



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Caracterización de la proteína de unión a la histamina 2 (HBP2) de *Rhipicephalus linnaei* y evaluación de su eficacia vacunal

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MV. Diana Patricia Díaz García

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Querétaro, Qro. A 11 de Enero de 2025

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
(Enero de 2025)
México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Caracterización de la proteína de unión a la histamina 2 (HBP2) de *Rhipicephalus linnaei* y evaluación de su eficacia vacunal

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta:

MV. Diana Patricia Díaz García

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Secretaria

Dra. Minerva Camacho Nuez
Vocal

MSPAS Aldo Josué Pavón Rocha
Vocal

MSPAS Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio
Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
(Enero de 2025)
México

Dedicatoria

Este logro se lo dedico a mis padres, por su apoyo y amor constante, por alentarme día a día a ser mejor persona. A mis abuelas que, aunque no estaban de acuerdo con mi decisión de viajar a otro país, me dieron su bendición. A mis abuelos, que desde el cielo me siguen alentando para avanzar en mi proyecto de vida y a toda mi familia por su apoyo incondicional. También quiero dedicar este logro a ese ejército de personas, que constantemente oran por mí.

Por último, quiero dedicar y recordar a mis mascotas Niña, Luna y Polo por las huellas de amor dejadas a lo largo de los años compartidos, siempre vivirán en mi corazón.

Agradecimientos

Agradezco a Dios, por regalarme el don de la fortaleza; igualmente por la oportunidad de conocer a personas tan maravillosas y un país hermoso y mágico, que siento como mi segundo hogar.

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) y la Universidad Autónoma de Querétaro por su apoyo en mi formación académica.

Agradezco a todas las personas que hicieron posible este proyecto, en especial al director de tesis, Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por brindarme su total apoyo desde el primer momento, con sus consejos, aportes y sobre todo por permitirme conocer el maravilloso mundo de la investigación, ¡Mil gracias!.

Gracias a mis sinodales: Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú, Dra. Minerva Camacho Nuez, MSPAS Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio y MSPAS Aldo Josué Pavón Rocha, por sus conocimientos y valiosos aportes para este proyecto.

Agradezco a mis compañeros de generación (Andrea, Alejandra, Jessica, Aurora, Arturo y Karla), porque siempre me hicieron sentir acogida, por todo el conocimiento que me proporcionaron desde su campo de acción y por todos esos bonitos momentos vividos.

Agradecimiento especial al laboratorio de inmunología y vacunas (LINVAS) por abrir espacios de crecimiento profesional a partir de la investigación. A mis compañeros y equipo del laboratorio, por su valiosa colaboración, por todo lo compartido y esos buenos momentos vividos en este trabajo.

También quiero agradecer a mi amiga Valeria de la Cruz, por acogerme desde el primer momento, por brindarme su ayuda constantemente.

Gracias a este país, Estados Unidos Mexicanos por abrirme sus puertas, por enseñarme su cultura y por hacerme enamorar de este maravilloso lugar.

Finalmente, quiero agradecer enormemente a todos los amigos que se sumaron a mi vida, por brindarme su cariño, su conocimiento, por tantas sonrisas, y por permitirme mostrarles un pedacito de Colombia.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
Resumen.....	1
Summary.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Clasificación de las garrapatas.....	5
2.2 <i>Rhipicephalus linnaei</i>	7
2.2.1 Taxonomía.....	7
2.2.2 Ciclo biológico.....	9
2.2.3 Morfología general de <i>R. linnaei</i>	11
2.2.4 Alimentación.....	12
2.2.5 Control.....	13
2.3 Proteína de unión a histamina.....	14
III. HIPÓTESIS.....	17
IV. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
V. JUSTIFICACIÓN.....	19
VI. METODOLOGÍA.....	20
6.1 Materiales y métodos.....	20
6.1.1 Localización.....	20
6.1.2 Material biológico utilizado.....	20
6.1.3 Extracción de ARN total en <i>R. linnaei</i>	20
6.1.4 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>hbp2</i> en <i>R. linnaei</i>	22
6.1.5 Diseño de oligonucleótidos.....	23
6.1.6 Amplificación de la región codificante del gen <i>hbp2</i> en <i>R. linnaei</i>	23
6.1.7 Clonación de la región codificante del gen <i>hbp2</i> de <i>R. linnaei</i>	24

6.1.8	Análisis bioinformático e identificación de péptidos.....	25
6.1.9	Síntesis de péptidos.....	26
6.1.10	Inmunizaciones.....	26
6.1.11	Determinación de anticuerpos mediante ELISA indirecta.....	27
6.1.12	Evaluación de la eficacia vacunal.....	28
VII.	RESULTADOS.....	29
7.1	Análisis <i>in silico</i> del gen <i>hbp2</i> de <i>Rhipicephalus linnaei</i>	29
7.2	Diseño de oligonucleótidos.....	29
7.3	Evaluación de la expresión del gen <i>hbp2</i>	30
7.4	Clonación de la región codificante del gen <i>hbp2</i> de <i>R. linnaei</i>	32
7.5	Secuenciación de la región codificante del gen <i>hbp2</i> de <i>R. linnaei</i>	32
7.6	Análisis bioinformático e identificación de péptidos.....	33
7.6.1	Hidrofobicidad.....	35
7.6.2	Predicción y clasificación de topologías transmembrana.....	35
7.6.3	Péptido señal.....	36
7.7	Identificación y selección de péptidos con epítomos B.....	37
7.8	Resultados de la evaluación de los anticuerpos contra la proteína HBP2 mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA indirecta).....	39
7.9	Evaluación de la eficacia vacunal.....	40
7.9.1	Infestación experimental.....	40
7.9.2	Evaluación de los parámetros biológicos.....	41
7.9.3	Cálculo de la eficacia vacunal.....	43
VIII.	DISCUSIÓN.....	45
IX.	CONCLUSIONES.....	49
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	50
XI.	ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Descripción de las fases del ciclo biológico de <i>R. linnaei</i>	10
2	Programa de termociclado para amplificar la región codificante del gen de <i>hbp2</i> de <i>R. linnaei</i>	24
3	Características de los oligonucleótidos para la amplificación de la región codificante gen <i>hbp2</i> de <i>R. linnaei</i>	30
4	Características de los péptidos diseñados de la proteína HBP2 de <i>R. linnaei</i>	37
5	Eficacia de los péptidos evaluados	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Detalles morfológicos de las garrapatas de la familia <i>Ixodidae</i> y <i>Argasidae</i>	6
1	Relaciones filogenéticas de <i>R. sanguineus</i>	8
2	Filogenia del genoma mitocondrial de <i>R. linnaei</i> sensu lato (s.l.)	9
4	Ciclo biológico de las garrapatas <i>R. linnaei</i>	10
5	Descripción gráfica de la metodología	21
6	Esquematación de localización del gen <i>hbp2</i>	29
7	Oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento de la región codificante del gen <i>hbp2</i> .	29
8	Amplificación de la región codificante del gen <i>hbp2</i> de <i>R. linnaei</i> .	31
9	Amplicones obtenidos de la región codificante del gen <i>16S</i> de <i>R. linnaei</i>	31
10	Amplicón obtenido de la región codificante del gen <i>12S</i> de <i>R. linnaei</i>	32
11	PCR de colonias transformadas con el gen <i>hbp2</i> de <i>R. linnaei</i>	32
12	Secuencia experimental obtenida de la región codificante del gen <i>hbp2</i>	33
13	Matriz de porcentajes de identidad	34
14	Alineamiento de las secuencias	34
15	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína HBP2 de <i>R. linnaei</i>	35
16	Análisis bioinformático de topologías transmembranales	36
17	Análisis del péptido señal predicho en la proteína HBP2 de <i>R. linnaei</i>	36
18	Análisis de la arquitectura de los dominios en la proteína HBP2 de <i>R. linnaei</i>	37
19	Estructura de la proteína HBP2	38
20	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido HBP2-1	39
21	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido HBP2-2	40
22	Gráfica de determinación de anticuerpos de los conejos inmunizados con el péptido HBP2-2, durante la infestación experimental controlada.	40
23	Peso promedio de las garrapatas recolectadas.	41
24	Masa de oviposición obtenida con el total de garrapatas.	42
25	Viabilidad de las larvas, contabilizados en masa de huevos eclosionadas.	43
26	Fórmula para cálculo de eficacia vacunal.	43

Resumen

La garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus linnaei*, es una de las especies más relevantes en medicina veterinaria debido a su amplia distribución en México y el mundo; además, de su capacidad para transmitir patógenos con potencial zoonótico. El control de esta garrapata es crucial para prevenir enfermedades en animales y humanos. Sin embargo, el uso indiscriminado de acaricidas químicos ha generado problemas de contaminación ambiental y resistencia. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas sustentables para el control de estos parásitos, las vacunas contra garrapatas son una opción prometedora, ya que se basan en la utilización de proteínas inmunogénicas con funciones biológicas relevantes para la garrapata. La proteína de unión a la histamina 2 (HBP2) ha demostrado ser relevante durante el proceso de alimentación, en algunos parásitos como, *Rhipicephalus appendiculatus* y se ha determinado que esta proteína tiene una función significativa en la modulación de la respuesta inmune del hospedante, permitiendo a las garrapatas alimentarse eficientemente. Al ser una proteína con potencial inmunogénico, el objetivo de este trabajo fue caracterizar la HBP2 de *R. linnaei* y evaluar su eficacia vacunal. Para esto, se identificó la secuencia del gen *hbp2 in silico*, se amplificó mediante RT-PCR, se clonó y secuenció. Con base en la secuencia obtenida se seleccionaron 2 péptidos con epítomos B, se enviaron a sintetizar de manera comercial y se utilizaron para formular dosis vacunales. Posteriormente, se inmunizaron conejos con cada uno de los péptidos y se evaluó la respuesta inmunológica mediante inmunoensayos. Se obtuvieron títulos específicos anti-HBP2 en el grupo inmunizado con el péptido HBP2_2; además, se evaluó la eficacia vacunal mediante un desafío controlado y en la evaluación de los parámetros biológicos para determinar la eficacia vacunal, se evidenció una disminución del 6.67% en el peso promedio de las garrapatas, 9.66% en la producción de huevos y 16% en tasa de eclosión en las garrapatas desafiadas. Finalmente, se obtuvo una eficacia vacunal del 29,42%. Los resultados de esta investigación permiten establecer las bases metodológicas para la caracterización de la proteína de unión a la histamina 2 (HBP2) de *Rhipicephalus linnaei* y evaluación de su eficacia vacunal.

Palabras claves: canino, vacuna, garrapatas, HBP-2, *R. linnaei*.

Summary

The brown dog tick, *Rhipicephalus linnaei*, is one of the most relevant species in veterinary medicine due to its wide distribution in Mexico and the world; in addition, its ability to transmit pathogens with zoonotic potential. Control of this tick is crucial to prevent diseases in animals and humans. However, the indiscriminate use of chemical acaricides has generated problems of environmental contamination and resistance. Therefore, it is necessary to find sustainable alternatives for the control of these parasites. Tick vaccines are a promising option, since It's based on the use of immunogenic proteins with biological functions relevant to the tick. Histamine-binding protein 2 (HBP2) has been shown to be relevant during the feeding process in some parasites such as *Rhipicephalus appendiculatus* and it has been determined that this protein has a significant function in the modulation of the host's immune response, allowing ticks to feed efficiently. Since it is a protein with immunogenic potential, the objective of this investigation was to characterize HBP2 protein of *R. linnaei* and evaluate the vaccine efficacy. For this purpose, the sequence *hbp2* gene was identified *in silico*, amplified by RT-PCR, cloned and sequenced. Based on the sequence obtained, 2 peptides with B epitopes were selected, sent for commercial synthesis and used to formulate vaccine doses. Subsequently, rabbits were immunized with each of the peptides and the immune response was evaluated by immunoassays. Specific anti-HBP2 titers were obtained in the group immunized with the HBP2_2 peptide; In addition, vaccine efficacy was evaluated by means of a controlled challenge and in the evaluation of the biological parameters to determine vaccine efficacy, a 6.67% decrease in the average weight of ticks, 9.66% in egg production and 16% in hatching rate in challenged ticks was evidenced. Finally, a vaccine efficacy of 29.42% was obtained. The results of this research allow establishing the methodological bases for the characterization of the histamine binding protein 2 (HBP2) of *Rhipicephalus linnaei* and the evaluation of its vaccine efficacy.

Keywords: canine, vaccine efficiency, tick, HBP-2, *R. linnaei*.

I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos hematófagos obligados que parasitan a diversos vertebrados (Parola y Raoult, 2001), tienen una distribución mundial y ocupan el segundo lugar como vector de enfermedades infecciosas después de los mosquitos (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005); por esta razón, se consideran parásitos de interés en la salud pública, debido a su capacidad de transportar y transmitir diversidad de patógenos a los humanos (Dantas-Torres *et al.*, 2006).

Se ha identificado que estos artrópodos son vectores de los patógenos causantes de las rickettsiosis, babesiosis, ehrlichiosis y hepatozoonosis (Parola y Raoult, 2001; Dantas-Torres, 2010; Dantas-Torres y Otranto, 2015; Nava *et al.*, 2015); además, tienen capacidad para infestar a un gran número de vertebrados domésticos y silvestres (Coimbra-Dores *et al.*, 2016; Beati y Klompen, 2018).

Actualmente, la garrapata marrón del perro, es una de las especies más estudiadas debido a su relevancia veterinaria; sin embargo, el estudio de esta especie se ha limitado a su biología y ecología (Dantas-Torres, 2010), siendo deficientes las investigaciones acerca de las enzimas y proteínas que facilitan el proceso de alimentación de las garrapata; la mayoría de estas moléculas tienen propiedades que permiten evadir la respuesta inmune (Aounallah *et al.*, 2020), y el estudio de estas, podrían contribuir en la búsqueda de nuevas estrategias de control sustentables, a través del uso de antígenos de garrapatas como inmunógenos (Almazán, 2010); estos antígenos protectores contra la garrapata, tienen como función que los anticuerpos generados por el sistema inmunitario del hospedante, puedan acceder en cantidades suficientes a la garrapata durante la alimentación, para unirse a la proteína de interés, impidiendo su función normal, generando alteración de parámetros biológicos durante alguna fase del ciclo de vida (De la Fuente y Contreras, 2015). No obstante, Parola y Raoult (2001) mencionan que la búsqueda de nuevas estrategias había aumentado para la fecha; sin embargo, a pesar de más de 20 años de investigación, los resultados son muy incipientes.

El propósito de este trabajo es lograr un acercamiento a la proteína de unión a la histamina 2 (HBP2); debido a que esta proteína ha demostrado ser relevante durante el proceso de alimentación. Al ser una proteína con potencial inmunogénico es relevante el identificar y caracterizar esta proteína, debido a que permitirá generar una propuesta sobre su uso en estrategias de control inmunológico; es decir proponer un posible candidato vacunal patentable.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Clasificación de las garrapatas

En la actualidad las garrapatas se clasifican en el Phylum Arthropoda, orden Ixodida del superorden Parasitiformes, estas parasitan a toda clase de vertebrados en diversas regiones del mundo (Parola y Raoult, 2001; Dantas-Torres, 2008; Nicholson *et al.*, 2009; Nodari *et al.*, 2011) de gran importancia médica y veterinaria debido a que son vectores de algunos patógenos como *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bigemina* y *Rickettsia conorii* (Anderson y Magnarelli, 2008).

Las investigaciones filogenéticas realizadas, estiman que hace aproximadamente 120 millones de años en el cretácico tardío se produce la aparición de la garrapata (Klompen *et al.*, 1996); siendo el fósil más antiguo descubierto hasta el momento, el del Argásido *Carios jerseyi* con una antigüedad cercana a los 90 millones de años, lo que evidencia una temprana diversificación del grupo en las familias conocidas (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005). En la actualidad, se han descrito alrededor de 900 especies diferentes de garrapatas, pertenecientes a tres familias Argasidae, Ixodidae y Nuttalliellidae; esta última, con un único género *Nuttalliella namaqua* reportado en Namibia, Suráfrica y Tanzania; aunque se desconoce sobre su biología, esta especie parece no tener importancia médica veterinaria (Marquardt *et al.*, 2000). En general, estas familias mencionadas difieren en su ciclo biológico, anatomía (Figura.1) y fisiología (Estrada-Peña, 2015).

La familia Argasidae comprende dos subfamilias, Argasinae y Ornithodorinae con 4 géneros: *Argas*, *Carios*, *Ornithodoros* y *Otobius* (Parola y Raoult, 2001; Nava *et al.*, 2009;). Este linaje se conoce comúnmente como “garrapatas blandas” denominadas así, por la presencia de una cutícula externa flexible (Sonenshine y Roe, 1991); adicionalmente presentan palpos con un aspecto similar a las patas, los estigmas respiratorios son pequeños, y se encuentran por delante de las coxas del cuarto par de patas; las larvas presentan un escudo rudimentario y pulvilos tarsales bien desarrollados, mientras que las ninfas y adultos carecen de estos; Asimismo, poseen gnatosoma situado ventralmente bajo el idiosoma, en

una depresión que se conoce como camerostoma y no muestran dimorfismo sexual (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

Por otro lado, la familia Ixodidae o “garrapatas duras”, poseen placa dorsal esclerotizada, gnatosoma ubicado apicalmente y algunos atributos que mejoran su capacidad de transmitir patógenos (Dantas-Torres, 2008). La familia Ixodidae incluye 2 grupos principales, Prostriata (subfamilia Ixodinae, género Ixodes) y Metastricata (Parola y Raoult, 2001).

Beati y Klompen (2018) mencionan que las Metastricata incluyen cuatro subfamilias: tres monogénicas (Amblyomminae, Bothriocrotoninae y Haemaphysalinae) y Rhipicephalinae, contiene los géneros *Anomalohimalaya*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor*, y *Rhipicephalus*.

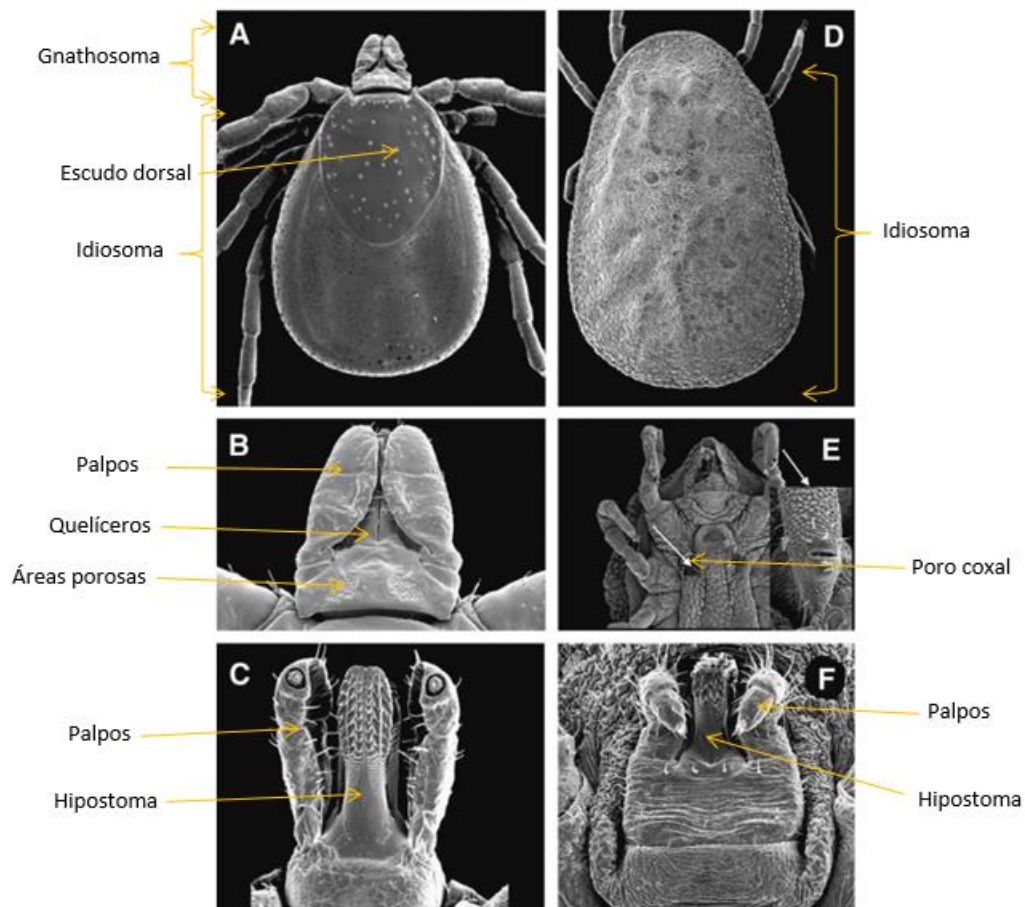


Figura 1. Detalles morfológicos de las garrapatas de la familia *Ixodidae* (A, B, C) y *Argasidae* (D, E, F) (Modificado de Estrada-Peña, 2015).

Los ciclos biológicos tanto de los argásidos como los ixódidos presentan tres estadios: larva, ninfa y adulto (macho o hembra), con un desarrollo indirecto, difieren entre sí, en su evolución de estadios larvarios (Nuttall, 1904), así como en la duración del ciclo; es decir, las ixódidas se alimentan durante varios días; mientras que las argásidas se alimentan solo durante minutos, y comúnmente durante la noche, mientras los animales descansan en sus madrigueras (Estrada-Peña, 2015).

2.2 *Rhipicephalus linnaei*

La garrapata marrón del perro, es probablemente el parásito con la distribución global más grande en todo el mundo (Dantas-Torres, 2008; Almeida *et al.*, 2017); introducida inicialmente desde la región africana a diversos países del mundo, eventualmente por la importación de perros domésticos infestados (Dantas-Torres *et al.*, 2006); esta especie se encuentra establecida en África, América del Norte, Central y del Sur, Asia, Europa y Oceanía (Moraes-Filho *et al.*, 2011); sin embargo, existe una mayor diversidad de especies en países tropicales y subtropicales (Anderson y Magnarelli, 2008; Páez-Triana *et al.*, 2021). Estos artrópodos son de gran importancia económica y de salud pública, dado que se han identificado como vectores de los patógenos causantes de las rickettsiosis, babesiosis, ehrlichiosis y hepatozoonosis, entre otras (Parola y Raoult, 2001; Dantas-Torres, 2010; Dantas-Torres y Otranto, 2015; Nava *et al.*, 2015); con capacidad para infestar a una amplia variedad de vertebrados domésticos y silvestres (Coimbra-Dores *et al.*, 2016; Beati y Klompen, 2018).

2.2.1 Taxonomía

Esta especie fue descrita inicialmente por Latreille (1806) como *Ixodes*. Sin embargo, la posición taxonómica actual de esta especie dentro del suborden Ixodida fue determinada por Koch (1844) quien lo transfirió al género *Rhipicephalus*. A pesar de que Koch (1847) presentó una breve descripción de *R. sanguineus*, la primera descripción completa de esta especie fue dada por Neumann (1897); no obstante, los recientes estudios genéticos, biológicos y análisis de secuencias de los genes del DNAr mitocondrial 16S y 12S separan

las muestras de garrapatas en diferentes poblaciones en al menos 2 linajes distintos; “linaje tropical”, distribuido desde el norte de Argentina hasta México y “linaje templado” en zonas de bajas temperaturas en el sur de Argentina, Brasil, Chile, Estados Unidos, Egipto, Israel , Francia y Uruguay (Figura. 2) (Moraes-Filho *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2013; Nava *et al.*, 2015); así mismo, Šlapeta *et al.* (2022) señalan en su artículo, una reclasificación basada en estudios filogenéticos de *Rhipicephalus sanguineus* a *Rhipicephalus linnaei* el “linaje tropical” de la garrapata marrón (Figura. 3).

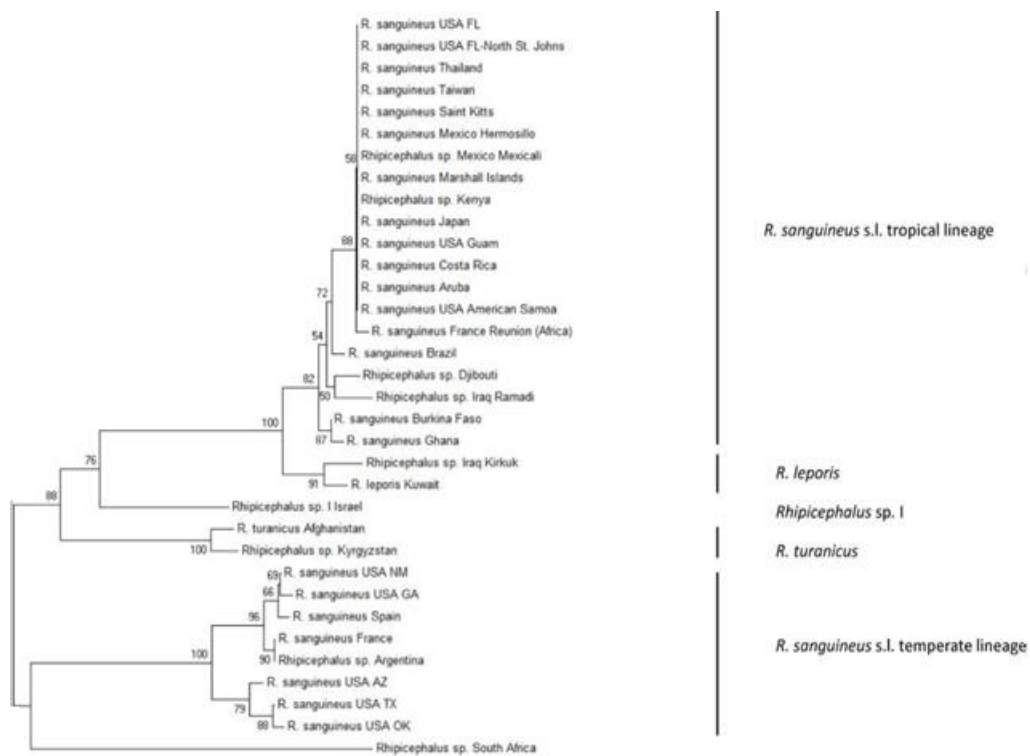


Figura 3. Relaciones filogenéticas de *R. sanguineus* (Zemtsova *et al.*, 2016)

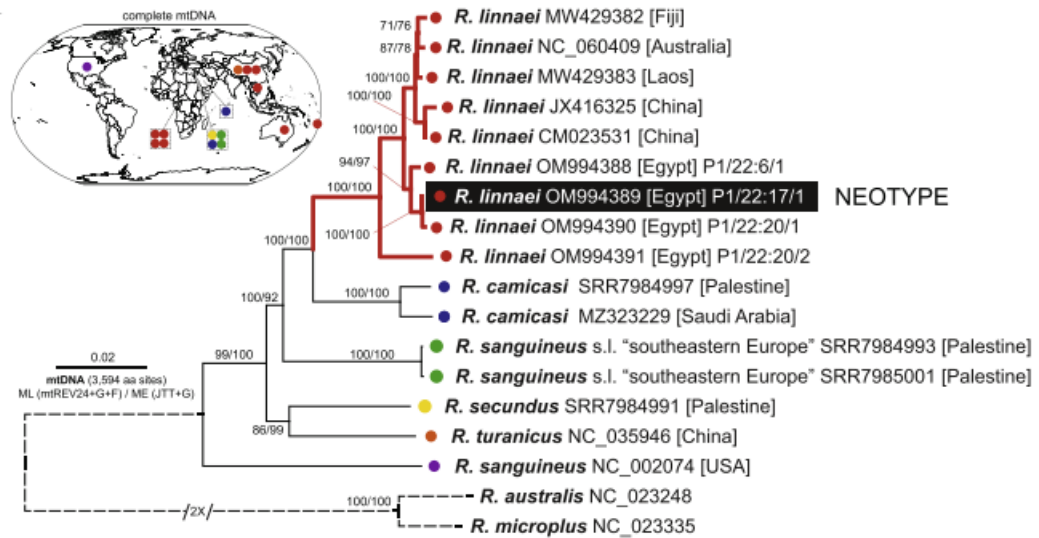


Figura 4. Filogenia del genoma mitocondrial de *R. linnaei* sensu lato (s.l.) Šlapeta *et al.* (2022)

2.2.2 Ciclo biológico

La especie presenta cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto; las tres últimas etapas son activas y el paso de una etapa a otra dependerá de la ingestión de sangre de un hospedante; la digestión de la misma, implica cambios morfoanatómicos (Cuadro 1) que finaliza con la muda del tegumento y un período de vida libre a la búsqueda de un nuevo anfitrión (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

R. linnaei es una garrapata de tres hospederos siendo el perro el principal hospedero (Szabó, 2001) (Figura 4); sin embargo, en su etapa inmadura (larvas y ninfas) habitualmente se alimentan de pequeños huéspedes (roedores y pájaros), mientras que los adultos usualmente se alimentan de animales grandes, incluidos carnívoros y ungulados (Estrada-Peña y De la Fuente, 2014).

Cuadro 1. Descripción de las fases del ciclo biológico de *R. linnaei*.

<i>Etapa</i>	<i>Aspecto</i>		<i>Descripción</i>
<i>Larva</i>	Largo 0,5 mm Ancho 0,4 mm	Amarillo claro	Se alimenta durante 3-10 días; muda a los 5-15 días; puede sobrevivir hasta 8 meses sin comer.
<i>Ninfa</i>	Largo 1-1,3 mm Ancho 0,5-0,6 mm	Amarillo, marrón claro	Se alimenta durante 3-11 días; muda a los 9-47 días; puede sobrevivir hasta 6 meses sin comer.
<i>Macho Adulto</i>	Largo 2-3 mm Ancho 1-1,6 mm	Plano, rojizo-marrón, con pequeñas cavidades en el dorso.	Puede Sobrevivir hasta 19 meses sin comer.
<i>Hembra Adulta</i>	Largo 2-3 mm Ancho 1-1,6 mm	Similar a los machos excepto por el escudo dorsal, más corto	Se alimenta durante 5-21 días; puede sobrevivir hasta 19 meses sin comer.
<i>Hembra repleta de sangre</i>	Largo 11,5 mm Ancho 7,5 mm	Gris verdoso con un escudo dorsal marrón	El periodo de ovoposición es de 16-18 días; después de la puesta la hembra muere.

Fuente: Adaptado de Dantas-Torres (2008; 2010).

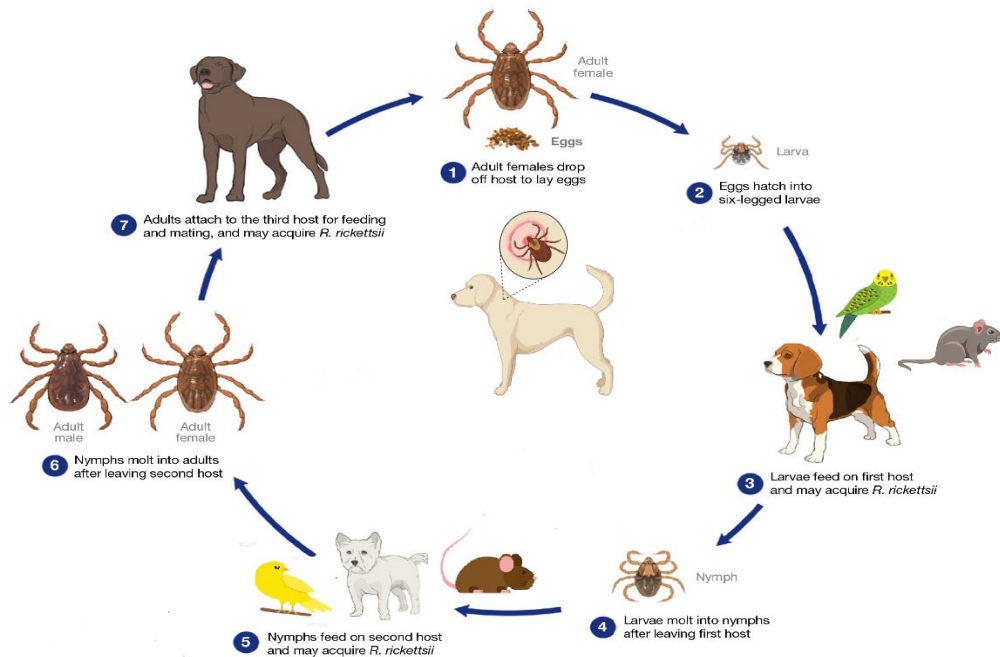


Figura 4. Ciclo biológico de las garrapatas *R. linnaei* (modificado del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades CDC).

El ciclo biológico de las garrapatas se deriva de un proceso de adaptación a condiciones ambientales y la disponibilidad de hospedadores adecuados para cada uno de los estadios que aparecen en su ciclo biológico (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005); es decir, los periodos de alimentación varían por factores bióticos (especie huésped) y abióticos (temperatura y humedad) (Gray *et al.*, 2013).

Adicionalmente, las hembras requieren grandes cantidades de sangre para producir huevos (4.000, incluso hasta 7.273 huevos) logrando aumentar hasta cien veces su peso corporal (Dantas-Torres, 2008); contrario a las hembras, los machos pueden permanecer adheridos al huésped durante varias semanas y no se repletan de la misma manera, pero deben ingerir pequeñas cantidades de sangre para que su espermatogénesis proceda y complete el proceso de apareamiento (Dantas-Torres, 2010), mientras que las larvas y las ninfas necesitan sangre para su proceso de muda (Gray *et al.*, 2013).

2.2.3 Morfología general de *R. linnaei*

Las garrapatas son parásitos de gran tamaño (2 a 30 mm) (Parola y Raoult, 2001), siendo la característica diferencial de las garrapatas duras, el escudo dorsal que cubre toda la parte dorsal de los machos y parcialmente el de las hembras (Estrada-Peña, 2015); el escudo dorsal de la hembra, más corto, permite que su cuerpo se expanda durante su alimentación con sangre (Gray *et al.*, 2013).

El cuerpo de las garrapatas carece de segmentación (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005); generalmente su estructura consiste en dos partes fusionadas capitulum (gnathosoma) y cuerpo (idiosoma) (Estrada-Peña, 2015). La parte anterior del cuerpo, el capitulum, contiene las piezas bucales, incluidos los palpos tetrsegmentados (cuatro artejos) dispuestos lateralmente que presentan capacidad sensorial, un par de quelíceros y el hipostoma con numerosos dientes curvados que anclan la garrapata a la piel del huésped (Márquez-Jiménez, *et al.*, 2005; Anderson y Magnarelli, 2008).

Las larvas tienen 3 pares de patas, contrario a los adultos que tienen 4 pares de patas para desplazarse, al igual que las ninfas; sin embargo, son sexualmente inmaduras, es decir, no tienen abertura genital (Dantas-Torres, 2008).

Estos parásitos tienen una variedad de órganos sensoriales periféricos (Parola y Raoult, 2001). Estos incluyen una estructura para la búsqueda y detección que se realiza mediante el llamado órgano de Haller, el cual se ubica en el extremo dorsal del primer par de patas (Estrada-Peña, 2015); asimismo, una estructura similar a pelos en el cuerpo, las piernas, las piezas bucales y un complejo sensorial con receptores olfativos y gustativos; además posee un sistema circulatorio encargado de irrigar todos los órganos y tejidos con su fluido hemolinfa (Parola y Raoult, 2001).

2.2.4 Alimentación

Para completar su ciclo de vida, las garrapatas necesitan alimentarse de sangre para la reproducción y desarrollo (Anderson y Magnarelli, 2008) siendo la hemoglobina, la principal fuente de alimento, excluyendo a los demás nutrientes. Como parásitos obligados, las garrapatas deben buscar un hospedante adecuado, adherirse a la superficie de la piel con sus garras tarsales, comenzar a cortar la epidermis y la dermis con sus quelíceros y anclar en el tejido, el hipostoma para acceder a los vasos sanguíneos (Dantas-Torres, 2008). La alimentación implica tres regiones del tubo digestivo: (1) boca, faringe y esófago (para adquirir la sangre); (2) intestino medio (digestión de la sangre); y (3) saco rectal/canal anal (almacenamiento y eliminación de residuos) (Sonenshine y Roe, 2013).

La digestión de las proteínas de la sangre, como la hemoglobina y otras moléculas es totalmente intracelular, se realiza dentro de las células epiteliales del intestino medio (Anderson y Magnarelli, 2008); sin embargo es relativamente lenta, por lo que el proceso de la digestión de grandes cantidades de sangre es progresivo, lo que permite a la garrapata mantener grandes volúmenes del alimento ingerido, como reserva o almacenamiento en su tracto digestivo (Sonenshine y Roe, 2013), el tiempo que se tarda la garrapata en alimentarse, varía de acuerdo con el estado de desarrollo en que se encuentre cómo se muestra en el Cuadro 1, página 11 (Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016).

Las glándulas salivales también contribuyen al proceso de alimentación en la lubricación de partes o piezas bucales, y en la secreción de sustancias (cemento) para anclar las piezas bucales a la piel del huésped (Parola y Raoult, 2001). Adicionalmente, debido a que la alimentación puede durar tiempo prolongado, es necesaria la participación de sustancias que evadan la respuesta inmune del hospedante (Estrada-Peña, 2015).

Estas moléculas que permiten la evasión de la respuesta inmune son consideradas como buenos candidatos para el desarrollo de una vacuna. Dado que, al aislar el inmunosupresor salival, se evidencia un efecto en el establecimiento del parásito y se induce la generación de anticuerpos contra este componente para neutralizar su actividad biológica (De la Fuente y Contreras, 2015).

2.2.5 Control

El control de las garrapatas es fundamental para disminuir pérdidas económicas y problemas en la salud animal y pública; sin embargo, el control de garrapatas se debe basar en un concepto de manejo integrado; es decir, adaptación a diferentes métodos de control en un área y contra una especie de garrapata, considerando el impacto ambiental (Parola y Raoult, 2001) entendiendo que: solo el 5% de las garrapatas están en el perro; el restante 95% está en el medio ambiente (Dantas-Torres, 2008).

Los métodos de control en perro pueden tratarse con una amplia gama de preparaciones como: aerosoles, baños, collares, champús y polvos; siendo los acaricidas químicos los más utilizados; estos productos han ido perdiendo su eficacia ya que las poblaciones de garrapatas expuestas constantemente a estos químicos generan resistencia hacia ellos, sumado a los altos costos, riesgos a la salud humana y contaminación ambiental que conlleva el uso de estos químicos (Dantas-Torres, 2008; Rodríguez-Vivas, 2010).

En México entre los años 1974 y 1984 se realizó la Campaña Nacional de erradicación de la garrapata, detectándose el primer caso de resistencia a organofosforados dado su uso excesivo en *R. microplus* en un rancho en el sur de México (Tuxpan, Veracruz) en 1983. Por otro lado, el amitraz producto muy usado en el control de ectoparásitos, tuvo un uso limitado

inicialmente; sin embargo, su uso se volvió más frecuente después de 1993; no obstante, en 2002 se informa el primer caso de resistencia en México. Actualmente, los ixodicidas más empleados son: fipronil, piretroides sintéticos, amitraz y lactonas macrocíclicas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2013).

La búsqueda de nuevas estrategias de control sustentables contra las garrapatas ha ido en incremento en los últimos años (Parola y Raoult, 2001). Uno de los métodos de control sustentable, es el control inmunológico, a través del uso de antígenos de garrapatas como inmunógenos (Almazán, 2010). El fundamento básico por el cual funcionan los antígenos protectores contra la garrapata, es que los anticuerpos generados por el sistema inmunitario del hospedero puedan acceder en suficientes cantidades a la garrapata durante la alimentación, para unirse a la proteína de interés y bloquear su función normal, viéndose afectado algún parámetro biológico durante alguna fase de su ciclo de vida (De la Fuente y Contreras, 2015).

2.3 Proteína de unión a histamina

La histamina (HA) producto de la descarboxilación del aminoácido histidina es un mediador inmunológico de reacciones inflamatorias (Paesén *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 2022), que puede encontrarse en casi todos los tejidos del cuerpo de los mamíferos (Alrashdi *et al.*, 2022). Esta molécula es sintetizada principalmente por mastocitos y basófilos (Karasuyama *et al.*, 2020). Existen cuatro receptores de histamina (H1, H2, H3 y H4) que median distintos efectos en el momento de la unión a histamina y tienen diferentes distribuciones en los tejidos (Owen *et al.*, 2016).

La proteína de unión a la histamina (Histamine Binding Protein- HBP2) fue estudiada por primera vez en la garrapata *Rhipicephalus appendiculatus*.

Paesén *et al.* (2000) caracterizaron en las glándulas salivales de *R. appendiculatus* tres proteínas de unión a histamina, denominadas RaHBP1, RaHBP2 y RaHBP3. La caracterización de esta proteína permitió conocer que HBP-1 y HBP-2 se expresan exclusivamente en garrapatas hembras, que su expresión máxima se da en 48 h después de la adhesión con el hospedero y que está ausente después del cuarto día de alimentación; por

otro lado, la proteína HBP3 es secretada exclusivamente por larvas, ninfas y garrapatas macho adultas; este hallazgo se correlaciona con el hecho de que los machos se unen más de una vez durante una fase de alimentación y es necesario regular la respuesta inmune en cada sitio de unión (Mans, 2005).

Paesén *et al.* (2000) menciona que la proteína de unión a histamina es miembro de la familia de proteínas lipocalinas, estas moléculas típicamente son pequeñas con una masa molecular promedio de 18- 20 kd (García *et al.*, 2007). Las lipocalinas en general, se han clasificado como proteínas de transporte extracelular, tienen la capacidad para unirse a moléculas pequeñas, principalmente hidrofóbicas y consiguen acarrear sobre sí pequeñas moléculas lipofílicas como vitaminas, hormonas esteroideas y tiroideas, ácidos grasos, ácidos biliares, agentes inmunógenos y moléculas odorantes (Flower, 1996; García *et al.*, 2007).

Estructuralmente la proteína HBP2 está constituida por 171 residuos y se secreta como monómero de 20 kDa no glicosilados y mientras que la mayoría de las lipocalinas tienen cavidades de unión altamente hidrofóbicas diseñadas para unir compuestos lipofílicos, las HBP han evolucionado para atrapar moléculas catiónicas e hidrofílicas (Paesén *et al.*, 2000).

Wang *et al.* (2016) señalan que estas proteínas secretadas por las glándulas salivales de las garrapatas, están involucradas con la capacidad de estas para superar los mecanismos inmunes de sus hospederos. Así mismo, Jang *et al.* (2022) indica que la garrapata puede secretar HBP en el momento que muerde al huésped, ingresar la proteína se une a la molécula de histamina en la sangre y suprime o bloquea los ligandos correspondientes a la respuesta inflamatoria y coagulación de la sangre. Por otro lado, las investigaciones realizadas han establecido que la liberación de la histamina puede causar en el hospedante prurito y acicalamiento; sin embargo, se ha determinado que este mediador puede alterar el comportamiento en las garrapatas causando tasas de desprendimiento en larvas de *B. microplus* (Kemp & Bourne, 1980). Adicionalmente, se evidenció que la histamina puede alterar el comportamiento alimentario normal de las garrapatas. Es decir, las actividades de salivación y alimentación de la garrapata parecen ser significativamente reducidos tras el contacto con concentraciones de mediadores que podría encontrarse localmente en la piel de huéspedes resistentes a las garrapatas (Paine *et al.*, 1983)

Actualmente se han evidenciado estudios desarrollados asociados con la proteína HBP derivada de artrópodos y los efectos terapéuticos sobre el asma alérgica (Couillin *et al.*, 2004). Sin embargo, Aounallah *et al.* (2020) mencionan al respecto que los estudios están limitados a unas cuantas proteínas y moléculas salivales de garrapata, así como el desarrollo con fines médicos sigue siendo incipiente.

III. HIPÓTESIS

R. linnaei tiene el gen que codifica para la proteína HBP2 y los anticuerpos contra esta proteína generan eficacia vacunal.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar el gen *hbp2* y determinar su eficacia vacunal en *R. linnaei*.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la expresión del gen *hbp2* en *R. linnaei*.
- Determinar la inmunogenicidad de la proteína HBP2 de *R. linnaei*.
- Evaluar la eficacia vacunal de la proteína HBP2 de *R. linnaei*.

V. JUSTIFICACIÓN

La garrapata *Rhipicephalus linnaei* es una especie distribuida mundialmente, responsable del mantenimiento y transmisión de virus, bacterias y parásitos que afectan a los animales domésticos y ocasionalmente a los humanos. Debido a su relevancia en la salud pública, esta especie es una de las más estudiadas; sin embargo, aún no se establecen medidas de control sustentables eficaces, que eventualmente no generen resistencias como lo hacen los acaricidas químicos debido a su uso indiscriminado.

En la actualidad, se han desarrollado diversos estudios acerca de las enzimas y proteínas que facilitan el proceso de alimentación de las garrapatas; la mayoría de estas moléculas tienen propiedades anestésicas, anticoagulantes y componentes con propiedades aglutinantes que ayudan a unirse al hospedante; no obstante, el conocimiento que se tiene sobre la proteína HBP2 de *R. linnaei* es nula. Adicionalmente, el identificar y caracterizar esta proteína permitirá generar una propuesta sobre su uso en estrategias de control inmunológico en contra de esta especie de garrapata.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Materiales y métodos

Los procedimientos de experimentación con animales fueron evaluados y aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo el número de aprobación 007FCN2023.

6.1.1 Localización

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas, en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. De igual forma, se realizaron algunas actividades en el área cunícola (ARCUN) en las instalaciones del Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro del municipio del Marqués.

6.1.2 Material biológico utilizado

La extracción del material genético para la caracterización de la proteína de unión a la histamina 2 (HBP2), se realizó en garrapatas *R. linnaei* obtenidas de una colonia mantenida en condiciones de laboratorio propiedad del Laboratorio de Inmunología y Vacunas.

En los experimentos de inmunización y desafío se trabajó con un grupo de conejos de la raza Nueva Zelanda de 2 meses de edad, mantenidos en el área cunícola (ARCUN) del Campus Amazcala.

6.1.3 Extracción de ARN total en *R. linnaei*

La extracción de ARN de los aislados se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del reactivo TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, California, USA). A continuación, se describe el protocolo utilizado:

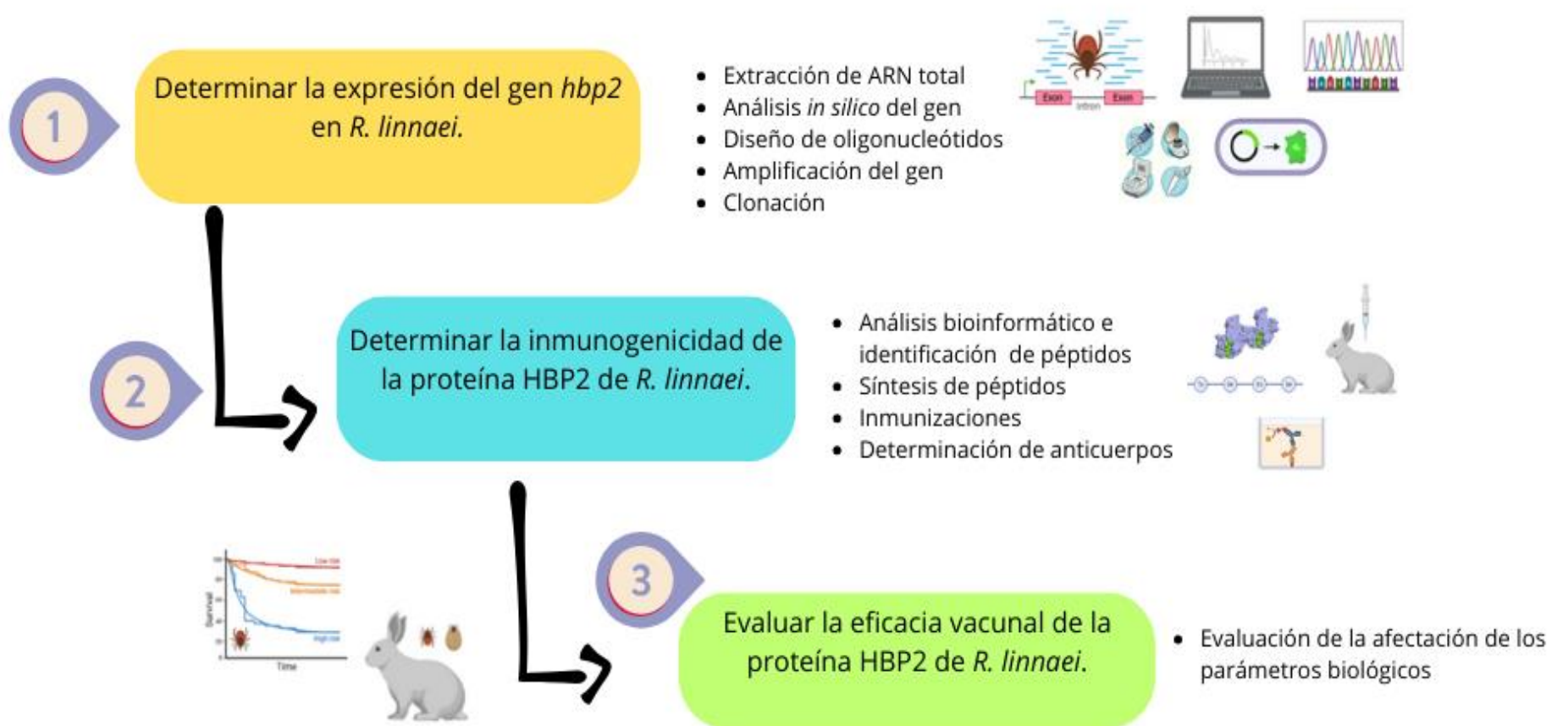


Figura 5. Descripción gráfica de la metodología

La muestra de tejido (garrapata) se homogenizó en 400µL de TRIzol[®], se maceró completamente y se incubó por 5 minutos; posteriormente; se adicionó 200µL de cloroformo y se agitó el tubo hasta homogenizar completamente. Las muestras, se incubaron por 3 minutos, a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000g, por 15 minutos, a 4°C. luego se procede a eliminar la fase acuosa, obtenida después de la centrifugación, se adicionó 200µL de Etanol, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 3 minutos; posteriormente, se centrifugó a 2000g, por 5 minutos, a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet, se lavó con 400µL de Citrato de Sodio 0,1M en Etanol al 10% y se mezcla mediante un agitador, durante 30 minutos, a temperatura ambiente; inmediatamente, se centrifugó a 2000g, por 5 minutos, a 4°C; este paso, se repitió dos veces. Posteriormente, se adicionó 600µL de etanol y se centrifugó a 2000g, por 5 minutos, a 4°C; el sobrenadante fue eliminado y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente; por último, se resuspendió en 15µL de agua grado biología molecular y almacenado a -20°C, hasta su uso.

Después se procedió a tratar la extracción de ARN con ADNAsas empleando el kit DNase I (Invitrogen, California, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante: se tomó en un tubo de 200 µL, un volumen de 8.5 µL de la extracción de ARN, se añadió a la reacción 1.5 µL de buffer de reacción, 0.75 µL DNase I y 4.25 µL de agua grado biología molecular alcanzando un volumen total de 15 µL, se procede a incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente es almacenado a -20°C, hasta su uso.

6.1.4 Análisis *in silico* del gen *hbp2* en *R. linnaei*

Mediante la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) se realizó la búsqueda de secuencias reportadas del gen *hbp2* de *R. linnaei* (Anexo 1) (código de acceso: NC_051183.1) y el transcrito predicho del gen (Anexo 2) (código de acceso: XM_037668894.2). Se utilizó la primera secuencia mencionada para la predicción de exones e intrones.

6.1.5 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región codificante del gen *hpb2* fueron diseñados a partir de la secuencia obtenida previamente con los programas oligo analyzer de la compañía Integrated DNA Technologies (IDT™) y primer Blast® del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En el diseño de los iniciadores se tuvieron las siguientes consideraciones:

- a. **Tamaño:** el tamaño puede variar entre 18 y 30 nucleótidos de longitud, siendo un tamaño ideal de 20-25 nucleótidos (Somma *et al.*, 2006).
- b. **Base en el extremo 3':** debe ser guanina y citosina por sus uniones más estables debido a sus tres puentes de hidrógeno, para así garantizar la unión del primer o la secuencia plantilla y la unión de la polimerasa (Martínez *et al.*, 2006).
- c. **Temperatura de alineamiento:** 50 a 65 °C porque menos de 50°C permite que el primer se pegue a cualquier secuencia y un valor mayor de 65 °C va a impedir que se pegue por la alta temperatura (Ye *et al.*, 2013).
- d. **Tm:** La temperatura de fusión debe ser 2 a 5 °C grados menor a la Temperatura de alineamiento (Ye *et al.*, 2013).
- e. **Contenido de guaninas y citosinas:** El contenido debe oscilar entre 40 y 60% de G-C (Yeh *et al.*, 2012).
- f. **Evitar regiones repetidas:** evitar más de 3 bases iguales continuas (Martínez *et al.*, 2006).
- g. Posteriormente se evaluaron las horquillas para este se tolera una energía libre de Gibbs $\Delta G \geq -3$ kcal/ mol y para la formación de heterodímeros y homodímeros $\Delta G \geq -6$ kcal mol.

6.1.6 Amplificación de la región codificante del gen *hbp2* en *R. linnaei*

La evaluación de la transcripción se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa punto final a partir de cDNA obtenido de una retrotranscripción punto final. Este proceso se realizó utilizando el kit comercial SuperScript® III (Invitrogen, California, USA) siguiendo el método descrito por el fabricante.

Posterior a la retrotranscripción se procedió a realizar la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el DNA complementario obtenido. Los elementos de esta PCR se calcularon para un volumen total de 12.5 μL , constituidos por 1 μL de cDNA, 0.5 μL de cada oligonucleótido, 4.25 μL de agua grado biología molecular y 6.25 μL de PCR Master Mix 2x Bioline. Como control negativo se utilizó ARN total tratado con buffer de ADNasa y sin procesarlo con enzima retrotranscriptasa. Los programas de termociclado se especifican en el cuadro 2. El producto de la reacción se visualizó en gel de agarosa al 1% con GelRed™ (GOLDBIO, St. Louis, USA) y se usó como referencia el marcador de talla molecular Hyperladder™ 1 kbp (Bioline, Luckenwalde, Germany).

Cuadro 2. Programa de termociclado para amplificar la región codificante del gen de *hbp2* de *R. linnaei*

ETAPA	T° C	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94 °C	3:00 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 seg	30
Alineamiento	60 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	25 seg	
Extensión final	72 °C	3:00 min	1

6.1.7 Clonación de la región codificante del gen *hbp2* de *R. linnaei*

El producto obtenido de la PCR del gen *hbp2* se procedió a purificar mediante el kit comercial Molecular Biology, EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction (Southern Labware®, Cumming, Georgia, USA).

La clonación y transformación en células competentes, se realizó utilizando un vector comercial 2.1 PCR TOPO TA, Invitrogen® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y la cepa *E. coli* TOP10. Este proceso se llevó a cabo agregando el producto de la purificación, calculando la relación inserto/vector en la página biomath de la empresa Promega® (<https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/>). Después de calcular la relación, se procedió a realizar la clonación, siguiendo las indicaciones del fabricante; es decir: en un microtubo de 0.2 ml se añadió 1 μl de sales, 1 μl del vector 2.1

PCR TOPO TA Cloning, la cantidad necesaria del producto de la purificación y agua libre de nucleasas para un volumen final de 6 μ l. Esta mezcla se procedió a agitar e incubar en el termociclador a 23 °C por 30 min. Posteriormente, se realizó la transformación bacteriana. En 2 viales de 50 μ l de células competentes, se dispuso en hielo por 30 min, después se agrega 3 μ l del producto de clonación a cada uno de los viales. Posteriormente, se realizará un choque térmico de temperatura poniendo los tubos a 42 °C durante 30 s y de inmediato se pasó a hielo por 5 min. Una vez terminado el choque térmico se dispuso 250 μ l del medio SOC (2% de triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM de glucosa) y se incubó a 37 °C durante una hora con agitación a 200 rpm. Al terminó del tiempo de incubación, se colocarán 100 μ l de este cultivo en cajas petri con medio LB (Lurian Berthani) sólido, adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina; el cultivo se esparció de manera uniforme con un asa estéril y se pasó a incubar a 37 °C durante 12 horas. Pasado el tiempo de incubación se tomaron 10 colonias bacterianas crecidas en el medio y con un palillo de madera estéril se tomaron pequeñas muestras y se procedió a determinar la presencia del inserto en las bacterias mediante una reacción en cadena de la polimerasa de colonia. Cuando se confirmó la presencia de la secuencia de interés, se realizó una expansión de estas colonias bacterianas, en 5 ml de caldo LB adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina. Estos cultivos se incubaron 37 °C durante 18 horas con una agitación promedio de 250 rpm. Luego, se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el kit comercial ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Posteriormente, se enviará a secuenciar el ADN plasmídico utilizando el método de Sanger, las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa GENTle.

6.1.8 Análisis bioinformático e identificación de péptidos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron con las herramientas bioinformáticas: a) ExpASy (<https://web.expasy.org/translate/>) para identificar marcos de lectura abiertos y obtener secuencias predichas de aminoácidos, b) ExpASy protscale (<https://web.expasy.org/protscale/la>) para identificar en base a la escala Kyte & Doolittle regiones hidrofóbicas en la secuencia, c) SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)

para predecir la presencia de péptido señal en la secuencia de aminoácidos, d) TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para predecir la presencia de regiones transmembranales y e) SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) para identificar dominios de proteínas. Adicionalmente, con la herramienta Clustal Omega se realizará un alineamiento de las secuencias de la proteína HBP2 y se realizará la comparación (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>); asimismo, se utilizará este programa para determinar el porcentaje de similitud con otras secuencias.

Para la identificación de epítomos B, se utilizarán las herramientas bioinformáticas ACBpred y BepiPred y se seleccionarán los péptidos con base en resultados obtenidos en los algoritmos. Finalmente, las secuencias peptídicas se analizarán mediante la herramienta bioinformática BLAST.

6.1.9 Síntesis de péptidos

Con base en los análisis bioinformáticos se seleccionaron dos péptidos (HBP2_1 y HBP2_2) de la proteína y se enviaron a sintetizar químicamente a la empresa Thermo Fisher Scientific en un sistema de dendrímeros de 8 ramas (MAPS-8) con el propósito de aumentar su inmunogenicidad.

6.1.10 Inmunizaciones

Respecto a la generación de anticuerpos contra la proteína HBP2 se inmunizaron un grupo de conejos, raza Nueva Zelanda de 2 meses de edad. El grupo estuvo conformado por tres individuos; es decir, 2 individuos por cada péptido a evaluar y un control negativo. Se inocularán los péptidos sintéticos en los conejos por vía subcutánea a dosis de 100 µg diluidos en 1 ml, diluido en 300 µl de PBS 1x estéril y 700 µl de adyuvante de tipo Montanide ISA 71VG, el grupo control se inmunizó con adyuvante 700 µl y 300 µl de PBS 1× estéril.

El calendario de vacunación se dio inicio con la primera inmunización (día 0), en donde además se obtuvo suero pre-inmunización y posteriormente se aplicaron 2 refuerzos

cada veintiún días; es decir, tres inmunizaciones en total (día 0, 21, 42); posterior al desafío, se procedió al sacrificio de los animales y a la obtención de los sueros hiper- inmunes.

6.1.11 Determinación de anticuerpos mediante ELISA indirecta

Para determinar el incremento de anticuerpos en los conejos inmunizados se realizó un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas de tipo indirecta. El protocolo utilizado se describe a continuación: 1) Se sensibilizaron placas de 96 pozos de poliestireno de alta unión de la marca Costar® (Corning Incorporated, No. Cat. 3590), con un volumen final de 100 µl a una concentración de 4 µg/ml de cada péptido a analizar diluido en buffer de carbonatos pH 9.6 y se incubó a 4 ° C, 2) se retiró el buffer de carbonatos y se procedió a lavar la placa aplicando 200 µl de PBS Tween al 0.05%, pH 7.4. El lavado se repitió tres veces, aplicando pequeños movimientos a la placa, se continuó con el bloqueo de la placa, agregando 200 µl de leche descremada al 5% diluida en PBS Tween 0.05% y se dejó incubando a 37 ° C durante 1 hora 3) Se prepararon las diluciones del anticuerpo primario; es decir, el suero pre inmunización y todos los sueros post inmunización de los conejos inmunizados con cada uno de los péptidos sintéticos. 4) Al terminar el tiempo de incubación del bloqueo, se procedió a repetir el lavado descrito anteriormente. 5) Se realizó la incubación del anticuerpo primario, colocando por cada conejo 100 µl de suero pre inmunización y todos los sueros post inmunización por triplicado; posteriormente, se incubó a 37 ° C durante 1 hora y se volvió a lavar con PBS Tween 0.05%. 6) Después, se incubó 100 µl del anticuerpo secundario diluido en leche al 2% en 1:4000 durante 45 minutos; el anticuerpo secundario es un Anti Ig G H+L de Conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA). Después de la incubación se repitieron los lavados. 7) Se preparó la solución de revelado, compuesta por citrato de sodio al 0.1 M y ácido cítrico al 0.1 M, en un volumen de 5 ml cada uno, posteriormente se agregó 4 mg de dihidrocloruro de fenilendiamina (OPD) y 8 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). 8) Se agregaron 100 µl de solución de revelado por pozo, y se tomó lectura a los 15 minutos a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se evaluaron y graficaron utilizando el software GraphPad Prism® versión 8.0.1 (244).

6.1.12 Evaluación de la eficacia vacunal

Por último, se evaluó la eficacia vacunal de cada péptido mediante la especificidad de los anticuerpos contra cada péptido. Se realizó un ensayo inoculando los péptidos de la proteína en conejos y posteriormente se desafiaron de manera controlada. Para el desafío se infestaron (4 conejos) con 10 garrapatas hembras adultas; para determinar si existía una afectación en parámetros biológicos como peso individual a la repleción, peso de la masa de huevos ovipositados y porcentaje de eclosión de larvas.

En los experimentos de evaluación de la inmunogenicidad y eficacia vacunal se utilizaron un grupo de conejos control, los cuales solo fueron inmunizados con adyuvante y solución PBS. El cálculo de la eficacia se obtuvo mediante la siguiente fórmula $100 [1 - (EW \times EO \times EH)]$, donde EW es el promedio del peso de las garrapatas repletas, EO es el promedio del peso de los huevos por cada hembra y EH es el porcentaje de la eclosión de larvas de cada grupo. evaluar su respuesta comparándolos con un grupo control.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico* del gen *hbp2* de *Rhipicephalus linnaei*.

Mediante análisis bioinformático se observó la secuencia genómica del gen *hbp2*, la cual tiene un tamaño de 15114 pb, presenta 5 exones y 4 intrones, la información se resume y se esquematiza en la Figura 6. Adicionalmente, se obtuvo el transcrito predicho del gen *hbp2* con tamaño aproximado de 576 pb (Anexo 2).

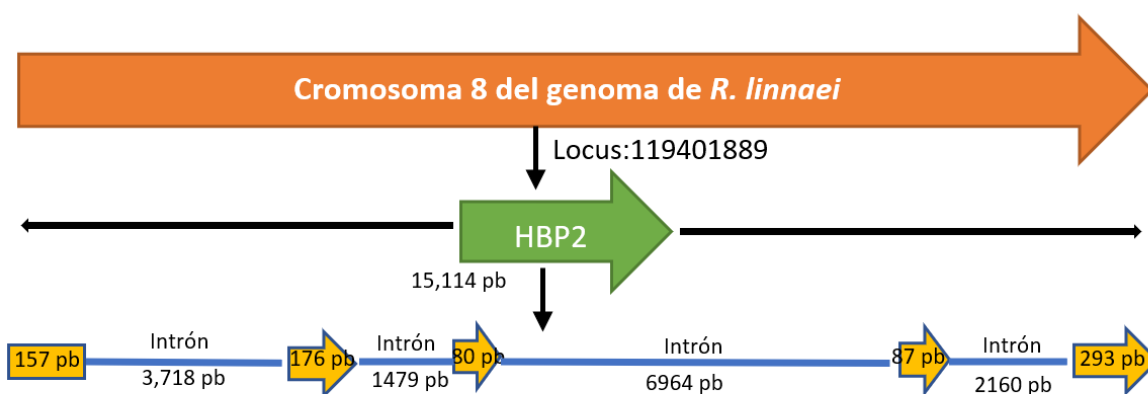


Figura 6. Esquematización de localización del gen *hbp2* en el cromosoma 8 de *R. linnaei*. Las líneas en color azul representan los intrones, las flechas y rectángulo en color amarillo, son los exones.

7.2 Diseño de oligonucleótidos

Utilizando los programas bioinformáticos y consideraciones establecidas en la metodología, se diseñaron los primers para la amplificación de la región codificante del gen *hbp2* de *R. linnaei*, estos son descritos en la Figura 7 y Cuadro 3.

```
ATGAAGTTTCTTGTA  
CTCTGCCTTG  
CCTCCACCTTGGCGCTCAGCCAGGCTAAG  
GGAGATCCGCCAGCTTGGGCGGATGAAGCGGCAAATGGGGCCACCAAGACG  
CCTGGAAGAGTCTCAAAGCCAGCGTCGAAAGCATGTACTTCATGATAAAGGCC  
ACCTACAAGAATGACCCAGTCTGGGGCAATAACTTCACTTGTGTGGCTGTTGCG  
GCTGATGATGCGAACGAAGATGAGAAGAGCGTTGAAGCAACGTTTATGTTTTT  
CAATAATGCTAACAGGTTATTCCACCGATTTTCTACTGAAAAGGCGACTGCTGT  
TAAAATGTATGGTTACAATAAGGAAAACGCCTTTAAATACGAGACAAGGGATG
```

GACAAGTGTTCACAGATGTCGTTGCATTCTCCGATGACGACTGCTATGTAATGT
 ACGTTCCTGGTACAGACGGAAACGAAGAAGGTTATGAACTGTGGAGTACCTTG
 TACGGGTGCGTTCCGCTCAGTTGTTTGGACAAGTTAATGAATACGCTGCGCGC
 ATGGAGGTACGAGACGTGTT**CACAAGCAAGTGCGTGGAAT**AA

Figura 7. Oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento de la región codificante del gen *hbp2*. El oligonucleótido en dirección 5'→3', se encuentra resaltado en color amarillo, mientras que el cebador en dirección 3'→5', aparece en color turquesa. El producto de amplificación esperado se muestra en letras de color azul.

Cuadro 3. Características de los oligonucleótidos para la amplificación de la región codificante gen *hbp2* de *R. linnaei*.

PROTEÍNA DE INTERÉS HBP2			
	Forward	Reverse	
Secuencia	ATG AAG TTT CTT GTA CTC TGC CTT G	TTC CAC GCA CTT GCT TGT	Tamaño esperado del amplicón
Longitud (pb)	25	18	
Contenido de G-C (%)	40 %	50%	
MELT T°	55.3 °C	55.3 °C	
Horquillas ΔG (kcal/mol)	-0.08 (kcal/mol)	-0.89 (kcal/mol)	
ΔG (kcal/mole)	-3.65 kcal/mol	-5.09 kcal/mol	573 pb
Heterodímeros	-5.09 kcal/mol	-5.09 kcal/mol	

7.3 Evaluación de la expresión del gen *hbp2*

Mediante la realización de una RT-PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados, se obtuvo el amplicón esperado de 570 pb aproximadamente, a partir de cDNA de *R. linnaei* extraída de colonia mantenida en condiciones de laboratorio, aislados de Chiapas, Nayarit, Querétaro y Tamaulipas (Figura 8). También se utilizó como control negativo ARNm sin la enzima transcriptasa reversa.

Adicionalmente, se realizó amplificación del gen *16S* de los aislados Chiapas, Nayarit Querétaro y Tamaulipas; además de la amplificación del gen *12S* de *R. linnaei* del aislado de Chiapas como se observa en las Figuras 9 y 10. Se evidencia en las imágenes un amplicón del tamaño esperado para el gen mitocondrial *16S* de alrededor de 360 pb y del gen mitocondrial *12S* de 420 pb. Después de amplificar con éxito las secuencias deseadas, se realizó el envío para secuenciación directamente el producto de PCR purificado. Los análisis mostraron que las secuencias obtenidas pertenecen al linaje tropical de la garrapata marrón del perro; es decir, *R. linnaei*. Este resultado confirma la identidad de la especie y su presencia en las zonas geográficas donde se recolectaron las muestras de garrapata.

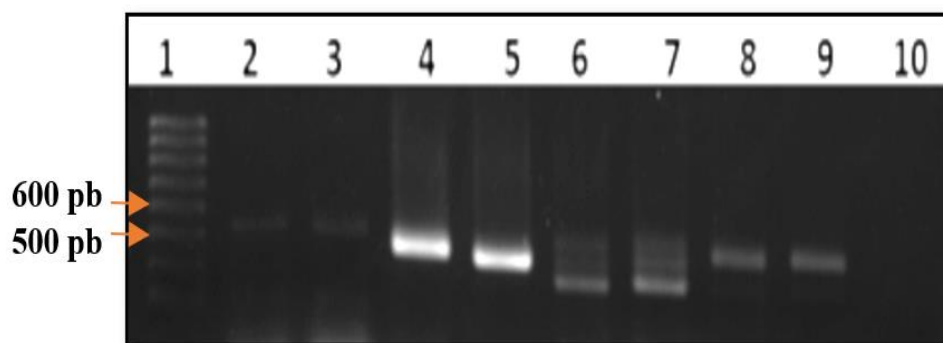


Figura 8. Amplificación de la región codificante del gen *hbp2* de *R. linnaei*. Visualización en gel de agarosa al 1%, utilizando GelRed™. Carril 1: marcador de talla molecular 100 pb, Carril 2 y 3: cDNA aislado Tamaulipas, Carril 4 y 5: cDNA aislado Nayarit, Carril 6 y 7: cDNA aislado Querétaro, Carril 8 y 9: cDNA aislado Chiapas, Carril 10: control negativo.

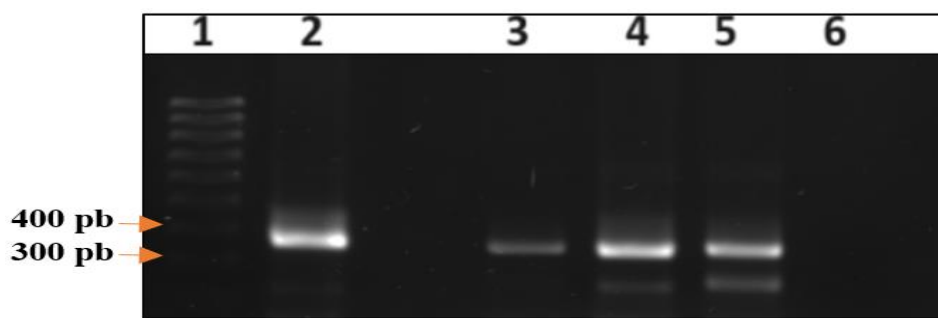


Figura 9. Amplicones obtenidos de la región codificante del gen *16S* de *R. linnaei* en gel de agarosa al 1%, utilizando GelRed™. Carril 1: marcador de talla molecular 100 pb, Carril 2: cDNA aislado Chiapas, Carril 3: cDNA aislado Tamaulipas, Carril 4: cDNA aislado Querétaro, Carril 5: cDNA aislado Nayarit, Carril 6: control negativo.

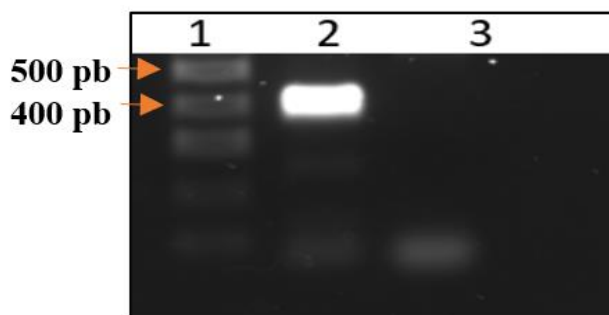


Figura 10. Amplicón obtenido de la región codificante del gen *12S* de *R. linnaei* en gel de agarosa al 1%, utilizando GelRed™. Carril 1: marcador de talla molecular 100 pb, Carril 2: cDNA aislado Chiapas, Carril 3: control negativo.

7.4 Clonación de la región codificante del gen *hbp2* de *R. linnaei*

Se seleccionaron 10 colonias, procedentes de la clonación y transformación de la cepa *E. coli* TOP10 con el inserto de la región codificante del gen *hbp2* de *R. linnaei*, se observó que todas las colonias fueron positivas; es decir, mostraron amplificación con el tamaño esperado; excepto la colonia 9 (Figura 11).

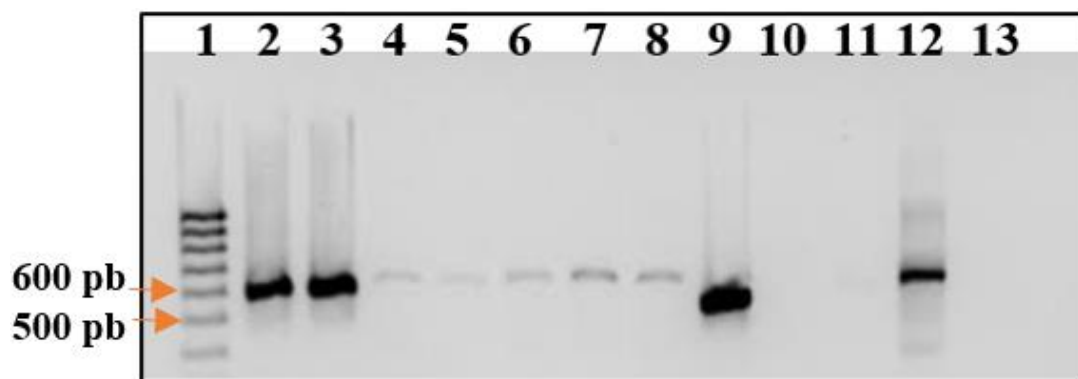


Figura 11. PCR de colonias transformadas con el gen *hbp2* de *R. linnaei*. Visualización en gel de agarosa al 2%, utilizando GelRed™. Carril 1: marcador de talla molecular 100 pb, Carril 2-11: colonias 1-10, Carril 12: control positivo, Carril 13: control negativo.

7.5 Secuenciación de la región codificante del gen *hbp2* de *R. linnaei*.

Se secuenciaron por duplicado los DNA plasmídicos de las colonias 6 y 8 transformadas con “TOPO+ HBP2”; posteriormente, se analizaron los electroferogramas y

se obtuvo una secuencia consenso (Anexo 3) mediante edición. Después, se realizaron análisis bioinformáticos y alineamientos.

7.6 Análisis bioinformático e identificación de péptidos

La secuencia de aminoácidos de la proteína, se obtuvo mediante la herramienta de buscador de marcos de lecturas ORF finder del NCBI (Figura 12).

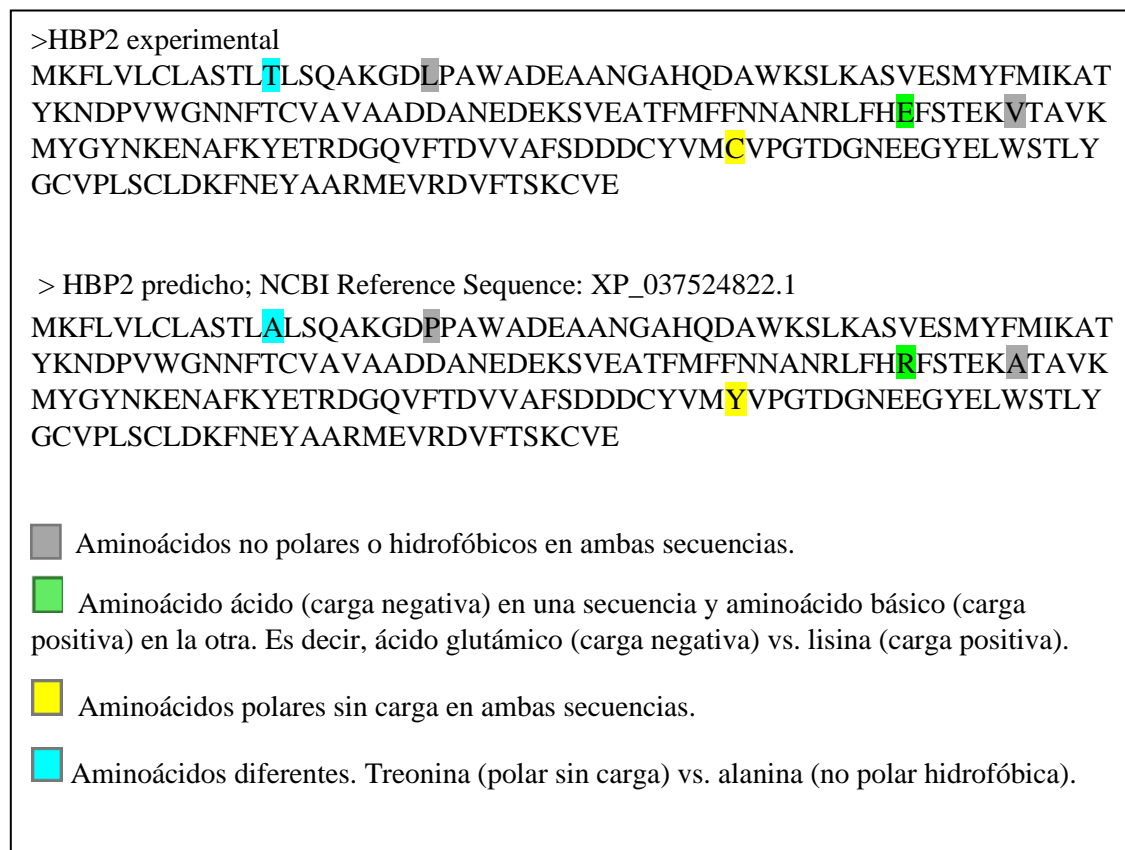


Figura 12. Secuencia experimental obtenida de la región codificante del gen *hbp2*. Los aminoácidos coloreados muestran las diferencias entre las secuencias. Los colores utilizados indican la similitud o diferencia entre los aminoácidos en cada posición comparando la secuencia obtenida de forma experimental y la secuencia predicha por el algoritmo en NCBI.

La secuencia de aminoácidos fue analizada utilizando herramientas bioinformáticas para determinar la homología de la secuencia de aminoácidos con proteínas relacionadas, la comparación se realizó mediante la herramienta BLAST del NCBI y Clustal Omega para obtener los porcentajes de identidad (Figura 13 y 14). Con base en los alineamientos se determinó que la proteína HBP2 tiene una identidad del 61.05% con la proteína HBP1 de la

especie *Rhipicephalus microplus*; mientras que la especie *Rhipicephalus appendiculatus* obtuvo un porcentaje de identidad del 71.68% con la HBP2 *R. linnaei*.

1: HBP1M	100.00	61.05	58.72
2: HBP2L	61.05	100.00	71.68
3: HBP2A	58.72	71.68	100.00

Figura 13. Matriz de porcentajes de identidad. En la figura se muestran los porcentajes de identidad para tres secuencias que corresponden a diferentes especies de garrapatas: 1. *Rhipicephalus microplus* (HBP1M); 2. *Rhipicephalus linnaei* (HBP2L) y 3. *Rhipicephalus appendiculatus* (HBP2A); cada número se correlaciona con la secuencia específica de cada especie.

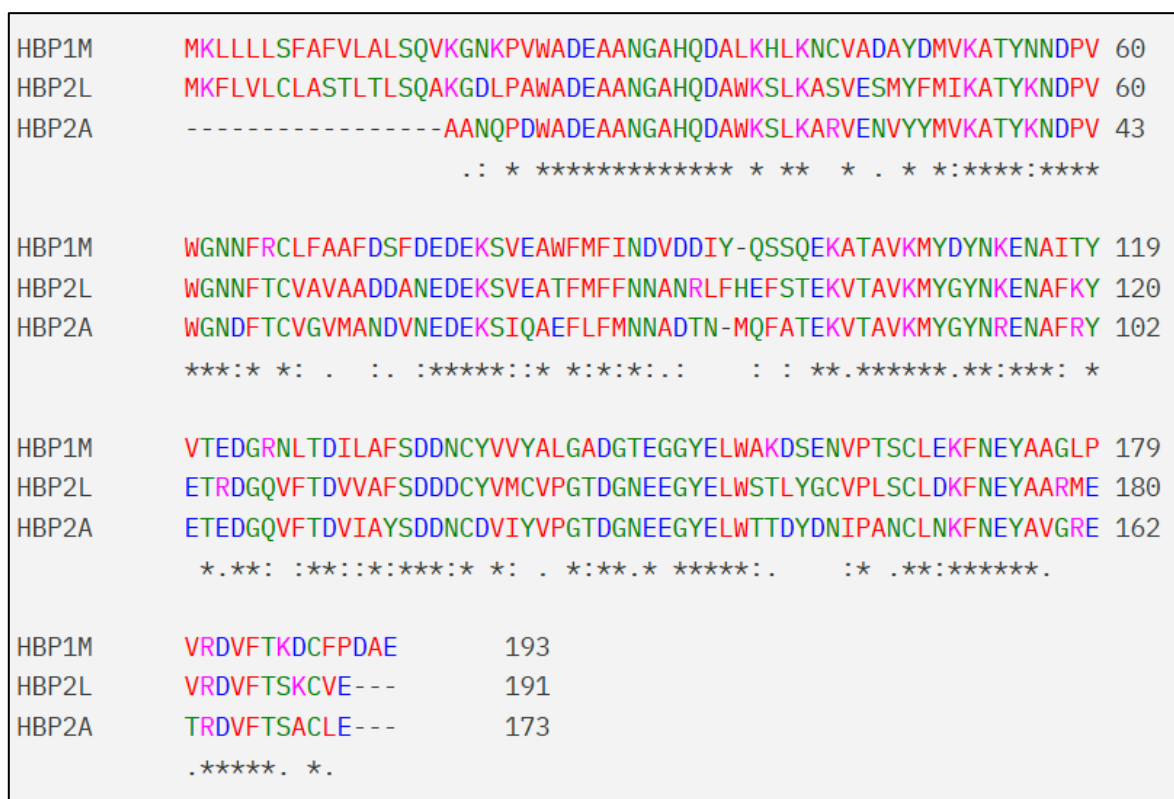


Figura 14. Alineamiento de las secuencias de *R. microplus* (HBP1M); *R. linnaei* (HBP2L) y *R. appendiculatus* (HBP2A); los asteriscos (*) y puntos (.) indican aminoácidos conservados en las secuencias.

7.6.1 Hidrofobicidad

Se analizó la hidrofobicidad con la herramienta ProtScale (las regiones hidrofóbicas tienen un valor superior a 1.6 en el score), con base a la escala Kyte & Doolittle, se evidencia una región hidrofóbica en los primeros aminoácidos (Figura 15).

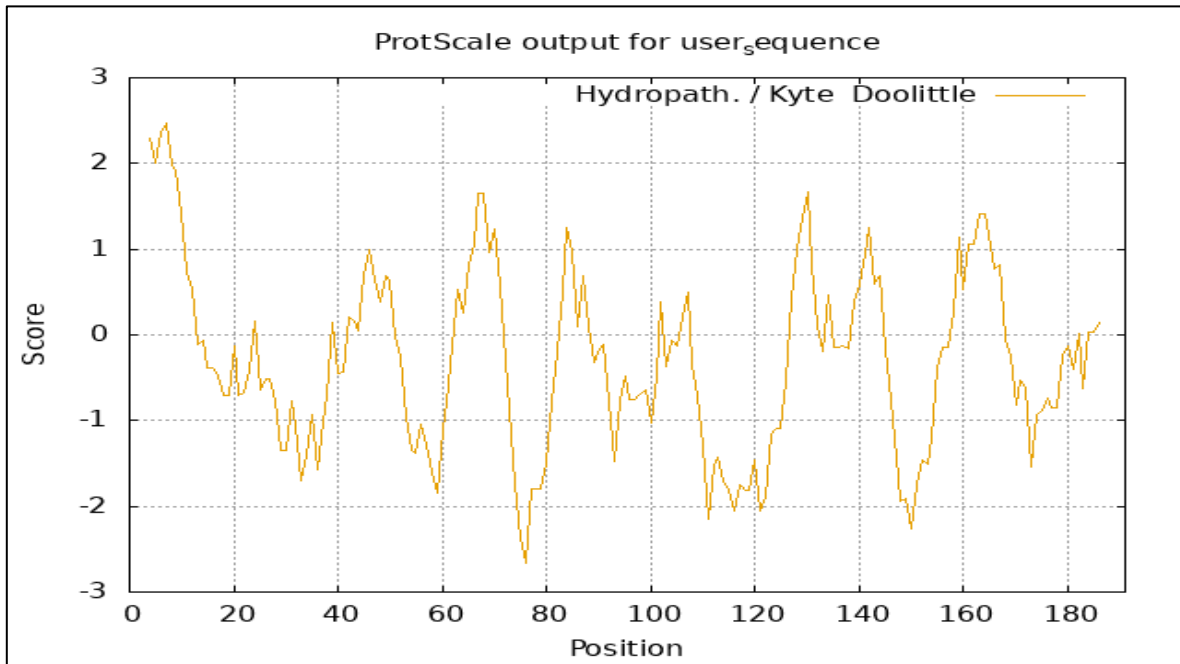


Figura 15. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína HBP2 de *R. linnaei* con el programa hidrofobicidad Kyte & Doolittle.

7.6.2 Predicción y clasificación de topologías transmembrana

Con base en análisis bioinformático mediante el algoritmo TMHMM se determinó que la proteína no tiene un dominio transmembranal (Figura 16), se evidencia que la proteína está afuera de la célula. Asimismo, se evidenció que la proteína carece de hélices transmembranales.

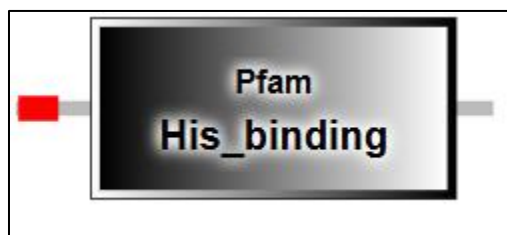


Figura 18. Análisis de la arquitectura de los dominios en la proteína HBP2 de *R. linnaei* con la herramienta SMART.

7.7 Identificación y selección de péptidos con epítomos B predichos de la proteína HBP2.

Utilizando herramientas bioinformáticas, se seleccionaron dos secuencias peptídicas HBP2-1 y HBP2-2 con epítomos B; posteriormente se realizó una comparación de los resultados (predicciones obtenidas) en Microsoft Excel®. Adicionalmente, se realizó una búsqueda con la secuencia de los sitios de unión de la histamina con la herramienta INTERPRO y una comparación con los ligandos de histamina en la especie *Rhipicephalus appendiculatus* descritos por Paesén *et al.* (2000). La información completa de las secuencias seleccionadas se encuentra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Características de los péptidos diseñados de la proteína HBP2 de *R. linnaei*

	HBP2-1	HBP2-2	
Secuencia	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ	
Posición en la secuencia	48-67	106-126	
longitud	20 aminoácidos	21 aminoácidos	
Herramientas bioinformáticas			
BCEpred	Hidrofobicidad	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	Flexibilidad	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	Accesibilidad	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	giros	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	Expuesto a superficie	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ

	Polaridad	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	Propensión Antigénica	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	ABCpred	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	Bebipred	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	IEDB	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	INTERPRO (sitios de unión)	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ
	<i>R. appendiculatus</i> Paesén <i>et al.</i> (2000).	YFMIKATYKNDPVWGNNFTC	AVKMYGYNKENAFKYETRDGQ

Nota: En el cuadro se presentan los resultados del análisis bioinformático. La predicción de secuencias lineales que contienen epítomos B están resaltadas en color amarillo. Los ligandos de unión a histamina, propuestos por Paesén *et al.* (2000) se han señalado con los siguientes colores: Amarillo (Unión baja) y verde (Unión alta).

Adicionalmente se realizó un modelaje 3D de la proteína HBP2 con el software Chimera (Figura 19), este esquema contiene los péptidos predichos con el fin de identificar la ubicación dentro de la estructura.

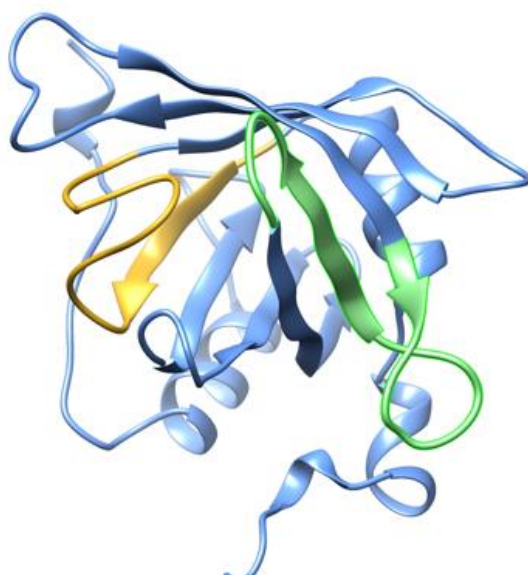


Figura 19. Estructura de la proteína HBP2, el diagrama muestra la disposición de los péptidos diseñados; HBP2_1 (amarillo) y HBP2_2 (verde).

7.8 Resultados de la evaluación de los anticuerpos contra la proteína HBP2 mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA indirecta)

El análisis de la respuesta inmune contra los péptidos de *R. linnaei* se presenta en las Figuras 20 y 21. Mediante ELISA indirecta, se evaluó la generación de anticuerpos para la dilución 1:500 en sueros de conejos obtenidos después de cada inmunización del grupo control y grupo experimental, con la mezcla de los péptidos a una concentración de 100 µg de cada péptido. Los resultados mostraron un aumento significativo en la densidad óptica; es decir, un incremento en la producción de anticuerpos anti-HBP2 en los conejos inmunizados con el péptido 2 (HBP2_2), especialmente después de la segunda inmunización (Figura 22), se evidenció que la estimulación de la producción de anticuerpos fue más eficiente en el individuo (conejo 5). En contraste, no se observó producción de anticuerpos en los conejos inmunizados con el péptido 1 (HBP2_1).

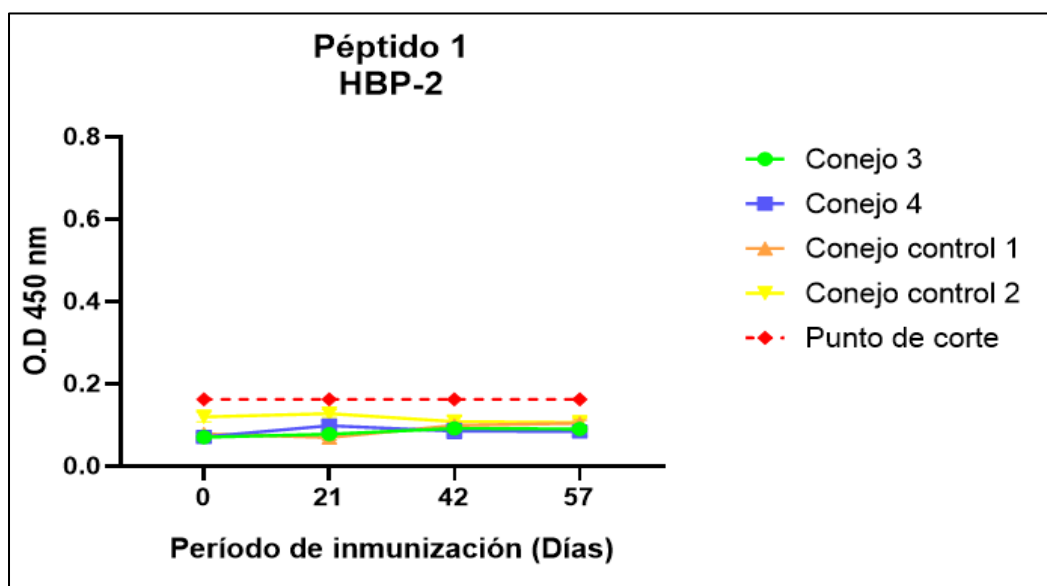


Figura 20. Gráfica de la inmunogenicidad del péptido HBP2-1. Dilución 1:500. Conejos 3 y 4 inmunizados con 100 µg del péptido; conejos 1 y 2 inmunizados con adyuvante.

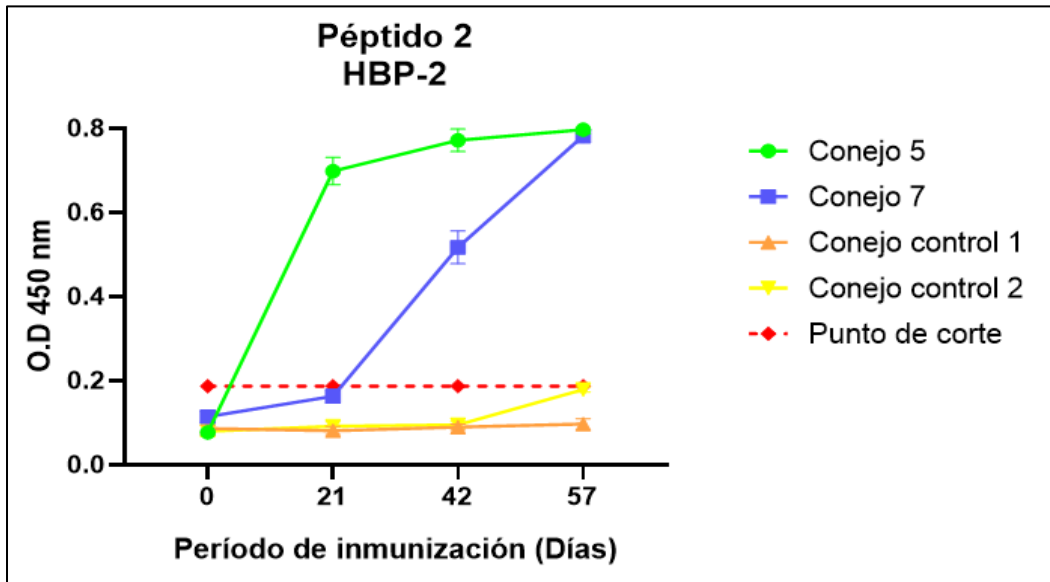


Figura 21. Gráfica de la inmunogenicidad del péptido HBP2-2. Dilución 1:500. Conejos 5 y 7 inmunizados con 100 µg del péptido; conejos 1 y 2 inmunizados con adyuvante.

7.9 Evaluación de la eficacia vacunal

7.9.1 Infestación experimental

Se realizó una infestación experimental controlada en los conejos 5 (hembra) y 7 (macho). Cada conejo fue infestado con 10 garrapatas hembras adultas y se recolectaron entre los días 8 y 10 posteriores a la infestación. Los resultados mostraron que los anticuerpos se mantuvieron durante el estudio, como se evidencia en la Figura 22. El conejo 5 presentó una respuesta inmune particularmente estable.

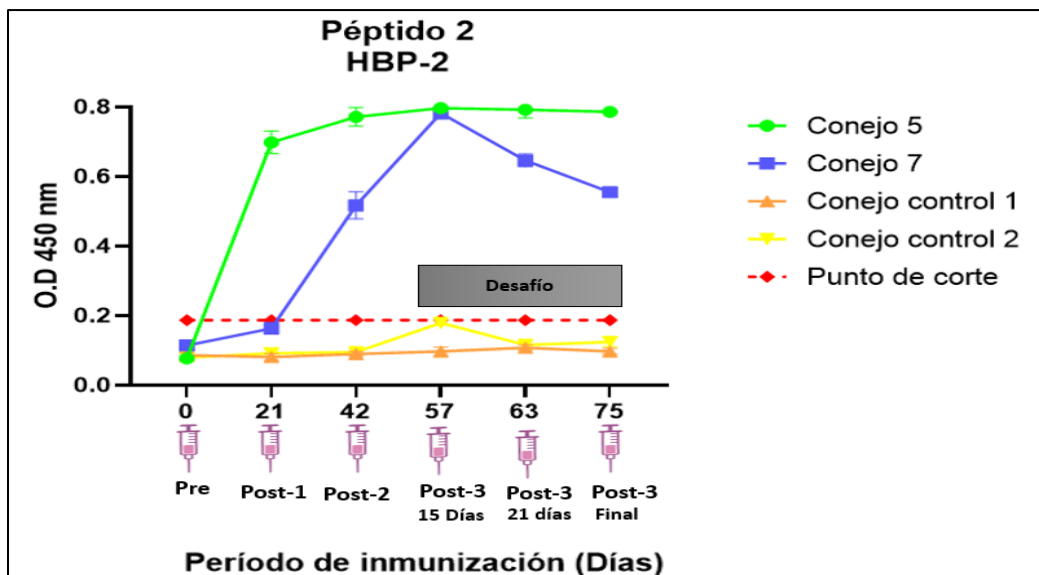
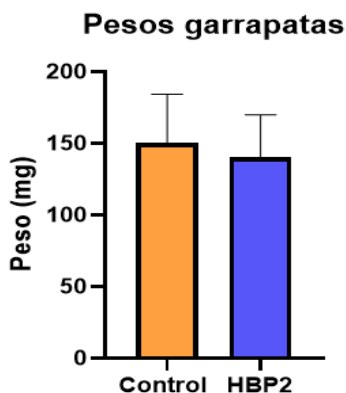


Figura 22. Gráfica de determinación de anticuerpos de los conejos 5 y 7 inmunizados con el péptido HBP2-2, durante la infestación experimental controlada. Los sueros fueron utilizados en una dilución 1:500.

7.9.2 Evaluación de los parámetros biológicos

Se analizaron varios parámetros biológicos para determinar la eficacia vacunal, incluyendo: Peso de las garrapatas repletas, masa de huevos ovipositados y efecto sobre la viabilidad de las larvas. Se evaluó el efecto de la respuesta inmunitaria sobre el peso de las garrapatas como primer parámetro biológico, y los datos se presentan gráficamente en la Figura 23.



Figuras 23. Peso promedio de las garrapatas recolectadas.

La comparación entre el grupo tratado con HBP2_2 y el grupo control, mediante la prueba de t-Student ($P < 0.05$) no mostró diferencia estadística significativa en el peso promedio de las garrapatas ($t = 0.7499$; $P = 0.41617$) lo que sugiere que no hay afectación de las inmunizaciones sobre el peso obtenido de las garrapatas. Sin embargo, se evidenció una disminución del 6.67% del peso en las garrapatas desafiadas con HBP2_2.

La evaluación del segundo parámetro biológico; la oviposición, se realizó mediante la cuantificación de la masa de huevos ovipositados por garrapatas control y garrapatas sometidas a tratamiento. Los datos se presentan gráficamente en la Figura 24.

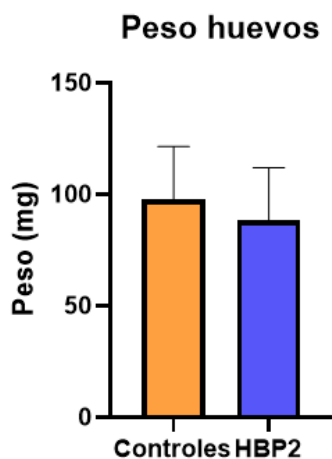


Figura 24. Masa de oviposición obtenida con el total de garrapatas.

El análisis estadístico comparativo entre el grupo tratado con HBP2_2 y el grupo control no reveló diferencias significativas en la masa total de oviposición ($t = 0.9531$, $P = 0.3514$), lo que indica que las inmunizaciones no tienen un efecto notable sobre la oviposición. Asimismo, se encontró que las garrapatas expuestas al péptido HBP2_2 presentaron una disminución del 9.66% en la producción de huevos, sugiriendo un efecto sobre la capacidad reproductiva de las garrapatas.

El impacto del péptido HBP2_2 en la viabilidad larval fue evaluado como parámetro biológico final. Los resultados mostraron que, en presencia del péptido, el porcentaje de huevos no eclosionados aumentó (Figura 25). Sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa mediante la prueba t-Student ($t = 1.174$, $P = 0.2537$). Además, se evidenció que la exposición al péptido provocó una reducción significativa en la tasa de eclosión (16%) en comparación con el grupo control.

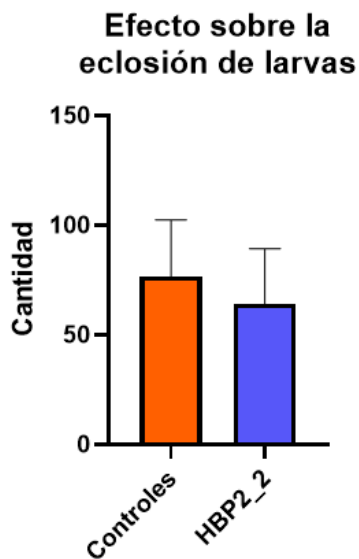


Figura 25. Viabilidad de las larvas, contabilizados en masa de huevos eclosionadas.

7.9.3 Cálculo de la eficacia vacunal

Para determinar la eficacia vacunal (E), se consideraron los siguientes parámetros: Peso promedio de garrapatas repletas (EW), producción de huevos por hembra (EO) y tasa de eclosión de larvas (EH) (Figura 26). Los resultados obtenidos se detallan en el Cuadro 5.

$$E = 100 \times [1 - (EW \times EO \times EH)]$$

Figura 26. Fórmula para cálculo de eficacia vacunal.

Cuadro 5. Eficacia de los péptidos evaluados.

Péptido evaluado	EW (%)	EO (%)	EH (%)	E (%)
HBP2_2	0,93	0,90	0,84	29,42%

Los resultados obtenidos muestran que el péptido evaluado tiene efecto en los parámetros biológicos de *R. linnaei*; siendo necesario estudios complementarios que permitan ratificar los resultados obtenidos en esta investigación.

VIII. DISCUSIÓN

Las garrapatas son los parásitos hematófagos de mayor relevancia en medicina veterinaria, debido a su impacto negativo en la salud animal y por el riesgo de transmisión de patógenos con potencial zoonótico a su hospedante (Dantas-Torres, 2008; Estrada-Peña, 2015). Los estudios realizados en México estiman que el impacto económico por garrapatas asciende a US\$ 573.61 en la especie *Rhipicephalus microplus* (Rodríguez Vivas *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha estimado que las garrapatas y las enfermedades que transmiten son un tema que preocupa a todos los países, debido a las pérdidas económicas asociadas a los tratamientos, control, pérdidas de producción, muertes e impacto en la salud humana (Rodríguez Vivas *et al.*, 2017; Springer *et al.*, 2021; Paucar-Quishpe *et al.*, 2023), de igual forma, Almazán (2010) menciona que la necesidad de controlar este parásito ha propiciado el uso indiscriminado de acaricidas químicos, causando problemas de contaminación ambiental y la generación de resistencia; por esta razón es crucial establecer medidas efectivas para controlar las garrapatas y prevenir la propagación de enfermedades, una estrategia prometedora, es la identificación de blancos moleculares en la garrapata, para el desarrollo de vacunas (De la Fuente y Contreras, 2015). Actualmente existen vacunas comerciales contra la garrapata del ganado *R. microplus*, la cual ha demostrado ser elemento importante en el control integrado de este parásito (Rodríguez Vivas *et al.*, 2010). Sin embargo, para la especie *R. linnaei* aún no se tienen antígenos vacunales que sean utilizados de manera comercial. Por lo tanto, dada la importancia de la especie y el marcado incremento de la tenencia responsable de caninos como mascotas, se propuso la caracterización de un antígeno vacunal.

En cuanto a la proteína de unión a la histamina 2 (HBP2) ha demostrado ser relevante durante el proceso de alimentación, su principal función reside en la modulación de la respuesta inmune del hospedante, permitiendo cumplir el proceso eficientemente en las garrapatas.

En 1977 Chinery y Ayitey-Smith, mencionan que los extractos de glándulas salivales de *Rhipicephalus* muestran una actividad bloqueadora de histamina; sin embargo, aún no se había caracterizado para la época. El primer estudio sobre la proteína fue realizado por Paesén *et al.*, (1999), los autores caracterizaron en glándulas salivales de *R. appendiculatus* tres proteínas de unión a histamina, denominadas RaHBP1, RaHBP2 y RaHBP3, mediante inmunotransferencia y RT-PCR confirmaron que la proteína HBP2 se expresa exclusivamente en hembras; este patrón de expresión se relaciona con lo observado en el presente estudio en la especie *R. linnaei*, mediante RT-PCR se determinó que la proteína HBP2 se expresa en hembras adultas y la transcripción se demostró al obtener de cDNA el amplicón esperado de 570 pb, que coincide con la información de las bases de datos. Por otra parte, (García *et al.*, 2007) mencionan que la proteína de unión a histamina es miembro de la familia de proteínas lipocalinas, estas son moléculas típicamente pequeñas, con masa molecular promedio de 15- 20 kd; el análisis bioinformático del presente estudio, determinó que este organismo posee la secuencia genómica del gen *hbp2* con tamaño de 15114 pb (15kd), con 5 exones y 4 intrones.

A partir de la secuenciación de la región codificante del gen *hbp2* en diferentes aislados de la especie *R. linnaei* y su posterior análisis bioinformático, se estableció tamaño de 191 aminoácidos. Lo anterior, es comparable con los resultados obtenidos por Paesén *et al.* (1999, 2000), donde obtuvieron un transcrito de 175 aminoácidos.

Con base en los análisis bioinformáticos realizados a la secuencia obtenida, se determinó la hidrofobicidad, utilizando la escala de Kyte y Doolittle (1982), esta escala se utiliza para detectar regiones hidrofóbicas en proteínas. En el presente estudio, se identificó una región hidrofóbica en los primeros aminoácidos de la secuencia proteica, coincidiendo con el péptido señal (SP), el cual está compuesto por una serie de aminoácidos hidrofóbicos, comprendidos del residuo 1 al 17. Owji *et al.* (2018) mencionan que las proteínas con péptido señal, generalmente son proteínas secretadas al medio extracelular y se encuentran principalmente en eucariotas, su tamaño típico varía entre 25 y 30 residuos; sin embargo, los SP pueden tener tamaño de 16 aminoácidos, este tamaño coincidió con lo predicho por el algoritmo (17 aa). También se logró definir la estructura del SP compuesto por tres partes: región N, región H y región C (sitio de escisión), aspecto que se relaciona con lo mencionado

por los autores citados anteriormente. Además, se determinó que la proteína no tiene un dominio transmembranal; por tanto, no está anclado a la membrana, y carece de hélices transmembranales y la región del dominio funcional obtenido en este trabajo corresponde al Pfam asociado a la proteína de unión de histamina de la garrapata.

Se determinó la inmunogenicidad de la proteína HBP2 de *R. linnaei*; es decir, la capacidad de los péptidos para inducir la producción de anticuerpos específicos contra HBP2, mediante análisis de ELISA indirecta. Se obtuvieron títulos específicos anti-HBP2 en el grupo inmunizado con el péptido HBP2_2. Este estudio representa la primera evaluación de la inmunogenicidad del péptido de esta proteína; por lo tanto, no se evidencia literatura o datos previos que proporcionen información que permita comparar su capacidad para inducir una respuesta inmune.

El experimento de infestación se realizó con el péptido inmunogénico HBP2-2 ; debido a los resultados obtenidos; es decir, la respuesta inmune no decrece por debajo del punto de corte con inmunizaciones posteriores y los individuos evaluados generaban anticuerpos desde la segunda inmunización con diferencia estadística significativa respecto al control; sin embargo, se evidenció que los conejos inmunizados si difieren en su respuesta inmunitaria; Roth *et al.* (1999) , mencionan algunos factores del huésped responsables del fallo de la vacuna como son: desnutrición, estrés, infección concurrente, la inmadurez o senescencia del sistema inmunitario. En algunos estudios realizados se ha determinado efectividad de la vacuna sesgada en función del sexo, esta afirmación es confirmada por (Klein *et al.*, 2015; Fischinger *et al.*, 2019) donde señalan que las hembras tienen niveles más altos de anticuerpos específicos de antígeno inducidos por las vacunas.

La evaluación de la eficacia vacunal de la proteína HBP2 de *R. linnaei*, fue determinado con la fórmula que incluye los parámetros de efecto sobre el peso de la garrapata, capacidad de oviposición y fertilidad. Durante la infestación experimental, se evaluaron los parámetros biológicos reportados por De la Fuente *et al.* (1999), la variable DT (efecto sobre garrapatas adultas hembras) fue sustituido para este estudio, por el efecto sobre el peso promedio de las garrapatas.

Con base en el análisis estadístico, no existe diferencias significativas para los parámetros evaluados entre los grupos vacunados y el grupo control; sin embargo, se

evidenció una disminución del 6.67% en el peso promedio, 9.66% en la producción de huevos y 16% en tasa de eclosión en las garrapatas alimentadas con conejos inmunizados con el péptido HBP2_2.

Los resultados revelan que este péptido altera positivamente los parámetros biológicos de *R. linnaei*, obteniendo una eficacia vacunal del 29,42%. Este trabajo proporciona información valiosa sobre la caracterización de la proteína de unión a la histamina 2 (HBP2) de *Rhipicephalus linnaei* y evaluación de su eficacia vacunal, para futuras investigaciones.

IX. CONCLUSIONES

- Esta es la primera investigación en relación a la caracterización de la proteína de unión a la histamina 2 (HBP2) de *Rhipicephalus linnaei* y evaluación de su eficacia vacunal.
- En este estudio se evidenció la transcripción del gen *hbp2* y la expresión en hembras adultas en la especie *Rhipicephalus linnaei*.
- Se determinó que el péptido HBP2_2 es inmunogénico, estimulando la producción de anticuerpos específicos en conejos.
- En la evaluación de los parámetros biológicos para determinar la eficacia vacunal, se evidenció una disminución del 6.67% del peso, 9.66% en la producción de huevos y 16% en tasa de eclosión en las garrapatas desafiadas.
- Se determinó que la eficacia vacunal de la proteína HBP2 de *Rhipicephalus linnaei* fue del 29,42%.
- Finalmente, con los resultados obtenidos se acepta la hipótesis planteada en esta investigación, la especie *Rhipicephalus linnaei* tiene el gen que codifica para la proteína HBP2 y los anticuerpos contra esta proteína generan eficacia vacunal.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Almazán García C. (2010). Control inmunológico de garrapatas en bovinos. Capítulo 34. En: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Editores: Quiroz, R.H. Figueroa, C.J.A., López, A.M.E. Editado por AMPAVE. pp. 517-529. ISBN: 978-607-00-4015-3.
- Almeida, C., Simões, R., Coimbra-Dores, M. J., Rosa, F., & Dias, D. (2017). Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. from the western Iberian Peninsula. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(2), 167–177. <https://doi.org/10.1111/mve.12222>
- Alrashdi, I., Alsubaiyel, A., Chan, M., Battell, E. E., Ennaceur, A., Nunn, M. A., Weston-Davies, W., Chazot, P. L., & Obara, I. (2022). Votucalis, a Novel Centrally Sparing Histamine-Binding Protein, Attenuates Histaminergic Itch and Neuropathic Pain in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.846683>
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 22, Issue 2, pp. 195–215). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>
- Aounallah, H., Bensaoud, C., M'ghirbi, Y., Faria, F., Chmelař, J., & Kotsyfakis, M. (2020). Tick Salivary Compounds for Targeted Immunomodulatory Therapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). *Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583845>.
- Beati, L., & Klompen, H. (2018). Phylogeography of Ticks (Acari: Ixodida). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117>.
- Chinery, W.A., and Ayitey-Smith, E. (1977). Histamine blocking agent 1991). in the salivary gland homogenate of the tick *Rhipicephalus sanguineus sanguineus*. *Nature* 265, 366–367.
- Coimbra-Dores, Maria João & Nunes, Telmo & Dias, Deodália & Rosa, Fernanda. (2016). *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) species complex: morphometric and ultrastructural analyses. *Experimental & applied acarology*. 70. 10.1007/s10493-016-0095-5.
- Couillin, I., Maillet, I., Vargaftig, B. B., Jacobs, M., Paesen, G. C., Nuttall, P. A., Lefort, J., Moser, R., Weston-Davies, W., & Ryffel, B. (2004). Arthropod-Derived Histamine-Binding Protein Prevents Murine Allergic Asthma. *The Journal of Immunology*, 173(5), 3281–3286. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3281>

- Dantas-Torres, F., Figueredo, L. A., & Pinto Brandão-Filho, S. (2006). *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), o carrapato vermelho do cão, parasitando humanos no Brasil. In *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (Vol. 39, Issue 1).
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152(3–4), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2015). Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>
- De la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, Serrano E, Valdés M, Enríquez A, Canales M, Ramos E, Boué O, Machado H, Leonart R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal.* 1999 Nov;15(3-5):143-8. doi: 10.1016/s1050-3862(99)00018-2. PMID: 10596754.
- De la Fuente, J., & Contreras, M. (2015). Tick vaccines: Current status and future directions. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1367–1376). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1076339>
- Estrada-Peña, A., & de La Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. In *Antiviral Research* (Vol. 108, Issue 1, pp. 104–128). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016>
- Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. In *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* (Vol. 34, Issue 1).
- Fischinger S, Boudreau CM, Butler AL, Streeck H, Alter G. Sex differences in vaccine-induced humoral immunity. *Semin Immunopathol.* 2019 Mar;41(2):239-249. doi: 10.1007/s00281-018-0726-5. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30547182; PMCID: PMC6373179.
- Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* 1996 Aug 15;318 (Pt 1) (Pt 1):1-14. doi: 10.1042/bj3180001. PMID: 8761444; PMCID: PMC1217580.
- García, G., Clavijo, D., Ramón Mejía, Ó., García, A., Vittorino, M., Alfonso Casadiego, C., Hernández, S., Cobos, C., Tovar, J., Andrés Rey, C., & Zamudio, C.

(2007). Aspectos biomédicos de la familia de las lipocalinas. *Universitas Médica*, vol. 48, núm. 2, 2007, pp. 118-128.

- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., & Levin, M. (2013). Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. In *Ticks and Tick-borne Diseases* (Vol. 4, Issue 3, pp. 171–180). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>
- Jang, H., Kim, Y. H., & Min, J. (2022). Specific histamine regulating activity of surface-modified yeast vacuoles by histamine-binding protein and its immune-enhancing effect. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14116>
- Karasuyama H, Miyake K y Yoshikawa S (2020) Inmunobiología de la resistencia adquirida a las garrapatas. *Front. Immunol.* 11:601504. doi: 10.3389/fimmu.2020.601504
- Kemp DH, Bourne A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae--studies in vivo and in vitro. *Parasitology*. 1980 Jun;80(3):487-96. doi: 10.1017/s0031182000000950. PMID: 7393620.
- Klein SL, Marriott I, Fish EN. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015 Jan;109(1):9-15. doi: 10.1093/trstmh/tru167. PMID: 25573105; PMCID: PMC4447843
- Klompen JS, Black WC, Keirans JE, Oliver JH. 1996. Evolución de las garrapatas. *Año Rev. Entomol.*41:141–61.
- Koch, C.L., 1844a. Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken. *Arch. Naturgesch.* 10, 217–239.
- Koch, C.L., 1844b. Deutschlands Crustaceen, Arachniden und Myriapoden. Herausgegeben von Herrich-Schäffer, part 39, Regensburg, pp. 1835–1844.
- Koch, C.L., 1847. Übersicht des Arachnidensystems. Nürnberg 4, 136.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1): 105–132.
- Latreille, P.A., 1806. *Genera crustaceorum et insectorum secundum ordinem naturalem in familia disposita, iconibus exemplisque plurimis explicata*. Paris et Argentorati 1, 302.
- Mans, B. J. (2005). Tick histamine-binding proteins and related lipocalins: Potential as therapeutic agents. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 6(11), 1131–1135.

- Marquardt, W.C., Demaree, R.S. and Grieve, R.B. (2000): Parasitology and Vector biology. 2nd Ed. Sandiago: Harcourt Academic press. California, USA, Pp.702.
- Márquez-Jiménez, F. J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodríguez-Liébana, J. J., & Muniain-Ezcurra, M. Á. (2005). Ticks (Acarina: Ixodidae) as vectors and reservoirs of pathogen microorganims in Spain. In Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica (Vol. 23, Issue 2, pp. 94–102). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1157/13071613>
- Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F. A., Richtzenhain, L. J., & Labruna, M. B. (2011). Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica*, 117(1), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.006>
- Nava Santiago, Guglielmone Alberto A., Mangold Atilio J. Mangold (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 2009, 14(8), 2857–2877. <https://doi.org/10.2741/3418>
- Nava, S., Estrada-Peña, A., Petney, T., Beati, L., Labruna, M. B., Szabó, M. P. J., Venzal, J. M., Mastropaolo, M., Mangold, A. J., & Guglielmone, A. A. (2015). The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary Parasitology*, 208(1–2), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.021>
- Neumann, L.G., 1897. Révision de la famille des ixodidés (2e mémoire). *Mem. Soc. Zool. Fr.* 10, 324–420.
- Nicholson, W. L., Sonenshine, D. E., Lane, R. S., & Uilenberg, G. (2009). Chapter 26. Ticks (Ixodida). In: G. R. Mullen, & L. A. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*. (pp. 493–542). 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier; Academic Press
- Nodari, E. F., Roma, G. C., Furquim, K. C. S., Bechara, G. H., & Mathias, M. I. C. (2011). Cytotoxic effects of permethrin in salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females. *Experimental Parasitology*, 128(2), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.003>
- Nuttall G. H .F. (1904). Ticks and Tick-Transmitted Diseases. *Trans Epidemiol Soc Lond*; 24:12-32. PMID: 29419268; PMCID: PMC5548484.
- Owen J.A., & Punt J, & Stranford S.A., & Jones P.P.(Eds.), (2016). *KUBY. Inmunología*, 7e. McGraw Hill.
- Paesen. (1999). Tick Histamine-Binding Proteins: Isolation, Cloning, and Three-Dimensional Structure.

- Paesen, G. C., Adams, P. L., Nuttall, P. A., & Stuart, D. L. (2000). Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. www.elsevier.com/locate/bba
- Páez-Triana, L., Muñoz, M., Herrera, G., Moreno-Pérez, D. A., Tafur-Gómez, G. A., Montenegro, D., Patarroyo, M. A., Paniz-Mondolfi, A., & Ramírez, J. D. (2021). Genetic diversity and population structure of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato across different regions of Colombia. *Parasites and Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04898-w>
- Paine SH, Kemp DH, Allen JR. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology*. 1983 Jun;86 (Pt 3):419-28. doi: 10.1017/s0031182000050617. PMID: 6877868.
- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), 897–928. <https://doi.org/10.1086/319347>
- Paucar-Quishpe V, Pérez-Otáñez X, Rodríguez-Hidalgo R, Cepeda-Bastidas D, Pérez-Escalante C, Grijalva-Olmedo J, et al. (2023) An economic evaluation of cattle tick acaricide-resistances and the financial losses in subtropical dairy farms of Ecuador: A farm system approach. *PLoS ONE* 18(6): e0287104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287104>
- Polanco Echeverry, D. N., & Ríos Osorio, L. A. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras.
- Rodríguez Vivas, R.I., Ojeda-Chi, M.M., Pérez-Cogollo, L.C., Rosado-Aguilar, J.A. (2010). Epidemiología y control de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en México. Capítulo 33. En: *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. Editores: Quiroz, R.H. Figueroa, C.J.A., López, A.M.E. Editado por AMPAVE. pp. 477-504. ISBN: 978-607-00-4015-3.
- Rodríguez-Vivas RI, Li AY, Ojeda-Chi MM, Trinidad-Martinez I, Rosado-Aguilar JA, Miller RJ, Pérez de León AA (2013) In vitro and in vivo evaluation of cypermethrin, amitraz, and piperonyl butoxide mixtures for the control of resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 197(1–2):288–296
- Šlapeta, J., Halliday, B., Chandra, S., Alanazi, A. D., & Abdel-Shafy, S. (2022). *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the “tropical lineage” of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(6), 102024. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102024>

- Somma, S., Querci, M., 2006. Reacción en Cadena de la Polimerasa. European Commission. 34 (3): 8-10
- Sonenshine DE, Roe M. 1991. Biology of ticks. Vol. 1. New York: Oxford University Press.
- Sonenshine D.E. & Roe R.M. (2013): Biology of Ticks. 2nd ed.. European Journal of Entomology. 112. 10.14411/eje.2015.069.
- Springer A, Glass A, Probst J, Strube C. Tick-borne zoonoses and commonly used diagnostic methods in human and veterinary medicine. Parasitol Res. 2021 Dec;120(12):4075-4090. doi: 10.1007/s00436-020-07033-3. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33459849; PMCID: PMC8599405.
- Szabó MP, Cunha TM, Pinter A, Vicentini F: Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. Exp Appl Acarol 2001, 25:909-916.
- Wang, Y., Li, Z., Zhou, Y., Cao, J., Zhang, H., Gong, H., & Zhou, J. (2016). Specific histamine binding activity of a new lipocalin from *Hyalomma asiaticum* (Ixodidae) and therapeutic effects on allergic asthma in mice. Parasites and Vectors, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1790-0>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, L. T., 2013. Primer-BLAST: A tool to design target- specific primers for polymerase chain reaction. PLOS Pathogens. 11 (3): 1-3.
- Yeh, C. L., Huei, C. Y., Hong, Y. C., 2012. Specific primer design for the polymerase chain reaction. Biotechnol let. 9 (3): 3-5.
- Zemtsova GE, Apanaskevich DA, Reeves WK, Hahn M, Snellgrove A, Levin ML. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. Exp Appl Acarol. 2016 Jun; 69(2):191-203. doi: 10.1007/s10493-016-0035-4. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27003273; PMCID: PMC5666566.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Secuencia genómica del gen *hbp2*

```
>NC_051183.1:52724872-52739985 Rhipicephalus sanguineus isolate Rsan-2018
chromosome 8, BIME_Rsan_1.4, whole genome shotgun sequence
CCGAAGCGCTCCATACACCGACGGAACATTGAAGGAAGTCAGCATGAAGTTTCTTGTACTCTGCCTTGCC
TCCACCTTGGCGCTCAGCCAGGCTAAGGGAGATCCGCCAGCTTGGGCGGATGAAGCGGCAAATGGGGCCC
ACCAAGACGCCTGGAAGGTAAACGCTTTAACACTGATTGCAGTGTTCTTGAATGAAGAAAGCTGTGCAAT
GGAAAACCTTGACGAATGTGCGCACTGCGAATTCACACGCTTTGGTTCCCCCTGTCATCAATCCAATGTAT
TGCACTTTTAGGCGAACAAAAACGCTAGTGATGACACTCTTTATAGTCTCGACACCCCATGCCTTCTGTG
AAGCACGACACCGCAAACCGTCACACCACATCTCGTACGCTGTCTACAAGTTTCTCTTTCGACACCAGAGG
CCAGCTTTTACACTGACCTCTGTGCGAGATGTAGGCAAACCCCATTTCTCTCTCATTACCTCCAAATGAAT
TGAATTTTTTTGAGCGACCTTCGCGTATTCAATGAATCGCTTCTATATTCTAATTGAAGGATGGAGTTATG
CCCTTAGTATAAATTGTGCTTCCATGTCTCACGAAAGCGGCCATAAGTATTTAAGCACACATACTGTGG
CAATCCTTATTACTGCGATAGCAATCGTGTAGACACTCTCGACGGATTTTTGCCGTTGGCGTCGCCGTCG
CTGTCAATTTTCTCTATAAAAATCCAAATTGACAATATCACCTTCACTTCACATACAAAGGATCTAATAAA
GGATAGAAAGGATCTAATGAAAATTGACAGAACAAAGGAAATGAACTCTGTTTCATGACTTCCAGCTTATA
ACGCGGTGAGTGACGGCGACCGAAAGACTACAAATTATCATGTCAGAACAAAGCTGCTATGTGACCT
GGCTTCAGGCTCTCGCCGTGATGCTGCGAGTGTTCCTTGCAGTTGGAAACATGCGCGTACTGGGTACCTCA
GTAGTAGGGATGGGAAAGTATCGCAAAGAAATATCGGCAATACATGGATAAAGTGCAGCTCCATGATCTG
CGGTGCGGCAATGGCGACTGCCGCACCGCAGATCACGGAGCTGCACTTTATCAATGTCTCGCAAAAATTG
ATTTCCAATTTGCACAGCATGAACAAAATTTTCGCATGTGAAACCAACCACCGAAGATATTGCGAGTAAAA
GTCGGGACGTGTACGGTGTTCGCGCACACGCGACCGAACTACCTAAGAAGTCCGTGCCTTCGTTTCGG
ACGCCAAGTCATGAGGGGCTTGACAGTTTTCTCCTGCTTTTTTTTTTTCTTTTTTTACTTGTGGAAATTGC
ATAATCCCCTTAAGAATAAACATGCGCTCACTCCTGAACCAGGATATCGGTGAAAGTTTTAAGAAAGGCC
TAGTGTAACGAAGTTAGCGTTGGTTTTAGCCACCACACCCTAACCAAGCTGCGCCATTGGCCTTTATCGC
GTTTTAGGTATTTCGTCCTGTGCGAGTTATTGAAACTTGGAACTACTAGCTATTTCGAAGATAGAATCGAACT
ATTGGATTAGGTATTTCGATTCCAATTCGAAACTCGAACATTGGCACACCCCTACTAAATTTTTGTTGAGT
TCCGCGAGATCGGATTCAAAGAGTTTTGCCGCTTGGCTTACCTTGTGTAACTTTTACAATATGTTGCCAT
TGCATTCGTTGCTTCGGCCATGAGCGCAAATGTTATTTTTAATTTTTTTCTTCTTTTTTCGTATTTCGCTCGAC
TTGTGCTGCGCTAAAACAACATCATGGTCATGTGCTATCAATTGAGGCAATCCGCCACGTCAATGTGAAA
CTATATCGCCGTGTTTCGAGGTTTTTATTTTTTCACTCCCATTATTTAAAAAAGTTGGCATCTTTTATACCC
TGACCCATAGCGTACGAGGACGAGGAAAAAACGTACGAGGACAATTTTGATGTATTAAGTTGATTAGCGC
AAGGAAAATGTTTCGCCAAAGAGCGAAAAATCAAAGCATGATATAGGAGACATCGCTAAAACCGCAATGA
CATTGCGAATACGTATTTCGTACGAGGTCGACTGGGTTTTCCATGCAAATCACGCTGGACAACGCTGAAG
CAGCTCTGTAATGTTGACGATGCGTCACGTGAGGTTCCAAATTCGATAATCCAGTACAGGCGCAGGATGC
ACTTCATGGATGTCCAAGCGATAGCCGCTGCGCTGGCTTATGTGATAGGGGTCGAGCTCGGAAGTACGAG
TGTTGCATATTAATTACCGTCAAAGGTTGCTGCATCTCAGATGGCTCAGATGGCGGAGAGTACGCGTGCT
CCACCATAATGCGTTCTGAGGCCATCCTAATTTTTTACTGCAGAGATTCTATGATCGAGGTTTTCGGTTC
ATCGTAGATATAAAAATATCATCATGAAACGGCACGCGCTCAATGACCACTCAAATATGCGGTACAGGTG
GTTAACAAAGGAAGCTGAAACGGCGTGATTCTGCCAACATACGTGACACATAGGCGCTGTAGGAATGTT
ACAGAAAAGCTGTTATGGACGATATTTGCCGTTGTGCTGGATAAAAAATATCATGAACCGCCACGCGC
TCAATGAACACCCAAGCATTCTGTACTGATGGTTAAAGAGGTCCTCACACAATTTTTTAGAGTAATCGTCT
CATGGCTTTAATAAAAGAGCTTAATGCCTCACCAATCGACTGCCGCAAAAATTTTTTAGGATCCGTCAACC
AGAATCGGAGTCATAGGGAGTTGCAGCATGCTTCAAGCGCTCTCTCTCTACGCTGGGAGAGTGATGACAA
GGGGGCAAGAAGATGCGTCCCTTCGTGAGCGCGCGTCATGATCTGGAGCACTTCTTGTGATGTTCTTTTT
TTTTTCGAACACGCTGCTTATTTTTCGGTGTGATCCCAGCGAGCGCGCGGGCATGTGGCGGCATCCCACG
GTGTCAACGGGAATATGCGGCAAGCGATGCTCAAACCAGCCAAATTCGGGGACTTGGGTATATGGCGC
AGCAATTTGGGTATATGGAATCAGTTGTAGTGAGAAGACGGAGTGAATTGTAGTTGGCTGAGAAATAATT
GTAAGCGCTAGGCCGTGTGCCCCGCTGTAATAATGTTTAGCTCGCGTGTCTCAGGATCCTCGACTACCA
ATGGGCAGTGTTCCTGACCATGCTGAAAAAGAGTGGCCGGGCCCCCTTTCACAAAAGAAGCTGAAACGTG
CCCATCAGCACTAATGGGGCCCAGCCTTGCAGCACTTCGTGCTAGCTGCGCTAATTTTTTTGCTCGTTAA
ACCATACAACTTCAAATTCACAAATGATGAAAAGTTGCGTAATCTAGATGCACCAAAAATAAGTGTGG
CTTCATTGCTGTAATAACGGAGCAGTTGTAACCTCGGTAGCAAATATTCGCCTAGTTGTTTCATGCATATT
AAATAAAAGGCACCTGATCGGTTTTGATTGTTTTAATTCCTCAGTCGATGCACTAGCTTTCTCAACCT
```

TATGTGGTTGTGCATCACCTCCAAGATCGTAGGCAGTGAAGCTTTTTGCACCTCACCTGGGTTTATACT
GCAGCCGGGATGGCTCACAGTTGTCTGAAGCAATACTTTTCGGTTCGATGCCGTACCATGCGACGTTTCAT
TCTCTCTGTACAGATGATGTTGGAAATTTTGGCGATCCGTGACACCATGAAGTCTTTCACGTGCTTGCCTC
ATGGCTTGACGGTGATAGTTTGAACCCCTCGTTGCGGCTCCGCCGTTGAAGCGGACGGTCAATTTTCGTG
TTTGATGAGGCATCAAATGCTTTCACCTAACATCGCACTAGACATTTTCGAAAGTGAATTCAGTGGCA
GTGTAATCGCGCCTATATATTTTCAGAGTCTCAAAGCCAGCGTCGAAAGCATGTACTTCATGATAAAGGCC
ACCTACAAGAATGACCCAGTCTGGGGCAATAACTTCACTTGTGTGGCTGTTGCGGCTGATGATGCGAACG
AAGATGAGAAGAGCGTTGAAGCAACGTTTATGTTTTTCAATAATGCTAACAGGTTATTCCAGTAAGTACC
TTGTTCTTGCCACTATATCTGTCAAAAATATTTTGCATATTCACCAGCAACCAGCACACAAGCTGAAC
TAGACATCATTTTGTGTTTGTACACGATAGTGGAGCACTGCTACTGCACCGGACGCAACGCAATCTGGGAG
TCAGAAAAGCTACAGGCTATTTGGGCGAAGGAAGTTTGGTGGTATTTATTGCCGAATAGGCAGTAGCATC
GTCCCAAAAAGTGGATCAAGCACAGACTTCCGGAGCGGGAGCACGTACTGTAGCGATGAGAAGAAACGCG
AACGCCGGGAAGCGTGACCTTCGGTACACTCAGCGCCGGCTAGCCTCGGTTCGCTATTCCGAGGCTGCGT
GTCAAACCTCCGATTTTCTTGGTTTACTGTTACGCGGACCTGCGTCTTTTTCGGGCACCACCCTTGCCT
AGAATTTTGTTCGGCTGGCACTACCGCATCGCATGTGCTTATCATCTGCCAGTCATATCTGGCCACAAC
CTGGCCAAGATTCTAGCTCGACGGTAACGTAGGGTGCAAGGACAGATTCCCTTTCGAGAGAAACAGGGTCA
TATCGAAGTTGGGCGCCTGGTTTTCGGACTAGCCGACTGACGCTACGCTACGCTGACTGTTCCCAAAAGAG
CGTTTTCTGTTGCTCGCCTTTTCGGTTCATCACGATAGCAAGTCCCTATAATTTCTGCACGTTGTACCGACA
AATTTGGTGCATCATAGGTATGAACGTTATATGAATAACTCTTTACTGTTTATAGTATCTTCTTTATTTA
AGCGAAAATACTGCAAAGATATGTTTAGCTTGAGCTGTTTACTATTATTTTTTTCAGGCCATGTTTAAACA
TACATGACTATGTGTACACTCTGTACAGTAAAACACAATAAGTAGCGTGTGCCTTTAAGCGGACCTGAAG
TTTACAAATAGGCTTTATAAATGGAGCCTCATAATAGTACACATGTATCCAGACAATAATATTTTGTCTCA
TTGCACAGTAACTTTGAGTTACTGGGGTTATGCAATATTTTGTATGTCATTCCCTCTCTGACTAATTAAT
TATCTGCCCGCAATTGCTTGAAGAGATATTAACCCAGTACGACACCATTGATTGTCATATAAAAATA
TTTGGCTGTTACATACGCAAATAATTTTCAGGTTAAGACTTGAAAGTGAATAGATATTGAAGTAATGCTTG
AGCCGAGTTTATCACTAATTAACACATCGATGTCAATATAATGCAGAACGAGCTACGTTGATAATGGCCA
GGTTCCTGTGACAATTTACGGTGTCTAATATTGAATTCATTGTCTTAATGAGAAAAGCTGACTGTGGT
TTGAGTAAGTGGCTTTATATAATAAGGTTGATGAGAATATGTCTGCAGAAGCCCCGTTTCGTGATCTGCG
TCCAGTTGACTATTGCTCCCTGAAATTCAGCCTGAAATTAACACCAGTACTCCATTTCTAAAAACTTTTCAG
CCGATTTTCTACTGAAAAGGCGACTGCTGTTAAAATGTATGGTTACAATAAGGAAAACGCCTTTAAATAC
GAGACAAGGGGTAAGTTTTGCTATCCTCTCATGCATTACTTGTGTAACCTTGAAGATATGACTGACTACA
TAACTGCCGTGCTAGTTTTCGATCATTTTTCTTTGTAAGTACACATTACTTTGAGAAGAGCAAAGCAAGATA
ATAAAAAGTTGAATTTATAACCCCGTTCACTTCATAATGTTGCAAAAACCTGAGCTTTGCGTTCTGTGTT
TCTCTATGCATTCAACCCGTGTGCACTGAAATGAAACTCGCGCTTCCCTCTGAGGTGATGTGTGTTTCTGC
TACATCTAAATGGCAATAAGTAAAGAATAGTAAACCTGATTCAATGTTTCACTTTATATTGAAGGACTTT
GCAGTGCCATTCAAGTGCGGCGCCTCAGTACCAATTCCTCTCACGGGCATTGTGAGATGCAGTGTGCCTG
TGGGCGATGTTGCGCTTTTTTCGAAAAAATGACAGGTTTACAGTGGTGAAGTGTCTGTCTGCGCGACA
GCACTTCAGCAACAAGTGAAGCATGAGTCATCAAGTTAACTCTATTTCGGGCTGCAATGACGTCAACT
TGGTAGCTTTTAGAAAACGGAGTGCTGGTAGCTTGGAGCAGCATCCTCAAACATGCCTGATGCGATACGCT
TAGATGGAACACGAGTGAATTCAGAATAAAATGCTGGCTTTTCATGGATGCAACCTGCTTTCTTAGGT
CATCCTGTTAACTGCAGTGTGTTTTCGTGATTTGGGAGTGTCTGAAATTTTTCTTAGGACACACCGACAA
TTGGCGATTCTATCAAAATAGATCTGAATACAGTGTGTTATGTATCTACCATATCAAAGCCTTTAAAAACA
GCTGTGCTTACTCGTCGGGGCCGGGAGCGCCTAATCTGCCTTGGCCATTACTTGGCCTTGTGTTTAGCAT
CCAAGCTGTTTATCAAATCGTTCCTTGTGAGTCGATCGCTGAAAACCTATCATCTTAAACGGGTTTGTGCCA
CTGTGCGGCGACCTGAGAGCGAGTACAGAGAGAGCGAAAAGAAAAGGAGAACCAAGCACAGAGACCC
AAAGAAAAATATAAAGAAAAGAGAAAAAATTTCCCTCAGAAATTTTTCACGAGGCGGGATTCCAATCTGC
GTATCCTCGGTCCAAAAGTCAAGCGTCTAACCCTATGCTTATCCAGGCAAGCTAGAAGGGCATAGCATA
CATAGCCTTGTACGGTATAGTGTAGCAAAGGGGTGAAAAGGGAAGTGAAGAGGAGGGGAAAAGGA
GGAGGGGAGCGAGTAAAGCATACGCACCACATAAAAGAATGGGAAAAGAGAGAAAATAGAACATTAACGAAAAG
AGAGAAAAACATGGTTGATCTCTCCGTCTAGGAATCGGAATAACACGAAAAGTAAAGCGTGCCTTATA
GAAGTAACTGAATGTTTACTGTACATTGATAACAAGAGAGTTTGCACAATGTATATTGATGTCTGGCAGCT
ATAGCACCGTTTTAACGCGCATGTACCCACTTTGATCACTGGTGGTACATCTACAAACCCTTGCGGTAGCT
GTAGTAGTTAACGGTGAAGCGTAATCAAAGAACGAGGTGTGATTGCCAGAAGAGCGTTCGCATATTGGAC
GCAGAACTTGGTTCGCCATCCCGCGCATGTTAAAATGTGATTGAACACCACGGCCGGGCTAGAGGGAAAC
GCAAAGCGCGTTCGTGCCGCCCCCGGCCGCGATTCTTCTCGGGGTGAGCGCGTGAAGCAGGGAACGCGGT
GTTACAGCCAGGGGAGACAGGCGCGCTGCGAGAGCTATTTTTCGGTTTTTATCAGCGTATTGCTATGAGC
GAGGCCGACGCTTTTACGAAGCTTGGGCCAATGTGCGCCACCTCGCGGTGTGTTAAGGCATTGACAAAATT

GAAC TTTTATTGAATACGCGGCGAATGGGACAGACGTGTAACGCGTTGCAGGTGCTAATCGCGGAGGCCA
TAGTAATGACGGATTACTTTACCTTACCGCTCCCAAAGGGCAACACCACCCCGTTCGACCGGGAGTGGTAT
ATATAAAAGGCGCGTTTTGTAAAGCCTCTAGAGTCTGTGACCGTGGCGCAGTGGATAGCGTGC CCGGGATC
TGTTGTTGCGGACTGAGCGGTTCGTGGGTTTCGATGCCCGGTGACGGAACCTTTTTGCCATCTGAACGTGTAC
CTATTTTCGACGTCATTTCCGCGACGGAAATACGTCATTGAAGTCTTGGTGGACCCCGGCATAAAAACACT
TTCGTGTTTTAAAACATGGCGGTGTCTCTGTGCATAAGAATCGGTACAACACCAAAGTGAAAATTGTCTT
CCCAGACGAAGTTGAGCGTTTTGTTGTGCATTGTTTCGCCACAAGATGTAACGAATGAATACTATCGCAAC
AAATTGTAATGTCCCGGGTAGAACGGCAAGCAGCTCGAAACTCACAACGCACTGGTTCGAACAGAAAGGAC
GCATGAAAATAACGTATACGGGATGAGCACGAAGTAACAAATGTCACATCTCGACAGTCAAACCCGCGCTG
CTCAAAAACACAACGGAGGACGCACAAAATGAACGCACAAGTATACACAAGATGATCATGAACCTAAGTGT
ACGGTTGTAACCTTATTTCTGTGTGAGCAGCACGCTCCTTTTCGCAAAAGCAGCTGCTGCAGTGAGCGAAGT
GACCTTCTTTCTGCCTGTAACCTTCAAAAACAACTTGGGGTGAGAGCACAAGACGTACAAAACACCGCCAT
CACGGGATAAGCGCGCGCACACGAGTGAGCACGCCCTGTAGAGACGTGCGCTCATCGCAACGCGCGGGAC
GACGAACTTTAAACCGCGCCCTTTGATCCTTTTCGCACAATTTTCGCTAGTGATAGTGAAAACACGCCGAAG
TTCCACCGATCTCTGTCTACCGCCCCAGGTAAATTGTGTATATATAACTCCCCGTTAGTATGTTCAAG
AGCGTGCCTTGTGTGGCGGAGTCTTCTGCAGAGCCAGGGGCCCCGAAAGTTCGACTACCGGTGTCTGAACT
TTTTCTTCTAGTTTTATTCTTTGCCATCTCTTAGTCTATATATTTTTACAATGTCATAACCGTGACGGCAA
TACGCCAGTGGAGCCGTGGTGAACCTCCAGCATAAAAACACTTTTCGTGTTAAAAAAAAGTGAGATCATCAAC
GAAATAGACAAAAAATAAGTAGAGAGAAAAAAAACGCCAGGCCTGCGCTGAAACCGCAGCACAGTCAACA
GCGAAAGCTGGAAGAGCGCGTTTTCTACAGGCGGTTGTAGGCTCTCTTGGGGCTGCAAAATACACGTACCC
ACTACGCCATAAATACAAGCAAGGTACCCACTACGCCATAAATCACAATTTTTTGTGAAGTTGGGAAGCAC
CTACTAAGCCATTATTCTCATTCTGCGGAGAAGCGAGTCAACAGATACACGTCTGTAAGGCATTATGTG
TACTTTGTTGAGGCGAGGACTGATAACGATGAAGAATTATGACTCAGCCCTTTGTAATGGCTTGGAAAGCT
TTAAACGGCTCACAGTTATCCAATTTGCATTGGGTGACGCCCGGTTCGTTATTTCCCTCTCCCGCCATGC
TGTATAACATATAACATATGTTGACGTGCGAGCGGAGCGAGGGGGGGGGGGGGGGAAGAAGCTTTATTGA
TACCCCGAGGAAATGGATCATGCGCTTATGTGCTTCTTGGCAACCAATACAAGTGCACCTTGCGAAGAAC
CCACTACGCTATAAAATAAATGTAATTTCTGAGAAGTAGGGAAGCAGGCACTATGCCATTTTTTCGTCAATC
TATGGAGAGCCGTGGTACCTGCTCAACGCATGTAAGGCATTATGCGCTGTGCCTGATGCATGTAAGCAT
TATGGCGGAGCCCTTTGTAATGGGTGGAAGCATTCAACAACCTACAGCTGCGCAATTCGCATTGTGTGA
CGCCTGGTTACAGAATTCGGGTTGTGCGACGCCAGGTGCTTATTTTTACTCTTCTACCACGCTATATTGCA
TACGTTAATGTGGTTCCCTTCCCGACATGAAGCTTGTATAGGACCTTTTTTGCAAGCCGCGTCAAGCACCG
GCATGGCTCAGAGGTTGATTGCTGGGCTCCCACGCAGAGGGCCCAGGTTCGAACCTCGTTGTATCCTGGA
ATTTTTTTTTCTTAATTAGTTTTTTTTTATTTTCGAGCGATAGTGGTTACGGACACCGGCGGGCGGACAAC
GGCCGCTGAAAAACGGCCGCTGAAACGATCTCATAACAGCTTTTCGCTGTAAAAAAGCTAGAAAAACAAG
AAGCAAGCATATCGTCCGAGCGATCAGATACCGCACCACTGGCTAAGCCGCGCATGCGCAGCAGCTA
AGCTACGCCAGCGACGGGAGACATCGCGCGCGACCTCCGCTCTATAGTGCATAGCGTGGCTGCCTACTC
CCGAGGAGGAAGCCGCGCATCTCGAAGCCATACGTGTCCGTGACGGGCAGTGCAGCGGGCAGCGGGTCC
GTGCTTCGCCGTCGAAACTTTGCGAGAGAGAGTTCAAACGTCCCGCTATTTTTTTTTCAGTATCATACTA
AGCGTTGTCTTTGGGATGCGGTACGAAGCAGTGATGTAATGTTTATTTTTCTCACGTGCGATTGCATTAA
TTACCGCAAGCTTTGCGGGGAACAACACGTTCTTCTGTTTTGTGGCATCGATCGCGTTAAGAAAAACGAGC
GGAAAAGCGAACAGCGACCCCTCATGATGGGACGGTGGCGAAAAAAGAAGGAATAATGTGAAAAACACG
TAATACCCAGCGGCATTTTTCTATTTCGGTCCGGCGGGCGCGCTCCTTATAACACCGCTCGGTCTCACATAT
GCGTGAGAGAAAGTCACCTTACGTGAGGAAAAGCCAAATATGTGTGATGGAAGCCAGGTTTTGGGGCATT
TCACGTGGTCCGATGTTTTGTAACCTCAAGTTTTCTGACTAGATTTCTAAGATGTTGCCGTGCACTTTGAC
ATCATTGGCGTTAAAGAAACGCTGTATTTCGAAAAAAGTTCTTTATAAAGGATGCTTCGATATAACCCGACT
TCAATATAGTAAGTTTCGGCTGTAACCTGCTATATAAAAACACTTGCATGAAAGTGCTGCAAGCTATACTGT
CTTTGTGCTCAAGTATTTGATCAAATATTTCAATTCATTACTATTTTCATCGTAACGGTAAAAGTAAAATGC
ATCATCCGGTAACTTCCAAGCCTTTATTGATGTTTTCTCCAAGTACTGTTTACACAAAAGGCTATGAAA
TATTAGAAATAGGGCTGTTGTGGTATAAGGCAAGATAATATCACATAAATTGTCGTTATGGTATAAAATAGC
GTCACTGACATCTATTCTAACGAACAAGAGCTGTGCTCCGTCCCGGTGGATCAGTGGCTACGGTTCTGG
GATGCTGACCAGAAAGTCCCGGGCTCAGTCACTGGCGCGGGTTCGATTTTCGGTGAAGCGAGATGGTG
GAGGCCGGCGTAATGTGCGATGTCAGTGCACGCTAAAGAATTCCAGATGGTCAAATTTCCAGAGCCTTC
TACTACGGCGTCCCTCATAATCGTATCGTGGTTTTGGGATGTAAAACCTCCAGATAATATTTATGCGATAG
CAATTATATGGACAATCTCGACAGGTTTTTGTGTTGCTGTGCATGTCCTGTGTAACGTGCAAATTCATAA
CACCTCCCAGGCATCGTATGTTCTACCGCTGGTAAAATCGAGCAAGCGGAGTTTACGAACGCCGCTGAAG
CAGACATCAAACGAGCCGGCCAATCTCCGTCACTCTCAGGGCGCATGCGATAACACCACCTCGCTCGGGA
AGCCTGCCGTGCAAAACAGAGAGGAAATGATCCGCCCGTCTCGAACGAGCCTGCAAAATACGCGAGGGGAGG

GGGTGCCCTCGAGCAGCATCTTTGAATTTGCAATCCAAAGGTGCAGTCTCGATCATTGCGGCACGCGCT
ATCTCGGCAGCCCTTAGCGGGCGGCTCGTATTCCCTTCTACGGGCTGCGCTCTCAACGCAAAGAACTGT
GCGAAAAGAGCATCTCTTCTGGAGCGGCCGTATTCTCTAACACCAGCGTTGTGTAGAGTTACGCGAGAT
CGGAACCAAAAGAGTTAGCTGCTTGCCTCACATCGTATAACATTACAATTTGTTTCTATCGCATTCAAGG
TTTCGCCCATGTGGTGAAGCTGTGACTTTTTATTGAACAGAAGCTGCAGAAATCTAGTGTAGTGGTTGAG
GTACAATGTGCATGAAATTTCTTCTTCAGTGAAGGAACCTGAGGCATTTTTTCTGTGTTTCACTTGTTC
TATATAATCAGGGCGTCAATGGCAAATAAATGCCTATTATTTCTTGGAGAACCGCTAACCTTAAAACCG
CTTCACCGTGATAAGCTCGATGGTGTATTTAGGCTCTTTCTGTAGCTGCAGATGTTGGACGGCAAAGAC
ACAAAGATTACACTTAGCTACTAATACAGAGTAGATTGCCTGTTTTAATAGAGTATATGCATAATCAAGC
TTTCACCTTTTTTACATTTTTTCAATTTTTTATTAGGCACTACAGCAACCAACATTTTTTAGTTATTAG
AAACCGTACTTATACGTCTATAGAAATCATCAAACCTTATATGTTTACGATAAAAAAAAAATATAAAAAAATT
CAGAAAACAGAGTTTTTATTTTTTTTTCTGTTTTTCTATTTACCTTCGTTATTACCCGTTATTTTTGAGG
AATAATGAAAATTTTCATGTTTTCTAGTGTTCATTTTTGTTGTCCTCTAACTCCTGGCTGAAATGCTGATT
TGCACAAGTAAACACCGTCTCTGTGCTTATTACTGGAAAATGCGAAGACTCCAAGAGAATAATTTTTTAT
GATATTCCTGCACGTACACCTAACTGCTTTGAAATGTTGATTATTACGCGAGATCATAAAAGGCCATCCA
TTATGTTTTACAATAACTCACAGCACATTAATTTCTGTTTGAAG ATGGACAAGTGTTCACAGATGTGCTT
GCATTCTCCGATGACGACTGCTATGTAATGTACGTTCTGGTACAGACGGAAACGAAGAAGGTAAGTAAA
TGCAACAATTTGCATTCACAATAGAATTTGTAACGCTCTCGTGTATTAAGCGCTCTTGCGGAGGTTTTTG
TGAAATTTGCATGAAGTAATTGATCACAGACGGTTCCCGAAACGAGCACGCCTGTTGCTCCGTTGAGGAG
GAGGTTTTTGCTGTTTTAGATGTGAAGCATCTTACGGTGGAGTTCAATCCGGTGGTGGTGTGCGGCG
TGACCGCTTTACTGCGCATGCGCAAACCTTTCCCCACAGCTCCTCTCCCTTTCCCTTCTCCACTTCA
AATCTCTGCTCCATTTTTCTCTCTCCCTCCGCTATCCACTTTCTTCTCCACTCCTCCTCTCCACTACC
CTCTCGACTTTCTTCTCCAGTCTCTATCTCCTCCCTCTCCACTCCCTTCTCCACTCCCCCTCTCCCT
CCCCCATCTGAAACTCGGGCTCGACATGCCCAAACGCTGCTTCGCATCGCCTCATGGTCCCCTTTAGTGG
GAGATGGTGTGAGTTTTTCTTCTGTAGCATGTGTGATCAGGTACAAGCGCGTACTTTTTTACAGAAAA
AAAGTAAAATCAAATTTGTAGTTAAATTCGAAGCAACTGAATAATAGTTGATAGTCTTCTTTCATTGCA
GTGTGAAGCTTTGTCTCATCTTTGTGCACCGGCTCACCAAATAGTCACACGGAATGTCCGCCAAAATA
ATCGTTGGCTTACACACGAAACACAGTACTCCACCATTTTTAGCCAGCGCATCGAAATCGCCGAAATCTGT
TCTTCAAACCTTTTTCAAACGCAGTTTCAAGGAAGGTGTATACACCACGCCGCTCAAATACTCGTTAGAAA
ATTGATGCATTCCACCCGCCAGAAAACGCCAACATTGCCGCGCGCGTATGAGCACTGAAAATGTTGTTT
TGAAAACCTGGCTAGTTCCCTGCCCTTACCTTCGAATCAATACCGAAAAGCTCATTAGGTCTGCTTCTCAA
AAAAGAAAAACTACACGCTCATTCAATGGTAACTGCTCAGAGAAAAGTAATATTTGAAAGCGAATATCGAG
GATGGCCTGGCTGAGCTGACAGTGCATGTGCTTAGAAAATATGCTTCATATCTATGGAAAACAGTCAAAG
CTAATGACAAGCATTTCGACACATTTTTCTGCACTAAAATGCTAACACGTGAAAAATAGCGCTCATTGGGCA
CCTTTCTGTTTTGTGATTGTGTGATTGTAAGGCTGGAAACGTCCATTTCTATTTAAAATCATGACCCAGAG
TCAAACATAACGTGTTACACCTTTTGAATGATATTCTATGAACCATTCAAACATACTCAGGTAATAT
TGTTTACGCGCTAATAAAAAATTGCTCATAACGCGATGGACATGGGGAACATTAACATCTGATCAATCGCA
AAAGGGAGGGAAAAATTTTTGCTACCCTTGTGCTTGGTAAGAAAATTTGAGAATTACCGCGAATTCACAAG
AAGACGCAATGCTCAACAACGCTGTTTGTTCGTAATAAGCACATCAGTCTTCTTTCTGATGTAGGATTTG
ATTTTCGAGCTTCAAGAGGTGCTCACACTACATTAGCCTGTCATGCTAAACTCCTGTACAGCGCAGTAAAT
TCCAAAGCTCATTAACTCCTAATGATATAGATAATTTTACATTGAAGTCAATTTTACATGGCGCACCTA
CTGAATCTGATATAATCATGACGTAAAAATGCAGTATGAATTTCTGGTGGCTAGTAGTGAGGACGTTGGGT
ACGAATACATTACATAATAACCGAGCACTCCCTCCGTTGGTGGGACACCAACGGAGGGGATTGCTCGGTT
ATTATGAATGTATTGATGACAAACACCAACGGAGGGGAGAGCTCATGGGAATGGCGAGAATCTCGCTCGA
GCACGTGATGAGAAGCTCGTACTGTGTGCTCAGGACCGTGCAGTAGAAGCCATTACGAGCTTTTAAAG
ACATGTAAAAAATTTTCAGGCAGCTTAGCGCTTAGAAGTATATTTTTATATGCTCCTGAGGGCTTGTCTT
TTCACTTGACGCAAACACAGTGGCACGTGAAAATTTTCGTGCCAGTACCCATTTAACAATAATTTCTTTGT
CCCGTACGTTATCTATCTGTACCTTATCCCTAACTTTAATTTTTATTTTTCAGGTTATGAACTGTGGAGTAC
CTTGTACGGGTGCGTTCCGCTCAGTTGTTTGGACAAGTTTAAATGAATACGCTGCGCGCATGGAGGTACGA
GACGTGTTACAAGCAAGTGCCTGGAATAATGTCTTGAAGTATTGCTATTTCAAAGCTGAAACTGGATA
ATGTCACCATGGCTCCGAATGCTCGATGTAGCCTTCGATAATACTGTTTGGCTTAGGTTTTTGGTTTTGGG
TACATTGTAGTCTTTGCAGACGACCAGCATATGTAATGAAAAATAAAATATTGTGCAGTAGGAA

Anexo 2. Secuencia predicha de *hbp2*

PREDICTED: Rhipicephalus sanguineus female-specific histamine-binding protein 2-like (LOC119401889), mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_037668894.2

>XM_037668894.2 PREDICTED: Rhipicephalus sanguineus female-specific histamine-binding protein 2-like (LOC119401889), mRNA

```
ATGAAGTTTCTTGTACTCTGCCTTGCCTCCACCTTGGCGCTCAGCCAGGCTAAGGGAGATCCGCCAGCTTGGG
CGGATGAAGCGGCAAATGGGGCCCACCAAGACGCCTGGAAGAGTCTCAAAGCCAGCGTCGAAAGCATGTACTT
CATGATAAAGGCCACCTACAAGAATGACCCAGTCTGGGGCAATAACTTCACTTGTGTGGCTGTTGCGGCTGAT
GATGCGAACGAAGATGAGAAGAGCGTTGAAGCAACGTTTATGTTTTTCAATAATGCTAACAGGTTATTCCACC
GATTTTCTACTGAAAAGGCGACTGCTGTTAAAATGTATGGTTACAATAAGGAAAACGCCTTTAAATACGAGAC
AAGGGATGGACAAGTGTTACAGATGTCGTTGCATTCTCCGATGACGACTGCTATGTAATGTACGTTTCTGGT
ACAGACGGAAACGAAGAAGGTTATGAACTGTGGAGTACCTTGTACGGGTGCGTTCCGCTCAGTTGTTTGGACA
AGTTTAATGAATACGCTGCGCGCATGGAGGTACGAGACGTGTTTACAAGCAAGTGCGTGGAATAA
```

Anexo 3. Secuencia obtenida del electroferograma.

>SECUENCIA CONSENSO HBP2

```
ATGAAGTTTCTTGTACTCTGCCTTGCCTCCACCTTGACGCTCAGCCAGGCTAAG
GGAGATCTGCCAGCTTGGGCGGATGAAGCGGCAAATGGGGCCCACCAAGACG
CCTGGAAGAGTCTCAAAGCCAGCGTCGAAAGCATGTACTTCATGATAAAGGCC
ACCTACAAGAATGACCCAGTCTGGGGCAATAACTTCACTTGTGTGGCTGTTGCG
GCTGATGATGCGAACGAAGATGAGAAGAGCGTTGAAGCAACGTTTATGTTTTT
CAATAATGCTAACAGGTTATTCCACGAATTTTCTACTGAAAAGGTGACTGCTGT
TAAAATGTATGGTTACAATAAGGAAAACGCCTTTAAATACGAGACGAGGGATG
GACAAGTGTTACAGATGTCGTTGCATTCTCTGATGACGACTGCTATGTAATGT
GCGTTTCTGGTACAGACGGAAACGAAGAAGGTTATGAACTGTGGAGTACCTTG
TACGGGTGCGTTCCGCTCAGTTGTTTGGACAAGTTTAATGAATACGCTGCGCGC
ATGGAGGTACGAGACGTGTTTACAAGCAAGTGCGTGGA
```