2001. Recent developments in ectoparasiticide. *Vet. J*; 161: 253-268.

**Titus RG, Bishop JV, Mejía JS.** 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol*; 28: 131-141.

**Tizard I.** 2002. *Inmunología Veterinaria*. 6<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F; 317-319.

**Ullmann AJ, Lima CM, Guerrero FD, Piesman J, Black WC.** 2005. Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Mol Biol*; 14: 217–222.

**Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW.** 2001. Parasitología Veterinaria. 2ª ed. Acribia. Zaragoza, España. p. 207-216.

**Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JM.** 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. J. Exp. Med; 194: 331-342.

**Wang H, Nuttall PA.** 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. Cell Mol. Life Sci; 56: 286-295.

**Wikel SK.** 1981. The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg; 31: 284-288.

**Willadsen P, Mckenna RV, Riding GA.** 1988. Isolation from the cattle ticks *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. Int. J. Parasitol; 18: 183-189.

**Willadsen P, Kemp DH.** 1988. Vaccination with concealed antigens for tick control. Parasitol. Today; 4: 196-198.

**Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, Lahstein J, Cobon GS, Gough JM.** 1989. Immunological control of a parasitic arthropod: identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. J. Immunol; 143: 1346-1351.

**Willadsen P, Mckenna RV.** 1991. Vaccination with 'concealed' antigens: myth or reality?. Parasite Immunol; 13: 605-616.

- Willadsen P.** 1997. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet. Parasitol*; 71: 209-222.
- Willadsen P, Jongejan F.** 1999. Immunology of the tick–host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol. Today*; 15: 258-262.
- Willadsen P.** 2001. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Vet. Parasitol*; 101: 353-367.
- Willadsen P.** 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitol*; 129: S367-S874.
- Willadsen P.** 2006. Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol*; 138:161-168.
- Zhang Y.** 2007. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins*; 69: 108–117.
- Zhang Y.** 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinform*; 9: 40.
- Zivkovic Z, Torina A, Mitra R, Alongi A, Scimeca S, Kocan KM, Galindo RC, Almazán C, Blouin EF, Villar M, Nijhof AM, Mani R, La Barbera G, Caracappa S, Jongejan F, de la Fuente J.** 2010. Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. *BMC Immunol*; 11: 7.

## XI. Apéndices

**Apéndice. 1** Consideraciones de importancia para el diseño de oligonucleótidos específicos.

- 1) Que los oligonucleótidos no tuvieran ninguna diferencia con respecto a la secuencia de interés.
- 2) Evitar secuencias que pudieran formar estructuras secundarias por sí mismas, pues esto dificultaría la unión de los oligonucleótidos al DNA muestra y podría ocurrir una auto-complementariedad.
- 3) Diseñar oligonucleótidos con longitud de 20 a 24 bases para reducir al mínimo la posibilidad de hibridación en sitios secundarios en el vector o inserto.
- 4) Comprobar en las bases de datos que las secuencias de oligonucleótidos elegidas no se encontraran en algún otro lugar del genoma, lo que podría generar amplificaciones de regiones no deseadas.
- 5) Que los oligonucleótidos tuvieran un contenido de C/G entre 40 y 60%. Para oligonucleótidos con contenido menor al 50% de C/G, sería necesario incrementar la secuencia de los mismos para elevar la  $T_m$  sobre la temperatura de alineamiento.
- 6) Añadir al oligonucleótido sentido 4 bases (CACC) al principio, de esta manera el extremo saliente del vector (GTGG) se complementa con el extremo 5' del producto de PCR, e incorpora el producto de PCR en la dirección correcta.

**Apéndice. 2** Mapa del vector de expresión pET101/D-TOPO®.

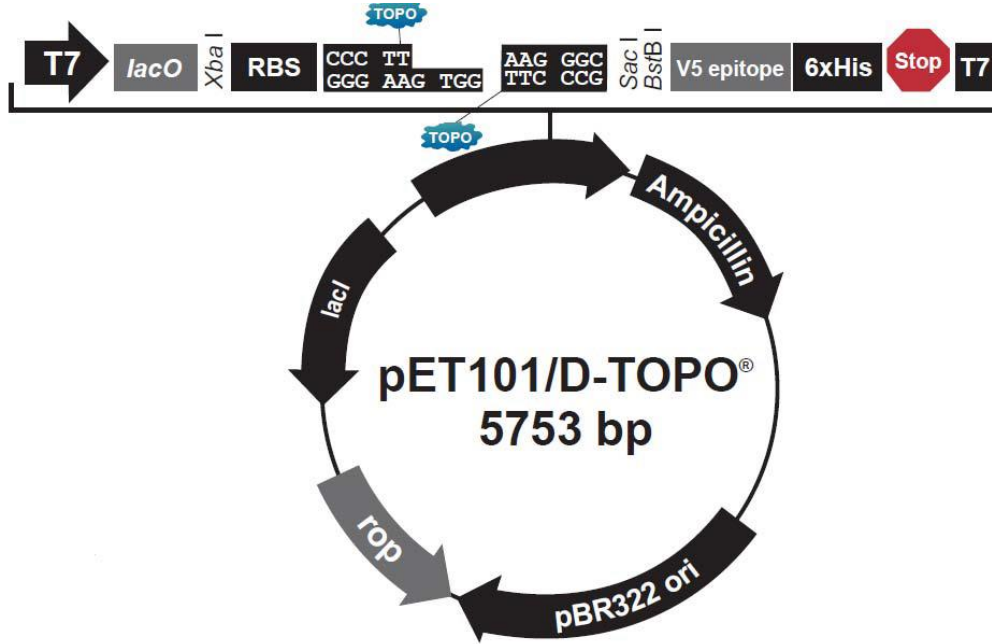


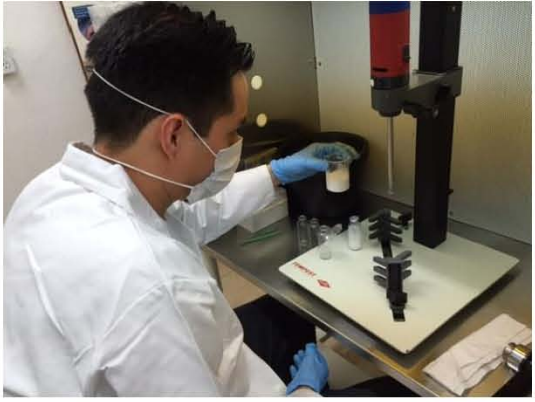
Imagen tomada del sitio en línea <https://www.lifetechnologies.com> . Se presentan los componentes del vector en el cual se clonó el producto amplificado por PCR del gen que codifica para la proteína Subolesin.

**Apéndice. 3** Reactivos para la clonación del inserto del gen *subolesin* en el vector.

	µL's
Producto de PCR	4
Solución salina	1
pET101/D-TOPO®	1
<b>Total</b>	<b>6</b>



**Apéndice. 4** Imágenes de la preparación del péptido recombinante subolesin con el adyuvante Montanide ISA 50 V2 (Seppic®, Paris, France) para el ensayo de inmunización en bovinos.



**Apéndice. 5** Valores de absorbancia (405 nm) obtenidos en la prueba de ELISA indirecto durante el experimento de inmunización en bovinos.

		<b>Semana 1</b>	<b>Semana 2</b>	<b>Semana 3</b>	<b>Semana 4</b>	<b>Semana 5</b>	<b>Semana 6</b>
Grupo Testigo	<b>Promedio</b>	0.347	0.272	0.516	0.537	0.572	0.403
	<b>Desv. Estándar</b>	0.229	0.223	0.177	0.055	0.044	0.009
Grupo Tratado	<b>Promedio</b>	0.435	0.438	0.674	0.601	0.541	2.538
	<b>Desv. Estándar</b>	0.099	0.070	0.110	0.060	0.048	0.797

		<b>Semana 7</b>	<b>Semana 8</b>	<b>Semana 9</b>	<b>Semana 10</b>	<b>Semana 11</b>
Grupo Testigo	<b>Promedio</b>	0.472	0.549	0.554	0.288	0.316
	<b>Desv. Estándar</b>	0.049	0.036	0.048	0.206	0.216
Grupo Tratado	<b>Promedio</b>	2.934	2.853	2.816	2.916	2.832
	<b>Desv. Estándar</b>	0.967	1.065	1.259	1.550	1.584