



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

**“Desarrollo de un inmunógeno recombinante a partir de un fragmento de
la proteína Bm86 de la garrapata *Rhipicephalus microplus* y evaluación de
su capacidad inmunogénica en bovinos”**

TESIS

Que para optar por el grado de
Maestro en Ciencias

PRESENTA

Raymundo Coate Camacho

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. Moisés Martínez Velázquez

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



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.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a todos los que estuvieron a mi lado mientras esta idea se convertía en realidad. En especial, a mi familia y amigos, quienes me apoyaron y alentaron a pesar de los desafíos y múltiples problemas.

También quiero dedicarla a las nuevas amistades que hice en este viaje; no esperaba encontrar personas tan memorables, y ahora las considero más que mis amigos.

Especial y personalmente está dedicada a aquellos que ya no están. Desearía que pudieran ver esto, que fueran parte de esto y me acompañaran en futuras aventuras... Es momento de seguir adelante.

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la realización de este proyecto.

Al Dr. Rodolfo Lagunes Quintanilla, mi tutor principal, quien me brindó la oportunidad de trabajar en su laboratorio y adentrarme en un campo de investigación que, aunque me resultaba familiar, no lo dominaba del todo. Su paciencia y ejemplar guía me permitieron descubrir nuevas perspectivas que espero continuar desarrollando. Le estoy profundamente agradecido y aspiro a poder retribuir su apoyo en el futuro.

Al Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz, miembro de mi comité tutorial, quien desempeñó un papel fundamental al proporcionarme valiosos conocimientos y apoyo en el campo. Siempre estuvo dispuesto a aclarar mis innumerables dudas sobre el experimento, y permitió que un biólogo sin experiencia pudiera formar parte de su centro de trabajo.

Al Dr. Moisés Martínez Velázquez, quien contribuyó de manera significativa en la búsqueda de bibliografía, ofreció consejos clave en el tema molecular y brindó su experiencia en la redacción de la tesis, lo cual hizo que este recorrido fuera mucho más llevadero.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de su Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, le agradezco por permitirme continuar persiguiendo este sueño.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero brindado a través de la beca que sustentó mis estudios de posgrado y por los valiosos cursos que ofrecieron.

Al CENID-PAVET, INIFAP por permitirme hacer uso de sus instalaciones, igualmente al equipo de la Unidad de Artropodología por su apoyo y acertadas indicaciones para el desarrollo de la investigación.

Al CEIEGT-FMVZ-UNAM, un entorno excepcional para el aprendizaje y la práctica, con distinguidos investigadores, trabajadores entregados a su labor y brillantes compañeros. Quisiera expresar un reconocimiento personal al Dr. Jesús Jarillo Rodríguez y el Dr. Agustín Fernández Salas, quienes siempre estuvieron dispuestos a brindarme consejo y asistencia. Asimismo, la Dra. Mariana Isabel Olivares Salazar, cuyo conocimiento en el campo de la parasitología resultó esencial y que además se convirtió en una gran amiga.

Por último, quiero dar un agradecimiento especial a la Dra. Nancy Mendoza Martínez, quien no solo me enseñó todo lo que necesitaba saber sobre bovinos y garrapatas, sino que también brindó un apoyo incondicional al desarrollo del trabajo en campo. No exagero al afirmar que el 50% de este proyecto se logró gracias a sus aportes significativos. Te agradezco enormemente por tu compañía y ayuda; nunca lo olvidaré.

Gracias.

Resumen

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es un ectoparásito de amplia distribución que tiene un impacto significativo en la producción ganadera. El uso de acaricidas es el método de control principal, sin embargo, su uso extensivo ha llevado a la selección de poblaciones resistentes, además de causar contaminación ambiental y de productos derivados del ganado. En este contexto, las vacunas contra garrapatas representan una alternativa ecológica, segura y económica para coadyuvar al control de las infestaciones de *R. microplus*. No obstante, la efectividad de estas se ve afectada por la variabilidad genética de estos ectoparásitos.

En este estudio, se evaluó la inmunogenicidad de un polipéptido conservado derivado de la proteína Bm86 a partir de la cepa mexicana "media joya" de *R. microplus*. Doce vacas fueron asignadas a tres grupos experimentales de cuatro animales cada uno. El grupo 1 fue inmunizado con el polipéptido Bm86 (pBm86), el grupo 2 como control, recibió adyuvante/PBS y el grupo 3 recibió el inmunógeno Bm86 completo. Se aplicaron tres dosis a cada animal los días 0, 30 y 50. De manera paralela, se midieron los niveles de anticuerpos IgG específicos mediante ensayos de ELISA indirecto y se confirmaron mediante la técnica de Western blot. Además, se realizó la detección de la proteína nativa Bm86 en muestras de huevos, larvas e intestinos de *R. microplus* mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-pBm86.

Los resultados mostraron que el polipéptido de Bm86 fue inmunogénico y que los anticuerpos IgG anti-pBm86 fueron capaces de reconocer a la proteína nativa Bm86 en los tejidos de *R. microplus*. Aunque la cantidad de anticuerpos obtenidos no fue óptima, estos resultados demuestran la inducción de una respuesta inmune específica, al reconocer los epítomos de interés en tejidos de diferentes estadios de la garrapata. Finalmente, estos resultados respaldan la realización de nuevos experimentos con este polipéptido para demostrar su eficacia como vacuna.

Abstract

The tick *Rhipicephalus microplus* is a widely distributed ectoparasite that has a significant impact on livestock production. The use of acaricides is the primary control method; however, their overuse has led to the selection of resistant populations, in addition to causing environmental contamination and contamination of livestock-derived products. In this context, tick vaccines represent an ecological, safe, and cost-effective alternative to contribute to control *R. microplus* infestations. Nevertheless, the effectiveness of these vaccines is influenced by the genetic variability of these ectoparasites.

In this study, the immunogenicity of a conserved polypeptide derived from the Bm86 protein, obtained from the Mexican strain "media joya" of *R. microplus*, was evaluated. Twelve cows were allocated into three experimental groups, each consisting of four animals. Group 1 was immunized with the Bm86 polypeptide (pBm86), Group 2 served as a control and received adjuvant/PBS, and Group 3 received the complete Bm86 immunogen. Three doses were administered to each animal on days 0, 30, and 50. In parallel, levels of specific IgG antibodies were measured through indirect ELISA assays and confirmed using the Western blot technique. Furthermore, the detection of native Bm86 protein in samples of eggs, larvae, and intestines of *R. microplus* was carried out using Western blot with anti-pBm86 antibodies.

The results demonstrated that the Bm86 polypeptide was immunogenic, and the anti-pBm86 IgG antibodies were capable of recognizing the native Bm86 protein in *R. microplus* tissues. Although the quantity of obtained antibodies was not optimal, these findings demonstrate the induction of a specific immune response by recognizing target epitopes in tissues from different stages of the tick. Ultimately, these outcomes endorse the undertaking of further experiments with this polypeptide to establish its vaccine efficacy.

Índice

I.	Introducción	1
II.	Marco Teórico	4
2.1	Importancia de las garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> en el ganado mexicano	4
2.2	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	6
2.3	Morfología, taxonomía y genética	7
2.3.1	Origen y distribución geográfica	8
2.3.2	Ciclo de vida.....	11
2.4	Métodos de control	12
2.4.1	Resistencia a garrapaticidas.....	14
2.5	Control inmunológico	16
2.5.1	Desarrollo de vacunas basadas en Bm86.....	17
2.5.2	Respuesta inmune a la vacuna de Bm86	20
III.	Justificación.....	22
IV.	Hipótesis.....	23
V.	Objetivos	24
5.1	Objetivo General.....	24
5.2	Objetivos Específicos	24
VI.	Materiales y Métodos	25
6.1	Producción del polipéptido recombinante Bm86.....	25
6.1.1	Cultivo e inducción de células competentes BL21 Star (DE3)	25
6.1.2	Purificación y preparación del péptido recombinante	25
6.1.2.1	Gel de poliacrilamida SDS-PAGE	25
6.1.2.2	Western blot	26
6.1.2.3	Purificación del péptido recombinante	26

6.2	Lugar de experimentación en campo	27
6.3	Animales en experimentación.....	28
6.4	Ensayo de inmunización	28
6.5	Muestras de sangre.....	28
6.6	Cinética de anticuerpos por ELISA indirecto	29
6.7	Detección de la proteína Bm86 en tejidos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	30
6.8	Análisis estadístico	31
VII.	Resultados	32
7.1	Expresión del polipéptido de Bm86.....	32
7.2	Purificación y producción del inmunógeno	33
7.3	Respuesta inmune humoral, cinética de anticuerpos por ELISA indirecto.....	33
7.4	Detección de la proteína nativa Bm86 en tejidos de garrapata <i>R. microplus</i>	34
VIII.	Discusión	37
IX.	Conclusiones	46
X.	Bibliografía.....	47

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	12
Figura 2. Expresión del polipéptido recombinante de Bm86 en <i>E. coli</i>	32
Figura 3. Concentración de anticuerpos en suero de bovinos.	34
Figura 4. Reconocimiento de la proteína Bm86 nativa mediante Western blot.	36

Abreviaturas

<i>R. microplus</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
PIB.....	Producto Interno Bruto
ADN.....	Ácido Desoxirribonucleico
ARN.....	Ácido Ribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA.....	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
IPTG.....	IsoPropil- β -D-1 TioGalactopiranosido
TBS.....	Tris amortiguador salino
PBS.....	Solución amortiguadora de fosfatos
6X-His.....	Etiqueta de poli-histidina
pBm86.....	Polipéptido de Bm86
Anti-His.....	Anti-histidinas

I. Introducción

Las infestaciones de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) en el ganado bovino tienen implicaciones tanto en el ámbito sanitario como en el económico. El comportamiento hematófago de estos artrópodos ejerce efectos directos e indirectos en los animales parasitados (Little, 2011). El impacto directo se relaciona con la acción traumática de la perforación cutánea causada por la garrapata, seguida de su actividad hematófaga, la cual puede resultar en anemia, pérdida de apetito y retraso en el crecimiento de los animales. Estos efectos, presentes en casos de infestación moderada o alta, se atribuyen también al estrés causado por los parásitos. Además, las garrapatas pueden causar daños en la calidad de la piel disminuyendo el valor de ésta (Betancur Hurtado & Giraldo-Ríos, 2019).

El efecto indirecto está relacionado con la capacidad de las garrapatas de transmitir microorganismos tales como bacterias, virus, protozoos y helmintos, a través de su saliva o al facilitar la entrada de infecciones mediante lesiones cutáneas. En estos casos, el vector puede formar parte del ciclo biológico del patógeno o simplemente provocar una transmisión mecánica del mismo (Little, 2011). Es precisamente este efecto indirecto el responsable de la mayor parte del daño al ganado y, por consiguiente, a la economía. Las garrapatas son los principales vectores de enfermedades en animales, por lo tanto, es de vital importancia su estudio y control (Yu et al., 2015).

En la actualidad, existen tres métodos de control de garrapatas: El método principal es el control químico, el cual se basa en el uso de garrapaticidas que han demostrado ser altamente efectivos en la eliminación inmediata de los ectoparásitos. Sin embargo, este enfoque presenta problemas de contaminación tanto en el medio ambiente como en los productos derivados del ganado. Además, su uso a menudo conduce a un fenómeno de selección en las poblaciones de garrapatas, lo que resulta en la aparición de poblaciones resistentes a estos agentes químicos (ixodicidas) (Tramboo et al., 2021).

Una alternativa al uso de acaricidas es el control por prácticas fundamentadas en observaciones y experimentos, que incluyen métodos tradicionales, como la rotación de potreros, quema controlada de pastizales, eliminación de maleza y la cría de animales especialmente resistentes a las infestaciones de garrapatas, así como el diseño de cercos que

impiden el paso del ganado, posiblemente infestado, de un lugar a otro (Showler & Saelao, 2022).

Existe el control biológico, el cual se basa exclusivamente en el uso de organismos vivos con el propósito de eliminar ectoparásitos. Este enfoque ha demostrado buenos resultados. Consiste en utilizar especies depredadoras de las garrapatas, que incluyen hongos, nematodos, bacterias y otros artrópodos como hormigas y avispa. Sin embargo, es importante destacar que se trata de una forma de ingeniería ecológica que requiere un manejo preciso para evitar daños a las cadenas tróficas locales (Goolsby et al., 2015; Samish et al., 2008; Showler & Saelao, 2022).

Desde finales de los años 80, se ha investigado y aplicado el control inmunológico, el cual se fundamenta en el uso de estrategias de tecnología recombinante. Este enfoque tiene como objetivo identificar antígenos poco variables en la especie objetivo y posteriormente desarrollar inmunógenos específicos con capacidad protectora (Rodríguez-Valle & Guerrero, 2018). El control inmunológico puede formar parte de un programa de control integral. El uso de vacunas recombinantes es un método seguro que no deja residuos en los productos finales, no contamina el medio ambiente y no representa riesgos para la salud, tanto de los animales como para las personas involucradas, como trabajadores y clientes (Pereira et al., 2022).

El inmunógeno más estudiado y que ha mostrado resultados prometedores es la proteína Bm86 presente en el intestino de la garrapata *R. microplus*. Esta proteína se considera un antígeno "oculto", ya que no tiene contacto con la respuesta inmune del hospedador. Fue descubierta en 1986 y su éxito ha llevado al desarrollo de vacunas comerciales que utilizan esta proteína como inmunógeno. Estos productos han mostrado diversos niveles de eficacia y, al combinarse con estrategias de análisis modernas, se presentan como una alternativa viable ante la posible propagación de la resistencia a los ixodicidas en las poblaciones de *R. microplus* (de la Fuente et al., 2007; R. E. Lagunes-Quintanilla & Bautista-Garfías, 2019; León-Clavijo & Hernández-Rojas, 2012; Rand et al., 1989; Willadsen et al., 1989, 1995).

En México, se han identificado 82 especies de garrapatas que parasitan regularmente tanto a animales domésticos como salvajes. Sin embargo, es importante destacar que *Rhipicephalus microplus* es la especie que genera los mayores problemas económico-sanitarios en la

producción bovina a nivel nacional (Higa et al., 2020). En las últimas décadas, la especie *Rhipicephalus microplus* ha experimentado una dispersión geográfica significativa. Esto se debe a una combinación de factores, que incluyen la resistencia a los garrapaticidas, el cambio climático y el movimiento de animales debido a la exportación. Esta expansión de *Rhipicephalus microplus* representa un grave problema tanto para la salud animal y humana (zoonosis) como en el ámbito económico (Dantas-Torres, 2015; Estrada-Peña & Salman, 2013). Debido a esta situación, surge la necesidad de contar con controles alternativos al uso exclusivo de ixodicidas, e incluso se plantea como una obligación realizar este cambio paulatino.

La complejidad evolutiva exhibida por parásitos como las garrapatas, junto con la gran diversidad de especies, etapas de desarrollo variables, así como su capacidad de adaptabilidad a diferentes climas y hospedadores, representan una barrera desafiante para el desarrollo de inmunógenos eficaces contra estos ectoparásitos (Rodríguez-Mallon et al., 2022).

En la última década los avances en bioinformática, permiten analizar *in silico* secuencias de ADN con el propósito de diseñar, caracterizar y seleccionar secuencias de epítomos ideales para el control de ectoparásitos. Esta estrategia permite ahorrar tiempo y recursos para realizar pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*. El uso de la bioinformática también facilita la comparación entre especies de garrapatas, lo que brinda una visión más amplia y permite descartar o confirmar posibles reacciones de inmunidad cruzada. Además, resulta útil para distinguir la variabilidad existente, incluso dentro de la misma especie, como en el caso de *Rhipicephalus microplus* (Bellgard et al., 2012; García-García et al., 1999).

Todas estas acciones, que incluyen el desarrollo de antígenos mediante enfoques *in silico*, pruebas *in vitro* y estudios *in vivo*, tienen como objetivo principal la generación de vacunas potenciales, estables y efectivas para inducir una respuesta inmune adaptativa en el ganado bovino. Estas vacunas representarán una herramienta clave en el control de las garrapatas y serán fundamentales en la lucha contra la resistencia que estos ectoparásitos han desarrollado frente a los garrapaticidas utilizados en el método tradicional de control.

II. Marco Teórico

2.1 Importancia de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* en el ganado mexicano

La ganadería de bovinos como actividad económica es de suma importancia para nuestro país, si bien su aportación al PIB no es decisiva, sí sostiene parte de la seguridad alimentaria nacional y es parte importante de la dinámica social en las áreas rurales. México es el 6to lugar mundial en consumo de carne de bovino y el 7mo en producción, siendo el estado de Veracruz el más activo en este campo (Consejo Mexicano de la Carne, 2023). Dado que las zonas de producción se encuentran mayoritariamente en climas tropicales o áridos, se hace evidente la importancia de mantener al ganado en óptimas condiciones de salud y protegerlo de las diversas parasitosis que podrían afectar su rendimiento económico.

En algunos estudios se ha señalado la clara tendencia decreciente que muestra la competitividad que tiene la ganadería mexicana con respecto a otras naciones. Esto se debe, en parte, a una apertura comercial desmedida al mercado externo, creando un clima de dependencia en el abastecimiento de carne de bovino y generando un déficit amplio en la producción carne de bovino en México. La pérdida de rentabilidad de la ganadería bovina se atribuye a aumentos en los costos de materias primas, la baja en el precio de la carne bovina, tratados comerciales que han aumentado las importaciones, problemas sanitarios dada la aparición de infestaciones por garrapatas que impiden la exportación de ganado en pie, además de enfermedades como la babesiosis y anaplasmosis. Estos factores climáticos, sanitarios y económicos reflejan la amplitud de los desafíos en este negocio. Los problemas para comercializar el ganado han provocado la normalización de la dependencia alimentaria, la migración y el despoblamiento de las áreas rurales, demostrando que la situación es tanto económica como social. Es necesario un cambio de paradigma que brinde un mayor apoyo a esta actividad económica, que genera empleo, fomente nuevas empresas y promueva la autosuficiencia y seguridad alimentaria del país (Carrera-Chávez & Bustamante-Lara, 2013; Consejo Mexicano de la Carne, 2023).

Sin embargo, de acuerdo con datos proporcionados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la producción ganadera ha experimentado un incremento sostenido durante la última década. Estos datos reflejan un aumento en las

ganancias del sector en comparación con años previos, evidenciando un momento próspero para esta industria. Además, la tendencia sugiere que este crecimiento se mantendrá en el futuro (SIAP, 2022). El gobierno mexicano ha enfatizado la relevancia de esta actividad económica, destacando la producción de carne como "la labor más diseminada en el medio rural" (FRC, 2017). Estos datos están en sintonía con informes gubernamentales que resaltan esfuerzos de modernización en la pasada década, abarcando áreas como infraestructura, control sanitario y mejoramiento genético en el sector ganadero, impulsados a través de diversos fideicomisos. (*Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*, 2017).

En México se han identificado 82 especies de garrapatas que infestan animales domésticos y salvajes, siendo las más relevantes *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma mixtum* (Higa et al., 2020). En el caso de *R. microplus*, también conocida como la garrapata común del ganado, es un parásito especializado en atacar al ganado bovino. Aunque puede completar su ciclo de vida en otros hospedadores de forma temporal, se ha observado que las poblaciones de garrapatas en estos hospedadores eventuales no alcanzan el mismo volumen que en los hospedadores ideales. Esta garrapata ocasiona importantes pérdidas económicas en la industria ganadera, especialmente en la producción de carne y leche. Este problema se atribuye tanto a su capacidad para alimentarse de sangre y debilitar a los animales como a su función como vector de enfermedades. (Betancur Hurtado & Giraldo-Ríos, 2019; Pothmann et al., 2016).

En México, la garrapata *Rhipicephalus microplus* ha generado una problemática significativa tanto para los grandes productores ganaderos como para aquellos que se dedican a la ganadería a menor escala. Este ectoparásito es responsable de ocasionar pérdidas económicas considerables, alcanzando la cifra de \$573.61 Millones de dólares anuales en nuestro país (Rodríguez-Vivas et al., 2017). El impacto económico está estrechamente relacionado con las enfermedades transmitidas por las garrapatas, las cuales generan tanto pérdidas directas como indirectas. Además, el estrés causado por la infestación de garrapatas disminuye el rendimiento de los animales. Parte de las pérdidas económicas también se atribuyen a regulaciones que implican la confiscación de productos con residuos de ixodícidas, restricciones en la movilidad y venta de ganado infestado, así como los gastos asociados al

tratamiento de enfermedades transmitidas por este vector (Betancur Hurtado & Giraldo-Ríos, 2019).

Las garrapatas y su alimentación hematófaga generan lesiones que actúan como puertas de entrada para diversos patógenos. Algunos de éstos pueden transportarse dentro de la garrapata y formar parte fundamental de su ciclo de vida, mientras que otros son organismos oportunistas que ingresan cuando la garrapata utiliza sus quelíceros para abrir la piel del hospedador. En este sentido, las garrapatas funcionan tanto como vectores biológicos como vectores mecánicos (Little, 2011). La comunidad científica está de acuerdo en que estos ectoparásitos son el mayor vector de enfermedades en los animales tanto domésticos como salvajes y son consideradas el segundo entre los humanos después de los mosquitos (Mansfield et al., 2017; Yu et al., 2015). Estos ectoparásitos transmiten una variedad importante de patógenos que van desde especies de endoparásitos como protozoarios y helmintos hasta bacterias altamente patógenas, incluso es posible la transmisión de hongos y virus, situación que ha adquirido gran relevancia en los últimos años debido a la gran cantidad de nuevas especies recientemente descritas (Yu et al., 2015). Algunas cifras señalan que los patógenos transmitidos por garrapatas afectan al 80% del ganado en el mundo especialmente en las zonas tropicales (Estrada-Peña & Salman, 2013). Además de ser vectores de enfermedades tienen un efecto directo en los animales parasitados; inducen inflamación en el lugar de la mordedura, dermatitis, prurito, estrés, reacciones alérgicas y anemia (Rodríguez-Vivas et al., 2019). La capacidad de la garrapata como vector de enfermedades es compleja, presentado incluso transmisión vertical (transovárica) y horizontal (transstadial) (Eskezia & Desta, 2016). Las especies patógenas de mayor importancia transmitidas por *Rhipicephalus microplus* son los protozoarios *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y la bacteria *Anaplasma marginale*, causantes de la babesiosis y la anaplasmosis, respectivamente (Jongejan & Uilenberg, 2004).

2.2 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Las garrapatas son artrópodos pertenecientes a la clase *Arachnida*, orden *Acarida* y al suborden *Metastigmata*, y se dividen en 3 familias. La familia más importante es *Ixodidae*, donde se encuentra el género *Rhipicephalus* y, por ende, la especie *Rhipicephalus microplus*.

Anteriormente, esta especie era conocida como *Boophilus microplus*. Sin embargo, a través de investigaciones relacionadas con la conservación del ARN mitocondrial y la subunidad citocromo C oxidasa, se determinó que *Boophilus* sea considerado un subgénero de *Rhipicephalus* (Barker & Murrell, 2004; Murrell & Barker, 2003). A pesar de los cambios taxonómicos, es común encontrar literatura en la que los autores se refieren a estas garrapatas como *Boophilus microplus* e incluso *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, con el propósito de resaltar su importancia individual en comparación con otras garrapatas del mismo género (Willadsen, 2008).

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es un ectoparásito monoxeno que se ha adaptado eficazmente a parasitar al ganado bovino (Carvalho et al., 2016). Esta especie ha demostrado una gran capacidad de adaptación a diferentes climas y microclimas en todo el mundo, lo cual se atribuye en gran medida al cambio climático. Esta capacidad de adaptación ha resultado en un éxito reproductivo y adaptativo, lo cual conlleva graves consecuencias económicas (Estrada-Peña et al., 2005).

2.3 Morfología, taxonomía y genética

En general todas las garrapatas tienen un cuerpo redondeado sin segmentación llamado idiosoma y la región anterior llamada prosoma que es la parte anatómica que incluye el gnatoestoma, en términos simples podemos denominar este último como la cabeza de la garrapata. En el caso de los ixódidos, que incluye al género *Rhipicephalus*, se puede observar una placa de quitina que cubre la parte dorsal de la garrapata. Es importante destacar que este "escudo" está presente en los machos, cubriéndolos por completo, pero en las hembras protege una zona muy limitada. Además, las hembras son de mayor tamaño que los machos, lo que da lugar a dimorfismo sexual en los adultos (Quiroz, 2005; Walker et al., 2000).

El sistema digestivo se encuentra distribuido de forma radial por todo el idiosoma formando ciegos. Igualmente se observa un sistema excretor basado en túbulos de Malpighi igualmente radiales en el idiosoma pero que se conjuntan en el saco excretor que termina en un orificio anal. El sistema respiratorio se caracteriza por la presencia de túbulos de diámetro reducido que llegan al fluido celómico; estos túbulos forman dos tráqueas que abren en los sacos aéreos internos. El sistema reproductivo en machos contiene dos testículos que dan lugar al

espermatóforo. Las hembras solo tienen un ovario, los oviductos que salen de éste van hacia el orificio genital (Nuñez et al., 1985)

Rhipicephalus microplus carece de ornamentos en el escudo, el hipostoma en su parte ventral tiene un arreglo típico de 4 por 4 dientes por lado. En los machos, se observa una proyección caudal, presentan córnua y espinas en la coxa 1, mientras que el capítulo es de longitud reducida. Por otro lado, las hembras tienen un poro genital con forma de herradura ubicado entre las coxas 1 y 2. Al observar los adultos, se destacan características como un gnatosoma corto hexagonal, palpos más cortos que el hipostoma y la ausencia de festones (bordes dentados en la estructura caudal del idiosoma). Además, presentan espiráculos ovalados. Un rasgo distintivo de los machos es la presencia de cuatro placas adanales (Benavides-Montaña et al., 2018). También observamos que los quelíceros tienen músculos contráctiles que ayudan a su actividad de corte. Los palpos se constituyen de 4 segmentos y se encuentran a los lados del hipostoma (Nuñez et al., 1985).

El genoma de *Rhipicephalus microplus* tiene un tamaño estimado de 7.1 giga pares de bases (Gpb), que equivale a más del doble del genoma humano; el genoma de *Rhipicephalus microplus* es hasta 70% repetitivo, lo cual representa un problema al momento de secuenciar y un contratiempo para la investigación del mismo (Bellgard et al., 2012). En general está dividido en 0.82% de ADN plegado (no accesible), 31% altamente repetitivo, 38% moderadamente repetitivo y solo el 30% es no repetido (único) (Ullmann et al., 2005). Los cromosomas de *Rhipicephalus microplus*, presentan un cariotipo diploide $2n$ con 22 cromosomas para las hembras y 21 para los machos; en el caso de las hembras hablamos de 20 autosomas y 2 cromosomas sexuales (XX), en el caso de los machos son la misma cantidad de autosomas pero solo 1 cromosoma sexual (XO) (Oliver, 1977). En estos casos peculiares el sexo fenotípico es determinado por el cromosoma X (Gunn et al., 1993).

2.3.1 Origen y distribución geográfica

La especie *Rhipicephalus microplus* fue descrita por primera vez por Canestrini en 1887 bajo el nombre de *Haemaphysalis micropla* usando muestras originarias de Paraguay (Quinlan et al., 1980). Posteriormente, se llevaron a cabo estudios en África, Australia y Sudamérica, donde se describieron garrapatas similares entre sí. Los investigadores emplearon diversos

nombres para caracterizarlas, lo que causó confusión en la taxonomía. Debido a esta situación, se optó por comparar especímenes, lo cual condujo a la unificación de observaciones alrededor del mundo en una única especie, actualmente conocida como *Rhipicephalus microplus* (Estrada-Peña & Salman, 2013). La habilidad de *Rhipicephalus microplus* para colonizar nuevos hábitats es un problema clave para rastrear su origen. Esta especie exhibe una alta capacidad de resiliencia, lo que se traduce en una notable facilidad para introducirse en nuevas regiones geográficas, utilizando a sus hospedadores como vehículos y aprovechando otras especies con el mismo propósito (Barré & Uilenberg, 2010; Chevillon et al., 2013). Sin embargo, a través de investigaciones sobre infestaciones, rastreo de animales, análisis de fósiles y estudios antropológicos, se ha concluido que estas garrapatas son originarias de la región del sudeste asiático (Barré & Uilenberg, 2010), otras hipótesis indican que su evolución y diversificación comenzó en África en el mesozoico temprano hace 225 millones de años prolongándose hasta la actualidad (Kitsou et al., 2021), algunos otros lo ubican en la última parte del mesozoico, el cretácico. Incluso se cree existen desde el Paleozoico. Puntualmente, dichas investigaciones plantean que la especie *Rhipicephalus microplus* podría tener origen en África, en el terciario (Barker & Murrell, 2004; Nava, 2009). Igualmente interesante es el hecho de que las garrapatas están relacionadas con los *Holothyridos* que son un grupo de ácaros de vida libre especializados en consumir fluidos de organismos muertos, se piensa que las garrapatas se adaptaron al consumo de sangre a partir de un proceso de alimentación relacionado al consumo de hemolinfa de otros insectos (Mans & Neitz, 2004).

En 1978, se realizó un interesante experimento en el cual estimularon el apareamiento entre machos de *Rhipicephalus microplus* de Australia y hembras de Sudáfrica. Este cruce resultó en un 62% de descendencia viable. Sin embargo, cuando se invirtieron los sexos, es decir, se utilizaron hembras australianas y machos sudafricanos, la tasa de éxito se redujo a 1.82%. Estos resultados podrían sugerir un proceso de especiación alopátrica que, en un futuro relativamente lejano, podría dar lugar a la separación total de estas poblaciones, creando dos especies distintas incapaces de desarrollar descendencia fértil (Spickett & Malan, 1978). En 2009, se realizó un experimento similar que arrojó resultados equivalentes. En este caso, los cruces entre garrapatas americanas (Argentina) y africanas (Mozambique) fueron exitosos. Sin embargo, al cruzar garrapatas australianas con argentinas o mozambiqueñas, se

obtuvieron híbridos estériles, lo que demostró que las garrapatas americanas y africanas seguían siendo una misma especie, a diferencia de las australianas, que aparentemente representaban una especie separada. Estos hallazgos se respaldaron mediante el estudio molecular del ADN mitocondrial, que reveló la diferencia genética de la variedad australiana. Estos resultados confirman que la separación geográfica y ecológica puede conducir a un proceso de especiación alopátrica, que eventualmente daría lugar al surgimiento de nuevas especies (Labruna et al., 2009). Aunque aún no está claro en cuánto tiempo se desarrollaría este proceso, podría ser un indicio de la divergencia molecular que afectaría varios aspectos genéticos, incluidas proteínas de interés para el control de estos ectoparásitos.

R. microplus se ha dividido en tres clados: A, B y C. Las garrapatas del clado A representan a *R. microplus* presentes en Latinoamérica, África y el sur de Asia. El clado B corresponde a las garrapatas distribuidas en China, y el clado C se refiere a aquellas ubicadas en el suroeste de Asia (Rodríguez-Mallon et al., 2023).

Rhipicephalus microplus es una especie de garrapata con una amplia distribución pantropical posiblemente originada en el sudeste asiático (Barré & Uilenberg, 2010). Esta garrapata ha tenido la capacidad de viajar de un continente a otro, acompañando al ganado bovino en diversas exportaciones comerciales. Su adaptabilidad a climas tropicales y subtropicales le ha permitido establecerse en diferentes regiones, incluyendo áreas templadas e incluso regiones áridas donde tradicionalmente se cría ganado bovino (Alcala-Canto et al., 2018). En 1978 *Rhipicephalus microplus* se extendía entre los paralelos 30 norte y 48 sur (Nuñez et al., 1985), mediciones recientes y precisas sugieren que su distribución se concentra principalmente entre los paralelos 32 norte y 34 sur demostrando su capacidad de adaptación más allá de los límites tropicales (Fuentes-Castillo et al., 2018; Sossai et al., 2005). El cambio climático, representado por el “efecto invernadero”, genera las condiciones apropiadas para la prevalencia de multitud de parásitos tropicales, incluidas las garrapatas, fuera de sus zonas de dominio actuales. El desplazamiento del nicho ecológico hacia los polos representa una crisis sanitaria grave que probablemente se extenderá si no se logra un consenso en su control (Dantas-Torres, 2015; Morgan, 2011).

2.3.2 Ciclo de vida

Rhipicephalus microplus es una especie de garrapata que se caracteriza por requerir un solo hospedador a lo largo de su vida (Higa et al., 2020) ([Figura 1](#)). Su ciclo de vida se divide en dos fases distintas: la fase parasitaria y la fase de vida libre; la fase parasitaria en general dura 23 días. Esta garrapata se especializa en parasitar al ganado bovino, aunque también puede encontrarse en otros animales como caballos, ovejas, ciervos e incluso conejos, en el caso asiático y sudamericano se ha encontrado en búfalos de agua, sin embargo esto es en menor medida y de forma incidental cuando no logra encontrar un hospedador ideal (Benitez et al., 2012; Bowman, 2011; Ma et al., 2016). Las garrapatas *R. microplus* necesitan alimentarse de sangre en sus tres estadios de desarrollo (Eskezia & Desta, 2016). Una vez alcanzada la adultez, el apareamiento y la ingurgitación, la garrapata hembra cae del hospedador, posteriormente la hembra ingurgitada pasa por 4 etapas: preoviposición, oviposición, postoviposición e incubación seguido de la eclosión de la larva de vida libre. Durante la preoviposición, la hembra repleta busca un lugar seguro para depositar sus huevos, lo cual puede llevar entre 4 y 44 días, dependiendo de las condiciones climáticas. La oviposición ocurre aproximadamente entre los 5 y 15 días siguientes, nuevamente influenciada por las condiciones climáticas. Durante este proceso, las hembras logran depositar entre 2500 y 3000 huevos (± 1000). Después de la oviposición, la hembra entra en la fase de postoviposición, que puede durar entre 5 y 15 días hasta su muerte. El período de incubación varía entre 7 y 69 días, acortándose o prolongándose al tener mejores o peores condiciones de temperatura y humedad, aunque en general se completa en 21 días, momento en el cual las larvas de vida libre eclosionan. Estas larvas trepan por la vegetación y pueden esperar la presencia de un hospedador durante un máximo de 250 días. La supervivencia y el éxito de las garrapatas dependen en gran medida del azar, determinado por la disponibilidad de hospedadores y el clima de la región, es por esto que la cantidad de huevos depositados suele ser grande. Las garrapatas son atraídas por la presencia de CO₂. Cuando la larva de garrapata logra sujetarse, moverse y fijarse en el hospedador, comienza la fase parasitaria, que generalmente dura alrededor de 18 a 23 días. Durante este período, la larva se alimenta y se mantiene en el hospedador durante aproximadamente 3 a 4 días, luego pasa por una muda y emerge como ninfa continuando su alimentación durante ± 10 días. Una vez completado este período, las ninfas se convierten en adultos, en esta etapa se observa el dimorfismo sexual. Los machos

y las hembras se aparean, la hembra grávida continúa alimentándose hasta alcanzar la ingurgitación máxima que ocurre entre el día 21 y 23. En este momento, la hembra se desprende del hospedador, dando inicio a un nuevo ciclo (Canevari et al., 2017; Jongejan & Uilenberg, 2004; Quiroz, 2005; Rodríguez-Vivas et al., 2011).

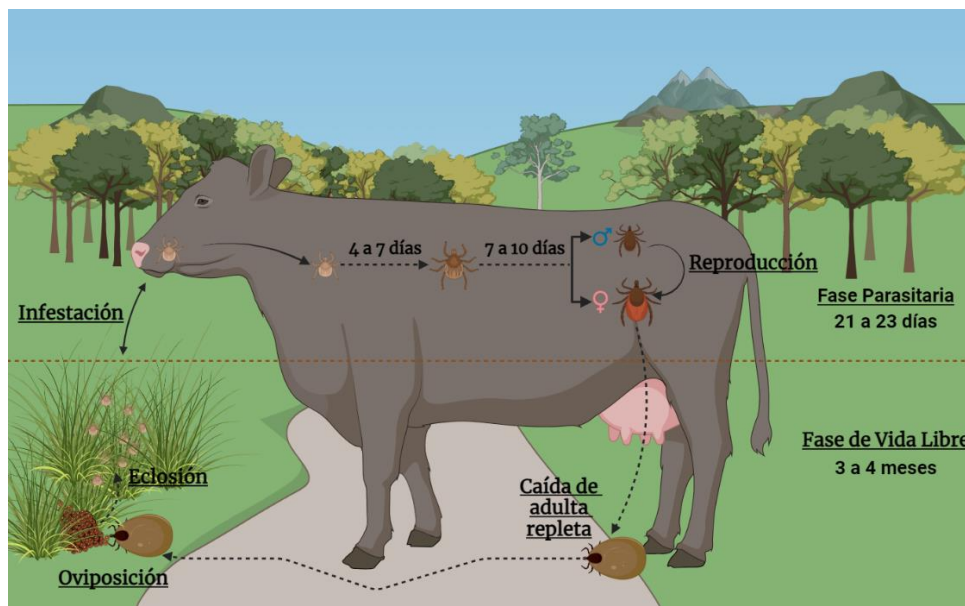


Figura 1. Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*

2.4 Métodos de control

El control de garrapatas inicialmente se llevaba a cabo mediante técnicas empíricas y métodos rudimentarios de protección tópica. Se tiene conocimiento de que los sumerios, hace 4500 años, utilizaban azufre como pesticida (Umetsu & Shirai, 2020). Sin embargo, con el desarrollo de la ganadería a gran escala, se fueron implementando y modificando diversos métodos. Entre ellos, se aplicó la prohibición de la movilidad del ganado entre regiones con enfermedades y aquellas libres de ellas. Además, se llevaron a cabo tratamientos con sustancias de origen vegetal, intentos de eliminación manual e incluso se utilizó petróleo y combinaciones como keroseno y azufre para evitar la adhesión de estos parásitos a la piel del ganado. Posteriormente, se implementaron baños con arsénico, que marcaron el inicio en forma del control químico. A mediados de la década de 1940, se desarrolló el primer organofosforado, lo que dio inicio al desarrollo y aplicación formal de este tipo de control, sentando las bases para la protección anti-garrapatas en todo el mundo (George et al., 2004).

El control químico es por excelencia el que ha obtenido los mejores resultados como garrapaticida, el desarrollo en esta área de la química ha dado como resultado la formulación de diversas sustancias con efectos inmediatos sobre estos parásitos. Todos se basan en formas naturales de moléculas que afectan estructuras específicas conservadas entre diversos artrópodos, el efecto resultante se conoce como knock-down y se basa en intoxicación, parálisis y muerte del artrópodo (Wickham et al., 1974). Sin embargo, la variedad genética de las garrapatas excede la capacidad insecticida de estos compuestos. Algunas de estas sustancias son consideradas orgánicas dado que provienen de plantas, tal es el caso de las piretrinas. Estas moléculas posteriormente fueron rediseñadas generando un compuesto sintético conocido como piretroide; esta invención ha resultado satisfactoria en el combate de las garrapatas al inhibir las funciones celulares provocando una parálisis irreversible. Posteriormente surgieron los carbamatos con efectos neurotóxicos que inhiben a la acetilcolinesterasa, esto provocan que la acetil-colina no sea liberada de la sinapsis provocando parálisis generalizada en el artrópodo. La familia de las amidinas tiene como elemento más conocido al Amitraz, que igualmente tiene un efecto sobre enzimas que regulan la eliminación de neurotransmisores, en este caso la monoamino-oxidasa (Lynn, 2011), lactonas macrocíclicas que actúan produciendo muerte por parálisis, fenilpirazolonas produciendo hiperexcitación y muerte, finalmente los inhibidores del desarrollo que, como su nombre lo indica, interrumpen fases críticas en los estadios del ciclo de vida de la garrapata (Alonso Díaz & Fernández-Salas, 2022).

Este tipo de control ha demostrado ser muy efectivo, sin embargo se ha observado que su uso prolongado y sin moderación puede generar contaminación en el ambiente y en los productos derivados de los bovinos, además de favorecer el fenómeno de resistencia en garrapatas (Sossai et al., 2005).

Cabe destacar que durante todos estos años se han usado métodos tradicionales y otras estrategias empíricas cuyo origen se remonta al mismo inicio de la ganadería; Estos métodos prácticos, que prescinden del uso de medicamentos o productos químicos, incluyen la rotación de potreros en combinación con la implementación de cercas diseñadas para impedir el paso del ganado de un área a otra, la realización de quemas controladas en praderas, la eliminación de maleza y la cría selectiva de razas particularmente resistentes a las

infestaciones de garrapatas, como *Bos indicus* (Showler & Saelao, 2022). La implementación de métodos de control, como el control químico, es una práctica constante que debe combinarse con enfoques novedosos, como el control biológico, que se fundamenta en el uso exclusivo de organismos vivos para eliminar ectoparásitos (Alonso-Díaz et al., 2022; Showler & Saelao, 2022), y el control inmunológico, que se basa en el uso de vacunas recombinantes. Estas estrategias deben complementarse para formar un enfoque integral de control, con el objetivo de interrumpir el ciclo de vida de la garrapata *R. microplus* y, en última instancia, lograr la eliminación de sus tres estadios de desarrollo (Pereira et al., 2022; Willadsen, 2008).

2.4.1 Resistencia a garrapaticidas

Las garrapatas, al igual que otros organismos parasitarios, han demostrado una notable capacidad de adaptación, reproducción y supervivencia en entornos dinámicos, cambiantes y hostiles. Estas adaptaciones están asociadas a modificaciones de nucleótidos que reflejan una notable plasticidad genética, evidente en la expresión de diversos fenotipos. Dichas modificaciones son más prominentes en poblaciones sometidas a una continua presión de selección. De hecho, la especie humana ha ejercido una influencia significativa en el desarrollo y progreso de poblaciones de garrapatas resistentes, gracias al uso de ixodicidas. Este fenómeno puede considerarse una forma de "selección artificial" en la cual las dinámicas de las poblaciones de estos ectoparásitos se moldean en respuesta a presiones de selección completamente antropogénicas. Por supuesto en este caso no es algo voluntario, todo lo contrario, es un efecto negativo en nuestros intentos por erradicar esta plaga (Centenaro et al., 2022; Diyes & Rajakaruna, 2016).

El fenómeno de resistencia se manifiesta cuando una presión de selección intensa es ejercida, resultando en la eliminación de la mayoría de la población. En nuestro caso, el uso de ixodicidas provoca la eliminación de la mayoría de las garrapatas al entrar en contacto con ellas. Sin embargo, existe un porcentaje reducido que presenta cierto grado de resistencia. Esta resistencia puede deberse a la modificación de la estructura molecular de la proteína objetivo del ixodicida, debido a mutaciones puntuales en el gen correspondiente, lo cual genera insensibilidad hacia el compuesto químico. Además, es posible que ocurra una

desintoxicación metabólica acelerada de los compuestos xenobióticos debido a la acción de enzimas esterasas u oxidasas especialmente eficientes (Rosario-Cruz & Domínguez-García, 2016). Existen otros mecanismos de resistencia en las garrapatas, como la disminución de la absorción de acaricidas debido al desarrollo de capas adicionales de quitina que físicamente impiden el paso del ixodicida (Alonso Díaz & Fernández-Salas, 2022). Además, se ha observado resistencia por comportamiento, donde las garrapatas tienen la capacidad de evadir el químico mediante acciones específicas, es decir no tener contacto con él. Es importante destacar que es posible que se presenten múltiples ejemplos de resistencia en una misma cepa de garrapatas, lo que resulta en casos de resistencia múltiple. Estas formas de resistencia adicional amplían la capacidad de las garrapatas para sobrevivir y proliferar a pesar de la exposición a los acaricidas, representando un desafío significativo en el control de estas plagas (Alonso Díaz & Fernández-Salas, 2022).

El uso indiscriminado y excesivo de acaricidas ha llevado a la aparición de poblaciones de garrapatas que presentan resistencia frente a todos los ixodicidas disponibles en el mercado (Torrents et al., 2020). Esta resistencia generalizada tiene importantes repercusiones en la propagación de enfermedades transmitidas por estos parásitos, ya que se espera un aumento continuo en la morbilidad y mortalidad asociada. Estos hallazgos resaltan la necesidad de estas estrategias de control, sin embargo, también evidencian la limitada efectividad a largo plazo de los ixodicidas actualmente útiles, debido a las malas prácticas presentes en el campo y en la industria (Rivera, 2012). Es necesario un control integral donde se presionen a estas poblaciones de garrapatas mediante diferentes estrategias de control, con el fin de asegurar la eliminación paulatina, progresiva y total de las garrapatas.

El fenómeno de resistencia en garrapatas ha sido objeto de estudio en el territorio nacional desde su primer registro en 1981 en Tuxpan, Veracruz. En aquel entonces se identificó una cepa con resistencia a los organofosforados. Posteriormente, se observó la aparición de resistencia a los piretroides en Tamaulipas y Tabasco, en 1993. Con el paso del tiempo, esta adaptabilidad se extendió a los ixodicidas más modernos, como las amidinas en el año 2001, seguidas de las lactonas macrocíclicas, que incluyen a las ivermectinas (Alonso-Díaz et al., 2006; Rodríguez-Vivas et al., 2018). Estas evidencias revelan una emergencia de gran magnitud en el panorama de la resistencia, que es comparable con la problemática observada

en las bacterias y su preocupante resistencia a antibióticos. Se hace necesario comenzar a emplear alternativas de control tales como el impulso a las prácticas culturales, la promoción del mantenimiento de la fauna local en campo, con el propósito de favorecer una dinámica de depredación sobre las garrapatas, así como la vacunación con antígenos y el mantenimiento de la inmunidad a base de refuerzos periódicos (Rosario Cruz et al., 2022).

2.5 Control inmunológico

Este tipo de control se basa en el uso de vacunas diseñadas para inducir la producción de anticuerpos específicos que puedan reconocer y neutralizar componentes importantes de las garrapatas. Al dirigirse a proteínas clave no redundantes, se logra desestabilizar por completo el sistema biológico del parásito, lo que resulta en efectos adversos a corto y largo plazo. A lo largo del siglo pasado, se han desarrollado enfoques de vacunación que han llevado al descubrimiento de estructuras de interés en la garrapata *R. microplus*, siendo la proteína Bm86 la más destacada y la única que se ha consolidado como un producto comercial. La eficacia de estas vacunas puede variar, pero en general se ha observado un impacto positivo en el control de las infestaciones por garrapatas (Nuttall et al., 2006; Rodríguez-Mallon, 2023).

Las vacunas desarrolladas pueden producirse utilizando sistemas tanto eucariotas como procariotas. En la industria, la plataforma *Pichia pastoris* es la principal, mientras que cepas modificadas de *E. coli* se emplean en la investigación y desarrollo temprano. Por lo general, se utilizan proteínas Bm86 completas de garrapatas obtenidas de la zona geográfica de interés donde se aplicará la vacuna. Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto el uso de fragmentos específicos de la proteína e igualmente conservados entre diferentes cepas de la zona donde se pretende implementar el inmunógeno. Estas regiones peptídicas se eligen de manera que tengan una mayor probabilidad de contener epítomos inmunogénicos, al mismo tiempo deben ser conservadas y estables. Una vez que la vacuna es administrada al ganado bovino, se desencadena una respuesta inmunológica humoral. Los anticuerpos producidos circulan por la sangre y son consumidos por las garrapatas adheridas al bovino inmunizado. Se espera que, dentro de la garrapata, los anticuerpos formen complejos antígeno-anticuerpo y activen proteínas del sistema del complemento, para posteriormente lisar las células

epiteliales del intestino (De La Fuente & Merino, 2013; Nuttall et al., 2006; Valdez-Espinoza et al., 2021).

Como se mencionó anteriormente, los anticuerpos generados en respuesta a la proteína Bm86 y la activación del sistema de complemento, resultan en la lisis de la célula epitelial con daño a la pared intestinal de la garrapata. Este efecto tiene como objetivo principal reducir la capacidad de ingurgitación del parásito, lo cual tiene un impacto directo en su viabilidad, formación de huevos, oviposición y eclosión. Además, se ha observado que la proteína Bm86 también puede estar presente en las estructuras sexuales de la garrapata hembra, lo que sugiere que la acción del inmunógeno podría afectar directamente la formación de huevos en el ovario. En última instancia, este enfoque contribuye a una disminución gradual de las infestaciones al reducir la capacidad reproductiva del parásito (Fuentes-Castillo et al., 2018; Marcelino et al., 2012; Trambo et al., 2021).

El efecto positivo de la vacuna se evidencia mediante la reducción en el número de garrapatas ingurgitadas, la cantidad de sangre extraída y, especialmente, en la cantidad y calidad de los huevos depositados por las hembras. Es importante destacar que el efecto de la vacuna difiere del de los ixodicidas, los cuales eliminan directamente a los parásitos mediante una acción casi inmediata. La vacuna, por su parte, actúa al afectar la capacidad de alimentación de las garrapatas hembras y, en consecuencia, su eficacia biológica “fitness”. El impacto en la capacidad reproductiva de las garrapatas contribuye a una disminución gradual de las infestaciones, al debilitar su capacidad de establecer y mantener poblaciones viables en el ganado u otros hospedadores (Domingos et al., 2013; Duval & Hübner, 2022).

2.5.1 Desarrollo de vacunas basadas en Bm86

La investigación sobre el control inmunológico de garrapatas se ha llevado a cabo durante aproximadamente 84 años. No obstante, los primeros registros y observaciones formales sobre el fenómeno de la resistencia natural a las garrapatas datan de al menos un siglo atrás (Johnson & Bancroft, 1919; Trager, 1939).

Posteriormente, tras múltiples intentos de desarrollar un enfoque inmunológico, se llevaron a cabo experimentos con el objetivo de inducir una respuesta inmune contra antígenos

presentes en la saliva y órganos de la garrapata. Sin embargo, se observó una amplia variación entre los antígenos salivales. A lo largo de miles de años de selección y contacto con el sistema inmune de los hospedadores, estos antígenos se han especializado en variar de un individuo a otro, con el propósito de evadir las defensas del organismo. Es importante destacar que la garrapata también utiliza hormonas, enzimas y otras proteínas capaces de atenuar la respuesta inmune del hospedador. Estos mecanismos le permiten a la garrapata garantizar su alimentación y supervivencia, al debilitar o eludir la respuesta inmune del hospedador. Ante este panorama, se decidió dirigir la investigación hacia los antígenos ocultos. Se esperaba que estos antígenos presentaran una variabilidad menor en comparación con los antígenos salivales, debido a su ubicación dentro de la garrapata y por ende menor exposición al sistema inmune del hospedador. Este enfoque buscaba identificar antígenos que pudieran ser más estables y consistentes en su capacidad inmunogénica, brindando así oportunidades prometedoras para el desarrollo de estrategias inmunológicas contra las garrapatas (Allen & Humphreys, 1979; Trager, 1939; Willadsen et al., 1989).

Con un peso de ~72 kDa en su forma no procesada, ~86 kDa en su forma nativa y constituida de 650 aminoácidos, el descubrimiento de Bm86 en 1986 (publicado hasta 1989) y su posterior éxito en pruebas de campo, abrió un panorama totalmente nuevo al desarrollo de vacunas antigarrapatas. Bm86 es considerado un antígeno "oculto" debido a su localización en las células epiteliales del intestino de la garrapata *R. microplus*. Algunos autores también lo describen como una combinación de "oculto" y "expuesto", ya que se encuentra en un tejido, que si bien se ubica dentro de la garrapata, mantiene contacto con elementos del exterior y la proteína Bm86 en sí misma tiene presencia extracelular (Tabor, 2019). Al conjuntar la tecnología del ADN recombinante y la genómica, se desarrolló la primer vacuna comercial de la historia contra un ectoparásito, marcando el camino para esta y otras líneas de investigación (Lightowlers, 2021; Rand et al., 1989; Willadsen, 2008).

En la década de los años 90 se desarrolló y registró en Australia la primera vacuna comercial contra garrapatas basada en Bm86. Este logro fue posible gracias a la colaboración entre la industria y grupos de investigación científica. La vacuna recibió el nombre de TICKGARD® (Hoechst Animal Health, Australia). Posteriormente, se desarrolló la vacuna GAVAC® (Heber Biotec S.A., La Habana, Cuba), la cual se basó en la vacuna australiana y utilizó cepas

locales para generar el efecto protector en Latinoamérica. La vacuna TICKGARD® marcó un hito importante en el desarrollo de vacunas contra garrapatas y abrió el camino para futuras investigaciones y avances en este campo; sin embargo, su éxito se vio severamente limitado y GAVAC® surgió como una mejor opción dada la efectividad demostrada tanto en estudios controlados en laboratorio como en campo (Canales et al., 1997; de la Fuente et al., 2007; Ferreira-Leal & Sanchez-Ferreira, 2021; Lightowlers, 2021).

Posteriormente, se desarrollaron nuevos enfoques de vacunación, que van más allá de la utilización exclusiva de la proteína completa Bm86. Entre estos enfoques se encuentran variantes de Bm86 y otras proteínas, como la Subolesina (Kabi et al., 2022; Lagunes et al., 2016; Merino-Charrez et al., 2019). Como resultado de estos avances, se ha llegado a la conclusión de que es posible atacar múltiples sistemas de la garrapata mediante la utilización de una amplia variedad de antígenos. Este enfoque de vacunación múltiple se basa en la idea de que, al emplear una cantidad considerable de antígenos, se puede lograr una respuesta inmune más efectiva. En algunos casos, se han utilizado conjugados que combinan varios antígenos de diferentes tipos macromoleculares, incluyendo péptidos, glúcidos y lípidos (Willadsen, 2008). La conjugación de la proteína P0 con Bm86 representa un ejemplo notable y prometedor. Sin embargo, a pesar de sus alentadores resultados, su implementación a nivel de campo aún parece distante (Rodríguez-Mallon et al., 2022).

Estos avances en la diversificación de los antígenos utilizados en las vacunas representan una estrategia prometedora para mejorar la eficacia de la inmunización. Al dirigirse a múltiples sistemas de la garrapata, se busca incrementar la protección y reducir la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmunológica (Parthasarathi et al., 2021). El diseño de inmunógenos independientes de estructuras proteicas íntegras, como lo es el desarrollo de antígenos sintéticos a partir de Bm86 constituye el eje fundamental en las investigaciones contemporáneas sobre inmunógenos antigarrapatas (Patarroyo et al., 2002, 2020).

Estas investigaciones continúan avanzando en la búsqueda de combinaciones óptimas de antígenos y en la evaluación de su eficacia en el control de estas parasitosis. El desarrollo de enfoques de vacunación más complejos y personalizados representa un paso importante hacia el manejo efectivo de las infestaciones de garrapatas y la reducción del impacto de estas

plagas en la salud animal y humana (Parthasarathi et al., 2023; Rodríguez-Mallón et al., 2020; Willadsen, 2008).

El empleo de vacunas se considera una de las alternativas más prometedoras en el campo, no obstante, persiste cierta reticencia por parte de los productores debido a que no brinda un efecto inmediato y se requiere complementarlo con un control químico. Aunque los acaricidas logran la eliminación de los estadios parasitarios de las garrapatas, no resultan efectivos contra las larvas de vida libre, lo que implica que la amenaza no es completamente erradicada, lo que a su vez conlleva a un uso continuo del producto y, en consecuencia, al desarrollo de resistencia. En cambio, en el caso de la vacuna, si bien su efecto puede tardar en manifestarse, éste se acumula progresivamente, ya que la eficacia biológica de *R. microplus* se deteriora de generación en generación, alcanzando un punto en el cual resulta más sencillo eliminar tanto los estadios de vida libre como los parasitarios (Suarez et al., 2016).

2.5.2 Respuesta inmune a la vacuna de Bm86

La investigación en vacunas contra garrapatas se origina a partir de observaciones en las que se evidenciaba la resistencia natural del ganado a estos parásitos, después de múltiples infestaciones. Estas observaciones condujeron a estudios de diversas estructuras de las garrapatas con potencial antigénico, y aunque la respuesta inmune puede variar según el antígeno, existen muchas similitudes entre ellas. En términos generales, los efectos de la vacuna en las garrapatas son similares a los observados en la resistencia natural a estos ectoparásitos. Esto se refiere al hecho de que las garrapatas no logran alimentarse adecuadamente, lo cual prolonga su tiempo en el hospedador en un intento fallido de repletarse. Además, la vacuna tiene efectos sobre el desarrollo de las garrapatas al inhibir la muda, en algunos casos ocasiona la muerte de las garrapatas durante la alimentación, reduce la cantidad de huevos producidos y disminuye la tasa de eclosión de los mismos (Karasuyama et al., 2020).

La acción de la vacuna se inicia al ser administrada en el hospedador, momento en el cual el adyuvante libera gradualmente el antígeno y provoca una respuesta inflamatoria local. El antígeno Bm86 es internalizado por células presentadoras de antígeno, como las células

dendríticas o los macrófagos. Estas células se activan y presentan fragmentos del antígeno procesado a través del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) en su superficie. Posteriormente, migran hacia los ganglios linfáticos, donde presentan estos fragmentos a los linfocitos T vírgenes, los cuales se activan y se desplazan hacia los centros germinales. En los centros germinales, los linfocitos T activados estimulan la diferenciación de los linfocitos B vírgenes en células plasmáticas efectoras y células B de memoria. Las células plasmáticas efectoras se desplazan hacia la médula ósea, donde comienza la producción de anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno Bm86 (Ndawula, 2021).

Una vez que el anticuerpo se une al antígeno Bm86, ocurre una cascada de activación donde el sistema de complemento actúa generando poros y dañando la membrana celular del tejido epitelial del intestino (Ferreira-Leal & Sanchez-Ferreira, 2021). Es importante destacar que las vacunas recombinantes requieren el uso de adyuvantes para facilitar el transporte, potenciar la respuesta inmune y mantener la acción antigénica a largo plazo (Shi et al., 2019).

Naturalmente, la garrapata ha desarrollado una serie de mecanismos de defensa que incluyen proteínas de unión a inmunoglobulinas. Estas estructuras defensivas se unen a los anticuerpos producidos por el hospedador (IgG) y los transportan desde el intestino a la hemolinfa, y posteriormente a las glándulas salivales, desde donde son reingresados al hospedador (Ferreira-Leal & Sanchez-Ferreira, 2021). Además, la garrapata ha desarrollado proteasas que tienen la capacidad de eliminar tanto los anticuerpos como las proteínas del sistema de complemento antes de que puedan unirse y llevar a cabo su acción (Popara et al., 2013).

III. Justificación

El control inmunológico ha sido reconocido como una alternativa prometedora para contrarrestar la creciente resistencia a los ixodicidas. En la actualidad, el desarrollo de inmunógenos basados en el análisis *in silico* de regiones específicas del ADN, conocidas por dar lugar a proteínas con actividad antigénica, se ha convertido en una herramienta recurrente y de alto valor tanto en investigación básica como en la industria farmacéutica. En el caso de las vacunas antigarrapatas, existen productos comerciales que se basan en el antígeno Bm86, sin embargo, su eficacia se encuentra limitada debido a la presencia de polimorfismos en el gen codificador de dicha proteína, lo cual las hace menos efectivas en ciertas regiones del mundo donde el polimorfismo alcanza porcentajes altos. Por consiguiente, consideramos de vital importancia el diseño, producción y evaluación de antígenos vacunales obtenidos a partir de cepas locales con una variabilidad genética mínima y un potencial protector superior a la vacuna comercial.

IV. Hipótesis

El polipéptido derivado de la proteína Bm86 generará una respuesta inmune humoral en los bovinos superior a la generada por el inmunógeno completo de Bm86.

V. Objetivos

5.1 Objetivo General

Desarrollo de un polipéptido recombinante derivado de la proteína Bm86 y evaluación de su capacidad inmunogénica específica a la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

5.2 Objetivos Específicos

- Expresar el inmunógeno experimental derivado a partir de la proteína Bm86.
- Evaluar la capacidad de inducir una respuesta inmune humoral específica en bovinos, del inmunógeno experimental de Bm86 en bovinos mediante las técnicas de ELISA indirecto y Western blot.

VI. Materiales y Métodos

La fase experimental del presente estudio se llevó a cabo en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Número 8534, Col. Progreso, C.P. 62550, Jiutepec, Morelos, México. La parte práctica en campo se realizó en el 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 kilómetro 5.5 de la Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, México.

6.1 Producción del polipéptido recombinante Bm86

6.1.1 Cultivo e inducción de células competentes BL21 Star (DE3)

Las células de *E. coli* BL21 Star (DE3) conteniendo el plásmido recombinante con el fragmento de BM86 (pET101-fBM86), fueron inoculadas en medio líquido Luria Bertani (LB), al cual se le añadió ampicilina en una concentración de 50 µg/ml. Posteriormente, el cultivo fue incubado a una temperatura de 37°C y una velocidad de agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de O.D. 600 = 0.5, una vez que el crecimiento del cultivo se encontró en este rango, se procedió a añadir isopropil-β-D-1tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1 mM. La incubación del cultivo continuó durante 5 horas, manteniendo las mismas condiciones de temperatura y velocidad de agitación antes mencionadas. Este periodo de incubación permitió inducir la expresión del péptido recombinante. Para finalizar, las células fueron recolectadas mediante centrifugación y se conservaron a una temperatura de -20°C, con el propósito de analizarlas posteriormente mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Lagunes et al., 2016).

6.1.2 Purificación y preparación del péptido recombinante

6.1.2.1 Gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Las pastillas celulares fueron reconstituidas utilizando un tampón de lisis SDS-PAGE 1X que consiste en SDS al 10%, 2β mercaptoetanol a 10 mM, glicerol al 100%, Tris-HCl al 0.2 M y

azul de bromofenol al 0.05%. La proporción utilizada fue de 1:1 (muestra:amortiguador). Antes de cargar las muestras en el gel, se sometieron a baño María a 90°C durante 5 minutos. Luego, se analizaron en un gel SDS-PAGE al 15% siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). Se incluyeron muestras control en el gel para validar los resultados y facilitar la identificación visual del péptido en estudio. Estos controles consistieron en cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) sin inductor (IPTG). La tinción se realizó con azul de Coomassie durante 50 minutos, seguido de un lavado con metanol : ácido acético durante 12 horas y posteriormente con agua destilada. Se utilizó un marcador de peso molecular para proteínas (6-200 kDa) Broad Range[®], Bio-Rad.

6.1.2.2 Western blot

Después de realizar la separación de las proteínas mediante un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15%, se procedió a su visualización y transferencia a una membrana de nitrocelulosa aplicando una corriente de 100 V durante 2 horas. Con el fin de determinar la masa molecular de las proteínas, se utilizó un marcador de peso molecular previamente teñido para proteínas en el rango de 10 a 180 kDa denominado Page Ruler[®] (Fermentas, Waltham, MA, USA). Para bloquear la membrana de nitrocelulosa, se empleó una solución de leche descremada al 5% en Tris amortiguador salino (TBS) con pH 8.0 y una concentración de 0.05% de Tween 20, manteniéndola durante una hora a temperatura ambiente y luego a 4°C durante toda la noche. Se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T (0.05%). A continuación, se procedió a la adición de un anticuerpo anti-His conjugado con fosfatasa alcalina (Invitrogen, Waltham, MA, USA) en una dilución de 1:2000 para detectar la proteína recombinante de fusión. Finalmente, se llevó a cabo el revelado mediante la utilización de una reacción que emplea el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato junto con el cloruro de nitroazul de tetrazolio BCIP/NBT durante un periodo de 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de agua destilada (Lagunes et al., 2016).

6.1.2.3 Purificación del péptido recombinante

Se recuperaron las pastillas celulares almacenadas a -20°C mediante su suspensión en 10 ml de Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con un pH de 7.2, seguido de sonicación a 6

pulsos de 1 minuto con intervalos de descanso de un minuto y medio entre cada pulso. Este proceso se llevó a cabo en condiciones de baja temperatura para prevenir la desnaturalización del péptido. Una vez finalizada la sonicación, las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad; se usaron columnas de 1 ml con alta afinidad al níquel Ni-NTA spin (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La incorporación de una etiqueta de poli-histidina (6X-His) en el péptido recombinante permitió su reconocimiento y purificación mediante cromatografía de afinidad. Posteriormente, se realizó la separación de las proteínas purificadas utilizando un gel SDS-PAGE al 15%, con el objetivo de evaluar el grado de purificación alcanzado.

Finalmente, el péptido recombinante fue mezclado con el adyuvante Montanide ISA 50 V2 (Seppic[®], Paris, France) (Lagunes et al., 2016). Dicho adyuvante consiste en una emulsión de aceite mineral, de tipo agua en aceite, que se caracteriza por inducir una respuesta inmune humoral sólida y de larga duración. Se prepararon dosis de 2 ml para el ensayo de inmunización que consistieron en una mezcla de péptido y adyuvante de la siguiente manera: 100 µg de péptido se diluyeron en 1 ml de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM KH₂PO₄). Posteriormente, se añadió 1 ml del adyuvante Montanide ISA 50 V2 (Seppic[®], Paris, France).

6.2 Lugar de experimentación en campo

El ensayo de inmunización se llevó a cabo en el módulo de producción de doble propósito ubicado en el 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). Este módulo se encuentra en el Km. 5.5 de la Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, en el municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, México. Esta región se caracteriza por tener un clima cálido húmedo, con una temperatura promedio anual de 23.4°C y una precipitación pluvial de 1743 mm al año (INEGI, 2017). Estas condiciones climáticas son favorables para el desarrollo del ciclo biológico de las garrapatas *R. microplus*.

6.3 Animales en experimentación

Se utilizaron un total de 12 vacas adultas de entre 6 y 7 años de edad, pertenecientes a la cruce *Bos taurus x Bos indicus* (5/8 Holstein y F1 Holstein x Cebú), con un peso promedio de 600 kg. Estos animales presentaban un estado de salud adecuado para su inclusión en el experimento. Asimismo, se mantuvieron en pastoreo rotacional en 5 potreros, permaneciendo en cada uno de ellos un promedio de 10 días. Durante este período, las vacas se alimentaron principalmente de pasto nativo, complementado con 1000 g de concentrado comercial por animal al día, además de tener acceso libre a agua y sales minerales.

Con el fin de equilibrar las características de edad, peso y genotipo, se distribuyeron las 12 vacas en 3 grupos, cada uno compuesto por 4 individuos.

6.4 Ensayo de inmunización

Los grupos se dividieron de la siguiente manera: Grupo 1 inmunizado con el polipéptido Bm86 emulsificado con adyuvante Montanide ISA 50 V2 (Seppic, Paris, France), en concentración 100 µg/2 mL (proteína/adyuvante). El grupo 2 recibió el antígeno Bm86, siendo éste el control positivo en concentración 100 µg/2 mL (proteína/adyuvante). El grupo 3 corresponde al control negativo, éste fue inoculado con una mezcla de buffer de fosfatos (PBS) y adyuvante Montanide ISA 50 V2 en una concentración 1:1.

Las inmunizaciones se realizaron los días 0, 30 y 50, el volumen inyectado fue de 2 mL en todos los grupos. La inmunización se realizó de forma subcutánea en la tabla del cuello usando jeringas de 5 mL con agujas de 18 G. El cuidado y supervisión de los animales estuvo a cargo de veterinarios especializados en bovinos, quienes se encargaron de monitorear su bienestar durante todo el estudio.

6.5 Muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre de forma semanal durante un período de 63 días, comenzando desde la primera inmunización (semana 0) y continuando hasta dos semanas después de la tercera inmunización (semana 9). Para la recolección de muestras, se utilizaron tubos Vacutainer® de 6 ml sin anticoagulante, extrayendo la muestra de la vena coccígea.

Cada muestra fue debidamente etiquetada con el número correspondiente al animal muestreado y se mantuvo a temperatura ambiente por un máximo de 1 hora con 30 minutos. Una vez en el Laboratorio de Sanidad Animal del CEIEGT, las muestras fueron centrifugadas a 4000 RPM durante 15 minutos. Posteriormente, se almacenaron en congelación a -20°C. Una vez concluido el trabajo de campo, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la unidad de garrapatas del CENID-SAI-INIFAP.

6.6 Cinética de anticuerpos por ELISA indirecto

La cinética de anticuerpos generados en los animales inmunizados se evaluó mediante la técnica de ELISA indirecto. En resumen, se recubrieron las placas de ELISA con 1 µg de proteína purificada (polipéptido de Bm86) en un volumen de 100 µl por pozo, y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados de la placa con 300 µl de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, adicionada con Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween 0.05%), 3 repeticiones durante cinco minutos cada una. Luego, se bloqueó la placa con 200 µl de PBS-Tween 0.05% y leche descremada al 5%, incubando durante una hora a temperatura ambiente, al terminar se procedió con lavados con PBS-Tween 0.05%

Los sueros de los animales se diluyeron a una proporción de 1:100 en PBS-Tween 0.05%, añadiendo 100 µl por pozo y realizando tres repeticiones. La incubación se llevó a cabo durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.05%, posteriormente se agregó el conjugado de anti-IgG de bovino acoplado con la enzima fosfatasa alcalina, diluido en PBS-Tween 0.05% a una proporción de 1:2000 y en un volumen de 100 µl por pozo. La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con PBS-Tween 0.05%.

La reacción de color se desarrolló mediante la adición de *p*-Nitrofenil-fosfato (Sigma[®], St. Louis, Mo., EUA), en un volumen de 200 µl por pozo, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La densidad óptica se determinó utilizando un espectrofotómetro lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Por último, se consideraron niveles de anticuerpos positivos cuando el valor de la absorbancia fue al menos dos veces mayor que el valor del suero preinmune.

6.7 Detección de la proteína Bm86 en tejidos de *Rhipicephalus microplus*

Se procedió a realizar la disección de cinco hembras ingurgitadas de *R. microplus*, utilizando un bisturí y pinzas de punta fina para separar los intestinos. Estos intestinos fueron sometidos a un lavado doble con PBS y posteriormente almacenados a una temperatura de -70 °C para su posterior utilización. Asimismo, se llevó a cabo la pulverización de 100 mg de larvas y masas de huevos utilizando un mortero congelado. La muestra resultante fue colocada en un tubo Eppendorf y se le añadió 1 mL de solución de PBS. Los extractos obtenidos fueron preparados siguiendo el método descrito por Popara en 2013. Para determinar las concentraciones de proteína en dichos extractos, se empleó el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como estándar de referencia. A continuación, los extractos de proteínas fueron separados mediante geles SDS-PAGE al 15% y posteriormente transferidos a membranas de PVDF. Estas membranas fueron bloqueadas utilizando una solución de leche descremada al 5% en una solución de PBS-Tween, incubadas durante una hora a una temperatura de 4 °C, con agitación suave. Seguidamente, las membranas fueron lavadas en tres ocasiones con una solución de PBS-Tween, y posteriormente fueron cortadas en tiras de aproximadamente 0.4 cm de ancho. Estas tiras fueron incubadas con suero obtenido de un bovino representativo de cada grupo experimental, el cual fue recolectado en el día 35 del estudio. El suero se diluyó en una proporción de 1:300 en una solución de PBS-Tween, y la incubación se llevó a cabo durante dos horas a una temperatura de 4 °C. Después de la incubación, las tiras fueron lavadas nuevamente siguiendo el protocolo previamente descrito, y se procedió a incubarlas con un anticuerpo secundario anti-IgG conjugados a Fosfatasa Alcalina (AP) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), el cual fue diluido en una proporción de 1:2000 en una solución de PBS-Tween. Esta segunda incubación se realizó durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, la señal positiva fue visualizada mediante la adición del sustrato de fosfatasa alcalina BCIP/NBT (Millipore, Burlington, MA, EE. UU.), lo que permitió la detección y visualización de los complejos antígeno-anticuerpo.

6.8 Análisis estadístico

Se empleó la prueba de ANOVA de una vía ($p < 0.05$) para evaluar las diferencias entre grupos en los valores de la absorbancia de los sueros. Se utilizó el paquete estadístico StatGraphics versión 18.1.08.

VII. Resultados

7.1 Expresión del polipéptido de Bm86

Previamente, el polipéptido de Bm86 fue sintetizado e incorporado en un vector conocido como pET101/D-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) para su posterior uso en la transformación de células *E. coli* BL21 Star (DE3) (Valdez-Espinoza et al., 2021).

La síntesis del polipéptido se llevó a cabo realizando ensayos de inducción con IPTG del cultivo bacteriano que contenía el mencionado plásmido. Una vez que las bacterias *E. coli* BL21 Star (DE3) completaron el período de producción del péptido, se realizaron ensayos de análisis de proteínas utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%. En dichos geles, se observó una banda de color azul intenso con un peso molecular cercano a 26 kDa (Figura 2-1). Para confirmar este hallazgo, se llevó a cabo un ensayo de Western blot (Figura 2-2); utilizando un anticuerpo monoclonal anti-histidinas (Anti-His), el cual reconoció la etiqueta de histidinas (6X-His) presente en la construcción del plásmido.

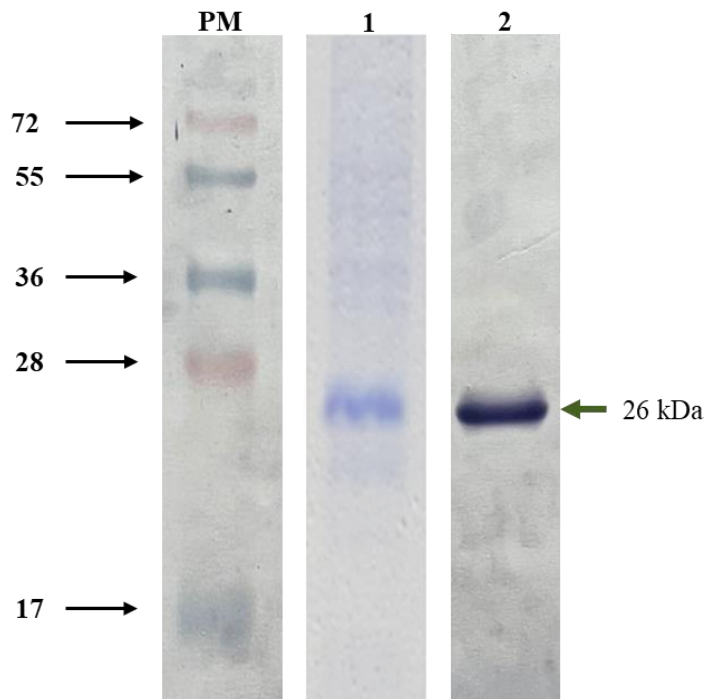


Figura 2. Expresión del polipéptido recombinante Bm86 en *E. coli*. 1) Gel SDS-PAGE donde se observa el péptido de Bm86 concentrado. 2) Reconocimiento del polipéptido Bm86 con anticuerpos monoclonales anti-His. La flecha indica el sitio de reconocimiento del péptido Bm86 en 26 kDa. PM: Peso Molecular.

7.2 Purificación y producción del inmunógeno

Después de la inducción con IPTG, los niveles de expresión del polipéptido Bm86 se situaron en torno al 10% del total de las proteínas celulares. El peso molecular del polipéptido Bm86 fue estimado en aproximadamente 26 kDa, conforme a los resultados observados en el gel de SDS-PAGE y la prueba de Western Blot. La pureza del polipéptido Bm86 se estimó en un 90%.

Una vez obtenida la confirmación de la presencia del polipéptido recombinante, se procedió a la formulación del inmunógeno. Para ello, las proteínas recombinantes fueron mezcladas con adyuvante comercial Montanide ISA 50 V2 en una concentración de 100 µg por cada 2 ml. El uso de adyuvantes en la vacunación es fundamental para potenciar la respuesta inmune y aumentar la eficacia del inmunógeno.

7.3 Respuesta inmune humoral, cinética de anticuerpos por ELISA indirecto

La concentración de anticuerpos se determinó mediante la técnica de ELISA indirecto, utilizando sueros de los bovinos a lo largo de las 8 semanas de duración del experimento. Como se observa en la [Figura 3](#), se evidenció una respuesta humoral relativamente alta en las vacas del grupo experimental inmunizadas con el polipéptido de Bm86. Los niveles de anticuerpos en este grupo experimentaron un incremento exponencial 14 días después de la primera inmunización, mostrando una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control. Sin embargo, tras la segunda inmunización, se observó un decremento en la concentración de anticuerpos, seguido de un aumento tras la tercera inmunización. Aunque esta variación es teóricamente inusual, es una respuesta esperada en un ensayo a nivel de campo.

Por otro lado, el grupo inmunizado con el antígeno Bm86 presentó un patrón de respuesta inmunológica típico, con un ligero incremento tras la primera inmunización, seguido de una disminución y un aumento exponencial a partir de la segunda inmunización. Sin embargo, también se observó un descenso posterior a la tercera inmunización, que se mantuvo hasta el final del experimento. En contraste, el grupo control mostró un comportamiento basal, sin evidenciarse concentraciones significativas de anticuerpos.

Los resultados revelan diferencias significativas ($p < 0.05$) en casi todos los muestreos realizados entre los grupos inmunizados y el grupo control. Es importante destacar que, a

pesar del comportamiento atípico de la respuesta inmune de los animales en el grupo experimental frente al polipéptido de Bm86, este grupo no presentó diferencias significativas en comparación con el grupo inmunizado con la proteína completa, indicando una respuesta muy similar en ambos grupos.

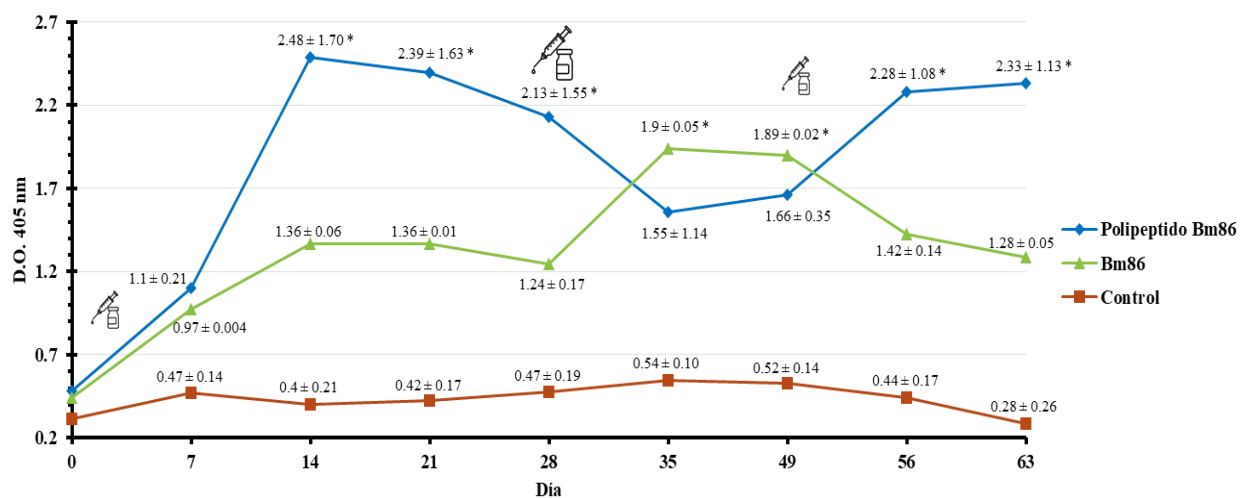


Figura 3. Concentración de anticuerpos en suero de bovinos. Se marcan los días 0, 28 y 49 en donde se realizó cada inmunización. El nivel de anticuerpos se expresa en D.O. (Densidad Óptica) medida a 405 nm. Los títulos de anticuerpos se determinaron con ELISA indirecto. Se compararon los grupos tratados contra el grupo control (* $p < 0.05$; $N = 4$).

7.4 Detección de la proteína nativa Bm86 en tejidos de garrapata *R. microplus*

El reconocimiento de la proteína Bm86 nativa en órganos de interés se llevó a cabo mediante Western blot, utilizando sueros recolectados el día 35 de un animal representativo de cada grupo. Los sueros que contenían anticuerpos IgG anti-Bm86 reaccionaron al contacto con los tejidos en estudio. Tanto el grupo inmunizado con el polipéptido de Bm86, como el grupo inmunizado con el antígeno Bm86 mostraron detección de la proteína nativa en huevo (Figura 4-A), larvas (Figura 4-B) e intestino (Figura 4-C). En la Figura 4 se pueden observar bandas de aproximadamente 72 kDa, que corresponden con el peso molecular de la proteína Bm86 presente en los distintos tejidos de interés en *Rhipicephalus microplus*.

En contraste, el grupo control, que recibió únicamente adyuvante y solución salina, no mostró reconocimiento hacia la proteína Bm86 nativa. Las bandas adicionales observadas en las membranas, podrían ser atribuidas a la presencia de anticuerpos producidos previamente por las vacas en estudio, en respuesta a diversas proteínas derivadas de infestaciones por garrapatas.

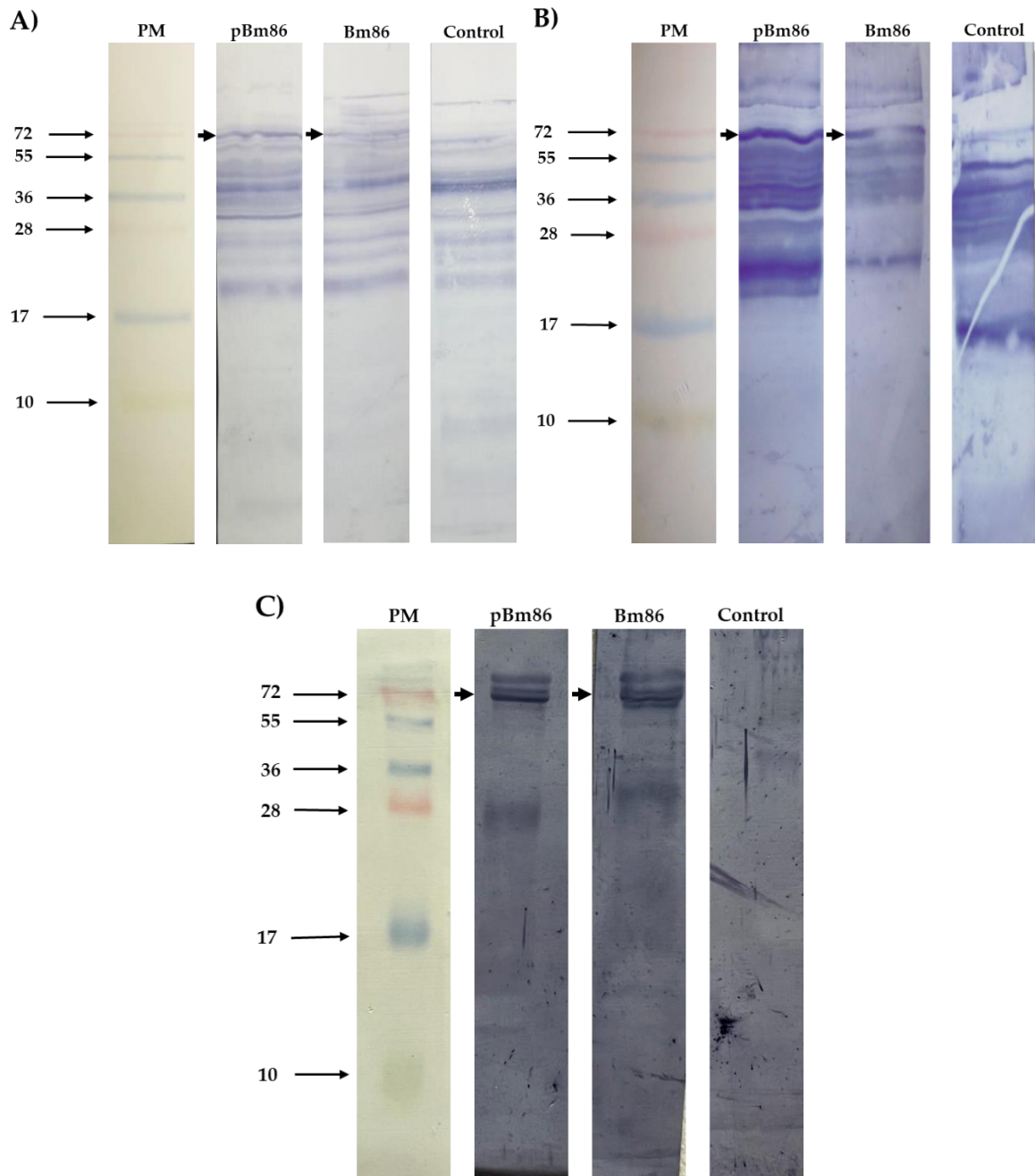


Figura 4. Reconocimiento de la proteína Bm86 nativa vía Western blot. A) Detección de Bm86 en huevo, B) Detección de Bm86 en larvas, C) Detección de Bm86 en intestino de garrapatas. pBm86: polipéptido de Bm86, antígeno Bm86: proteína completa y Control de solución salina con adyuvante. PM: Peso Molecular del marcador, las flechas negras indican el sitio donde se detectó Bm86.

VIII. Discusión

Si bien el término "vacunología reversa" fue acuñado hace 23 años, el uso del análisis genético y la ingeniería genética con fines de desarrollo e investigación de inmunógenos ha estado presente al menos desde los años 90 en diversos campos, tanto en medicina humana como animal (Cohen, 1993; Rappuoli, 2000; Willadsen et al., 1995). En el campo de la medicina veterinaria, la aplicación de vacunas recombinantes antiparasitarias basadas en investigaciones observacionales y experimentales, ha llevado al desarrollo de TICKGARD[®], la primera vacuna comercial exitosa contra un ectoparásito (*Rhipicephalus microplus*) (Lightowlers, 2021; Willadsen, 2008). Este hito abrió la puerta de múltiples investigaciones; la más importante en Latinoamérica fue el desarrollo de la vacuna GAVAC[®], la cual tuvo una efectividad regional considerablemente mayor que su antecesora (De la Fuente et al., 1998; De la Fuente et al., 1999).

Es probable que el uso de antígenos Bm86 en la vacuna TICKGARD[®], provenientes de ejemplares de garrapatas *Rhipicephalus australis*, una especie considerada diferente a *R. microplus* debido a diferencias morfológicas y genéticas sustanciales, haya sido la razón por la cual esta vacuna comercial tuvo tan poco éxito en Latinoamérica. Por el contrario, GAVAC[®], desarrollada con una cepa local de *R. microplus*, obtuvo mejores resultados (Ali et al., 2016; Blecha et al., 2018; Labruna et al., 2009). Esto demuestra que diferencias genotípicas puntuales, desempeñan un papel crucial en el diseño de inmunógenos. Para lograr un desarrollo eficiente y rentable de inmunógenos contra garrapatas, es imperativo garantizar su viabilidad económica y efectividad. Por consiguiente, resulta fundamental iniciar cualquier investigación en este campo mediante estrategias *in silico*, con el objetivo de llevar a cabo el análisis de posibles candidatos a inmunógenos, e incluso seleccionar fragmentos específicos y conservados en diferentes cepas (Merino-Charrez et al., 2019; Valdez-Espinoza et al., 2021).

Esencialmente, esta fue la premisa detrás del diseño del polipéptido experimental en el presente estudio, con el propósito de obtener una construcción proteica altamente inmunogénica y, al mismo tiempo, reducir los costos asociados al proceso de desarrollo. En este estudio se utilizó un polipéptido recombinante derivado de Bm86, conservado en

diversas cepas de *Rhipicephalus microplus* presentes en nuestro país. Estas secuencias fueron analizadas *in silico* (Valdez-Espinoza et al., 2021).

El uso de bacterias *E. coli* BL21 Star (DE3), especialmente diseñadas para la producción de proteínas recombinantes, es apropiado en este tipo de estudios, donde se busca una alta producción en un tiempo comparativamente corto. Esta plataforma de desarrollo ha demostrado ser económicamente viable, escalable y relativamente fácil de mantener. Aunque existen otras plataformas más avanzadas como levaduras, células de insectos y células de mamíferos, que ofrecen una mayor pureza de proteínas y la capacidad de obtener productos con modificaciones postraduccionales similares a su forma nativa, estas plataformas presentan desventajas en términos de curva de aprendizaje, desarrollo y estandarización, además de requerir instalaciones y equipos costosos, lo cual dificulta su utilidad en la investigación básica. No obstante, estas limitaciones se compensan cuando se lleva el desarrollo a etapas de producción industrial, que normalmente son el paso subsecuente a la investigación (Rosano & Ceccarelli, 2014; Vieira Gomes et al., 2018).

Se han llevado a cabo numerosos ensayos de vacunas comerciales y experimentos que involucran el uso de proteínas Bm86 de cepas locales en distintas regiones del mundo, así como la utilización de péptidos derivados de esta proteína, con resultados variables en términos de eficacia. El polipéptido derivado de Bm86 empleado en el presente estudio exhibe una similitud que oscila entre el 98% y el 100% cuando se compara con cepas de *R. microplus* originarias de Estados Unidos, Brasil y Argentina. La identificación de 2 epítomos B lineales junto con 2 sitios de N-glicosilación refuerza la premisa de que este polipéptido posee un alto potencial inmunogénico (Valdez-Espinoza et al., 2021).

En la región latinoamericana, las vacunas derivadas de Bm86 han exhibido una efectividad que varía entre el 51% y el 91%. Un referente de este tipo de control es la vacuna GAVAC[®], desarrollada en Cuba. Esta vacuna se fundamenta en un recombinante completo de Bm86, expresado en *Pichia pastoris*. Al ser sometida a pruebas en condiciones controladas y enfrentada a desafíos con diversas cepas latinoamericanas en distintas razas bovinas, GAVAC[®] ha demostrado una efectividad global superior al 50%. Es notable su alta eficacia, llegando al 91%, frente a la cepa Camcord, que coincide esencialmente con la cepa de origen del recombinante. Sin embargo, su rendimiento disminuye, alcanzando solo el 51%, cuando

se enfrenta a cepas como Tuxpan, que es una cepa continental mexicana (Canales et al., 1997).

Sin embargo, en ensayos en condiciones de campo, se han registrado variaciones en la efectividad de la vacuna. Estas discrepancias podrían atribuirse a la heterogeneidad en la respuesta de los animales a la vacunación. Se ha observado que algunos individuos generan una menor cantidad de anticuerpos, lo cual podría deberse a condiciones de estrés experimentadas por el animal, que estaría asociadas a las variaciones climáticas en el área de estudio, lo cual influiría en la respuesta inmunológica (Rodríguez et al., 1995).

Los ensayos de campo realizados con GAVAC® en países como Brasil, Colombia, Venezuela y Argentina han revelado que la vacuna ejerce un impacto sobre el peso y tamaño de las garrapatas. Se sabe que este efecto se origina a partir de la influencia de la vacuna en la funcionalidad metabólica de dichos ectoparásitos (Rodríguez et al., 1995; Suarez et al., 2016). De forma gradual, esta interacción parece repercutir en el ciclo de vida de las garrapatas, un fenómeno que se evidencia después de varias generaciones. Entre los objetivos centrales del empleo de estas vacunas destaca la reducción en la necesidad de utilizar ixodicidas. Esta premisa ha sido validada en diversos estudios, arrojando resultados positivos que respaldan este propósito (Duval & Hüe, 2022; Hüe et al., 2017).

Se han llevado a cabo investigaciones en campo con Bm86. En la región de Veracruz, México, se condujo un estudio en el que una vacuna basada en la proteína Bm86 de *R. microplus* demostró una eficacia del 56% (Mendoza-Martínez et al., 2021). Asimismo, en una localidad en la región sur del Pacífico, se evaluó una vacuna también basada en la proteína Bm86 completa derivada de la especie *R. australis* y expresada en *E. coli*, logrando una eficacia del 74.2% (Hüe et al., 2017).

El diseño y la evaluación de péptidos sintéticos han sido ampliamente discutidos en diversos estudios. Estas estructuras se fundamentan en un análisis exhaustivo de la proteína Bm86, con la posterior selección de regiones caracterizadas por una alta inmunogenicidad. El polipéptido de Bm86 empleado en este estudio incorpora un epítipo B lineal previamente utilizado en un péptido sintético denominado SBm7462®, el cual demostró una eficacia del 81% en investigaciones realizadas bajo condiciones controladas, evaluando la cepa de

laboratorio BmUFV1 (Patarroyo et al., 2002). Además, este mismo polipéptido logró una eficacia del 72% frente a una cepa autóctona del sureste de Brasil (Patarroyo et al., 2020).

Se han llevado a cabo diversos ensayos de vacunación que han buscado mejorar la capacidad antigénica de Bm86 mediante la conjugación de proteínas heterólogas. Una investigación en particular ha explorado la utilización de la proteína quimérica P0-Bm86. Esta construcción química involucra la incorporación de 1 a 18 péptidos de P0 en cada proteína Bm86, utilizando la plataforma *Pichia pastoris*. Los péptidos de P0 empleados constan de 20 aminoácidos y se conjugan a una proteína Bm86 completa, la cual se utiliza en la vacuna GAVAC®. Esta vacuna ha sido sometida a pruebas en caninos y bovinos infestados con garrapatas *R. sanguineus* y *R. microplus*, respectivamente. Los resultados demostraron una eficacia del 86% contra *R. sanguineus* en perros y del 84% contra *R. microplus* en bovinos (Rodríguez-Mallon et al., 2022).

En investigaciones complementarias, se ha empleado una estrategia de inmunización dual en bovinos, combinando una vacuna basada en Bm86 con otro inmunógeno fundamentado en Subolesina. Es relevante señalar que, en este enfoque particular, se utilizó la proteína completa de Bm86 y que ambas inmunizaciones se administraron de manera independiente, es decir, no estaban conjugadas. No obstante, se detectó que estos regímenes de inmunización dual pueden enfrentar dificultades al generar una respuesta inmune óptima. Este desafío podría asociarse con un fenómeno en el cual uno de los antígenos se establece como inmunodominante y suprime la respuesta inmunológica dirigida hacia el otro antígeno, en general este tratamiento dual obtuvo una eficacia de 49% contra *R. microplus* (Mendoza-Martínez et al., 2021).

En esta investigación nos concentramos en evaluar la respuesta inmune adaptativa de las vacas mediante la medición de los niveles de anticuerpos anti-Bm86 generados por los animales a lo largo del experimento. Observamos que el grupo inmunizado con el polipéptido Bm86 mostró un aumento exponencial en los niveles de anticuerpos después de la primera inmunización, seguido de un descenso continuo incluso después de la segunda inmunización. Durante esta fase, se esperaba un nuevo aumento en los niveles de anticuerpos, sin embargo, no se observó un incremento significativo hasta pasadas dos semanas, seguido de un claro repunte posterior a la tercera inmunización.

Se observó un incremento en los títulos de anticuerpos desde la primera inmunización, un patrón que coincide con lo documentado tanto para un péptido sintético previo (Patarroyo et al., 2020) como para la vacuna GAVAC®. No obstante, la notable amplitud de títulos de anticuerpos registrada en algunos individuos tras la inmunización inicial permanece como una incógnita. Esta situación solo puede ser atribuida a dinámicas individuales de cada sujeto en estudio. Estos episodios de hiperinmunidad ya han sido reportados tanto en animales como en humanos. En investigaciones relacionadas con ganado bovino infectado por *Dictyocaulus viviparus*, se ha observado el fenómeno de re-infección. En este contexto, los animales más longevos, que presentan inmunidad inducida naturalmente o mediante vacunación, tienden a desencadenar una respuesta inmunitaria exacerbada, la cual puede manifestar síntomas clínicos análogos a un fenómeno conocido como síndrome de reinfección (Inman & Hudson, 2009). En seres humanos, se han registrado situaciones parecidas, como una elevada producción de anticuerpos tras la inmunización o, en contraste, una respuesta después de no haber mostrado reacción alguna a dos inmunizaciones previas. Este último fenómeno ha sido especialmente observado en individuos de edad avanzada (Kusunoki et al., 2023). Lamentablemente, no se profundizó en la investigación de este particular aspecto. A pesar de este comportamiento irregular, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en prácticamente todas las mediciones en comparación con el grupo control ($p < 0.05$).

Este patrón de respuesta es comúnmente observado en experimentos que utilizan Bm86 o sus derivados, y está en concordancia con estudios previos donde el inmunógeno logró desarrollar una respuesta humoral superior al control (Parthasarathi et al., 2023; Patarroyo et al., 2002, 2020; Rodríguez-Mallón et al., 2020).

A pesar de las expectativas, el grupo inmunizado con el polipéptido de Bm86 mostró un rendimiento muy similar al grupo inmunizado con el antígeno Bm86. Se esperaba que el polipéptido, al ser conservado y contener diversas regiones antigénicas, exhibiera un rendimiento superior, como se ha observado en investigaciones anteriores con polipéptidos similares (Patarroyo et al., 2020). Sin embargo, varios factores podrían estar contribuyendo a esta situación, como la salud y la edad de los animales, así como posibles condiciones de estrés relacionadas con el entorno de campo. En relación a la edad y condición de salud de los animales, se ha documentado ampliamente el fenómeno conocido como

inmunosenescencia, aunque su estudio se ha centrado principalmente en ratones y humanos con fines terapéuticos y cosméticos. Se sabe poco acerca de esta situación en el ganado bovino, pero se puede inferir que el sistema inmunológico comienza a debilitarse con la edad. Sin embargo, también se reconoce que en condiciones de campo, los animales de mayor edad tienen una mayor probabilidad de estar expuestos a múltiples infestaciones de garrapatas, lo que podría haber generado cierta inmunidad contra estos parásitos y, por lo tanto, una respuesta inmune diferenciada (Ndawula, 2021). Esto podría explicar por qué la primera inmunización en este grupo mostró una respuesta inmune exponencial similar a la que se observaría en una segunda inmunización.

En estudios anteriores que evaluaron la eficacia de una vacuna contra *Leptospira spp.*, se observó una correlación negativa entre la edad de las vacas y los niveles de anticuerpos posteriores a la vacunación. Estos hallazgos indicaron que la respuesta inmune puede disminuir con la edad dando lugar a la inmunosenescencia, el deterioro del sistema inmunológico, lo que resulta en una respuesta reducida a la vacunación (Mughini-Gras et al., 2014). Nuestros resultados parecen respaldar esta situación, ya que las vacas del experimento tenían un promedio de edad de 6.5 años, que se considera adultez avanzada en esta especie. Por lo tanto, es plausible considerar una posible disminución en la capacidad inmunológica de estos animales.

Profundizando en esta información, sabemos que las células CD4⁺ desempeñan un papel clave en la producción de IL-2, una citocina que induce la proliferación de células B y estimula la producción de anticuerpos. Algunos estudios en ratones han demostrado que a medida que envejecen, las células CD4⁺ producen gradualmente menos IL-2, lo que limita la proliferación de las células responsables de la respuesta humoral (Giese, 2016). Por supuesto, no podemos pasar por alto la acción inmunosupresora de las garrapatas en el ganado bovino, que incluye la liberación de factores inmunosupresores transportados por la saliva del ectoparásito. Estos factores actúan para reducir e incluso silenciar la respuesta inmune del hospedador, permitiendo la parasitación sin obstáculos. Se ha observado que estos factores inhiben la bradiquinina, interfieren con el sistema del complemento, bloquean la formación de inflamomas y, como resultado, reducen la respuesta de las células presentadoras, bloquean los linfocitos T y, por lo tanto, impiden la activación y proliferación

de los linfocitos B (Tizard, 2019). Con esta serie de factores en juego, podemos deducir que la producción de anticuerpos anti-Bm86 podría estar reducida en algunos individuos del grupo tratado, lo cual también podría explicar las amplias variaciones observadas en los datos.

Desafortunadamente, la evidencia de inmunosenescencia en vacas es escasa. La mayoría de la información disponible proviene de modelos murinos y de estudios clínicos en humanos. Sin embargo, dado que estamos hablando de mamíferos superiores, podemos establecer correlaciones con los datos limitados disponibles. Estudios en ratones han demostrado que los anticuerpos producidos en individuos de edad avanzada son menos efectivos en comparación con los producidos por individuos jóvenes. También se ha observado que las células plasmáticas jóvenes tienen una mayor capacidad para producir anticuerpos de alta afinidad, mientras que las células plasmáticas de mayor edad se limitan principalmente a producir anticuerpos policlonales de baja afinidad, especialmente del tipo IgM (Frasca & Blomberg, 2009).

En un estudio previo, se investigó la relación entre la edad de las vacas y la producción de leucocitos durante el periodo previo al parto. Se observó que las vacas de mayor edad mostraban una disminución en el número de células B, lo cual afectaba la producción de anticuerpos y el desarrollo de células B de memoria. Además, se ha constatado que la cantidad de linfocitos disminuye con la edad, especialmente en vacas mayores de 1.5 años. Esta reducción gradual puede atribuirse al deterioro de la composición de las membranas lipídicas de los linfocitos, causado por la generación de radicales libres, los cuales se vuelven más difíciles de metabolizar a medida que el organismo envejece (Shihab, 2018). Dado que las vacas incluidas en nuestro estudio forman parte de un grupo de vacas lecheras sujetas a un programa de reproducción establecido por la administración del centro, esta información es relevante y debe ser considerada.

Por otra parte, la reactividad de los sueros de los animales con tejidos de interés reveló que tanto el antígeno Bm86 como el polipéptido de Bm86 son igualmente inmunogénicos. Además, los anticuerpos generados logran reconocer de manera efectiva la proteína nativa de Bm86 en huevo, larvas e intestino de *Rhipicephalus microplus*. Las bandas observadas en los análisis demuestran un reconocimiento altamente específico, lo que confirma la

especificidad de los anticuerpos anti-Bm86 producidos. Tanto la concentración como la eficacia de estos anticuerpos son similares a las observadas en investigaciones previas (Jackson & Opdebeeck, 1990; R. Lagunes-Quintanilla et al., 2022; Mendoza-Martínez et al., 2021; Rodríguez et al., 1995).

Se pudo observar que se produjo un reconocimiento de otros antígenos, lo cual puede ser atribuido a las condiciones de campo en las que se encontraban las vacas en estudio. Es muy probable que hayan experimentado infestaciones previas de garrapatas *Rhipicephalus microplus*, lo que habría generado respuestas inmunológicas frente a diversas estructuras antigénicas del parásito (Cruz et al., 2020; Kitsou et al., 2021). Es importante destacar que, independientemente de las condiciones del experimento, el polipéptido de Bm86 en estudio logró generar una respuesta de anticuerpos que resultó ser igualmente efectiva que la respuesta generada por la proteína completa, es decir, el antígeno Bm86. El diseño del inmunógeno, que seleccionó epítomos particularmente antigénicos y conservados entre distintas cepas, demostró ser competente, tal como se esperaba (Valdez-Espinoza et al., 2021). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que factores externos difíciles de controlar en un entorno de campo, como la edad y el estado de salud de los animales, así como el estrés del entorno predominante, desempeñan un papel importante que afecta a las vacas individualmente y se refleja en el conjunto (Bagath et al., 2019; De la Fuente et al., 1998). Es esencial comparar y analizar estas variaciones para ajustar los tratamientos y obtener resultados superiores en futuras investigaciones.

Actualmente, existen diversas aproximaciones en el diseño y formulación de vacunas, y la mayoría de ellas utilizan la vacunología reversa como un enfoque económicamente viable para iniciar la investigación. Este enfoque permite una identificación, caracterización y diseño más rápidos de los antígenos antigarrapatas, en comparación con los métodos tradicionales que implicaban la búsqueda y purificación de antígenos a partir de tejidos, lo cual resultaba costoso y requería mucho tiempo. En el caso del polipéptido de Bm86 utilizado en esta investigación, también se ha seguido esta línea de investigación, lo cual parece ser una estrategia adecuada y escalable (Muhanguzi et al., 2022).

El control inmunológico de las infestaciones de garrapatas se presenta como una alternativa ecológica y económicamente viable. El enfoque aislado y la falta de regulación en el uso de

acaricidas y otros pesticidas con potencial de selección han contribuido a la problemática de resistencia. Para lograr un control efectivo de estas infestaciones en nuestro país, es necesario implementar un programa nacional que combine el uso de acaricidas alternativos efectivos contra las poblaciones resistentes a otros acaricidas, estrategias zootécnicas y la aplicación de vacunas (Showler & Saelao, 2022). En este sentido, el uso de acaricidas eliminaría las garrapatas al contacto, mientras que las estrategias zootécnicas interrumpirían su ciclo de vida y ayudarían a eliminar los estadios clave en su desarrollo. Por su parte, las vacunas serían responsables de disminuir la capacidad reproductiva de las garrapatas, lo que conduciría a la generación de poblaciones más manejables o, en el mejor de los casos, su erradicación completa. Esta estrategia integral permitiría reducir gradualmente la dependencia de los acaricidas, disminuyendo así la contaminación del medio ambiente y de los productos bovinos, así como el avance de la resistencia a estos productos. Además, se evitarían riesgos para la salud animal y humana, en línea con el enfoque de Una Salud (Tiffin et al., 2022).

Para implementar con éxito esta estrategia, es crucial una colaboración estrecha entre los sectores gubernamentales, la industria ganadera y los expertos en salud animal. Es necesario promover la concientización, la capacitación y la adopción de estas medidas integrales para garantizar un control efectivo y sostenible de las infestaciones de garrapatas en nuestro país.

IX. Conclusiones

Los resultados de esta investigación muestran que el polipéptido de Bm86 tiene un efecto inmunogénico significativo, generando una respuesta humoral similar a la observada con el antígeno Bm86. Los anticuerpos demostraron afinidad por la proteína Bm86 nativa, indicando una respuesta inmune específica. Se sugiere considerar diversos factores en futuros ensayos de campo, como la edad del ganado, recopilación exhaustiva de datos sobre infestaciones y enfermedades, condiciones ambientales y presencia de otros parásitos generadores de estrés en los animales. A pesar de los desafíos, es esencial continuar investigando en condiciones de campo para lograr un control integral de las infestaciones de garrapatas, aunque se necesita más investigación y análisis en este contexto para mejorar las estrategias de control y enfoques para la salud del ganado.

X. Bibliografía

- Alcala-Canto, Y., Figueroa-Castillo, J. A., Ibarra-Velarde, F., Vera-Montenegro, Y., Cervantes-Valencia, M. E., Salem, A. Z. M., & Cuéllar-Ordaz, J. A. (2018). Development of the first georeferenced map of *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* In Mexico from 1970 to date and prediction of its spatial distribution. *Geospatial Health*, 13(1). <https://doi.org/10.4081/gh.2018.624>
- Ali, A., Parizi, L. F., Ferreira, B. R., & Vaz Junior, I. D. S. (2016). A revision of two distinct species of *Rhipicephalus*: *R. microplus* and *R. australis*. *Ciência Rural*, 46(7), 1240-1248. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151416>
- Allen, J. R., & Humphreys, S. J. (1979). Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature*, 280, 491-493. <https://doi.org/10.1038/280491a0>
- Alonso Díaz, M. A., & Fernández-Salas, A. (2022). *Rhipicephalus microplus: Biología, control y resistencia* [Manual].
- Alonso-Díaz, M. A., Jiménez-Ruiz, M., & Fernández-Salas, A. (2022). First Evidence of the Tickicide Effect of Entomopathogenic Fungi Isolated from Mexican Cattle Farms Against *Amblyomma mixtum*. *Journal of Parasitology*, 108(6). <https://doi.org/10.1645/21-116>
- Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Fragoso-Sánchez, H., & Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(2). <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200003>
- Bagath, M., Krishnan, G., Devaraj, C., Rashamol, V. P., Pragna, P., Lees, A. M., & Sejian, V. (2019). The impact of heat stress on the immune system in dairy cattle: A review. *Research in Veterinary Science*, 126, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.011>

- Barker, S. C., & Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, *129*(S1), S15-S36.
<https://doi.org/10.1017/S0031182004005207>
- Barré, N., & Uilenberg, G. (2010). Spread of parasites transported with their hosts: Case study of two species of cattle tick. *Rev Sci Technol Off Int Epizoot*, *29*(1), 149-160.
- Bellgard, M. I., Moolhuijzen, P. M., Guerrero, F. D., Schibeci, D., Rodriguez-Valle, M., Peterson, D. G., Dowd, S. E., Barrero, R., Hunter, A., Miller, R. J., & Lew-Tabor, A. E. (2012). CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *International Journal for Parasitology*, *42*(2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.11.006>
- Benavides-Montaño, J. A., Jaramillo-Cruz, C. A., & Mesa-Cobo, N. C. (2018). GARRAPATAS IXODIDAE (ACARI) EN EL VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, *22*(1), 131-150.
- Benitez, D., Cetrá, B., & Florin-Christensen, M. (2012). *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* ticks can complete their life cycle on the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Buffalo Science*, *1*(2).
- Betancur Hurtado, O. J., & Giraldo-Ríos, C. (2019). Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. En M. Abubakar & P. K. Perera (Eds.), *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81167>
- Blecha, I. M. Z., Csordas, B. G., Aguirre, A. de A. R., Cunha, R. C., Garcia, M. V., & Andreotti, R. (2018). Analysis of Bm86 conserved epitopes: Is a global vaccine against Cattle Tick *Rhipicephalus microplus* possible? *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180056>

- Bowman, D. D. (2011). Artrópodos. En *Georgis Parasitología para Veterinarios* (9na ed., Vol. 1, pp. 5-83). Elsevier.
- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M., & de la Fuente, J. (1997). Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine GavacTM against cattle tick. *Vaccine*, *15*(4), 414-422. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00192-2)
- Canevari, J. T., Mangold, A. J., Guglielmono, A. A., & Nava, S. (2017). Population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in a subtropical subhumid region of Argentina for use in the design of control strategies: Ecology of *Rhipicephalus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*, *31*(1), 6-14. <https://doi.org/10.1111/mve.12199>
- Carrera-Chávez, B., & Bustamante-Lara, T. I. (2013). ¿Es la ganadería bovina de carne una actividad competitiva en México? *Nóesis: Revista de Ciencias Sociales y Humanidades*, *22*(43), 18-50. <https://doi.org/10.1353/ntc.1990.0050>
- Carvalho, I. T. S., Melo, A. L. T., Freitas, L. C., Verçoza, R. V., Alves, A. S., Costa, J. S., Chitarra, C. S., Nakazato, L., Dutra, V., Pacheco, R. C., & Aguiar, D. M. (2016). Minimum infection rate of Ehrlichia minasensis in Rhipicephalus microplus and Amblyomma sculptum ticks in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *7*(5), 849-852. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.04.004>
- Centenaro, F. C., Barbieri, A., Rico, I. B., Gonchoroski, G. Z., Jardim, F. T., Doyle, R. L., Dall'Agnol, B., Reck, J., & Webster, A. (2022). Rotational and selective protocols using acaricides to control a multi-resistant strain of Rhipicephalus microplus under field conditions in Southern Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *13*(5), 101987. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101987>

- Chevillon, C., de Garine-Wichatitsky, M., Barré, N., Ducornez, S., & de Meeûs, T. (2013). Understanding the genetic, demographical and/or ecological processes at play in invasions: Lessons from the southern cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, *59*(1-2), 203-218.
<https://doi.org/10.1007/s10493-012-9602-5>
- Cohen, J. (1993). Cancer Vaccines Get a Shot in the Arm: New genetically engineered compounds designed to combat human tumors are bringing respect to a maligned field. But older vaccines may deliver the goods first. *Science*, *262*(5135), 841-843.
<https://doi.org/10.1126/science.8235605>
- Consejo Mexicano de la Carne. (2023). *Compendio Estadístico 2023*.
- Cruz, B. C., de Lima Mendes, A. F., Maciel, W. G., dos Santos, I. B., Gomes, L. V. C., Felippelli, G., Teixeira, W. F. P., Ferreira, L. L., Soares, V. E., Lopes, W. D. Z., da Costa, A. J., & de Oliveira, G. P. (2020). Biological parameters for *Rhipicephalus microplus* in the field and laboratory and estimation of its annual number of generations in a tropical region. *Parasitology Research*, *119*(8), 2421-2430.
<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06758-5>
- Dantas-Torres, F. (2015). Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *4*(3), 452-461. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.07.001>
- de la Fuente, J. de la, Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J. M., Kocan, K. M., & Willadsen, P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, *8*(1), 23-28.
<https://doi.org/10.1017/S1466252307001193>

- De La Fuente, J., & Merino, O. (2013). Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine*, *31*(50), 5923-5929. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.049>
- De la Fuente, J., Rodrigues, M., Redondo, M., Montero, C., García-García, J. C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H., Lleonart, R., de Armas, C. A., Rey, S., Rodríguez, J. L., Artilles, M., & García, L. (1998). Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*, *16*(4), 366-373. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00208-9)
- De La Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J. C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H., & Lleonart, R. (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): The experience with the Bm86-based vaccine GavacTM. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, *15*(3-5), 143-148. [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(99\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(99)00018-2)
- Diyes, G. C. P., & Rajakaruna, R. S. (2016). Seasonal dynamics of spinose ear tick *Otobius megnini* associated with horse otoacariasis in Sri Lanka. *Acta Tropica*, *159*, 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.025>
- Domingos, A., Antunes, S., Borges, L., & Rosario, V. E. D. (2013). Approaches towards tick and tick-borne diseases control. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *46*(3), 265-269. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0014-2012>
- Duval, H., & Hüe, T. (2022). Field efficacy assessment of a vaccine against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *australis* in New-Caledonia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *29*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100702>

- Eskezia, B. G., & Desta, A. H. (2016). Review on the Impact of Ticks on Livestock Health and Productivity. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 6(22), 1-7.
- Estrada-Peña, A., Acedo, C. S., Quílez, J., & Del Cacho, E. (2005). A retrospective study of climatic suitability for the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Americas: Climate and habitat for the cattle tick in the Americas. *Global Ecology and Biogeography*, 14(6), 565-573. <https://doi.org/10.1111/j.1466-822X.2005.00185.x>
- Estrada-Peña, A., & Salman, M. (2013). Current Limitations in the Control and Spread of Ticks that Affect Livestock: A Review. *Agriculture*, 3(2), 221-235. <https://doi.org/10.3390/agriculture3020221>
- Ferreira-Leal, B., & Sanchez-Ferreira, C. A. (2021). Ticks and antibodies: May parasite density and tick evasion influence the outcomes following immunization protocols? *Veterinary Parasitology*, 300, 109610. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109610>
- Frasca, D., & Blomberg, B. B. (2009). Effects of aging on B cell function. *Current Opinion in Immunology*, 21(4), 425-430. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.06.001>
- FRC, F. de R. C. (2017). *La Ganadería en México*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/firco/articulos/la-ganaderia-en-mexico?idiom=es#:~:text=La%20ganader%C3%ADa%20en%20M%C3%A9xico%20es,din%C3%A1micas%20en%20el%20medio%20rural.&text=Como%20es%20d el%20conocimiento%20p%C3%ABlico,de%20econom%C3%ADas%20de%20tip o%20tradicional.>
- Fuentes-Castillo, A., Hernández-Rodríguez, Y., Quintana-Torrente, D., Rodríguez-Fernández, R., & Méndez-Mellor, L. (2018). *Estrategia de lucha contra la mosca*

Haematobia irritans y la garrapata *Rhipicephalus microplus* con el uso de Effipro Bovis en un rebaño bovino. 40(3), 6.

García-García, J. C., González, I. L., González, D. M., Izquierdo, G. B., & de la Fuente, J. (1999). Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Biochemical Society Transactions*, 28(5), A201-A201.

<https://doi.org/10.1042/bst028a201b>

George, J. E., Pound, J. M., & Davey, R. B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129(S1), S353-S366.

<https://doi.org/10.1017/S0031182003004682>

Giese, M. (2016). Elderly Immunology. En *Introduction to Molecular Vaccinology* (pp. 111-121). Springer International Publishing. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25832-4>

Goolsby, J. A., Mays, D. T., Schuster, G. L., Kashefi, J., Smith, L., Amalin, D., Cruz, M., & Racelis, A. (2015). Rationale for Classical Biological Control of Cattle Fever Ticks and Proposed Methods for Field Collection of Natural Enemies. *Subtropical Agriculture and Environments*, 66, 7-15.

Gunn, S. J., Hilburn, L. R., & Burbach, B. S. (1993). Homology Within the X Chromosomes of *Boophilus microplus* (Canestrini) and *B. annulatus* (Say). *Journal of Heredity*, 84(3), 232-235. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111327>

Higa, L. de O. S., Barradas Piña, F. T., Rodrigues, V. da S., Garcia, M. V., Salas, D. R., Miller, R. J., de Leon, A. P., Barros, J. C., & Andreotti, R. (2020). Evidence of acaricide resistance in different life stages of *Amblyomma mixtum* and *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from the same farm in the state

- of Veracruz, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 174, 104837.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104837>
- Hüe, T., Petermann, J., Bonnefond, R., Mermoud, I., Rantoen, D., & Vuocolo, T. (2017). Experimental efficacy of a vaccine against *Rhipicephalus australis*. *Experimental and Applied Acarology*, 73(2), 245-256. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0184-0>
- INEGI. (2017). *Anuario estadístico y geográfico de Veracruz de Ignacio de la Llave*. (p. 1225). https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2017/702825094980.pdf
- Inman, C., & Hudson, C. (2009). Cattle immunology: The immune response to parasites. *Livestock*, 14(3), 29-32. <https://doi.org/10.1111/j.2044-3870.2009.tb00225.x>
- Jackson, L. A., & Opdebeeck, J. P. (1990). Humoral immune responses of Hereford cattle vaccinated with midgut antigens of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Parasite Immunology*, 12(2), 141-151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1990.tb00943.x>
- Johnson, T. H., & Bancroft, M. J. (1919). Report on Mr. Munro Hull's Claims regarding Tick-resisting Cattle. *Queensland Agricultural Journal*, 11(1).
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(S1), S3-S14. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Kabi, F., Dhikusooka, M., Matovu, M., Mugerwa, S., Kasaija, P., Emudong, P., Kirunda, H., Contreras, M., Gortazar, C., & De la Fuente, J. (2022). Monitoring the Subolesin Vaccine Field Trial for Safer Control of Cattle Ticks Amidst Increasing Acaricide Resistance in Uganda. *Vaccines*, 10(10), 1594.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10101594>

- Karasuyama, H., Miyake, K., & Yoshikawa, S. (2020). Immunobiology of Acquired Resistance to Ticks. *Frontiers in Immunology*, *11*, 601504.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.601504>
- Kitsou, C., Fikrig, E., & Pal, U. (2021). Tick host immunity: Vector immunomodulation and acquired tick resistance. *Trends in Immunology*, *42*(7), 554-574.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2021.05.005>
- Kusunoki, H., Ekawa, K., Ekawa, M., Kato, N., Yamasaki, K., Motone, M., & Shimizu, H. (2023). Trends in Antibody Titers after SARS-CoV-2 Vaccination—Insights from Self-Paid Tests at a General Internal Medicine Clinic. *Medicines*, *10*(4), 27.
<https://doi.org/10.3390/medicines10040027>
- Labruna, M. B., Naranjo, V., Mangold, A. J., Thompson, C., Estrada-Peña, A., Guglielmone, A. A., Jongejan, F., & de la Fuente, J. (2009). Allopatric speciation in ticks: Genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1), 46.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-46>
- Lagunes, R., Domínguez-García, D., Quiroz, 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*(4), 726-738.
- Lagunes-Quintanilla, R. E., & Bautista-Garfias, C. R. (2019). El control inmunológico: Una alternativa contra garrapatas del ganado bovino. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, *7*(1). <https://doi.org/10.19136/era.a7n1.2263>
- Lagunes-Quintanilla, R., Valdez-Espinoza, U. M., Hernández-Ortiz, R., Castro-Saines, E., Merino, O., & Mendoza-Martínez, N. (2022). Experimental vaccination in rabbits

- using the peptide RmS-17 antigen reduces the performance of a Mexican Rhipicephalus microplus tick strain. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(6), 102044. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102044>
- León-Clavijo, M. A., & Hernandez-Rojas, E. C. (2012). Descripción de la proteína Bm86, polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. *NOVA*, 10(17), 24.
- Lightowlers, M. W. (2021). Antiparasitic vaccines. En *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (pp. 479-500). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54396-5.00018-0>
- Little, S. E. (2011). Enfermedades transmitidas por vectores. En D. D. Bowman (Ed.), *Georgis Parasitología para Veterinarios* (9na ed., Vol. 1, pp. 240-253). Elsevier.
- Lynn, R. C. (2011). Fármacos antiparasitarios. En D. D. Bowman (Ed.), *Georgis Parasitología para Veterinarios* (9na ed., Vol. 1, pp. 254-294). Elsevier.
- Ma, M., Chen, Z., Liu, A., Ren, Q., Liu, J., Liu, Z., Li, Y., Yin, H., Guan, G., & Luo, J. (2016). Biological parameters of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) fed on rabbits, sheep, and cattle. *The Korean Journal of Parasitology*, 54(3), 301.
- Mans, B. J., & Neitz, A. W. H. (2004). Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: Evolution from a functional perspective. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(1), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.09.002>
- Mansfield, K. L., Jizhou, L., Phipps, L. P., & Johnson, N. (2017). Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 298. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00298>

- Marcelino, I., de Almeida, A. M., Ventosa, M., Pruneau, L., Meyer, D. F., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., & Coelho, A. V. (2012). Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4232-4250. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.026>
- Mendoza-Martínez, N., Alonso-Díaz, M. A., Merino, O., Fernández-Salas, A., & Lagunes-Quintanilla, R. (2021). Protective efficacy of the peptide Subolesin antigen against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* under natural infestation. *Veterinary Parasitology*, 299, 109577. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109577>
- Merino-Charrez, J. O., Gómez-Romero, N., Barrera-Molina, I., & Lagunes-Quintanilla, R. (2019). In silico analysis of the subolesin gene as a possible vaccine against *Rhipicephalus microplus* ticks. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), 129-136. <https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1832>
- Morgan, R. F. (2011). A New Journal for the Torrid Zone. *Journal of Tropical Psychology*, 1(1), 1-1. <https://doi.org/10.1375/jtp.1.1.1>
- Mughini-Gras, L., Bonfanti, L., Natale, A., Comin, A., Ferronato, A., La Greca, E., Patregnani, T., Lucchese, L., & Marangon, S. (2014). Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. *Epidemiology and Infection*, 142(6), 1172-1181. <https://doi.org/10.1017/S0950268813001817>
- Muhanguzi, D., Ndekezi, C., Nkamwesiga, J., Kalayou, S., Ochwo, S., Vuyani, M., & Kimuda, M. P. (2022). Anti-Tick Vaccines: Current Advances and Future Prospects. En *Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2. Vaccines for Veterinary Diseases* (pp. 253-268). Springer US. <https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-1888-2>

- Murrell, A., & Barker, S. C. (2003). Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56(3), 169-172. <https://doi.org/10.1023/B:SYPA.0000003802.36517.a0>
- Nava, S. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience, Volume*(14), 2857. <https://doi.org/10.2741/3418>
- Ndawula, C. (2021). From Bench to Field: A Guide to Formulating and Evaluating Anti-Tick Vaccines Delving beyond Efficacy to Effectiveness. *Vaccines*, 9(10), 1185. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101185>
- Núñez, J. L., Muñoz-Cobeñas, M. E., & Moltedo, H. L. (1985). *Boophilus microplus*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-70256-3>
- Nuttall, P. A., Trimmell, A. R., Kazimirova, M., & Labuda, M. (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, 28(4), 155-163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00806.x>
- Oliver, J. H. (1977). Cytogenetics of Mites and Ticks. *Annual Review of Entomology*, 22(1), 407-429. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.22.010177.002203>
- Parthasarathi, B., Kumar, B., Bhure, S. K., Sharma, A. K., Manisha, Nagar, G., Kumar, S., Nandi, A., Manjunathachar, H. V., Chigure, G. M., Shakya, M., Sankar, M., Fuente, J. de la, & Ghosh, S. (2023). Co-Immunization Efficacy of Recombinant Antigens against *Rhipicephalus microplus* and *Hyalomma anatolicum* Tick Infestations. *Pathogens*, 12(3), 433. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030433>
- Parthasarathi, B., Kumar, B., & Ghosh, S. (2021). Current status and future prospects of multi-antigen tick vaccine. *Journal of Vector Borne Diseases*, 58(3), 183. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.321739>

- Patarroyo, J. H., de Sousa Neves, E., Fidelis, C. F., Tafur-Gómez, G. A., de Araujo, L., Vargas, M. I., Sossai, S., & Prates-Patarroyo, P. A. (2020). Bovine immunisation with a recombinant peptide derived from synthetic SBm7462® (Bm86 epitope construct) immunogen for *Rhipicephalus microplus* control. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *11*(5), 101461. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101461>
- Patarroyo, J. H., Portela, R. W., De Castro, R. O., Couto Pimentel, J., Guzman, F., Patarroyo, M. E., Vargas, M. I., Prates, A. A., & Dias Mendes, M. A. (2002). Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *88*(3-4), 163-172. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00154-X)
- Pereira, D. F. S., Ribeiro, H. S., Gonçalves, A. A. M., da Silva, A. V., Lair, D. F., de Oliveira, D. S., Boas, D. F. V., Conrado, I. dos S. S., Leite, J. C., Barata, L. M., Reis, P. C. C., Mariano, R. M. da S., Santos, T. A. P., Coutinho, D. C. O., Gontijo, N. de F., Araujo, R. N., Galdino, A. S., Paes, P. R. de O., Melo, M. M., ... Giunchetti, R. C. (2022). *Rhipicephalus microplus*: An overview of vaccine antigens against the cattle tick. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *13*(1), 101828. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101828>
- Popara, M., Villar, M., Mateos-Hernández, L., de Mera, I. G. F., Marina, A., del Valle, M., Almazán, C., Domingos, A., & de la Fuente, J. (2013). Lesser protein degradation machinery correlates with higher BM86 tick vaccine efficacy in *Rhipicephalus annulatus* when compared to *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine*, *31*(42), 4728-4735. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.031>
- Pothmann, D., Poppert, S., Rakotozandrindrainy, R., Hogan, B., Mastropaolo, M., Thiel, C., & Silaghi, C. (2016). Prevalence and genetic characterization of *Anaplasma*

- marginalis in zebu cattle (*Bos indicus*) and their ticks (*Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*) from Madagascar. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(6), 1116-1123. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.013>
- Quinlan, J. F., Scarone, C. A., & Laneri, J. L. (1980). Cattle tick identification and seasonal variation in infestation rates in Paraguay. *Tropical Animal Health and Production*, 12(4), 259-264. <https://doi.org/10.1007/BF02236626>
- Quiroz, H. R. (2005). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos* (1ra ed.). Limusa.
- Rand, K. N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., & Cobon, G. S. (1989). Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9657-9661. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9657>
- Rappuoli, R. (2000). Reverse vaccinology. *Current Opinion in Microbiology*, 3(5), 445-450. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3)
- Rivera, E. D. (2012). Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1).
- Rodríguez, M., Massardj, C. L., Ramo, N. F., Labartail, V., & De la Fuente, J. (1995). Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine*, 13(18), 1804-1808. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(95\)00119-1](https://doi.org/10.1016/0264-410x(95)00119-1)
- Rodríguez, M., Penichet, M. L., Mouris, A. E., Labarta, V., Lorenzo Luaces, L., Rubiera, R., Cordovés, C., Sánchez, P. A., Ramos, E., Soto, A., Canales, M., Palenzuela, D.,

Triguero, A., Lleonart, R., Herrera, L., & de la Fuente, J. (1995). Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology*, 57(4), 339-349.
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00678-6](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00678-6)

Rodríguez-Mallon, A. (2023). The Bm86 Discovery: A Revolution in the Development of Anti-Tick Vaccines. *Pathogens*, 12(2), 231.
<https://doi.org/10.3390/pathogens12020231>

Rodríguez-Mallon, A., Encinosa-Guzmán, P. E., Fuentes-Castillo, A., Rodríguez-Fernández, R., Fernández-Alonso, Y., García-Martínez, Y., Bello-Soto, Y., Cano-Arguelles, A. L., Estrada-García, M. P., Méndez-Mellor, L., Aliaga Ramos, D., Díaz-García, A., Fernández-Cuetara, C., Ledesma-Brqavo, F. L., Silva Guirado, J. Á., & González-Alfaro, Y. (2023). Clasificación taxonómica precisa de aislamientos cubanos de garrapatas del complejo *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma cajennense*. En *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* (2023.^a-01-01 ed., Vol. 13, Número 1). <http://revistaccuba.sld.cu/index.php/revacc/article/view/1249>

Rodríguez-Mallón, A., Javier González, L., Encinosa Guzmán, P. E., Bechara, G. H., Sanches, G. S., Pousa, S., Cabrera, G., Cabrales, A., Garay, H., Mejías, R., López Álvarez, J. R., Bello Soto, Y., Almeida, F., Guirola, O., Rodríguez Fernández, R., Fuentes Castillo, A., Méndez, L., Jiménez, S., Licea-Navarro, A., ... Estrada, M. P. (2020). Functional and Mass Spectrometric Evaluation of an Anti-Tick Antigen Based on the P0 Peptide Conjugated to Bm86 Protein. *Pathogens*, 9(6), 513.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9060513>

Rodríguez-Mallon, A., Javier González, L., Encinosa-Guzmán, P. E., Estrada-García, M. P., Bello-Soto, Y., Cabrales, A., & Rodríguez Fernández, R. (2022). El conjugado

- químico pP0-Bm86 como antígeno de una vacuna de amplio espectro contra garrapatas. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 12(2), 11.
- Rodríguez-Valle, M., & Guerrero, F. D. (2018). Anti-tick vaccines in the omics era. *Frontiers in Bioscience*, 10(1), 122-136. <https://doi.org/10.2741/e812>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Chi, M. M. O., González, M. E. B., & Aguilar, A. R. (2019). Las garrapatas como vectores de enfermedades zoonóticas en México. *Bioagrociencias*, 12(1), 8.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez de León, A. A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J. F. de J., Fragoso Sánchez, H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., & García Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117(1), 3-29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M. M., Pérez-Cogollo, L. C., & Rosado-Aguilar, J. A. (2011). Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. En H. R. Quiroz, J. A. Figueroa-Castillo, F. Ibarra-Velarde, & M. A. López-Arellano (Eds.), *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. (pp. 477-504). AMPAVE.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

- Rosario Cruz, R., Inés Domínguez García, D., López Silva, S., & Rosario Domínguez, F. (2022). Integrated Management of the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and the Acaricide Resistance Mitigation. En R. Eduardo Rebolledo Ranz (Ed.), *Insecticides—Impact and Benefits of Its Use for Humanity*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100015>
- Rosario-Cruz, R., & Domínguez-García, D. I. (2016). Biological and Biochemical Bases of Pesticides Resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. En S. Trdan (Ed.), *Insecticides Resistance*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61839>
- Samish, M., Ginsberg, H., & Glazer, I. (2008). Anti-tick biological control agents: Assessment and future perspectives. En A. S. Bowman & P. A. Nuttall (Eds.), *Ticks* (pp. 447-469). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511551802.021>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Primera edición). (2017). Secretaría de Cultura, Instituto Nacional de Estudios Históricos de las Revoluciones de México : Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X., & Sun, B. (2019). Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*, 37(24), 3167-3178. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>
- Shihab, H. (2018). Effect of Aging on some Blood Parameters of Local Cows. *Journal Tikrit Univ. For Agri. Sci. Vol, 18(3)*, 28-33.
- Showler, A. T., & Saelao, P. (2022). Integrative Alternative Tactics for Ixodid Control. *Insects*, 13(3), 302. <https://doi.org/10.3390/insects13030302>

- SIAP. (2022). *Anuario Estadístico de la Producción Ganadera*. Anuario Estadístico de la Producción Ganadera. https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/
- Sossai, S., Peconick, A. P., Sales-Junior, P. A., Marcelino, F. C., Vargas, M. I., Neves, E. S., & Patarroyo, J. H. (2005). Polymorphism of the bm86 Gene in South American Strains of the Cattle Tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, 37(3-4), 199-214. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-3262-7>
- Spickett, A. M., & Malan, J. R. (1978). Genetic incompatibility between *Boophilus decoloratus* (koch, 1844) and *Boophilus microplus* (canestrini, 1888) and hybrid sterility of Australian and south African *Boophilus microplus* (acarina: Ixodidae). *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 45, 5.
- Suarez, M., Rubi, J., Pérez, D., Cordova, V., Salazar, Y., Vielma, A., Barrios, F., Gil, C. A., Segura, N., Carrillo, Y., Cartaya, R., Palacios, M., Rubio, E., Escalona, C., Ramirez, R. C., Baker, R. B., Machado, H., Sordo, Y., Bermudes, J., ... Estrada, M. P. (2016). High impact and effectiveness of GavacTM vaccine in the national program for control of bovine ticks *Rhipicephalus microplus* in Venezuela. *Livestock Science*, 187, 48-52. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.02.005>
- Tabor, E. A. (2019). The Enigma of Identifying New Cattle Tick Vaccine Antigens. En M. Abubakar & P. K. Perera (Eds.), *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81145>
- Tiffin, H. S., Rajotte, E. G., Sakamoto, J. M., & Machtinger, E. T. (2022). Tick Control in a Connected World: Challenges, Solutions, and Public Policy from a United States Border Perspective. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(11), 388. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7110388>

- Tizard, I. (2019). Inmunidad frente a parásitos. En *Inmunología veterinaria* (10.^a ed., pp. 310-323). Elsevier.
- Torrents, J., Sarli, M., Rossner, M. V., Toffaletti, J. R., Morel, N., Martínez, N. C., Webster, A., Mangold, A. J., Guglielmono, A. A., & Nava, S. (2020). Resistance of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin in Argentina. *Research in Veterinary Science*, *132*, 332-337. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.012>
- Trager, W. (1939). Acquired Immunity to Ticks. *The Journal of Parasitology*, *25*(1), 57. <https://doi.org/10.2307/3272160>
- Tramboo, S. R., Allaie, I. IM., Bulbul, K. H., Shahardar, R. A., & Wani, Z. A. (2021). Developments in anti-tick vaccines. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, *6*(2), 39-42.
- Ullmann, A. J., Lima, C. M. R., Guerrero, F. D., Piesman, J., & Black, W. C. (2005). Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Molecular Biology*, *14*(2), 217-222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00551.x>
- Umetsu, N., & Shirai, Y. (2020). Development of novel pesticides in the 21st century. *Journal of Pesticide Science*, *45*(2), 54-74. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-201>
- Valdez-Espinoza, U., Gómez-Romero, N., Hernández-Ortiz, R., Castro-Saines, E., & Lagunes-Quintanilla, R. (2021). Characterization of an immunogenic region of the Bm86 antigen as an improved vaccine against the *Rhipicephalus microplus* tick. *Mexican journal of biotechnology*, *6*(4), 35-49. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2021.6.4.35>

- Vieira Gomes, A., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., & Parachin, N. (2018). Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms*, 6(2), 38. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020038>
- Walker, J. B., Keirans, J. E., & Horak, I. G. (2000). *The Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World* (1.^a ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511661754>
- Wickham, J. C., Chadwick, P. R., & Stewart, D. C. (1974). Factors which influence the knockdown effect of insecticide products. *Pesticide Science*, 5(5), 657-664. <https://doi.org/10.1002/ps.2780050518>
- Willadsen, P. (2008). Anti-tick vaccines. En A. S. Bowman & P. A. Nuttall (Eds.), *Ticks* (1.^a ed., pp. 424-446). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511551802.020>
- Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G. S., & Hungerford, J. (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 110(S1), S43-S50. <https://doi.org/10.1017/S0031182000001487>
- Willadsen, P., Riding, G. A., McKenna, R. V., Kemp, D. H., Tellam, R. L., Nielsen, J. N., Lahnstein, J., & Cobon, G. S. (1989). Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *Journal of Immunology*, 143(4), 1346-1351.
- Yu, Z., Wang, H., Wang, T., Sun, W., Yang, X., & Liu, J. (2015). Tick-borne pathogens and the vector potential of ticks in China. *Parasites & Vectors*, 8(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0628-x>