



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

“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE UN POLIPÉPTIDO DE SUBOLESINA Y SU
COMBINACIÓN CON BM86 SOBRE GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus* EN
BOVINOS NATURALMENTE INFESTADOS”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
NANCY NOEMI MENDOZA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. RODOLFO ESTEBAN LAGUNES QUINTANILLA
Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad,
INIFAP

COMITÉ TUTOR:
Dr. MIGUEL ÁNGEL ALONSO DÍAZ
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Dr. AGUSTÍN FERNÁNDEZ SALAS
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MÉXICO., MARZO, 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

*A mamma e papà, che non mi hanno mai fatto mancare il
loro sostegno
e senza i quali non avrei potuto realizzare il mio sogno.*

*A miei fratelli David e Alejandro, che mi hanno supportato e
sopportato in questa avventura chiamata vità.*

A mia nonna, che è la mia adorazione.

Agradecimientos

Quisiera agradecer, no sólo la colaboración directa en este trabajo, sino el apoyo y ayuda recibidos, así como todo lo que he podido aprender durante este tiempo. Dicen que el fin no justifica los medios, pero en este caso ustedes son esos medios y para mí, mucho más importante que el fin...

A mi tutor, **Dr. Rodolfo Lagunes Quintanilla**, gracias por su confianza, enseñanzas, apoyo y, sobre todo, paciencia aportadas para la realización de este trabajo. Mil gracias por darme esta oportunidad.

A mi comité tutorial, el **Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz** y el **Dr. Agustín Fernández Salas**, por depositar en mí su confianza y su paciencia, por sus valiosas enseñanzas, además de su gran ayuda, aportaciones y disponibilidad para la elaboración y culminación de este trabajo.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a su bella **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, por brindarme la oportunidad de cursar mis estudios de maestría y abrirme nuevamente sus puertas.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento de beca otorgado para sustentar mis estudios de posgrado.

Al **CEIEGT-FMVZ-UNAM**, tanto a su personal académico y administrativo, por las facilidades y apoyo brindado para la realización de este trabajo, en especial **al Biól. Germán Muñoz Córdova, Doc Mariana Olivares Salazar, Inge Martha Salazar Ulloa, Inge Epigmenio Castillo Gallegos, Doc Ivette Rubio y Doc Lucía del Rayo Caro** por su apoyo, consejos y amistad incondicional durante mi estancia.

Aunque ya lo había hecho, quisiera agradecer de manera particular al **Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz**, por sus valiosas enseñanzas, confianza, apoyo, sobre todo por creer en mí y por brindarme nuevamente esta oportunidad. Infinitas gracias.

Agradezco los comentarios y sugerencias realizados por el comité revisor de esta tesis conformado por el **Dra. Yazmín Alcalá Canto, Dra. María Guadalupe Prado Ochoa, y Dr. José Octavio Merino Chárrez**, a fin de mejorar y concluir este trabajo.

A **mis padres y mis hermanos**, ustedes son el motor de mi día a día, por su sostén en los momentos más difíciles y su amor, por darme la confianza y fortaleza para seguir adelante, sin ustedes no sería lo que soy. Les debo todo.

A mis queridos amigos, **Loreto, Diana, Iris, Claus y Arita** por todos esos momentos de locura en mi vida y palabras de aliento en mis momentos difíciles, aunque no estemos siempre juntos, ustedes son parte de mí.

A todos aquellos que me acompañaron durante mis estudios de maestría: **Andrés, Richell y Diego** (Team Plasmodio Forever), **Zyanya, Lety, Lupita y Pamela** por su gran apoyo en cada momento, las risas, por ser mis cómplices y amigos desde el momento en que nos conocimos. Por último, pero no menos importante a **Pepe, Israel, Daniel, Paco, Caro, Fer y Cházaro** por su apoyo en la realización de este proyecto, las risas y el descontrol, no habría sido posible sin ustedes.

...Grazie di cuore!

Tutto questo non sarebbe stato possibile senza di voi!

RESUMEN

Las garrapatas *Rhipicephalus microplus* representan uno de los principales problemas de salud en bovinos en regiones tropicales y subtropicales. Las vacunas recombinantes se han estudiado en años recientes como un método de control alternativo, con la finalidad de disminuir la dependencia a los ixodicidas químicos y, con ello, disminuir la aparición de poblaciones resistentes a estos fármacos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto inmunoprotector de un polipéptido de subolesina y su combinación con Bm86 en bovinos infestados naturalmente con *R. microplus* en condiciones de campo. Se utilizaron 24 bovinos F1 (Holstein X Cebú) y 5/8 Holstein de 12-15 meses de edad y 244 ± 35 Kg de peso, fueron distribuidos en cuatro grupos (n=6) que se inmunizaron las semanas 0, 4 y 9 con dosis de 100 μ g de proteínas recombinantes de acuerdo con el siguiente esquema: el G1 con un polipéptido de subolesina, el G2 como testigo, el G3 con una combinación del polipéptido+Bm86 y el G4 con Bm86. El experimento tuvo una duración de 24 semanas. Cada siete días se contabilizaron y colectaron garrapatas repletas para evaluar sus parámetros reproductivos y cada 14 días se obtuvieron muestras sanguíneas de todos los animales para determinar la cinética de anticuerpos mediante ELISA indirecto. La eficacia general de la vacunación con el polipéptido de subolesina fue de 67%, para subolesina+Bm86 de 49% y con Bm86 de 56%. Con relación a la cinética de anticuerpos, a partir de la semana cinco los animales del G1 y G4 fueron significativos ($p < 0.05$), sin embargo, en el G3 fueron hasta la semana 11. En el G3 se observó una posible "competencia antigénica" moderada entre ambos antígenos. Se concluye que el polipéptido de subolesina es un antígeno inmunoprotector que podría utilizarse en programas de control integrado de ectoparásitos bajo condiciones de campo y se sugiere realizar más estudios para dilucidar si este antígeno en combinación con otro podría ser más eficaz, así mismo será necesario evaluar la eficacia del polipéptido de subolesina dentro de un programa de control integrado bajo condiciones de campo.

Palabras claves: Subolesina, inmunización, Bm86, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, competencia antigénica.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus ticks represent one of the main health problems in cattle in tropical and subtropical regions. Recombinant vaccines have been studied in recent years as an alternative control method, with the aim of reducing dependence on chemical ixodicides and, thereby, reducing the appearance of populations resistant to these drugs. The objective of the present work was to evaluate the immunoprotective effect of a subolesin polypeptide and its combination with Bm86 in bovines naturally infested with *R. microplus* under field conditions. 24 F1 bovines (Holstein X Zebu) and 5/8 Holstein 12-15 months old and 244 ± 35 Kg of weight were used, they were distributed in four groups (n = 6) that were immunized at weeks 0, 4 and 9 with doses of 100 µg of recombinant proteins according to the following scheme: G1 with a subolesin polypeptide, G2 as a control, G3 with a combination of polypeptide + Bm86 and G4 with Bm86. The experiment lasted 24 weeks. Full ticks were counted and collected every seven days to evaluate their reproductive parameters and every 14 days blood samples were obtained from all animals to determine the kinetics of antibodies by indirect ELISA. The overall efficacy of vaccination with the subolesin polypeptide was 67%, for subolesin + BM86 49% and with Bm86 56%. Regarding the kinetics of antibodies, from week five the animals of G1 and G4 were significant (p <0.05), however, in G3 they were until week 11. In G3 a possible "antigenic competition" moderate between both antigens. It is concluded that the subolesin polypeptide is an immunoprotective antigen that could be used in integrated control programs for ectoparasites under field conditions and it is suggested to carry out more studies to elucidate whether this antigen in combination with another could be more effective, and it will also be necessary to evaluate the efficacy of the subolesin polypeptide within an integrated control program under field conditions.

Key words: Subolesin, immunization, Bm86, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, antigenic competition.

CONTENIDO

	PÁG.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. La ganadería bovina en México.....	4
2.2. Garrapatas y su importancia.....	5
2.3. <i>Rhipicephalus microplus</i>	6
2.4. Distribución geográfica.....	8
2.5. Ciclo biológico.....	9
2.6. Importancia económica.....	10
2.7. Métodos de control.....	12
2.7.1. Método químico.....	12
2.7.2. Resistencia de <i>R. microplus</i> a ixodicidas.....	13
2.7.3. Métodos no químicos.....	15
2.8. Control inmunológico.....	16
2.9. Subolesina.....	20
2.10. Cócteles multi-antigénicos o vacunas multi-antigénicas.....	24
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo general.....	27
5.2. Objetivos específicos.....	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1. Área de estudio.....	28
6.2. Animales.....	28
6.3. Diseño experimental.....	29
6.4. Toma y procesamiento de muestras.....	29
6.4.1. Garrapatas <i>R. microplus</i>	29

6.4.2. Muestras de sangre.....	30
6.5. Mediciones y técnicas de laboratorio.....	30
6.5.1. Conteo de garrapatas.....	30
6.5.2. Evaluación del número de garrapatas y parámetros reproductivos en <i>R. microplus</i>	30
6.5.3. Determinación de la cinética de anticuerpos de los animales.....	32
6.5.4. Medición de temperatura y humedad relativa ambiental.....	33
6.6. Análisis estadístico.....	33
VII. RESULTADOS.....	34
7.1. Evaluación del efecto inmunoprotector de las proteínas recombinantes sobre el número de garrapatas <i>Rhipicephalus</i> <i>microplus</i> adultas y sus parámetros reproductivos.....	34
7.2. Determinación de la cinética de la cinética de anticuerpos en los animales inmunizados con las proteínas recombinantes mediante ELISA indirecto.....	36
7.3. Promedios de la temperatura (°C) y humedad relativa (%) ambientales por mes.....	38
VIII. DISCUSIÓN.....	39
IX. CONCLUSIONES.....	46
X. REFERENCIAS.....	47
XI. ANEXOS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Clasificación de las subfamilias de garrapatas (Barker y Murrell, 2004).....	7
2.	Situación actual estatus zoosanitario de <i>R. microplus</i> a nivel nacional (SADER-SENASICA, 2020).....	9
3.	Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
4.	Cinética de anticuerpos de los bovinos inmunizados.....	38

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.	Primeros reportes de poblaciones de garrapatas <i>R. microplus</i> resistentes a ixodicidas en unidades de producción bovina de México.....	15
2.	Porcentajes de reducción (inmunizado/testigo) en los parámetros reproductivos de <i>R. microplus</i> en bovinos.....	35
3.	Temperatura (°C) y humedad relativa (%) ambiental promedio registradas durante el periodo experimental de manera mensual.....	39

I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos hematófagos de la clase Arachnida, de distribución cosmopolita, que parasitan a un gran número de vertebrados incluidos los reptiles, las aves y los mamíferos (Rosario-Cruz *et al.*, 2009; Bowman, 2014). Éstas se clasifican en tres familias: Argasidae (garrapatas blandas, con aproximadamente 193 especies), Ixodidae (garrapatas duras, con aproximadamente 702 especies) y Nuttalliellidae (una sola especie, *Nuttalliella namaqua*) (Rosario-Cruz *et al.*, 2009; Guglielmone *et al.*, 2010; Bowman, 2014).

En México, los géneros de garrapatas que afectan al ganado bovino son de la familia Ixodidae: *Amblyomma mixtum*, *Rhipicephalus annulatus* y *Rhipicephalus microplus* (Alonso-Díaz *et al.*, 2012; Almazán *et al.*, 2018); esta última se distribuye en el 65.96% del territorio nacional (SENASICA-SADER, 2020).

Las infestaciones por garrapatas son las parasitosis más importantes a nivel mundial, especialmente en las regiones subtropicales y tropicales. En México, recientemente se ha estimado que las pérdidas económicas relacionadas a garrapatas se calculan en \$ 573.61 millones de dólares anuales, considerando únicamente pérdidas en la producción láctea y en ganancia de peso (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017), siendo una de las principales limitantes para optimizar la productividad dentro de las unidades de producción bovina (UPB) a nivel nacional.

Estas enfermedades parasitarias generan tanto pérdidas directas como indirectas, debido al efecto negativo en la salud y productividad animal, así como a los costos asociados a la aplicación de medidas de control (Nuñez *et al.*, 1982; Peter *et al.*, 2005; Almazán *et al.*, 2018), dificultan la importación de razas mejoradas con el propósito de realizar mejoramiento genético del ganado en áreas endémicas, así como la exportación de ganado a Estados Unidos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Los métodos utilizados para el control de las garrapatas se clasifican en químicos y no químicos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2010), siendo el uso recurrente de ixodicidas la forma más usada de control. El uso intensivo e inadecuado de estos fármacos ha favorecido el desarrollo y selección de poblaciones de garrapatas resistentes (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006; Domínguez-García *et al.*, 2010), aunado a otros efectos como la contaminación ambiental y la contaminación de los subproductos derivados para el consumo humano (Graf *et al.*, 2004). Por esta razón, se requieren nuevas alternativas de control como las vacunas recombinantes, las cuales podrían incorporarse en un programa de control integrado y coadyuvar indirectamente a reducir la incidencia de hemoparásitos en el ganado (Almazán *et al.*, 2010; Almazán *et al.*, 2018).

Las vacunas que inducen una protección inmunológica al ganado contra las infestaciones por garrapatas *R. microplus*, se desarrollaron y comercializaron a inicios de la década de los noventa (de la Fuente *et al.*, 2007). Hasta la fecha, el único antígeno comercial es Bm86, que se identificó en el intestino medio de garrapatas adultas semirepletas de *R. microplus*, y se obtuvo por tecnología recombinante (Willadsen *et al.*, 1989). Este antígeno es la base de las tres vacunas que han sido lanzadas al mercado: Gavac® que se comercializa en Cuba desde 1994 y en otros países latinoamericanos (Argentina, Colombia, Brasil y México), TickGARD®, que se comercializó en Australia de 1994-1997 (Cobon *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 2007), y recientemente en México, Bovimune Ixovac® (Bovimune Ixovac, 2018). La aplicación de estas vacunas reduce el número de garrapatas, su peso, su capacidad reproductiva y por consecuencia la generación de nuevas larvas (de la Fuente *et al.*, 2007; Almazán *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha reportado que existe variación en su eficacia, que está relacionada a polimorfismos encontrados en la secuencia del gen Bm86 (García-García *et al.*, 2000; Sossai *et al.*, 2005; Canales *et al.*, 2009). Por lo tanto, es necesario enfocar las investigaciones actuales en la identificación y desarrollo de antígenos conservados que puedan ser eficaces contra diferentes especies de garrapatas.

La proteína subolesina es un antígeno que fue identificado como candidato a vacuna contra *R. microplus*. Subolesina, descubierta en *Ixodes scapularis*, es una proteína ortóloga de Akirinas (AKR) de insectos y vertebrados conservada evolutivamente en varios artrópodos, entre ellos *R. microplus* (de la Fuente *et al.*, 2006a; Almazán *et al.*, 2003).

Ensayos de inmunización realizados en México utilizando subolesina recombinante expresada en *E. coli* han demostrado su eficacia inmunoprotectora contra las infestaciones de garrapatas *R. microplus* reduciendo el número de garrapatas y su capacidad reproductiva (Almazán *et al.*, 2010; Lagunes *et al.* 2016; Lagunes *et al.* 2018). Estos reportes indican que subolesina podría ser eficaz bajo condiciones de campo en el control de las infestaciones de *R. microplus*, siendo necesaria su evaluación.

Otra estrategia para mejorar la eficacia en las vacunas contra garrapatas, son los cócteles multiantigénicos que consiste en la combinación de dos o más antígenos, los cuales pueden tener un efecto sinérgico (Willadsen, 2008). No obstante, no existen reportes de la utilización de cócteles multiantigénicos utilizando SUB y Bm86 en *R. microplus* bajo condiciones de campo. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto inmunoprotector de un polipéptido de subolesina y su sinergia potencial con Bm86, sobre infestaciones naturales de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino bajo condiciones de pastoreo en el trópico húmedo mexicano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. La ganadería bovina en México

La ganadería en México es la actividad económica de mayor importancia en zonas rurales (García-Martínez *et al.*, 2017). De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2017), el 29.5% de las unidades de producción ganaderas se dedican a la cría y producción de bovinos, cuyo inventario es de 31, 948, 274 cabezas de ganado; y producen 1.9 millones de toneladas de carne y 11 mil 807 millones de litros al año, respectivamente (SIAP, 2017). En 2017, México ocupó el octavo lugar a nivel mundial como productor de carne de bovino contribuyendo con 3.1% del total de la producción (FIRA, 2018) y también en octavo lugar como productor de leche con una participación de 2.4% (FIRA 2019), demostrando que la ganadería bovina juega un papel fundamental para asegurar la soberanía alimentaria del país.

La producción de bovinos en México se desarrolla en cuatro regiones ecológicas-ganaderas: a) árida y semiárida, b) templada, c) trópico seco y d) trópico húmedo (Martínez Castro *et al.*, 2015), bajo distintos sistemas de producción como el sistema especializado en el norte, el semiespecializado y familiar en el altiplano central y el doble propósito en las regiones tropicales (García-Martínez *et al.*, 2017). La ganadería de doble propósito se desarrolla principalmente en la costa del Golfo de México que comprende el 28.3% del territorio nacional y concentra más del 40% del inventario bovino. En esta región, Veracruz, Chiapas y Tabasco concentran el 80% de la ganadería de doble propósito y este sistema genera el 19.5 % de la producción nacional de leche y el 50% de la producción de carne (Arce-Recinos *et al.*, 2017).

A pesar de esto, la producción nacional sólo abastece el 31.4% y 67% de la demanda mexicana de carne y leche, respectivamente (García-Winder, 2011); por lo tanto, es necesario optimizar las UPB existentes.

Una de las limitantes para el crecimiento de la producción cárnica y lechera, especialmente en los sistemas de producción de doble propósito en las zonas tropicales y subtropicales, es la presencia de parásitos, ya que estos se ven favorecidos por el predominio de climas cálidos, húmedos y subhúmedos. Las pérdidas económicas asociadas a estos patógenos se han estimado en US \$1, 411, 845, 004 y el 40.63% de estas pérdidas son provocadas por *R. microplus* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

2.2. Garrapatas y su importancia

Las garrapatas son artrópodos hematófagos obligados de distribución cosmopolita que parasitan a una gran variedad de vertebrados terrestres, incluidos mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Presentan tres variaciones en sus ciclos biológicos: a) garrapatas de tres hospederos (por ejemplo, los géneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*), b) garrapatas de dos hospederos (p.e., algunas especies de *Hyalomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus*) y; c) garrapatas de un solo hospedero (p.e., *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Dermacentor (Anocentor) nitens*) (Bowman, 2014; Sonenshine y Roe, 2014).

Existen 900 especies de garrapatas en el mundo, las cuales se dividen en tres familias: *Ixodidae* (garrapatas duras, con aproximadamente 702 especies), *Argasidae* (con 193 especies) y *Nuttalliedidae* (con una sola especie: *Nuttalliella namaqua*, con características intermedias entre las otras dos familias) (Sonenshine y Roe, 2014). Aproximadamente el 10% de las 900 especies de garrapatas conocidas actualmente son de importancia médica o veterinaria (de la Fuente *et al.*, 2017a). Los géneros más importantes que afectan al ganado bovino en México son: *Amblyomma mixtum*, *Rhipicephalus annulatus* y *Rhipicephalus microplus* (Alonso-Díaz *et al.*, 2012; Almazán *et al.*, 2018).

Las garrapatas son, después de los mosquitos, los vectores más importantes de enfermedades transmitidas por artrópodos en humanos y los vectores más importantes en el ganado (de la Fuente *et al.*, 2007), ya que transmiten una gran variedad de organismos patógenos como: hongos, virus, bacterias (incluyendo rickettsias) y protozoarios; asimismo, provocan de manera directa parálisis mortal, reacciones alérgicas y toxicosis causadas por la excreción de toxinas dentro de su saliva al fijarse sobre la piel de su hospedero para alimentarse (Sonenshine y Roe, 2014).

2.3. *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus se considera la garrapata con mayor importancia económica en la ganadería bovina a nivel mundial (Polanco y Ríos, 2016; Braga *et al.*, 2017; Trentelman *et al.*, 2017), aunque puede infestar a otros hospedadores, como: búfalos, cabras, ovejas, ciervos, caballos, burros, cerdos, perros, algunos animales silvestres y al ser humano (Guglielmone *et al.*, 2014). Es originaria de Asia, fue descrita por Canestrini en 1888 como *Boophilus microplus*. Taxonómicamente pertenece al phylum Artrópoda, clase Arácnida, orden Acarina, suborden Metastigmata, familia Ixodidae (Guglielmone *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2017). En años recientes, basado en estudios moleculares, se ha propuesto y aceptado que el género *Boophilus* se haya reagrupado en el subgénero de *Rhipicephalus*. Beati y Keirans (2001), estudiaron la relación sistemática entre garrapatas de los géneros *Boophilus* y *Rhipicephalus* usando la secuencia genética del gen mitocondrial 12S rDNA concluyendo que se observó una estrecha relación entre ambos géneros. Posteriormente, Barker y Murrell (2004), al utilizar secuencias de DNA mitocondrial (Citocromo-C Oxidasa I, 12S rDNA y 16S rDNA) para evaluar la filogenia y evolución de las especies de *Boophilus* spp. y *Rhipicephalus* spp. encontraron que el género *Boophilus* es parafilético con respecto al género *Rhipicephalus* (Figura 1).

Actualmente, análisis filogenéticos de secuencias del genoma mitocondrial indican la existencia de un complejo de especies de *R. microplus*. Este complejo consiste en *R. annulatus*, *R. australis* y dos clados de *R. microplus*: clado A o *R. microplus* sensu con garrapatas originarias del Sudamérica, África y el sudeste asiático y el clado B sensu con garrapatas de China y el norte de la India que están más estrechamente relacionados con *R. annulatus* que *R. microplus* (Burger *et al.*, 2014). Posteriormente, análisis filogenéticos adicionales basados en secuencias de los genes Citocromo Oxidasa subunidad I (COX1) y 16S rRNA de *R. microplus* recolectadas en Malasia confirmaron los resultados de Burger *et al.* (2014), pero también mostraron que el clado B sensu contiene sólo garrapatas de China y reveló la presencia de un tercer clado (Clado C sensu) con garrapatas de India y Malasia (Low *et al.*, 2015).

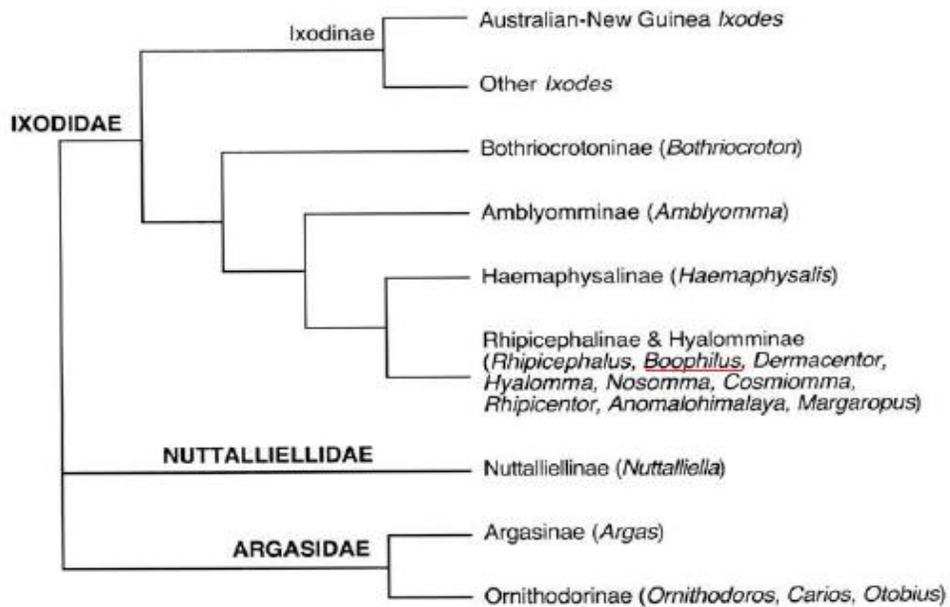


Figura 1. Clasificación de las subfamilias de garrapatas (Barker y Murrell, 2004).

2.4. Distribución geográfica

R. microplus se distribuye principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, siendo endémica entre los paralelos 32° Norte y 32° Sur (Léger *et al.*, 2013; Guglielmone *et al.*, 2014; Maruyama *et al.*, 2017). En América, se distribuye desde México hasta el Norte de Argentina (excepto en Chile) (Pulido *et al.*, 2015). En 1943, Estados Unidos fue declarado libre de *R. microplus* y *R. annulatus* tras un programa de erradicación intensiva, excepto por una Zona de Cuarentena Permanente en el sur de Texas en la frontera con México a lo largo del Río Bravo, que sirve como área de amortiguamiento (Lohmeyer *et al.*, 2011).

En México (Figura 2), los estados que están reconocidos oficialmente como libres de este ectoparásito son Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur, comprendiendo una superficie del territorio nacional de 599 367.84 Km², es decir, 30.60% del territorio nacional. Los municipios que se encuentran en fase de erradicación son Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; así como los municipios de la zona Desierto del estado de Coahuila: Cuatrociénegas, Ocampo y Sierra Mojada, con una superficie de 67 472.76 Km², que corresponde al 3.44% del territorio mexicano.

El resto del país comparte regiones en control y zonas libres naturales de garrapata *R. microplus*, donde el área en control comprende 1 292 407.02 Km², con el 65.96% del territorio nacional (SADER-SENASICA, 2020). En Estados limítrofes con partes del Golfo de México al este como Tamaulipas, Veracruz y Tabasco, el ≥90% de la población de ganado puede estar infestada con *R. microplus* debido a que presentan las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de su ciclo biológico (Almazán *et al.*, 2018). Asimismo, en Estados como Veracruz se ha reportado su presencia durante todo el año (Alonso-Díaz *et al.*, 2007).

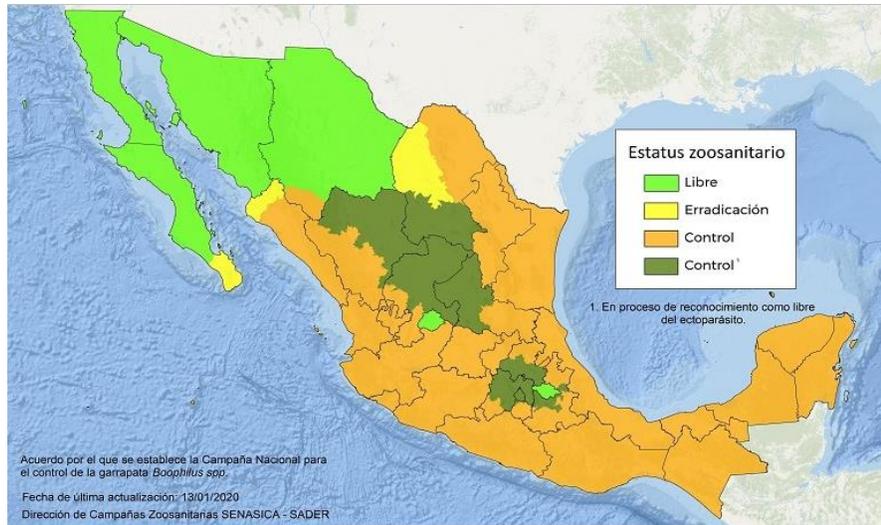


Figura 2. Situación actual estatus zoon sanitario de *R. microplus* a nivel nacional (SADER-SENASICA, 2020).

2.5. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *R. microplus* consiste en cuatro estadios evolutivos: el huevo y tres estadios parasitarios (larva hexápoda, ninfa octópoda y adulto), que requieren de un solo hospedero para desarrollarse (Guglielmone *et al.*, 2014; Sonenshine y Roe, 2014) (Figura 3). Su ciclo biológico se divide en dos fases: fase de vida libre o no parasítica y fase parasítica. Esta última es relativamente constante, mientras que la velocidad de desarrollo durante la fase de vida libre depende de factores como la temperatura (28°C) y humedad (>80%) (Benavides-Ortiz *et al.*, 2016).

La fase de vida libre inicia cuando la hembra ingurgitada se desprende de su hospedador y busca un lugar adecuado en el suelo para ovipositar. La hembra puede ovipositar entre 2000 y 3000 huevos aproximadamente, después de lo cual la hembra muere. Los huevos son incubados para desarrollarse en larvas después de 23 a 159 días (dependiendo de las condiciones climáticas). Las larvas migran en la vegetación y se ubican en el borde del pasto en masas de miles de individuos en la búsqueda de un hospedador.

La fase parasítica tiene una duración de 19 a 25 días, con un promedio de 21 días. Esta fase inicia cuando la larva se fija en la piel del hospedador, se alimenta y muda a estadio de ninfa y al estadio de adulto (con dimorfismo sexual). La cópula se lleva a cabo sobre el hospedero, donde la hembra queda grávida. 12-24 horas después, la hembra queda ingurgitada (repleta de sangre) y se desprende de su hospedador para continuar con la fase de vida libre (Sonenshine y Roe, 2014; Benavides-Ortiz *et al.*, 2016; Polanco y Ríos, 2016; Taylor *et al.*, 2016; Maruyama *et al.*, 2017).

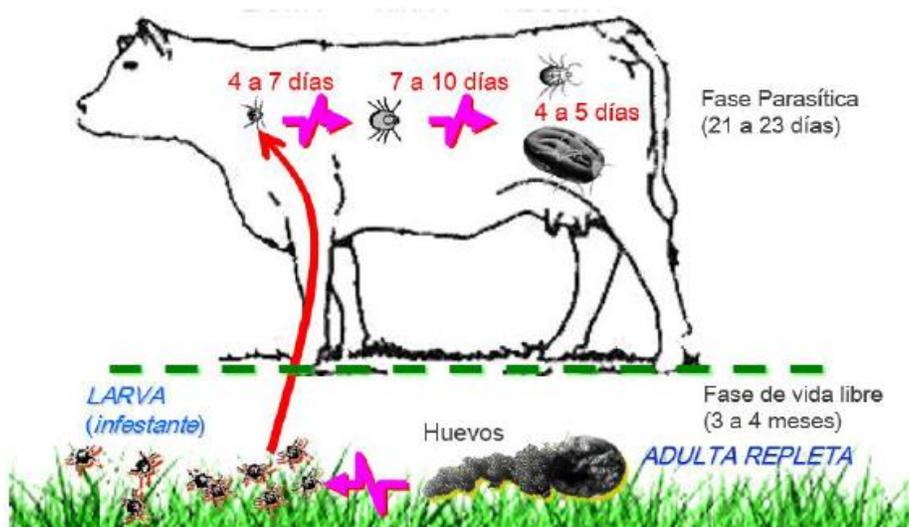


Figura 3. Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*.

2.6. Importancia económica

Las garrapatas y los patógenos transmitidos por éstos son considerados uno de los factores sanitarios más importantes que limitan la ganadería bovina en las regiones tropicales y subtropicales, siendo causantes de grandes pérdidas económicas en los animales (Estrada-Peña *et al.*, 2020). *R. microplus* impide a los animales expresar su potencial productivo debido a los efectos negativos de las infestaciones en su salud (Polanco y Ríos, 2016).

En México, actualmente se ha estimado que las pérdidas económicas relacionadas a *R. microplus* se calculan en \$ 573.61 millones de dólares anuales, considerando únicamente pérdidas en la producción láctea y en ganancia de peso (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). Estas pérdidas se pueden distribuir en pérdidas directas e indirectas. Los daños directos son provocados por la acción traumática, tóxica y expoliatriz que ejerce *R. microplus* sobre el hospedador, se ha estimado que una garrapata se alimenta de 1-3 ml de sangre para completar su ciclo de vida en un animal, causando anemia y pérdida de nutrientes. Además, la irritación producida por la picadura de las garrapatas en su sitio de fijación conduce a una reducción de la ingesta de alimentos por parte de los animales y deterioro de la piel. Todos estos factores provocan: disminución en la ganancia de peso, disminución de la producción de carne y leche, problemas reproductivos causados por la disminución de la fertilidad, daño en las pieles e incremento de los costos de control.

Los daños indirectos son causados por la transmisión de enfermedades como la babesiosis y la anaplasmosis ocasionadas por *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* que causan mortalidad en animales afectados, así como a los costos relacionados al tratamiento y control de estas enfermedades (Polanco y Ríos, 2016; Braga *et al.*, 2017; Almazán *et al.*, 2018; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

Se pueden generar altas pérdidas económicas por los gastos para el control de las infestaciones por garrapatas (Mapholi *et al.*, 2014). También, esta garrapata dificulta y amenaza la importación de razas puras para mejoramiento genético en áreas infestadas con garrapatas, así como la exportación de ganado en pie a zonas libres de garrapatas como Estados Unidos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011). Esta actividad exporta en promedio un millón de cabezas por año y se generan divisas por el orden de los 1 100 millones de dólares anuales por este rubro (González Sáenz-Pardo, 2018).

Es importante resaltar que, en México, cerca del 66% del territorio nacional está infestado con *R. microplus* y se estima que cerca de 24, 973, 983 cabezas de ganado están en riesgo de infestación (Rodríguez-Vivas *et al.* 2017), por lo que es necesario controlar las poblaciones de *R. microplus* en las UPB, debido a los efectos negativos que generan.

2.7. Métodos de control

El objetivo del control de las garrapatas *R. microplus* es reducir las poblaciones de estos parásitos sobre los animales, así como de las larvas presentes en las praderas a través de la interrupción de su ciclo biológico, sin ejercer presión de selección de poblaciones resistentes a las formas de control a largo plazo. Los métodos utilizados para el control de las garrapatas se clasifican en químicos y no químicos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2010).

Para el desarrollo de estrategias de control más adecuadas de las poblaciones de *R. microplus* en un área geográfica dada, es fundamental el estudio riguroso y preciso no sólo de su biología y ecología sino, además, de la función específica que desempeña dentro del agroecosistema y las relaciones que establece con su hospedador y los patógenos que trasmite (Ali *et al.*, 2016; Polanco y Ríos 2016).

2.7.1. Método químico

De manera global, el control de las poblaciones de garrapatas mediante el uso recurrente de moléculas químicas ha sido la principal estrategia, debido a que es práctico, efectivo y económico (Mapholi *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2017; Estrada-Peña *et al.*, 2020). Su función es romper los ciclos de vida de las garrapatas a través de la aplicación de estas moléculas aplicadas por inmersión, aspersion, vía epicutánea o por inyección a intervalos determinados por la región ecológica, las especies de ectoparásito a las que se va a combatir y la eficacia residual (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

Entre los principales ixodicidas que se utilizan para el control de garrapatas se encuentran las familias de los organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, fenilpirazolonas, lactonas macrocíclicas e inhibidores del desarrollo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012; Alonso-Díaz *et al.*, 2012). Con excepción de los reguladores del desarrollo, prácticamente todos los ixodicidas son neurotoxinas ejerciendo su efecto sobre el sistema nervioso del ectoparásito (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

Los ixodicidas siguen siendo la columna vertebral del control de garrapatas, ya que son eficaces tanto en el corto plazo, eliminando las garrapatas del animal (efecto de derribe), y a largo plazo, en la reducción de las enfermedades que transmiten (Manjunathachar *et al.*, 2014). Sin embargo, su uso excesivo y fallas en su aplicación ha favorecido el desarrollo y selección de garrapatas resistentes y multi-resistentes a los productos mencionados previamente (Braga *et al.*, 2017). Además, existen otras desventajas que se pueden presentar con el uso inadecuado de estas moléculas, tales como la contaminación ambiental y la contaminación de los subproductos derivados para el consumo humano (Graf *et al.*, 2004).

2.7.2. Resistencia de *R. microplus* a ixodicidas

La resistencia se define como un aumento significativo en el porcentaje de individuos de una población de garrapatas de una misma especie capaces de sobrevivir a concentraciones de ixodicidas que normalmente son letales para la mayoría de los individuos de dicha población, siendo de carácter hereditario (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

El desarrollo de la resistencia es un proceso evolutivo que aparece por selección genética (Rosario-Cruz *et al.*, 2009). La exposición continua a un ixodicida ocasiona una fuerte presión de selección que elimina a los individuos susceptibles, siendo el agente de selección más importante, disminuyendo la eficacia de este fármaco con el paso del tiempo (Abbas *et al.*, 2014; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

La velocidad con la que se desarrolla la resistencia a ixodicidas en una población de garrapatas, depende de varios factores como: a) la frecuencia de la mutación original en la población antes del tratamiento, b) el modo de herencia del alelo resistente (dominante, codominante o recesivo), c) la proporción de la población total de garrapatas que está expuesta al ixodicida, d) la frecuencia del tratamiento con el ixodicida y, e) la tasa de dispersión de garrapatas resistentes en nuevas áreas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

En los últimos 30 años, la resistencia a los ixodicidas en las poblaciones de ectoparásitos se ha vuelto cada vez un tema más problemático (McNair, 2015), debido al reporte de poblaciones de garrapatas que han desarrollado resistencia a la mayoría de las familias de estos compuestos, incluso de manera múltiple alrededor del mundo y en algunos estados de México (Fernández-Salas *et al.* 2012; Yessinou *et al.*, 2016; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018; Estrada-Peña *et al.*, 2020).

Por este motivo, es necesario evaluar otros métodos de control con la finalidad de disminuir la dependencia hacia estas moléculas y utilizarlas en determinados momentos, para no aumentar la presión de selección y alargar su vida útil, mediante el diseño y uso de estrategias de control integrado de garrapatas. En el cuadro 1 se enlistan los primeros reportes de poblaciones resistentes de *R. microplus* a las diferentes familias de ixodicidas utilizados en ganado bovino en México.

Cuadro 1. Primeros reportes de poblaciones de garrapatas *R. microplus* resistentes a ixodicidas en unidades de producción bovina de México.

Familia química	Año	Localización geográfica	Referencia
Organofosforados	1983	Tuxpan, Veracruz.	Aguirre y Santamaría, 1986.
Piretroides sintéticos	1993	Soto la Marina, Tamaulipas. Emiliano Zapata, Tabasco.	Ortíz <i>et al.</i> , 1994.
Amidinas	2001	Tabasco.	Fragoso y Soberanes, 2001.
Lactonas macrocíclicas (Ivermectina)	2010	Yucatán.	Pérez Cogollo <i>et al.</i> , 2010.
Fenilpirazolonas (Fipronil)	2013	Norte de México.	Miller <i>et al.</i> , 2013.

2.7.3. Métodos no químicos

El manejo integrado de garrapatas está basado en la aplicación sistemática de dos o más métodos de control de una manera ambientalmente compatible y rentable a fin de mantener niveles bajos de las poblaciones de parásitos que causan pérdidas económicas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014; Manjunathachar *et al.*, 2014; de la Fuente *et al.*, 2017b). Para este fin, es necesario utilizar métodos de control no químicos, entre los que se encuentran: selección de hospedadores resistentes, control biológico, control cultural, uso de plantas bioactivas y el control inmunológico (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2010; Abbas *et al.*, 2014; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014; Mapholi *et al.*, 2014; Manjunathachar *et al.*, 2014). Debido a la relación con el tema central de este trabajo, se le dará una mayor descripción al control inmunológico.

2.8. Control inmunológico

Las vacunas constituyen uno de los mayores avances de la ciencia, con un impacto trascendental en la mejora de la salud humana y animal, debido a la reducción significativa en la morbilidad y mortalidad de una serie de enfermedades importantes para la medicina humana y veterinaria (de la Fuente *et al.*, 2017b; Dellagostin *et al.*, 2017). Actualmente, la inducción de protección inmunológica en animales contra las infestaciones de garrapatas y las enfermedades que transmiten por medio del uso de vacunas ha demostrado ser una alternativa sostenible y efectiva para disminuir los efectos negativos provocados por los ixodídeos, además de tener otros beneficios como ser de fácil aplicación, reducir los tratamientos ixodídeos a mediano y largo plazo, mejorar la salud y bienestar animal mediante el control de las infestaciones por ectoparásitos y mejorar la salud pública por medio del control de zoonosis causadas por enfermedades transmitidas por estos ectoparásitos (de la Fuente *et al.*, 2007; Kules *et al.*, 2016; Rodríguez-Mallon, 2016; Villar *et al.*, 2017).

El control inmunológico se basa en el desarrollo de anticuerpos específicos en un hospedador inmunizado que interactúan con su antígeno diana en las garrapatas durante su alimentación, afectando su función y resultando en la reducción del número de hembras repletas, su peso y capacidad reproductiva, lo que a su vez conlleva a la disminución de manera gradual las infestaciones de garrapatas en las generaciones posteriores (de la Fuente *et al.*, 2007; de la Fuente y Contreras, 2015, de la Fuente *et al.*, 2015, 2016; Almazán *et al.*, 2018). Además, las vacunas que contienen antígenos derivados de garrapatas y/o derivados de patógenos involucrados en las interacciones garrapata-patógeno también afectan la infección y transmisión del patógeno, controlando de manera indirecta las enfermedades transmitidas por garrapatas (de la Fuente y Contreras, 2015; Villar *et al.*, 2017; Almazán *et al.*, 2018).

La primera noción de vacunas contra garrapatas fue reportada en 1979, cuando Allen y Humphrey utilizaron extractos nativos de intestino y otros órganos internos en cuayos y bovinos contra garrapatas *Dermacentor andersoni* generando protección inmunológica al observar una disminución en la alimentación y reproducción de las garrapatas obtenidas en animales inmunizados. Además, estos autores sugirieron que la vacuna sería ideal para el control de "*Boophilus microplus*" ya que todas las etapas de la garrapata se alimentan del mismo hospedador. Posteriormente, en otro ensayo de inmunización utilizando extractos obtenidos de glándulas salivales de hembras adultas de *Amblyomma americanum* parcialmente ingurgitadas generó inmunidad contra las garrapatas, al observarse una reducción en el número y peso de las garrapatas en cuayos inmunizados (Brown *et al.* 1984).

En el desarrollo de vacunas para el control de garrapatas, de manera general, se utilizan dos objetivos antigénicos. El primero es el uso de los antígenos "expuestos" o convencionales, que son proteínas o péptidos sintetizados en las glándulas salivales y secretados en la saliva de la garrapata durante la fijación y alimentación en el hospedador. Estos antígenos son recogidos y procesados por las células dendríticas para ser presentados a los linfocitos T, generando una respuesta inmune mediada por células principalmente (Nutall *et al.*, 2006; Olds *et al.*, 2013; Rodríguez-Mallon, 2016).

Por el contrario, los antígenos "ocultos" son aquellos que no están expuestos para los mecanismos inmunes del hospedador en la alimentación natural de la garrapata (Willadsen *et al.*, 1988), la falta de contacto entre este tipo de antígenos y el sistema inmune del hospedador impide el desarrollo de estrategias en los parásitos para escapar a la acción de una respuesta contra ellos, lo que los hace especialmente atractivos para el diseño de vacunas. Sin embargo, esto hace que requieran de inmunizaciones repetidas para mantener niveles de anticuerpos adecuados (Nutall *et al.*, 2006; Olds *et al.*, 2013; Rodríguez-Mallon, 2016). Este tipo de antígenos son candidatos potenciales a vacuna si: a) son altamente antigénicos y b) se asocian con alguna función biológica de la garrapata (Nutall *et al.*, 2006).

En 1989, el primer antígeno vacunal contra la garrapata *R. microplus* fue desarrollado en Australia mediante tecnología recombinante y expresado en *E. coli*, llamado Bm86, la cual es una glicoproteína que se encuentra en la membrana de células epiteliales de intestino de *R. microplus* (Willadsen *et al.*, 1989); posteriormente, esta proteína fue expresada en la levadura *Pichia pastoris*, obteniendo altos niveles de expresión y de pureza (Rodríguez *et al.*, 1994). Es un antígeno "oculto" cuya función no ha sido determinada, aunque se ha especulado que está involucrado en la endocitosis de sangre ingerida por garrapatas (Olds *et al.*, 2013; Rodríguez-Mallon, 2016).

Se ha hipotetizado que la respuesta inmune inducida por Bm86 está mediada por anticuerpos, los cuales se fijan a las células intestinales o células diana, y a través del complemento del hospedador, el cual produce lisis celular y aumento de la opsonización de los anticuerpos permitiendo el ataque por fagocitos, produciendo la inhibición de la endocitosis de la sangre ingerida por los ectoparásitos por daño al epitelio intestinal y una disminución de la viabilidad del huevo (Olds *et al.*, 2013; Rodríguez-Mallon, 2016; Andreotti *et al.*, 2018). El efecto de este inmunógeno, a diferencia del efecto de los ixodicidas químicos, no causa la muerte inmediata de los parásitos, pero produce daños a largo plazo, los cuales se ven reflejados en la reducción del potencial biótico de las garrapatas (Rodríguez-Mallon, 2016; de la Fuente *et al.*, 2017 b; Villar *et al.*, 2017).

Asimismo, algunos ensayos han mostrado que el antígeno Bm86 puede proteger contra otras especies de garrapatas como *Rhipicephalus annulatus* y *Rhipicephalus decoloratus* (Fragoso *et al.*, 1998; de la Fuente *et al.*, 2000; de Vos, *et al.*, 2001). La efectividad de las vacunas disponibles que usan esta proteína recombinante bajo condiciones de campo se ha reportado entre 45–100% alrededor del mundo contra *R. microplus* (de la Fuente *et al.*, 2007; Olds *et al.*, 2013; Lew-Tabor y Rodríguez, 2016; Rodríguez-Mallon, 2016; Suarez *et al.* 2016; Trentelman *et al.*, 2017; Almazán *et al.*, 2018; Andreotti *et al.*, 2018).

La variación en la efectividad de esta vacuna está relacionada con polimorfismos encontrados en la secuencia del gen Bm86 en cepas de *R. microplus* de diferentes ubicaciones geográficas (García-García *et al.*, 2000; Sossai *et al.*, 2005; Canales *et al.*, 2009). Además, se ha estimado que una diferencia $\geq 2.8\%$ de la secuencia que codifica para Bm86 podría ser suficiente para causar una respuesta ineficaz (García-García *et al.*, 2000; Martínez-Arzate *et al.*, 2019).

Desde el desarrollo de Bm86 y su comercialización en 1994, aún no hay disponibilidad de vacunas con otros antígenos y con mayor eficacia contra *R. microplus* y otras especies de garrapatas (Imamura *et al.*, 2008; Rodríguez-Mallon, 2016). por lo cual, se deben enfocar las investigaciones actuales en la identificación y desarrollo de antígenos conservados que puedan ser eficaces contra diferentes especies de garrapatas.

Actualmente, el desarrollo de nuevas tecnologías como la genómica y la proteómica han permitido identificar nuevos candidatos a antígenos potenciales contra una gama más amplia de especies de garrapatas y proteínas de patógenos transmitidos por éstas (Villar *et al.*, 2017). Asimismo, varios grupos de investigación se han dedicado a la identificación de antígenos como posibles candidatos vacunales, así como a la mejora de la inmunogenicidad de los antígenos ya probados, incorporando nuevos adyuvantes o formulaciones (Imamura *et al.*, 2007; Guerrero *et al.*, 2012). Uno de los antígenos que en los últimos años se ha reportado como candidato a agente vacunal debido a sus resultados promisorios es subolesina.

2.9. Subolesina

Subolesina (del latín suboles: progenie), originalmente llamada proteína 4D8, es un antígeno “oculto” que fue descubierto por medio de la inmunización en ratones con una biblioteca de DNA complementario (DNAc) y el uso combinado del análisis de las secuencias de etiquetas de expresión, en la garrapata *Ixodes scapularis* (Almazán *et al.*, 2003).

Es ortólogo estructural y funcional de Akirina (AKR) de insectos y vertebrados, las akirinas constituyen un grupo de proteínas que regulan varios procesos biológicos importantes como la respuesta inmunitaria, alimentación, reproducción y desarrollo; cuyos genes están conservados evolutivamente en insectos y vertebrados; en éstos últimos se han identificado dos parálogos de akirinas: akirina 1 y akirina 2; equivalentemente, subolesina se encuentra conservada evolutivamente en artrópodos, entre ellos, *R. microplus* (Artigas-Jerónimo *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha identificado un único gen de SUB/AKR en garrapatas e insectos y está relacionado evolutiva y funcionalmente con el parálogo Akirina 2 en vertebrados (de la Fuente y Contreras, 2015; Artigas-Jerónimo *et al.*, 2018).

Subolesina es una proteína intracelular (localizada en el citoplasma y el núcleo) presente en todos los estadios de las garrapatas y en diversos órganos como cuerpos grasos, intestino, linfonodos, glándulas salivales, cutículas y ovarios (de la Fuente *et al.*, 2006 a; Merino *et al.* 2013; Sultana *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2016; Artigas Jerónimo *et al.*, 2018). Funciona como un factor de transcripción necesario para la expresión génica vía dependiente de NF-κB, desempeñando un papel importante en varios procesos biológicos de las garrapatas, como la respuesta inmune innata, alimentación, desarrollo, infección y transmisión de patógenos, respuesta al estrés y reproducción (Almazán *et al.*, 2003, 2005 a; de la Fuente *et al.*, 2006 a, 2017 a; Busby *et al.*, 2012; Hajdušek *et al.*, 2013; Naranjo *et al.*, 2013; de la Fuente y Contreras, 2015; Artigas-Jerónimo *et al.*, 2018).

Estudios que utilizaron RNA de interferencia (RNAi) para silenciar el gen que expresa esta proteína, demostraron su amplia función como factor de transcripción en diferentes especies de garrapatas, ya que dicho silenciamiento produce degeneración de intestinos, glándulas salivales y tejidos reproductivos de hembras y machos, anomalías en la embriogénesis de los huevos, así como una reducción en la respuesta inmune de las garrapatas y alteraciones en su respuesta al estrés por alimentación. Esto causa disminución en el peso de las garrapatas ingurgitadas, tasa de ingurgitación, oviposición, tasa de eclosión, del comportamiento de “búsqueda” de un hospedador y de su capacidad de infección y transmisión de patógenos como *A. phagocytophilum*, *A. marginale* y *B. bigemina* (de la Fuente *et al.*, 2006 a, b; Kocan *et al.*, 2007; Nijhof *et al.*, 2007; Galindo *et al.*, 2009; Merino *et al.*, 2011; Busby *et al.*, 2012; Hajdušek *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2016; Khalesur *et al.*, 2018).

En años recientes se han realizado pruebas de inmunización con antígenos recombinantes de subolesina para evaluar su efecto inmunoprotector contra las infestaciones de distintas especies de ectoparásitos en bovinos. Almazán *et al.* (2010) reportaron un ensayo donde se evaluó subolesina recombinante expresada en *E. coli* en bovinos infestados artificialmente con *R. microplus* y *R. annulatus*, mostrando una eficacia general del 51 % y 60%, respectivamente.

Merino *et al.* (2013) en una prueba de vacunación con ganado infestado artificialmente con *R. microplus* reportó una reducción en el número de hembras ingurgitadas, su peso y oviposición, con una eficacia general de 60%. Shakya *et al.* (2014) en un ensayo llevado a cabo con subolesina recombinante en terneros desafiados en dos ocasiones con larvas de *R. microplus*, a los días 75 y 105 después de la última inmunización, reportaron que subolesina redujo el número de garrapatas, su peso, oviposición y fertilidad del huevo, con una eficacia general del 44.0% y 37.2% después del primer y segundo desafío respectivamente.

Contreras *et al.* (2019) utilizando una combinación de subolesina recombinante mezclada con *Mycobacterium bovis* (IV) inactivado por calor como adyuvante en una prueba de inmunización utilizando bovinos infestados artificialmente con *R. microplus*, observaron una reducción en el número de garrapatas y en la fertilidad de las garrapatas, con una eficacia general de 65%. Kasaija *et al.* (2020) en un ensayo con ganado *Bos indicus* y cruza de *B. indicus* X *B. taurus* infestados artificialmente con *R. appendiculatus*, *R. decoloratus* y *A. variegatum* reportaron una eficacia general entre 47-94% contra las diferentes especies de garrapatas.

En años recientes, el desarrollo y utilización de nuevas herramientas basadas en biología molecular como la genómica, proteómica, transcriptómica y bioinformática han permitido predecir ciertas propiedades moleculares, bioquímicas e inmunológicas de un antígeno y de esta manera, determinar las regiones, péptidos o epítomos que puedan ser usados como inmunógenos para generar anticuerpos específicos con el propósito de incrementar el potencial protector de dicho antígeno y desarrollar una vacuna más efectiva contra las infestaciones por garrapatas (Patarroyo *et al.*, 2002; Villar *et al.*, 2017).

En México, Lagunes *et al.* (2016) utilizando distintas herramientas bioinformáticas realizaron un análisis de distintas secuencias reportadas en México que codifican para la proteína subolesina de *R. microplus*. De acuerdo con los resultados de dicho análisis, se caracterizó un polipéptido dentro de la secuencia de subolesina que podría ser útil para inducir una respuesta inmune protectora y de reacción cruzada frente a una infestación provocada al menos por una especie de garrapata. El polipéptido de subolesina fue diseñado por predicción de epítomos de células B lineales y epítomos conformacionales discontinuos, los cuales fueron identificados por análisis *in silico* en la secuencia de aminoácidos de la proteína (Nº de acceso a GenBank DQ159965.1). El primer epítomo conformacional estaba constituido por 22 aminoácidos (residuos 9 a 30); el segundo por 10 aminoácidos (residuos 49, 51-53, 55-60) y el tercero por 10 aminoácidos (residuos 88-94, 97-99).

Estos epítomos fueron considerados dentro de un polipéptido de aproximadamente 15,5 kDa expresado en *E. coli*, basado en el análisis electroforético SDS-PAGE y Western Blot. El polipéptido recombinante de subolesina se obtuvo con un 95% de pureza mediante cromatografía de afinidad y emulsionado con adyuvante Montanide ISA 50 V (Seppic®, Paris, France).

Posteriormente, este polipéptido fue desafiado contra la infestación artificial de *R. microplus* en un ensayo realizado en bovinos, reportando una disminución en la carga parasitaria del 79% y en la tasa de eclosión del 30%. Asimismo, los animales inmunizados con el polipéptido de subolesina desarrollaron una respuesta inmune humoral fuerte y específica caracterizada por altos niveles de IgG anti-subolesina recombinante después de la última inmunización, la cual alcanzó un nivel estable después semana 7 y se mantuvo hasta el final del ensayo (semana 11).

Posteriormente, Lagunes *et al.* (2018) evaluaron el efecto de los anticuerpos específicos (IgG) anti-subolesina recombinante generados en el ensayo anterior contra hembras adultas de *R. microplus* de forma *in vitro*, utilizando un sistema de alimentación artificial capilar con sangre de bovinos inmunizados, utilizando sangre suplementada con 1 mg/ml de IgG purificadas específicas de antígeno obtenidas en las semanas 3, 5 y 7 después de la inmunización. En la semana 7 se reportó una reducción en el peso de las garrapatas en un 45% y una disminución de la oviposición de 71%, en comparación con las garrapatas alimentadas con sangre suplementada con IgG obtenidas del grupo testigo. Estos resultados en los parámetros reproductivos de *R. microplus* se debieron a los anticuerpos IgG producidos por el polipéptido anti-subolesina.

Estos reportes demuestran que subolesina es considerado como un candidato vacunal de importancia (Shakya *et al.*, 2014, Sultana *et al.* 2015, de la Fuente y Contreras, 2015), debido a los niveles de eficacia mostrados en estos ensayos y que genera una protección cruzada frente a diversas especies de ixódidos, así como en el control de patógenos transmitidos, sugiriendo que podría ser utilizado como un antígeno viable para el desarrollo y producción de vacunas contra *R. microplus*, siendo necesaria su evaluación *in vivo* bajo condiciones de campo.

2.10. Cócteles multi-antigénicos o vacunas multi-antigénicas

Una de las estrategias para mejorar la eficacia en las vacunas contra garrapatas, son los cócteles multi-antigénicos, que consisten en la combinación de dos o más antígenos (Willadsen, 2008). La prueba inicial que apoya este enfoque provino de un efecto sinérgico o aditivo entre más de un antígeno contra garrapatas en distintos ensayos de inmunización (Willadsen *et al.*, 1996; Almazán *et al.*, 2005b; Parizi *et al.*, 2012). Estos inmunógenos podrían tener el potencial de realizar protección cruzada contra múltiples especies de garrapatas de importancia médica o veterinaria (de la Fuente y Contreras, 2015; Ndwula Jr. *et al.*, 2019).

Entre los antígenos que puede ser candidato para utilizarse en una vacuna multi-antigénica se encuentra subolesina, debido a que se encuentra altamente conservada evolutivamente en artrópodos (Artigas-Jerónimo *et al.*, 2018), siendo potencialmente útil en el desarrollo de un inmunógeno eficaz contra múltiples especies de ectoparásitos.

Existen estudios realizados con la combinación de los antígenos Bm86 y subolesina que sugieren una potencial actividad sinérgica entre ambos contra garrapatas del género *Rhipicephalus*. Una prueba de vacunación utilizando la combinación de estos antígenos en terneros Hereford x Holstein infestados artificialmente con *R. microplus* y *R. annulatus*, reportaron una reducción de las hembras ingurgitadas de ambas especies del 97% en comparación a los animales inmunizados únicamente con Bm86, que tuvo una reducción del 79% (Schetters y Jansen, 2014). Trentelman *et al.* (2019) al evaluar *in vitro* el efecto de los antisueros contra Bm86, subolesina y sus combinaciones sobre la ingurgitación de larvas de *R. australis* mediante alimentación artificial por membranas, observaron que las larvas alimentadas con la combinación de los antisueros de Bm86 y subolesina redujo la ingurgitación larvaria en 62.7%, siendo mayor en comparación con las larvas alimentadas con los antisueros monoespecíficos de Bm86 y subolesina (39% y 5%, respectivamente). Sin embargo, no existen reportes de la utilización de cócteles multi-antigénicos utilizando subolesina y Bm86 en *R. microplus* bajo condiciones de campo.

III. JUSTIFICACIÓN

Uno de los mayores problemas que causan pérdidas económicas y sanitarias en la ganadería bovina son las infestaciones por *Rhipicephalus microplus*, debido a las alteraciones en la salud y productividad de los animales, así como pérdidas asociadas a mortalidad y tratamientos. Debido a la contaminación ambiental, riesgos a la salud pública por contaminación de productos pecuarios y la selección de garrapatas resistentes que conlleva el uso indiscriminado de ixodicidas, se requieren nuevas alternativas de control. En la actualidad, las vacunas contra garrapatas basadas en el antígeno recombinante Bm86 han demostrado, en estudios en campo, buenos resultados en el control de las infestaciones por *R. microplus*. Sin embargo, su eficacia se ve limitada ante el polimorfismo del gen que codifica a Bm86 entre cepas de garrapatas geográficamente distantes, siendo su efecto nulo en algunos casos. Es por esta razón que se considera de gran importancia evaluar el potencial inmunoprotector del antígeno basado en un polipéptido de subolesina y su combinación con Bm86 para el control de *R. microplus* en bovinos naturalmente infestados.

IV. HIPÓTESIS

El polipéptido recombinante de subolesina y su combinación con Bm86 tendrán un efecto inmunoprotector y sinérgico sobre la infestación de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en animales naturalmente infestados.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto inmunoprotector del polipéptido de subolesina y su potencial sinergia con Bm86 sobre infestaciones naturales de *Rhipicephalus microplus* en ganado bovino bajo condiciones de pastoreo en el trópico húmedo mexicano.

5.2. Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto inmunoprotector del polipéptido de subolesina sobre los niveles de infestación de garrapatas *R. microplus* y sus parámetros reproductivos en animales inmunizados.
2. Determinar la cinética de anticuerpos en los animales inmunizados con el polipéptido de subolesina y su relación con los efectos observados en las garrapatas *R. microplus*.
3. Determinar si existe efecto sinérgico entre el polipéptido de subolesina y el antígeno Bm86 sobre las infestaciones y los parámetros reproductivos de *R. microplus*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

El experimento se realizó en el módulo de producción de doble propósito del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), localizado en el Km. 5.5 de la Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, México. En esta zona predomina el clima cálido húmedo Af (m) "W" (e), con una temperatura promedio anual de 23.4° C y una precipitación pluvial de 1743 mm por año (García, 2004).

6.2. Animales

Se emplearon 24 hembras *Bos taurus* X *Bos indicus*, de genotipo 5/8 Holstein y F1 (Holstein x Cebú) entre 12-15 meses de edad con un peso promedio de 244±35 Kg. El estado nutricional y sanitario de los animales fue adecuado para realizar la prueba. Los animales fueron mantenidos bajo un esquema de pastoreo rotacional de 3 días de ocupación con 28 días de descanso en potreros infestados con garrapatas para permitir infestaciones naturales con *Rhipicephalus microplus*. Los animales tuvieron acceso a una dieta basal de Pasto Toledo (*Brachiaria brizantha*) y pasto nativo, y se les suplementó con 1000g de concentrado comercial por animal por día, agua y sales minerales *ad libitum*. Durante tres meses previos al periodo experimental los animales no fueron tratados con ixodicidas. Quince días antes de comenzar la primera inmunización, los animales fueron desparasitados con Albendazol al 10% adicionado con Sulfato de Cobalto (Albendaphorte 10% Co, Salud y Bienestar Animal ®) a dosis de 10 mg/Kg de peso vivo (PV). Todos los animales estuvieron bajo observación continua y se distribuyeron en cuatro grupos (n=6), los cuales se balancearon de acuerdo con la edad, peso, genotipo y carga parasitaria.

6.3. Diseño experimental

El experimento tuvo una duración de 24 semanas (6 de julio- 23 de diciembre de 2019), en donde el primer grupo (G1) fue inmunizado con el polipéptido diseñado por el CENID-SAI-INIFAP (subolesina) (Lagunes *et al.*, 2016), el segundo grupo (G2) fue tratado únicamente con solución salina más el adyuvante Montanide ISA 50 V2 (grupo testigo), el tercer grupo (G3) fue inmunizado con una combinación del polipéptido+Bm86 y el cuarto grupo fue inmunizado con el antígeno Bm86 como control positivo. Los animales fueron inmunizados con dosis de 100 µg de proteínas recombinantes cada uno más adyuvante (Montanide ISA 50 V2, Seppic®, Paris, Francia) en un volumen final de 2 ml/dosis con una dosis primaria en el día 0 (semana 0), seguida de dos dosis en los días 30 y 65 (semanas 4 y 9) (Almazán *et al.*, 2012). La aplicación se realizó en forma subcutánea en la tabla del cuello mediante jeringas de 5 ml con agujas de 16G (Canales *et al.*, 2009). Durante el experimento los animales no recibieron tratamiento acaricida.

6.4. Toma y procesamiento de muestras

6.4.1. Garrapatas *R. microplus*

Cada siete días se colectaron garrapatas adultas repletas por animal a partir del día siete del periodo experimental hasta el día 180 y se almacenaron en cajas de Petri etiquetadas por grupo y por fecha de colecta para ser transportadas al laboratorio de Sanidad Animal del CEIEGT-FMVZ-UNAM (10 garrapatas/caja de Petri). Las garrapatas se pesaron de manera individual y se mantuvieron en incubación a 80% de humedad y 27°C de temperatura durante 14 días para permitir la oviposición y 21 días para la eclosión (de la Fuente *et al.*, 1999). Posteriormente se realizó la evaluación de los parámetros reproductivos de las garrapatas.

6.4.2. Muestras de sangre.

Se tomaron muestras de sangre en tubos Vacutainer® de 6mL sin anticoagulante, directamente de la vena coccígea, de todos los animales cada 14 días durante todo el periodo experimental [semana 0 (primera inmunización) – semana 24 (final del experimento)]. Las muestras se identificaron y transportaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento en el Laboratorio de Sanidad Animal del CEIEGT, donde se obtuvo el suero por centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos y se almacenó en congelación (-20°C) para su transporte y posterior procesamiento en el laboratorio del CENID-SAI-INIFAP.

6.5. Mediciones y técnicas de laboratorio

6.5.1. Cuento de garrapatas *R. microplus*

Cada siete días se realizaron conteos de garrapatas a los animales de manera individual, únicamente tomando en cuenta garrapatas semirepletas y repletas (>4.5 mm) del lado derecho del animal. Todos los conteos fueron ejecutados en el mismo período del día (06:30 h) a través de un ensayo ciego (la persona que contaba las garrapatas no conocía qué animales pertenecían al grupo testigo y los grupos inmunizados) (Almazán *et al.*, 2010; Parizi *et al.*, 2012).

6.5.2. Evaluación del número de garrapatas y parámetros reproductivos en *R. microplus*

La evaluación de los parámetros reproductivos de las garrapatas *R. microplus* se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por de la Fuente *et al.* (1999), donde se evaluó: a) El número de garrapatas hembra adultas, b) El peso de las garrapatas repletas, c) El peso de la masa de huevos, d) efecto sobre la tasa de eclosión; y se calculó e) eficacia de la vacunación. Las fórmulas utilizadas para analizar los resultados obtenidos en los parámetros reproductivos de garrapatas *R. microplus* fueron las siguientes:

a) **Efecto sobre el número de garrapatas adultas:**

$$NG (\%) = 100 \left[1 - \frac{NGV}{NGC} \right]$$

Donde: NG (%) es el efecto sobre el número de hembras repletas, NGV es el número de garrapatas hembra repletas en el grupo tratado y NGC es el número de garrapatas hembra repletas en el grupo testigo.

b) **Efecto sobre el peso de garrapatas repletas:**

$$PG (\%) = 100 \left[1 - \frac{PGV}{PGC} \right]$$

Donde: PG (%) es el efecto sobre el peso de hembras repletas, PGV es el promedio del peso de garrapatas hembra repletas en el grupo tratado y PGC es el promedio del peso de garrapatas hembra repletas en el grupo testigo.

c) **Efecto sobre el peso de la masa de huevos:**

$$PO (\%) = 100 \left[1 - \frac{POGV}{POGC} \right]$$

Donde: PO (%) es el efecto sobre la oviposición, 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.

d) **Efecto sobre la tasa de eclosión:**

$$ECL (\%) = 100 \left[1 - \frac{PPLOV}{PPLOC} \right]$$

Donde: ECL (%) es el efecto sobre la eclosión, 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 control.

e) **Eficacia de la vacunación:**

$$E (\%) = 100 [1 - (CRT \times CRO \times CRF)]$$

Donde: E (%) es la eficacia de la vacuna, CRT = NGV/NGC, CRO = POGV/POGC y CRF = PPLOV/PPLOC que representan la reducción en el número de garrapatas hembra adultas, oviposición y la tasa de eclosión en comparación con el grupo de control, respectivamente.

6.5.3. **Determinación de la cinética de anticuerpos por ELISA indirecto**

La determinación de la cinética de anticuerpos de los animales inmunizados se realizó mediante la técnica de ELISA indirecto, de acuerdo con la metodología descrita por Lagunes *et al.* (2016). Brevemente: a) se utilizó 1 µg/pozo de proteína purificada (polipéptido de subolesina o Bm86) en un volumen de 100 µl/pozo para cubrir la placa de ELISA incubándose durante toda la noche a temperatura de 4°C; b) se realizó el lavado de la placa con 300 µl de solución amortiguada de fosfatos pH 7.2 y adicionada con Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween 0.05%) durante cinco minutos en tres ocasiones, c) para el bloqueo de la placa, se adicionó PBS-Tween 0.05% y leche descremada al 5% en un volumen de 200 µl/pozo incubándose durante 60 minutos a temperatura ambiente; d) los sueros de los animales fueron diluidos a 1:100 en PBS-Tween 0.05% adicionándose en cantidad de 100 µl/pozo realizando 3 repeticiones e incubándose durante una hora a temperatura ambiente; e) se adicionó el conjugado (anti-IgG de bovino acoplado con la enzima fosfatasa alcalina) diluido en PBS-Tw a 1:2000 en un volumen de 100 µl/pozo y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La reacción de color se desarrolló con p-Nitrofenil-fosfato (Sigma®, St. Louis, Mo., EUA) a un volumen de 200 µl/pozo e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. La densidad óptica se determinó en un espectrofotómetro lector de ELISA a 405 nm. Finalmente, los niveles de anticuerpos fueron considerados positivos cuando el valor de la absorbancia fue de al menos dos veces el valor del suero preinmune (Patarroyo *et al.*, 2002).

6.5.4. Medición de temperatura y humedad relativa ambiental

26 días antes y durante todo el periodo experimental se registró la temperatura (°C) y humedad relativa (%) ambientales por medio de The Weather Channel® (TWC Product and Techonology LLC, 2019), dos veces al día (8:00h, 17:00 h). Se calculó el promedio de las observaciones por mes.

6.6. Análisis estadístico

La evaluación del efecto de la inmunización sobre las diferencias entre grupos en cuanto al número y los parámetros reproductivos de las garrapatas se analizaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Las diferencias entre grupos en los valores de la absorbancia de los sueros se evaluaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Ambas pruebas se realizaron utilizando el paquete estadístico StatGraphics versión 18.1.08.

VII. RESULTADOS

7.1. Evaluación del efecto inmunoprotector de las proteínas recombinantes sobre el número de garrapatas *Rhipicephalus microplus* adultas y sus parámetros reproductivos.

En el Cuadro 4 se muestran los porcentajes de reducción respecto a los parámetros reproductivos de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* para cada grupo después de las inmunizaciones. Los animales inmunizados con subolesina mostraron un mayor porcentaje de reducción en el número de garrapatas con un 53%, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al peso de las garrapatas adultas, el grupo que presentó un mayor porcentaje de reducción fue el grupo inmunizado con la combinación subolesina+Bm86 con un 10%, seguido del grupo inmunizado con subolesina (8%); sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). La combinación de subolesina+Bm86 mostró un porcentaje de reducción en la oviposición de 19%, seguido del grupo inmunizado con subolesina con un 16% ($p < 0.05$).

En el caso del efecto sobre la eclosión, el grupo que mostró un mayor porcentaje de reducción fue el grupo inmunizado con subolesina con un 11% ($p < 0.05$). Los grupos inmunizados con la combinación de subolesina+Bm86 y con el antígeno Bm86, presentaron 6% y 5% respectivamente.

Se calculó la eficacia general de la vacunación, siendo el polipéptido de subolesina el que mostró mayor eficacia con 67%, mientras que el antígeno Bm86 y la combinación de subolesina+Bm86 tuvieron una eficacia de 56% y 49%, respectivamente.

Cuadro 2. Porcentajes de reducción (inmunizados/testigo) en los parámetros reproductivos de *R. microplus* en bovinos.

<i>Rhipicephalus microplus</i> (Cepa Martínez de la Torre)					
Grupo experimental	Porcentaje de reducción (inmunizado/testigo)				
	NG	PG	PO	ECL	E
Subolesina	53%* (33±14)	8% (188±13)	16%* (97±7)	11%* (52±5)	67%
Subolesina + Bm86	28% (50±18)	10% (184±23)	19%* (93±16)	6%* (55±6)	49%
Bm86	41% (41±16)	6% (193±18)	15%* (98±13)	5% (56±7)	56%
Control	(70±31)	(205±16)	(115±11)	(63±4)	---

El porcentaje de reducción fue calculado con respecto al grupo testigo: *NG*, efecto sobre el número de hembras adultas; *PG*, efecto sobre el peso de hembras repletas; *PO*, efecto sobre la oviposición; *ECL*, efecto sobre la eclosión; *E*, eficacia de la vacunación. En paréntesis se muestra la media \pm la desviación estándar por número de hembras adultas, peso, oviposición y fertilidad. *Señala diferencias significativas, según prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

7.2. Determinación de la cinética de anticuerpos en los animales inmunizados con las proteínas recombinantes mediante ELISA indirecto.

En la figura 4 se muestra la gráfica de la producción de anticuerpos obtenida durante el periodo experimental para todos los grupos y en el anexo 1, los valores de absorbancia (Densidad óptica, 405 nm) promedio obtenidos por grupo. Los valores de absorbancia fueron similares para los cuatro grupos al comienzo del ensayo y así se mantuvieron después de la primera inmunización (semana 2) y hasta la semana 4.

Después de la segunda inmunización, se muestra un aumento considerable en la producción de anticuerpos en la semana 5 para los grupos inmunizados con subolesina y con el antígeno Bm86, aumentando los valores de absorbancia a más del doble con respecto a los animales del grupo testigo. Además, el grupo inmunizado con Bm86 alcanzó su pico máximo en la producción de anticuerpos en la semana 5 y dicha producción se mantuvo constante hasta el final del experimento ($p < 0.05$).

Una semana después de la tercera inmunización, el grupo inmunizado con subolesina alcanzó su mayor pico de anticuerpos y su producción se mantuvo elevada y constante hasta el final del experimento ($p < 0.05$). Es importante resaltar que este grupo obtuvo los valores más altos en producción de anticuerpos en comparación a los grupos inmunizados con Bm86 y con la combinación subolesina+Bm86 durante todo el experimento.

Mientras que el grupo inmunizado con la combinación de subolesina+Bm86, alcanzó su pico máximo en la producción de anticuerpos en la semana 11, aumentando los valores de absorbancia a más del doble con respecto a los animales del grupo testigo, sin embargo, los niveles fueron significativos hasta la semana 16 ($p < 0.05$).

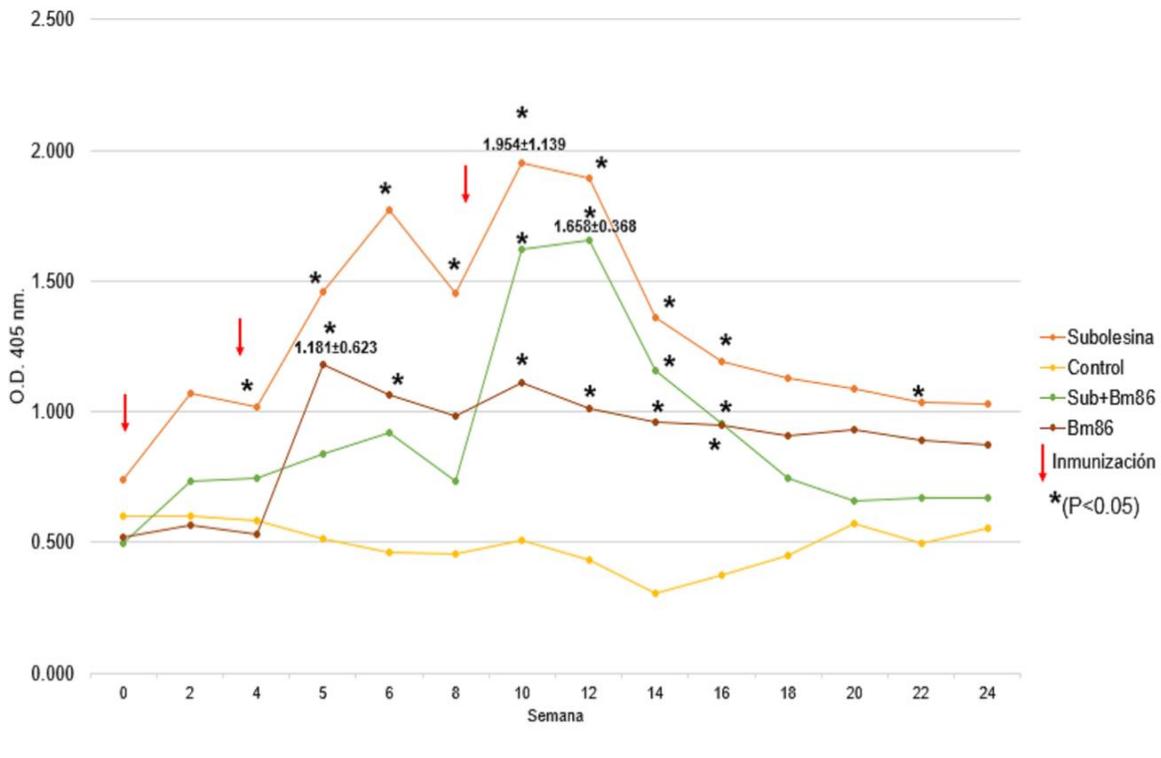


Figura 4. Cinética de la producción de anticuerpos en los bovinos inmunizados. En la gráfica se observa el promedio \pm desviación estándar de los niveles de anticuerpos. Los valores obtenidos fueron analizados y comparados con el grupo testigo mediante prueba de Kruskal-Wallis $*(p < 0.05)$. Las flechas rojas indican las inmunizaciones.

7.3. Promedios de la temperatura (°C) y humedad relativa (%) ambientales por mes

Durante los meses que abarcó el diseño experimental, los meses con mayor temperatura ambiental fueron junio y agosto durante ambos horarios, posteriormente comienza a descender a partir del mes de octubre y los meses con menor temperatura fueron noviembre y diciembre en ambos horarios. De manera general, la humedad relativa (%) fue mayor en el horario las 8:00h en comparación a las 17:00h (Cuadro 3).

Cuadro 3. Temperatura (°C) y humedad relativa (%) ambiental promedio registradas durante el periodo experimental de manera mensual.

Hora	8:00 h		17:00 h	
Mes	(Prom. ± d.e.)		(Prom. ± d.e.)	
	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
	26 ± 1	80 ± 6	31 ± 2	68 ± 6
Julio 2019	25 ± 2	83 ± 7	30 ± 3	68 ± 11
Agosto 2019	26 ± 1	77 ± 5	33 ± 1	60 ± 7
Septiembre 2019	25 ± 1	79 ± 6	30 ± 3	63 ± 10
Octubre 2019	23 ± 2	84 ± 5	27 ± 4	70 ± 7
Noviembre 2019	21 ± 3	85 ± 6	25 ± 3	72 ± 6
Diciembre 2019	19 ± 3	77 ± 8	24 ± 4	70 8

VIII. DISCUSIÓN

Rhipicephalus microplus es considerada la garrapata con mayor importancia económica en la ganadería bovina a nivel mundial (Braga *et al.*, 2017; Trentelman *et al.*, 2017), principalmente en las regiones subtropicales y tropicales (Estrada Peña *et al.*, 2020). La viabilidad de utilizar vacunas de proteínas recombinantes como método de control alternativo costo-beneficio sostenible a largo plazo contra garrapatas ha sido demostrada desde la introducción de dos productos a principios de la década de 1990; TickGARD[®], en Australia y Gavac[®], de Cuba, cuya base es el antígeno Bm86 (de la Fuente *et al.*, 2007); sin embargo, la variación en la eficacia de este antígeno bajo condiciones de campo debido a la presencia de polimorfismos en el gen codificador en distintas áreas geográficas (García *et al.*, 2000; Martínez Arzate *et al.*, 2019) ha hecho que la identificación y desarrollo de vacunas con otros antígenos recombinantes se haya priorizado en todo el mundo.

En este trabajo, en los animales inmunizados con el polipéptido de subolesina se redujo significativamente el número de garrapatas *R. microplus*, la oviposición y la eclosión, pero no existió efecto en cuanto al peso de las garrapatas, en comparación a los parámetros evaluados en los animales del grupo testigo. Cabe señalar que el efecto de las vacunas sobre la reducción en el número de garrapatas repletas y en su fertilidad se ha identificado como un parámetro crucial para el control de infestaciones por garrapatas en el ganado bovino (Schetters *et al.*, 2016). Estos resultados concuerdan con lo reportado con Lagunes *et al.* (2016) y (2018), en donde la base de estas investigaciones consiste en que la alimentación de forma *in vivo* e *in vitro* de garrapatas *R. microplus* con sangre de animales inmunizados con el polipéptido conlleva la ingestión de anticuerpos específicos anti-subolesina, los cuales provocan efectos adversos en la función biológica y reproductiva de las garrapatas, al afectar al antígeno diana.

Además, los resultados presentes en este trabajo concuerdan de manera parcial con estudios anteriores que evaluaron el efecto inmunoprotector de subolesina en pruebas de inmunización en bovinos infestados artificialmente con *R. microplus*, que reportan que no hubo disminución significativa en el peso y oviposición de las garrapatas (Almazán *et al.*, 2010; Lagunes *et al.*, 2016; Contreras *et al.*, 2019).

El nivel de eficacia general del polipéptido de subolesina encontrado en este estudio fue de 67%, basado en comparaciones con estudios previos, este estudio reporta una mayor eficacia, afectando considerablemente la supervivencia y la capacidad reproductiva de las garrapatas *R. microplus* (Almazán *et al.*, 2010; Shakya *et al.*, 2014; Merino *et al.*, 2013; Contreras *et al.*, 2019). Esto se debe probablemente a las regiones inmunogénicas consideradas en la síntesis del polipéptido, lo cual induce una respuesta inmune fuerte y específica con respecto a otros trabajos realizados donde utilizan la proteína completa, sugiriendo que existió una respuesta inmune potencial y dirigida hacia los epítomos contenidos en el polipéptido de subolesina

En cuanto a la cinética de anticuerpos obtenida en los animales inmunizados con el polipéptido, éstos desarrollaron una respuesta inmune humoral fuerte y específica, expresada por altos niveles de anticuerpos IgG1 anti-subolesina desde la segunda inmunización con una diferencia de 2 OD con respecto al grupo control, alcanzado su pico máximo después de la tercera inmunización (semana 10) y manteniendo dicha producción hasta el final del experimento. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores que realizaron pruebas de inmunización con subolesina contra *R. microplus* en bovinos (Almazán *et al.*, 2012, Merino *et al.*, 2013; Shakya *et al.*, 2014; Lagunes *et al.*, 2016; Lagunes *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que la cinética de anticuerpos desarrollada por los animales es el principal determinante de la eficacia vacunal en inmunógenos contra garrapatas, encontrándose una relación positiva entre los niveles de anticuerpos en los animales inmunizados con la eficacia vacunal (Willadsen *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 1998). Esta relación se ha confirmado no sólo para Bm86 (de la Fuente *et al.*, 2007; Almazán *et al.*, 2010), sino también para otros antígenos, incluyendo a

subolesina (Almazán *et al.*, 2010, 2012; Merino *et al.*, 2013; Shakya *et al.*, 2014; Contreras *et al.*, 2019) en pruebas de inmunización con bovinos. Estos resultados sugieren que la eficacia en la disminución en el número, oviposición y en la eclosión de las garrapatas se debió a la respuesta protectora generada por los anticuerpos anti-subolesina, de acuerdo con resultados similares obtenidos por estos autores, confirmando la capacidad inmunoprotectora del polipéptido de subolesina.

Estudios anteriores utilizando el antígeno Bm86 han demostrado que es posible controlar las infestaciones de garrapatas *R. microplus* por medio de la vacunación debido a que reduce el número y peso de las garrapatas ingurgitadas, el peso de la masa de huevos, el número de garrapatas en el campo (generaciones subsecuentes), la disminución de los tratamientos ixodicidas y muestra un impacto positivo implementándolo en programas de control integrado (de la Fuente *et al.*, 2007; Suarez *et al.*, 2016; Blecha *et al.*, 2018).

En este trabajo, únicamente la reducción en la oviposición por Bm86 fue significativa con un 15%, siendo similar a lo reportado por Almazán *et al.* (2010) y Canales *et al.* (2009). Es necesario señalar que existen estudios que reportan que el efecto más pronunciado de Bm86 en las garrapatas es la reducción en su capacidad reproductiva (Penichet *et al.*, 1994; de la Fuente *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 2000; Almazán *et al.*, 2010), lo que provoca una reducción gradual en las poblaciones de *R. microplus*, como se ha observado en estos resultados.

Asimismo, la eficacia general de Bm86 fue de 56%, concordando con los resultados obtenidos en otros estudios bajo condiciones de campo (de la Fuente *et al.*, 2007; Almazán *et al.*, 2010; Olds *et al.*, 2013; Lew-Tabor y Rodríguez, 2016; Rodríguez-Mallon, 2016; Suarez *et al.* 2016; Trentelman *et al.*, 2017; Andreotti *et al.*, 2018), que reportan una eficacia entre 45-100%. No obstante, la eficacia fue menor a la del polipéptido recombinante de subolesina.

Aunque en este trabajo no permite asegurar o rechazar dicha hipótesis, se ha reportado que la variación en la eficacia de este antígeno bajo condiciones de campo se debe a la presencia de polimorfismos en el gen codificador en distintas áreas geográficas, donde se ha estimado que una diferencia $\geq 2.8\%$ de la secuencia que codifica para Bm86 podría ser suficiente para causar una respuesta inmune ineficaz (García *et al.*, 2000; Martínez Arzate *et al.*, 2019). Por lo que es posible pensar que exista algún grado de divergencia en la cepa de *R. microplus* nativa que afecte la eficacia vacunal de Bm86.

La cinética de anticuerpos en los animales inmunizados con Bm86 mostró una respuesta típica expresada por altos niveles de anticuerpos IgG1 anti-Bm86 con una diferencia de 2 DO con respecto al grupo testigo después de la segunda inmunización, alcanzando el mayor pico de producción de anticuerpos en la semana 5 del periodo experimental, y dicha producción se mantuvo constante hasta el final del experimento. Estos resultados coinciden con autores que han reportado que con dos inmunizaciones bajo condiciones de campo es suficiente para inducir una buena cinética de anticuerpos por tiempo prolongado, generando protección contra infestaciones de *R. microplus* (Enríquez *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2010).

Los cócteles multi-antigénicos se han propuesto como una estrategia atractiva para mejorar y/o aumentar la eficacia de antígenos vacunales contra garrapatas, pudiendo tener el potencial de realizar protección cruzada contra una amplia gama de especies de garrapatas de importancia médica y veterinaria (Willadsen, 2008; de la Fuente y Contreras, 2015; Ndawula Jr. *et al.*, 2019). Por otro lado, son escasos los estudios que evalúan la posible sinergia entre Bm86 y subolesina contra *R. microplus* en bovinos. Este es el primer ensayo donde se evaluó la eficacia de SUB y su combinación con Bm86 bajo condiciones de campo.

En los animales inmunizados con la combinación de subolesina+Bm86 se redujo significativamente la oviposición y la eclosión, mostrando una eficacia general de 49%. Este resultado en la eficacia es menor a los antígenos subolesina y Bm86 administrados de forma separada y a lo reportado por autores que evaluaron la combinación de subolesina+Bm86 bajo infestaciones artificiales de *R. microplus* en

terneros, y de manera *in vitro* mediante alimentación artificial por membranas en larvas de *R. australis* (Shetters y Jansen, 2014; Trentelman *et al.*, 2019). Estos autores proponen una posible actividad sinérgica entre estos antígenos, no obstante, estos resultados sugieren una posible competencia antigénica entre los componentes.

El término “competencia antigénica” se ha utilizado para describir la tendencia de algunas vacunas multi-antigénicas a generar respuestas inmunes más bajas de las que se pueden lograr con el uso de vacunas de un solo antígeno (Schwartzkoff *et al.*, 1993; Tizard, 2020). Cuando se administran simultáneamente diferentes antígenos en combinación, se produce competencia entre antígenos y se conoce que ciertos epítomos dentro de una mezcla compleja de antígenos pueden ser inmunodominantes sobre otros epítomos denominados “inmunosilenciosos” (Schwartzkoff *et al.*, 1993; Tizard, 2020).

Esta competencia puede ser intermolecular o intramolecular en la naturaleza (Schwartzkoff *et al.*, 1993), por lo que un antígeno puede dominar en la generación de la respuesta inmune o interferir con la respuesta hacia otros antígenos (Tizard, 2020). Además, existen investigaciones sobre vacunas multi-antigénicas que demuestran que la competencia antigénica disminuye la eficacia vacunal en algunas de estas vacunas contra patógenos (O' Meara *et al.*, 1993; Schwartzkoff *et al.*, 1993; Raadsma *et al.*, 1994). En un experimento de inmunización, Almazán *et al.* (2005b) utilizando ovinos infestados con garrapatas adultas *I. scapularis* probó la eficacia de 4E6, 4F8, subolesina y su combinación, donde la combinación de estos antígenos tuvo una eficacia menor (58%) con respecto a subolesina (71%) pero fue mayor a los otros antígenos (4E6 con 40% y 4F8 con 33%), siendo similar a lo encontrado en este trabajo, donde la combinación de subolesina+ Bm86 tuvo una eficacia menor con respecto al polipéptido y al antígeno Bm86. Por lo que es posible hipotetizar que exista competencia antigénica entre el polipéptido de subolesina y Bm86 de manera moderada, posiblemente debido a que subolesina sea un antígeno inmunodominante con respecto a otros antígenos, por lo que se sugiere realizar más estudios con esta combinación.

En cuanto a la cinética de anticuerpos en los animales inmunizados con la combinación de subolesina+Bm86, se indujo un aumento del nivel de anticuerpos en comparación con los animales inmunizados con Bm86 y el grupo testigo, pero menor a la obtenida por subolesina, esto se debe posiblemente por competencia antigénica. Esta cinética de anticuerpos alcanzó su mayor pico dos semanas después de la tercera inmunización y los niveles de anticuerpos se mantuvieron constantes durante todo el experimento, sin embargo, sólo fueron significativos hasta la semana 16. Estos resultados sugieren que el efecto en la reducción sobre la oviposición y la eclosión en las garrapatas *R. microplus* se debe a la respuesta inmune desarrollada por los animales.

Las diferencias encontradas entre los diversos trabajos de investigación y este trabajo pueden estar asociadas a factores directamente relacionados con la naturaleza del experimento. Regularmente, las infestaciones naturales de garrapatas en experimentos bajo condiciones de campo varían debido a la influencia de factores intrínsecos y extrínsecos a los animales (Lima *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2006), principalmente por factores como el clima, el cual es difícil de predecir (Sutherst *et al.*, 1979; Willadsen *et al.*, 1995). El clima de la zona donde se realizó este trabajo es trópico húmedo Af (m) w" (e) con tres épocas definidas: 1) época seca (febrero-mayo), 2) lluvias (junio-septiembre) y 3) invernal o nortes (octubre-enero), con una temperatura promedio anual de 23.4°C y una precipitación pluvial de 1743 mm por año (García, 2004), asimismo se ha reportado previamente la dinámica poblacional de *R. microplus* en estas condiciones, donde las infestaciones por garrapatas se presentan durante todo el año, pero en la época entre junio-octubre son mayores (Alonso Díaz *et al.*, 2007, 2012), por lo que es necesario reforzar su control durante ese periodo.

En este trabajo, la infestación de garrapatas en los animales durante el periodo experimental fue menor en comparación a otros estudios realizados con infestaciones naturales bajo condiciones tropicales (Jittapalapong *et al.*, 2004). Esto pudo deberse a las altas temperaturas con baja humedad relativa registradas durante el experimento. Se ha reportado previamente que la temperatura y la humedad relativa ambiental son críticas para el desarrollo y supervivencia de *R. microplus* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011; Benavides-Ortiz *et al.*, 2016).

De acuerdo con los datos obtenidos por CONAGUA durante el año 2019 se registraron precipitaciones pluviales mensuales por debajo de sus promedios registrados con anterioridad, principalmente durante los meses de julio-septiembre. Este trimestre fue registrado como el más seco del periodo experimental y el año 2019 fue registrado como el tercer año más seco para el estado de Veracruz, de acuerdo con registros de lluvia anteriores (1951-2010) (INEGI, 2009; CONAGUA, 2019), lo cual influyó en la temperatura y humedad relativa ambiental durante el experimento (Anexo 2).

Sin embargo, es importante recalcar que resultados de experimentos previos han demostrado que subolesina es un antígeno con alto grado de conservación entre cepas mexicanas de *R. microplus* (Lagunes *et al.*, 2014; Merino-Charrez *et al.*, 2019; Pérez-Suarez *et al.*, 2019) y los animales inmunizados con este polipéptido desarrollaron una respuesta inmune humoral fuerte y específica contra *R. microplus*. No obstante, se sugieren realizar más estudios bajo condiciones de campo para que el polipéptido de subolesina pueda utilizarse en programas de control integrado de ectoparásitos como agente de control coadyuvante.

IX. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo demostraron que el polipéptido de subolesina tiene un efecto inmunoprotector contra las infestaciones de *R. microplus* en ganado bovino bajo condiciones de trópico húmedo con una eficacia general del 67%, la cual fue mayor al antígeno Bm86, posiblemente por algún grado de divergencia en la cepa de *R. microplus* nativa que afecte la eficacia vacunal de Bm86.
2. Este es el primer ensayo donde se evaluó la eficacia del polipéptido de subolesina y su combinación con Bm86 bajo condiciones de campo. Los resultados obtenidos sugieren una posible “competencia antigénica” moderada entre ambos antígenos.
3. Se sugieren realizar más estudios para poder dilucidar si este antígeno en combinación con otro podría ser más eficaz y probar la eficacia del polipéptido de subolesina bajo condiciones de campo en combinación con otras medidas de control.

X. REFERENCIAS

Abbas RZ, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z. 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Veterinary parasitology*, 203, 6-20.

Aguirre EJ, Santamaría VM. 1986. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. *Memorias de IV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria*. Octubre 4 -5. Cd. Victoria, Tamaulipas, México: Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria.

Ali A, Parizi LF, Ferreira BR, Vaz Junior IS. 2016. A revision of two distinct species of *Rhipicephalus*: *R. microplus* and *R. australis*. *Ciência Rural*, 46, 1240-1248.

Allen JR, Humphreys SJ. 1979. Immunization of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature*, 280, 491-493.

Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, 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 EE, de la Fuente J. 2005b. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*, 23, 5294– 5298.

Almazán C, Moreno-Cantú O, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Canales M, Villar M, de la Fuente J. 2012. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*, 30, 265-272.

Almazán C, Lagunes R, Villar C, Rosario R, Canales M, de la Fuente J. 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research*, 106, 471-479.

Almazán C, Moreno-Cantú O, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Canales M, Villar M, de la Fuente J. 2012. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*, 30, 265-272.

Almazán C, Tipacamú GA, Rodríguez S, Mosqueda J, Pérez de León A. 2018. Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in bioscience*, 23, 1535-1551.

Alonso-Díaz MA, López-Silva BJ, Leme de Magalhães Labarthe AC, Rodríguez-Vivas RI. 2007. Infestación natural de hembras de *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) en dos genotipos de bovinos en el trópico húmedo de Veracruz, México. *Veterinaria México*, 38, 503-509.

Alonso-Díaz MA, Fernández-Salas A, Basurto-Camberos H. 2012. *Manual Técnico: La garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus: su comportamiento, control y Resistencia a los acaricidas en el trópico mexicano*. Martínez de la Torre, Veracruz, México: CEIEGT, Universidad Nacional Autónoma de México, FUNPROVER.

Andreotti R, Giachetto PF, Cunha RC. 2018. Advances in tick vaccinology in Brazil: from gene expression to immunoprotection. *Frontiers In Bioscience, Scholar*, 10, 127-142.

Arce-Recinos C, Aranda-Ibáñez EM, Osorio-Arce MM R, González-Garduño R, Díaz-Rivera P, Hinojosa-Cuellar JA. 2017. Evaluación de parámetros productivos y reproductivos en un hato de doble propósito en Tabasco, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8, 83-91.

Artigas-Jerónimo S, Villar M, Cabezas-Cruz A, Valdés JJ, Estrada-Peña A, Alberdi P, de la Fuente J. 2018. Functional Evolution of Subolesin/Akirin. *Frontiers in Physiology*, 9, 1612.

Barker SC, Murrell A. 2004. Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129, 15-36.

Beati L, Keirans JE. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genus genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari:Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal ADN gene and sequences end morphological characters, *Journal of Parasitology*, 87, 32-48.

Benavides-Ortiz E, Romero Prada J, Villamil-Jiménez LC. 2016. *Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático: Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático.* Costa Rica: IICA.

Blecha IMZ, Csordas BG, Aguirre ADAR, Cunha RC, Garcia MV, Andreotti R. 2018. Analysis of Bm86 conserved epitopes: is a global vaccine against Cattle Tick *Rhipicephalus microplus* possible?. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27, 267-279.

Bovimune Ixovac®. 2018. Lapsa México: Bovimune Ixovac® (Manual técnico). http://www.lapsa.com/assets/recursos/Manual_Ixovac.pdf [Consulta 20 dic 2018].

Bowman DD. 2014. *Georgis' parasitology for veterinarians.* 10ª Edición. St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders.

Braga, AGS, Lima RA, Celestino CO, Facundo VA. 2017. Tick *Rhipicephalus microplus* canestrini: biological, morphological and biological activity. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 21, 88-96.

Brown SJ, Shapiro SZ, Askenase PW. 1984. Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. I. Immunization of guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibodies. *The Journal of Immunology*, 133, 3319-3325.

Burger TD, Shao R, Barker SC. 2014. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76, 241–253.

Busby AT, Ayllón N, Kocan KM, Blouin EF, de la Fuente G, Galindo RC, Villar M, de la Fuente J. 2012. Expression of heat-shock proteins and subolesin affects stress responses, *Anaplasma phagocytophilum* infection and questing behavior in the tick, *Ixodes scapularis*. *Medical and Veterinary Entomology*, 26, 92–102.

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

Cobon G, Hungerford J, Woodrow M, Smith D, Willadsen P. 1995. Vaccination against *Boophilus microplus*: the Australian field experience. En: de la Fuente J (Editor). *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*. La Habana, Cuba: Elfos Scientiae

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2019. *Reporte del clima en México: Reporte Anual: 2019.* [PDF, consulta 09 sep 2020] <https://smn.conagua.gob.mx/tools/DATA/Climatolog%C3%ADa/Diagn%C3%B3stico%20Atmosf%C3%A9rico/Reporte%20del%20Clima%20en%20M%C3%A9xico/Anual2019.pdf>

Contreras M, Kasaija PD, Merino O, de la Cruz Hernandez NI, Gortazar C, de la Fuente J. 2019. Oral vaccination with a formulation combining *Rhipicephalus microplus* Subolesin with heat inactivated *Mycobacterium bovis* reduces tick infestations in cattle. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 45.

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

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

de la Fuente J, Almazán C, Blas Machado U, Naranjo V, Mangold AJ, Blouin EF, Gortazar C, Kocan KM. 2006a. 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, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM. 2006b. Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitology Research*, *100*, 85-91.

de la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez-de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen, P. 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, *8*, 23–28.

de la Fuente J, Contreras M. 2015. Tick vaccines: current status and future directions. *Expert review of vaccines*, *14*, 1367-1376.

de la Fuente J, Villar M, Contreras M, Moreno-Cid JA, Merino O, Pérez-de la Lastra JM, de la Fuente G, Galindo RC. 2015. Prospects for vaccination against the ticks of pets and the potential impact on pathogen transmission. *Veterinary Parasitology*, *208*, 26–29.

de la Fuente J, Kopáček P, Lew-Tabor A, Maritz Olivier C. 2016. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite immunology*, *38*, 754-769.

de la Fuente J, Antunes S, Bonnet S, Cabezas Cruz A, Domingos AG, Estrada-Peña A, Johnson N, Kocan KM, Mansfield KL, Nijhof AM, Papa A, Rudenko N, Villar M, Alberdi P, Torina A, Ayllón N, Vancova M, Golovchenko M, Grubhoffer L, Caracappa S, Fooks AR, Gortazar C, Rego ROM. 2017a. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 114.

de la Fuente J, Contreras M, Estrada Peña A, Cabezas Cruz A. 2017b. Targeting a global health problem: Vaccine design and challenges for the control of tick-borne diseases. *Vaccine*, *35*, 5089–5094.

Dellagostin OA, Felix SR, Jorge S. 2017. Recombinant veterinary vaccines. En: Thomas Soccol V, Pandey A, Resende RR (eds.). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Human and Animal Health Applications*. Massachusetts, USA: Elsevier Saunders.

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. *Experimental and Applied Acarology*, 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 acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 181-192.

Enríquez A, Bouéc O, Redondo M, Montero C, Machado H, Joglar M, Soto A, Rodríguez M, de la Fuente J. 1999. Desarrollo y aplicación en bovinos de la nueva formulación vacunal Gavacplus contra la garrapata *Boophilus microplus*. *Biología Aplicada*, 16, 15-17.

Estrada-Peña A, Szabó M, Labruna M, Mosqueda J, Merino O, Tarragona E, Venzal JM, de la Fuente J. 2020. Towards an Effective, Rational and Sustainable Approach for the Control of Cattle Ticks in the Neotropics. *Vaccines*, 8, 9.

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). 2018. *Panorama Agroalimentario Carne de bovino 2018*. [PDF, consulta 13 jun 2019] https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2018_1.pdf

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). 2019. *Panorama Agroalimentario Leche y lácteos 2019*. [PDF, consulta 13 jun 2019] <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2019/06/Panorama-Agroalimentario-Leche-y-la769cteos-2019.pdf>

Fragoso SH, Soberanes CN. 2001. Control de la resistencia a los ixodídeos a la luz de los conocimientos actuales. *Memorias de XXV Congreso Nacional de Buiatría*. Veracruz, Veracruz, México: Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, A.C.

Fragoso H, Hoshmand Rad P, Ortiz M, 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.

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. *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 612–617.

García E. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Cuarta Edición. México D.F., México: Instituto de Geografía, UNAM.

García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boué O, Rodríguez M, Joglar M, Machado H, González IL, 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-Martínez A, López-Gama R, Morales-Almaraz E, Martínez-García CG, Albarrán-Portillo B, Rayas-Amor AA. 2017. Análisis productivo y económico de unidades de producción de ganado bovino para carne en Tlatlaya, Estado de México. *Agroproductividad*, 10, 22-28.

García-Winder M. La ganadería en México: Su contribución a la seguridad alimentaria. En: *Reunión de la Academia Mexicana de Ciencias: "Ciencia y Humanismo"*. (México D.F., México, Programa de Agronegocios y Comercialización Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Miami, FL, USA).

Graf JF, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini GA, Molento MB, Bordin EL, Arantes GJ. 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129, S427–S442.

González Sáenz-Pardo JR. 2018. Impacto de la garrapata en la exportación de ganado en pie hacia los Estados Unidos de América. En: Rodríguez Vivas RI, Torres Barajas T, Soberanes Céspedes N (eds.). *Memorias del Curso de capacitación para la inspección de ganado y control de la garrapata (*Boophilus* spp.) para la movilización nacional y exportación*; Septiembre 19-21. Piedras Negras, Coahuila, México: SAGARPA-INFARVET-CNOG.

Guerrero FD, Miller RJ, Pérez de León AA. 2012. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge?. *International Journal for Parasitology*, 42, 421–427.

Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada Peña A, Horak IG, Shao F, Barker SC. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528, 1-28.

Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada Peña A, Horak IG. 2014. *The Hard Ticks of the World: (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. New York, New York, USA: Springer.

Hajdušek O, Šíma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, de la Fuente J, Kopáček P. 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 26.

Imamura S, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2007. Recent topics of candidate antigens for immunological control of ixodid ticks. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35, 1-16.

Imamura S, Konnai S, da Silva Vaz IJ, Yamada S, Nakajima C, Ito Y, Tajima T, Yasuda J, Simuunza M, Onuma M, Ohashi K. 2008. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 56, 85-98.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2009. *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Martínez de la Torre, Veracruz de Ignacio de la Llave*. [PDF, consulta 02 sep 2020] http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30183.pdf

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2017. *Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) 2017*. [PDF, consulta 10 feb 2020] https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ena/2017/doc/ena2017_pres.pdf

Jittapalapong S, Jansawan W, Gingkaew A, Barriga OO, Stich RW. 2004. Protection of dairy cows immunized with tick tissues against natural *Boophilus microplus* infestations in Thailand. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, 289-297.

Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Albrecht MS, Hungerford J, Ansell J. 2000. Evaluation of TickGARDPLUS, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein–Friesian cows. *Veterinary parasitology*, 88, 275-285.

Kasaija PD, Contreras M, Kabi F, Mugerwa S, de la Fuente J. 2020. Vaccination with Recombinant Subolesin Antigens Provides Cross-Tick Species Protection in *Bos indicus* and Crossbred Cattle in Uganda. *Vaccines*, 8, 319.

Khalesur Rahman M, Saiful Islam M, Myungjo You M. 2018. Impact of Subolesin and Cystatin Knockdown by RNA Interference in Adult Female *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) on Blood Engorgement and Reproduction. *Insects*, 9, 39.

Kocan KM, Manzano Roman R, de la Fuente J. 2007. Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host Ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA. *Parasitology Research*, 100,1411–1415.

Kules J, Horvatic´ A, Guillemin N, Galan A, Mrljaka V, Mangesh Bhide M. 2016. New approaches and omics tools for mining of vaccine candidates against vector-borne diseases. *Molecular BioSystems*, 12, 2680.

Lagunes R, Domínguez-García DI, Martínez-Velázquez M, Quiroz-Romero H, Rosario-Cruz R. 2014. Molecular Cloning and Variability of a Subolesin Recombinant Peptide from a Mexican *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* Tick Strain. *Biochemistry & Molecular Biology*, 2, 17-23.

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

Lagunes R, de la Cruz-Hernández NI, Ramírez-Guillen PN, Merino-Charrez JO. 2018. Decrease in the cattle tick *Rhipicephalus microplus* biological parameters using anti-subolesin peptide antibodies by artificial capillary feeding. *Tropical Biomedicine*, 35, 1–9.

Léger E, Vourc’h G, Vial L, Chevillon C, McCoy KD. 2013. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, 59, 219–244.

Lew-Tabor AE, Rodriguez VM. 2016. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 573-585.

Lima WS, Ribeiro MF, Guimaraes MP. 2000. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Tropical Animal health and production*, 32, 375-380.

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. *Journal of Medical Entomology*, 48, 770-774.

Low VL, Tay ST, Kho KL, Koh FX, Tan TK, Lim YA, Ong BL, Panchadcharam C, Norma Rashid Y, Sofian Azirun M. 2015. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. *Parasites & Vectors*, 8, 341.

Lu P, Zhou Y, Yu Y, Cao J, Zhang H, Gong H, Li G, Zhou J. 2016. RNA interference and the vaccine effect of a subolesin homolog from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Experimental and Applied Acarology*, 68, 113-126.

Manjunathachar HV, Saravanan BC, Kesavan M, Karthik K, Rathod P, Gopi M, Tamilmahan P, Balaraju BL. 2014. Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S770-S779.

Mapholi NO, Marufu MC, Maiwashe A, Banga CB, Muchenje V, MacNeil MD, Chimonyo M, Dzama K. 2014. Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: A review, *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5, 475-483.

Martínez-Arzate SG, Sánchez-Bermúdez JC, Sotelo-Gómez S, Diaz-Albiter HM, Hegazy-Hassan W, Tenorio-Borroto E, Barbabosa-Pliego A, Vázquez-Chagoyán JC. 2019. Genetic diversity of Bm86 sequences in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from Mexico: analysis of haplotype distribution patterns. *BMC Genetics*, 20, 56.

Martínez-Castro CJ, Coteria Rivera J, Arceo Merales OL, Damien Forsythe E, Kido Cruz MT. 2015. Agentes y márgenes de comercialización del ganado bovino para abasto en Loma Bonita, Oaxaca. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 36, 1188-1198.

Maruyama SR, Garcia GR, Teixeira FR, Brandão LG, Anderson JM, Ribeiro JMC, Valenzuela JG, Horackova J, Veríssimo CJ, Luciana M, Katiki LM, Banin TM, Zangirolamo AF, Gardinassi LG, Ferreira BR, de Miranda Santos IKF. 2017. Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. *Parasites & Vectors*, 10, 206.

McNair CM. 2015. Ectoparasites of medical and veterinary importance: drug resistance and the need for alternative control methods. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, 351-363.

Merino-Charrez JO, Gómez-Romero N, Barrera-Molina I, Lagunes-Quintanilla R. 2019. Análisis in silico del gen subolesina como posible vacuna contra garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6, 129-136.

Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid JA, Galindo RC, de la Fuente J. 2011. Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine*, 29, 8575–8579.

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.

Miller RJ, Almazán C, Ortíz Estrada M, Davey RB, George JE, Pérez-De León A. 2013. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. *Veterinary Parasitology*, 191, 97– 101.

Naranjo N, Ayllón N, Pérez de la Lastra JM, Galindo RC, Kocan KM, Blouin EF, Mitra R, Pilar Alberdi P, Villar M, de la Fuente J. 2013. Reciprocal regulation of NF-κB (Relish) and Subolesin in the tick vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS One*, 8, E65915.

Ndawula Jr. C, Sabadin GA, Parizi LF, Vaz Jr IS. 2019. Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation. *Vaccine*, 37, 1918–1927.

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. *International Journal for Parasitology*, 37, 653–662.

Nuñez JL, Cobeñas MEM, Moltedo HL. 1982. *Boophilus microplus: la garrapata común del ganado vacuno*. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur.

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

Olds C, Bishop R, Daubenberger C. 2013. **Anti-tick Vaccines for the Control of Ticks Affecting Livestock**. En: Giese M, (ed.). *Molecular Vaccines From Prophylaxis to Therapy Volume 1*. New York, New York, USA: Springer.

O' Meara TJ, Egerton JR, Raadsma HW. 1993. Recombinant vaccines against ovine footrot. *Immunology and cell biology*, 71, 473-488.

Ortiz EM, Santamaría VM, Fragoso SH. 1994. Resistencia en garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas en México. *Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias*. Acapulco, Guerrero, México.

Parizi LF, Reck Jr J, Oldiges DP, Guizzo MG, Seixas A, Logullo C, de Oliveira PL, Termignonia C, Martins JR, da Silva Vaz Jr I. 2012. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. *Vaccine*, 30, 6912-6917.

Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Couto-Pimentel J, Guzman F, Patarroyo, ME, Vargas MI, Prates AA, Dias-Mendes MA. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary immunology and immunopathology*, 88, 163-172.

Penichet M, Rodriguez M, Castellano O, Mandado S, Rojas Y, Rubiera R, Sanchez P, Leonart R, de la Fuente J. 1994. Detection of Bm86 antigen in different strains of *Boophilus microplus* and effectiveness of immunization with recombinant Bm86. *Parasite Immunology*, 16, 493-500.

Pérez-Soria MME, Hernández-Silva DJ, Mosqueda J. 2019. Análisis de la variabilidad alélica de BmVDAC y Subolesina, dos candidatos vacunales contra *Rhipicephalus microplus* en aislados de México. *Nova scientia*, 11, 126-142.

Peter RJ, Van-den Bossche P, Penzhorn BL, Sharp B. 2005. Tick, fly, and mosquito control—Lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary Parasitology*, 132, 205–215.

Polanco-Echeverry DN, Ríos-Osorio LA. 2016. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 17, 81-95.

Pulido-Herrera LA, Rudas LA, Betancourt JA, Grant WE, Vilchez SJ. 2015. Distribución inusual y potencial de la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en zonas tropicales de alta montaña de los Andes colombianos. *Biota Colombiana*, 16, 75-95.

Raadsma HW, O' Meara TJ, Egerton JR, Lehrbach PR, Schwartzkoff CL.1994. Protective antibody titres and antigenic competition in multivalent *Dichelobacter nodosus* fimbrial vaccines using characterised rDNA antigens. *Veterinary immunology and immunopathology*, 40, 253-274.

Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcón V, Sanchez G, Bringas R, Cordovés C, Valdés M, Leonart R, Herrera R, de la Fuente J. 1994. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of biotechnology*, 33, 135-146.

Rodríguez-Mallon A. 2016. Developing Anti-tick Vaccines. En: Thomas S (ed.). *Vaccine Design Methods and Protocols Volume 2: Vaccines for Veterinary Diseases*. New York, New York, USA: Springer.

Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arévalo F, Fragoso SH, Santamaría VM, Rosario-Cruz R. 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatán, México. *Veterinary Parasitology*, 136, 335-442.

Rodríguez-Vivas RI, Arieta-Román RJ, Pérez-Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA, Ramírez-Cruz GT, Basto-Estrella G. 2010. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Archivos de medicina veterinaria*, 42, 115-123.

Rodríguez-Vivas RI, Ojeda-Chi MM, Pérez-Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA. 2011. Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. En: Quiroz-Romero H, Figueroa-Castillo JA, Ibarra-Velarde F, López-Arellano MA (eds.). *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. Primera edición. México D.F., México: Departamento de Parasitología, FMVZ-UNAM.

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

Rodríguez-Vivas RI, Rosado-Aguilar JA, Ojeda-Chi MM, Pérez-Cogollo LC, Trinidad-Martínez I, Bolio-González ME. 2014. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1, 295-308.

Rodríguez-Vivas RI, Grisi L, Pérez-de León AA, Silva-Villela H, Torres-Acosta JFJ, Fragoso-Sánchez H, Romero-Salas D, Rosario-Cruz R, Saldierna F, García-Carrasco D. 2017. Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8, 61-74.

Rodríguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C. 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117, 3–29.

Rosario-Cruz R, Domínguez-García DI, Rojas-Ramírez E, Ortiz-Estrada M, Martínez-Ibáñez N. 2009. Estrategias para el control de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Jiutepec Morelos, México: CENID-PAVET INIFAP.

Schettters TPM, Jansen T. 2014. Vaccine against *Rhipicephalus* ticks. International application number: PCT/EP2014/056248. *International publication number: WO2014/154847 A1.* [PDF, consulta 19 oct 2017] www.google.com/patents/WO2014154847A1?cl=en

Schettters T, Bishop R, Crampton M, Kopáček P, Lew-Tabor A, Maritz-Olivier C, Miller R, Mosqueda J, Patarroyo J, Rodriguez-Valle M, Scoles GA, de la Fuente J. 2016. Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. *Parasites & Vectors*, 9, 1-7.

Schwartzkoff CL, Egerton JR, Stewart DJ, Lehrbach PR, Elleman TC, Hoyne PA. 1993. The effects of antigenic competition on the efficacy of multivalent footrot vaccines. *Australian veterinary journal*, 70(4), 123-126.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2020. Situación actual del control de la garrapata *Boophilus* spp. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp> [Consulta 19 ene 2020].

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. Anuario Estadístico de la Producción Ganadera (Leche de bovino y carne en canal de bovino). https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/ [Consulta 22 nov 2018].

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, Roe RM. (Eds.). (2014). *Biology of ticks: Volume 1.* 2nd Edition. New York, New York, USA: Oxford University Press.

Sossai S, Peconick AP, Sales Junior PA, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, Patarroyo JH. 2005. Polymorphism of the Bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, 37, 199-214.

[STATGRAPHICS] Statpoint Technologies, Inc. 2017. STATGRAPHICS Centurion XVIII version 18.1.08. The Plains, Virginia, USA. [revisión: 04 abr 2020].

Suarez M, Rubi J, Pérez D, Cordova V, Salazar Y, Vielma A, Barrios F, Gil CA, Segura N, Carrillo Y, Cartaya R, Palacios M, Rubio E, Escalona C, Ramirez RC, Baker RB, Machado H, Sordo Y, Bermudes J, Vargas M, Montero C, Cruz A, Puente P, Rodriguez JL, Mantilla E, Oliva O, Smith E, Castillo A, Ramos B, Ramirez Y, Abad Z, Morales A, Gonzalez EM, Hernandez A, Ceballo Y, Callard D, Cardoso A, Navarro M, Gonzalez JL, Pina R, Cueto M, Borroto C, Pimentel E, Carpio Y, Estrada MP. 2016. High impact and effectiveness of Gavac™ vaccine in the national program for control of bovine ticks *Rhipicephalus microplus* in Venezuela. *Livestock Science*, 187, 48-52.

Sutherst RW, Wharton RH, Cook IM, Sutherland ID, Bourne AS. 1979. Long-term population studies on the cattle tick (*Boophilus microplus*) on untreated cattle selected for different levels of tick resistance. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30, 353-368.

Sultana H, Patel U, Sonenshine DE, Neelakanta G. 2015. Identification and comparative analysis of subolesin/akirin ortholog from *Ornithodoros turicata* ticks. *Parasites & Vectors*, 8, 132.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. 2016. *Veterinary Parasitology*. 4TH Edition. West Sussex, UK: Wiley.

[The Weather Channel] TWC Product and Techonology LLC. 2019. The Weather Channel© Application. Version 12.1. USA.

Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*, 4, 131–141.

Tizard IR. 2020. *Vaccines for Veterinarians*. 1ST Edition. St. Louis, Missouri, USA: Elsevier.

Trentelman JJA, Kleuskens JAGM, van de Crommert J, Schettters TPM. 2017. A new method for *in vitro* feeding of *Rhipicephalus australis* (formerly *Rhipicephalus microplus*) larvae: a valuable tool for tick vaccine development. *Parasites & Vectors*, 10, 153.

Trentelman JJA, Teunissen H, Kleuskens JAGM, van de Crommert J, de la Fuente J, Hovius JW, Schetters TP. 2019. A combination of antibodies against Bm86 and Subolesin inhibits engorgement of *Rhipicephalus australis* (formerly *Rhipicephalus microplus*) larvae *in vitro*. *Parasites & Vectors*, 12, 1-10.

Vargas M, Montero C, Sánchez D, Pérez D, Valdés M, Alfonso A, Joglar M, Machado H, Rodríguez E, Méndez L, Leonart R, Suárez M, Fernández E, Estrada MP, Rodríguez Mallón A, Farnós O. 2010. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavac plus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC veterinary research*, 6, 43.

Villar M, Marina A, de la Fuente J. 2017. Applying proteomics to tick vaccine development: where are we?, *Expert Review of Proteomics*, 14, 211-221.

Willadsen P, McKenna RV, Riding GA. 1988. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *International Journal for Parasitology*, 18, 183-189.

Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, Lahnstein J, Cobon GS, Gough JM. 1989. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *The Journal of Immunology*, 143, 1346-1351.

Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*, *Parasitology*, 110, S43–S50.

Willadsen P, Smith D, Cobon G, McKenna RV. 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*, 18, 241–246.

Willadsen P. 2008. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope?. *Parasitology Today*, 24, 164–167.

Yessinou RE, Akpo Y, Adoligbe C, Adinci J, Assogba MN, Koutinhouin B, IYA Karim, Farougou S. 2016. Resistance of tick *Rhipicephalus microplus* to acaricides and control strategies. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4, 408-414.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Valores de absorbancia (405 nm.) obtenidos en la prueba de ELISA indirecto durante el experimento de inmunización en bovinos.

	Semana experimental (Promedio ± Desviación estándar)						
Grupo	0	2	4	5	6	8	10
Subolesina	0.739±0.432	1.069±0.581	1.021±0.206	1.457±0.948	1.770±1.160	1.456±0.961	1.954±1.139
Control	0.603±0.095	0.603±405	0.583±0.186	0.515±0.321	0.463±0.298	0.456±0.323	0.511±0.183
Sub+Bm86	0.499±0.198	0.735±0.258	0.746±0.299	0.840±0.326	0.922±0.246	0.737±0.199	1.623±0.264
Bm86	0.520±0.222	0.568±0.240	0.529±0.202	1.181±0.623	1.065±0.517	0.985±0.521	1.112±0.665

	Semana experimental (Promedio ± Desviación estándar)						
Grupo	12	14	16	18	20	22	24
Subolesina	1.894±0.877	1.362±0.852	1.190±0.921	1.131±0.673	1.087±0.762	1.037±0.622	1.029±0.623
Control	0.432±0.272	0.304±0.271	0.374±0.275	0.448±0.244	0.570±0.426	0.496±0.362	0.556±0.343
Sub+Bm86	1.658±0.368	1.158±0.307	0.955±0.144	0.745±0.117	0.659±0.053	0.670±0.098	0.668±0.154
Bm86	1.014±0.554	0.959±0.447	0.948±0.497	0.910±0.440	0.931±0.409	0.888±0.430	0.873±0.4179

Anexo 2. Registros de precipitación pluvial (mm) acumulada mensual durante el periodo experimental para Martínez de la Torre, Veracruz, México (CONAGUA, 2019).

	Precipitación pluvial (mm) total acumulada mensual							
Meses del periodo experimental	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Total
Año 2019	146.54	42	24.82	52.31	338.72	161.2	42.11	807.7
Periodo 1951-2010								
Normal	126.3	152.1	154.8	315.4	226.8	161.9	100.0	1237.3
Máxima mensual	387.6	456.3	406.0	729.1	721.5	477.3	322.8	