



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Evaluación de la inmunogenicidad de péptidos basados en la proteína  
Vitелogenina como candidatos vacunales contra la garrapata *Amblyomma mixtum*.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta

Alejandra Guerra Elías

Dirigido por:

MSPAS. Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio

Santiago de Querétaro, Querétaro., 2025.

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.

## **VOTOS APROBATORIOS**

MSPAS. Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio

Director

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Asesor

Dra. Lineth Juliana Vega Rojas

Asesor

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Asesor

MSPAS. Daniel Gustavo López Díaz

Asesor

## RESUMEN

Las garrapatas son artrópodos ectoparásitos capaces de afectar animales y humanos, ocasionando pérdidas económicas millonarias. El género *Amblyomma*, tiene amplia distribución y capacidad de parasitar múltiples hospedantes, causa daños en la piel, consume grandes cantidades de sangre y puede transmitir diversas enfermedades de importancia. En México, *Amblyomma mixtum* es la segunda garrapata de mayor importancia en la ganadería bovina. Ante la necesidad de métodos de control efectivos y ecológicos, la vacunación resulta una alternativa viable a los ixodicidas, no obstante, no se ha desarrollado una vacuna comercial contra *A. mixtum*. Se ha propuesto que las vacunas anti-garrapatas podrían basarse en proteínas importantes para su fisiología. La vitelogenina, proteína sintetizada en diversos órganos de la garrapata, juega un rol fundamental en la formación de huevos, embriogénesis y es la principal fuente de nutrientes en el embrión. Durante el proceso de vitelogénesis, la vitelogenina capta el hierro de la sangre ingerida para transferirlo a los ovocitos, la interrupción de este proceso podría causar una acumulación tóxica de hierro en la garrapata hembra, llevándola a la muerte, así como la reducción en la viabilidad de la siguiente generación.

Este estudio propone que péptidos sintéticos basados en la proteína Vitelogenina de la garrapata *Amblyomma mixtum* inducirán una respuesta inmunológica humoral manifestada a través de la producción de anticuerpos específicos, indicando su potencial como candidatos vacunales para el control de esta garrapata.

Se evaluaron nueve péptidos sintéticos a partir de la producción de anticuerpos específicos, se utilizó el conejo como modelo animal debido a su capacidad para generar grandes cantidades de anticuerpos de alta calidad, sus requerimientos espaciales reducidos y el menor riesgo en su manejo. Se inmunizaron veinte conejos Nueva Zelanda con nueve péptidos sintéticos basados en la proteína vitelogenina (dos conejos por cada péptido sintético) y un grupo control inmunizado con PBS estéril y un adyuvante. Se administraron cuatro dosis en la región dorsal del conejo vía subcutánea en intervalos de 21 días. Se recolectaron muestras de suero después de cada inmunización para evaluar la respuesta inmune mediante la técnica de ELISA indirecta. Siete de los nueve péptidos (Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5) indujeron una respuesta de anticuerpos detectable por ELISA indirecta en los conejos inmunizados, los cuales son candidatos prometedores para futuras investigaciones en el desarrollo de una vacuna contra *Amblyomma mixtum*. Los péptidos Vg1Amix1 y Vg1Amix4 no demostraron una respuesta inmunológica significativa. La mayoría de los péptidos inmunogénicos alcanzaron su pico de respuesta más

alto después de la segunda inmunización y se mantuvieron elevados hasta la cuarta, mientras que Vg2Amix1 alcanzó su punto máximo en la cuarta inmunización.

**Palabras clave:** *Amblyomma mixtum*, vitelogenina, péptidos, anticuerpos, inmunización.

## SUMMARY

Ticks are ectoparasitic arthropods capable of infecting animals and humans, causing millions of dollars in economic losses. The widely distributed genus *Amblyomma*, capable of parasitizing multiple hosts, causes skin damage, consumes large quantities of blood, and transmits various serious diseases. In Mexico, *Amblyomma mixtum* is the second most important tick in cattle farming. Given the need for effective and environmentally friendly control methods, vaccination is a viable alternative to ixodicides, although no commercially available vaccine against *A. mixtum* has been developed. It has been proposed that anti-tick vaccines could be based on proteins important for tick physiology. Vitellogenin, a protein synthesized in various tick organs, plays a fundamental role in egg formation and embryogenesis and is the main source of nutrients for the embryo. During the process of vitellogenesis, vitellogenin captures iron from ingested blood to transfer it to the oocytes. Disruption of this process could cause a toxic accumulation of iron in the female tick, leading to its death and reducing the viability of the next generation.

This study proposes that synthetic peptides based on the vitellogenin protein of the *Amblyomma mixtum* tick will induce a humoral immune response manifested through the production of specific antibodies, suggesting their potential as vaccine candidates for the control of this tick.

Nine synthetic peptides were evaluated based on the production of specific antibodies in the rabbit as an animal model due to their ability to generate large quantities of high-quality antibodies, their reduced spatial requirements, and the lower risk of handling. Twenty New Zealand rabbits were immunized with nine synthetic peptides based on the vitellogenin protein (two rabbits per synthetic peptide) and a control group immunized with sterile PBS and an adjuvant. Four doses were administered subcutaneously into the dorsal region of the rabbit at 21-day intervals. Serum samples were collected after each immunization to assess the immune response by indirect ELISA. Nine of the nine peptides (Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 and Vg2Amix5) induced an antibody response detectable by indirect ELISA in the immunized rabbits, which are promising candidates for future research in the development of a vaccine against *Amblyomma mixtum*. Peptides Vg1Amix1 and Vg1Amix4 did not demonstrate a significant immune response. Most immunogenic peptides reached their highest peak response after the second immunization and remained elevated until the fourth, while Vg2Amix1 peaked at the fourth immunization.

**Keywords:** *Amblyomma mixtum*, vitellogenin, peptides, antibodies, immunization.

## **DEDICATORIAS**

A mis papás, por ser el apoyo más grande que tengo. Su amor y cariño me permitieron culminar mis estudios de licenciatura y crecer como persona. Gracias a ustedes soy quien soy y siempre les estaré infinitamente agradecida.

A mi hermano, por ser mi acompañante de vida y mentor en infinitos sentidos. Espero que todo lo bueno te llegue en la vida y siempre consigas tus metas.

A Manuel, mi amor tan adorado. Te agradezco con todo mi ser el ánimo que me das día tras día, por ser mi confidente y llenar mi corazón de alegría.

A Adri, Regina, Zulh, Dani, Seula, Nadia, Fer, Perla e Ilwi, por apoyarme en toda mi trayectoria de vida, tanto académica como personal. Los quiero de forma incalculable y espero que logren la felicidad que tanto se merecen.



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Ciencias Naturales por aceptarme en la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al MSPAS. Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio por su dirección en este proyecto de tesis, por la confianza, paciencia y todo el apoyo durante mi trayectoria académica, así como también por siempre impulsarme a mejorar y aprender cosas nuevas.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por permitirme el uso de las instalaciones del LINVAS-Investigación en Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro.

A la Dra. Lineth Juliana Vega Rojas por su maravillosa enseñanza en toda la parte experimental en el laboratorio.

A mi comité de tesis por asesorarme, evaluarme y apoyarme en mi proyecto de investigación y grado académico.

Al Área Cunicula ARCUN de la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarme los animales experimentales para el desarrollo del proyecto, así como el uso de sus instalaciones.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>5</b>
<b>DEDICATORIAS .....</b>	<b>7</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
Generalidades de las garrapatas .....	17
Importancia de las garrapatas.....	17
Anatomía de las garrapatas duras .....	18
Género <i>Amblyomma</i> .....	19
Clasificación taxonómica de <i>Amblyomma</i> .....	21
Distribución geográfica.....	22
Importancia e impacto económico .....	23
<i>Amblyomma mixtum</i> .....	25
Distribución geográfica de <i>Amblyomma mixtum</i> .....	26
Signología general .....	28
Ciclo de vida de <i>Amblyomma mixtum</i> .....	29
Métodos para el control y erradicación de garrapatas .....	31
Vacunación contra garrapatas .....	34
Digestión en garrapatas.....	36
Antígenos expuestos y ocultos: claves en el desarrollo de vacunas .....	37
Vitelogenina.....	39
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>43</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
Objetivo general.....	44
Objetivos específicos .....	44
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
Péptidos experimentales.....	45
Animales de experimentación. Criterios de inclusión y exclusión. ....	46
Preparación de dosis vacunales.....	46
Inmunización de animales.....	47
Determinación de la inmunogenicidad .....	49
Técnica de ELISA indirecta para determinación de anticuerpos .....	49
Análisis estadístico.....	50

<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
Animales de experimentación. Criterios de inclusión y exclusión .....	51
Preparación de dosis vacunales.....	52
Inmunización de animales.....	54
Obtención de suero de animales inmunizados .....	56
Determinación de la inmunogenicidad .....	57
Estandarización de la concentración de péptido y anticuerpo primario .....	58
Técnica de ELISA indirecta para determinación de anticuerpos .....	59
Análisis estadístico.....	61
<b>VIII. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>67</b>
<b>X. APÉNDICES.....</b>	<b>78</b>
Estandarización de la concentración del péptido sintético, anticuerpo primario y tiempo de revelado en la técnica de ELISA indirecta. ....	78

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género <i>Amblyomma</i> (Krantz y Walter, 2009).....	21
Cuadro 2. Características de los péptidos sintéticos basados en la proteína Vitelogenina (Guerrero Solorio, investigación en curso aún no publicada).....	45
Cuadro 3. Codificación de Acción Facial en Conejos de Experimentación (Rabbit Grimace Scale Manual, 2012).....	46
Cuadro 4. Formulación de dosis vacunales de péptidos sintéticos.....	47
Cuadro 5. Péptidos resuspendidos y su concentración final.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de las garrapatas <i>Ixodidae</i> . Vista dorsal y ventral (Parra <i>et al.</i> , 1999).....	19
Figura 2. Garrapata de Cayena. (A) Hembra adulto y (B) macho adulto de <i>Amblyomma cajennense</i> (vista dorsal) (Beati <i>et al.</i> , 2013).....	20
Figura 3. Distribución de las 6 especies del Complejo <i>Amblyomma cajennense</i> en América (Nava <i>et al.</i> , 2014).....	23
Figura 4. Distribución geográfica de <i>Amblyomma mixtum</i> en América (Aguilar <i>et al.</i> , 2021).....	27
Figura 5. Ciclo biológico de <i>A. mixtum</i> (Almazán <i>et al.</i> , 2016).....	30
Figura 6. Interacción parásito-hospedante y el proceso de digestión de la garrapata (Sonenshine y Roe, 2014).....	37
Figura 7. Calendario de inmunizaciones y extracción sanguínea en conejos experimentales.....	49
Figura 8. Vacuna elaborada visualizada en microscopio óptico aumento 100X.....	53
Figura 9. Elaboración de dosis vacunales.....	54
Figura 10. Vacunación de conejo en región dorsal.....	55
Figura 11. Extracción sanguínea a partir de arteria auricular.....	57
Figura 12. Densidad óptica de placa ELISA y su lectura.....	58

Figura 13. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg1Amix1 en los conejos experimentales 13 y 14.....	61
Figura 14. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg1Amix2 en los conejos experimentales 7 y 8.....	62
Figura 15. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg1Amix4 en los conejos experimentales 15 y 16.....	62
Figura 16. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg1Amix5 en los conejos experimentales 5 y 6.....	62
Figura 17. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix1 en los conejos experimentales 1 y 2.....	63
Figura 18. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix2 en el conejo experimental 16.....	63
Figura 19. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix3 en los conejos experimentales 19 y 20.....	64
Figura 20. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix4 en los conejos experimentales 9 y 10.....	64
Figura 21. Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix5 en los conejos experimentales 21 y 22.....	64
Figura 22. Gráfica de la respuesta antigénica del grupo control en los conejos experimentales C1 y C2.....	65
Figura 23. Diagrama de placa de 96 pocillos con 200µl de buffer de carbonatos y 10 µg/ml de péptido sintético.....	78
Figura 24. Diagrama de placa de 96 pocillos con 200µl de buffer de carbonatos	

y 10 µg/ml de péptido sintético en la fila A y E. 100 µl de buffer de carbonatos  
en los pocillos de las filas B, C, D, F, G y H.....79

Figura 25. Diagrama de placa de 96 pocillos con solución preinmune y  
solución postinmune.....80

## I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos ectoparásitos transmisores de patógenos de importancia médica, capaces de parasitar animales domésticos, silvestres y humanos (Mathinson y Pritt, 2014). Se estima que las pérdidas por infestaciones de estos artrópodos y las enfermedades que transmiten van de 13.9 a 18.7 mil millones de dólares anuales (FAO, 2010; INEGI, 2007).

La especie *Amblyomma mixtum* es una garrapata con capacidad multi hospedante y de amplia distribución. Está directamente relacionada a problemas de salud animal y es considerada la segunda garrapata de mayor importancia en la ganadería bovina mexicana, solo después de *Rhipicephalus microplus*. Esto debido a su capacidad de generar daños en la piel a partir de sus prominentes piezas bucales, ingerir altos volúmenes de sangre y transmitir patógenos causantes de enfermedades de importancia médica (De Lemos *et al.*, 1997; Guglielmone y Nava, 2014; Rodríguez *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2013).

Por lo anterior, es importante identificar un método de control efectivo contra *Amblyomma mixtum*. La vacunación resulta una alternativa efectiva, ecológica y económicamente viable al uso de Ixodicidas, sin embargo, no existe alguna desarrollada contra este artrópodo que actualmente se comercialice (De la Fuente y Koncan, 2006). De la Fuente y Contreras (2015) sostienen que algunas vacunas contra garrapatas pueden basarse en la identificación de proteínas participantes en la regulación fisiológica, la transmisión de patógenos o la modulación de la respuesta inmune del hospedante.

Las vitelogeninas son proteínas sintetizadas en los intestinos, ovarios y cuerpo graso de la garrapata; se localizan en la hemolinfa del animal e intervienen en el proceso de la formación de huevos, la embriogénesis y es la principal fuente de nutrientes para el embrión (Xavier *et al.*, 2018). Durante el proceso de vitelogénesis esta proteína tiene la capacidad de captar el hierro proveniente de la sangre que ingiere la garrapata para llevarlo al ovocito y ser el aporte de hierro para los embriones, la interrupción de este proceso puede producir una acumulación de hierro en la garrapata hembra causando toxicidad y muerte, así como también disminuyendo el peso en la oviposición y la reducción en la viabilidad de la progenie (Coons *et al.*, 1989).

En este trabajo se propone que las garrapatas alimentadas en un animal inmunizado con péptidos basados en la proteína vitelogenina, ingerirán anticuerpos que interrumpirán el proceso fisiológico de la vitelogenina e intervendrán con el desarrollo de la garrapata causando



su muerte prematura y la disminución de la viabilidad de los ovocitos de la siguiente generación (Wang y Nuttall, 1999).

Tellam *et al.* (2002) alimentó garrapatas hembras en ovejas inmunizadas con vitelina, un compuesto derivado de un procesamiento proteolítico de la vitelogenina (Chen y Hillen, 1983; Raikhel y Dhadialla, 1992), obteniendo una disminución en su peso y oviposición, por lo tanto, se propone que la vitelogenina puede ser una proteína mucho más accesible para la actividad de los anticuerpos y que puede generar un cambio severo en la garrapata adulta y su proge.

Los conejos son una especie animal favorable para la generación y obtención de anticuerpos contra péptidos candidatos vacunales, esto debido a que son capaces de producir una elevada cantidad de anticuerpos de excelente calidad, logrando optimizar experimentos posteriores; otra ventaja son las áreas reducidas que los requerimientos espaciales piden, además del menor riesgo para el personal que implica en el manejo de los animales. La utilización de conejos en un sistema *in vivo* (animales vivos) es una opción económica y de manejo factible para la generación de anticuerpos contra los péptidos de Vitelogenina, proteínas que se espera reconozcan los epítopos en la garrapata *Amblyomma mixtum* (Brossard y Rais, 1983).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmunológica humoral de nueve péptidos sintéticos basados en la proteína Vitelogenina con la generación de anticuerpos en el conejo como modelo animal.

## II. ANTECEDENTES

### Generalidades de las garrapatas

Las garrapatas son artrópodos hematófagos que se alimentan de la sangre de diversas especies de vertebrados, incluyendo mamíferos, anfibios, reptiles y aves (Bowman y Lynn, 2020). Se localizan geográficamente de forma variada, dependiendo de la especie implicada, la disponibilidad del hospedante que parasita, factores climáticos y las características del entorno (Wall y Shearer, 2001).

En el momento de su alimentación, estos artrópodos pueden generar daños de manera directa e indirecta. Pueden ocasionar traumatismos locales en la piel y/o tejido, afectado al momento de penetrar e introducir sus piezas bucales para alimentarse. También pueden ocasionar reacciones de hipersensibilidad al momento de la picadura e incluso reacciones sistémicas de tipo anafiláctico, es posible que el hospedante presente signos como irritación, inflamación en la piel, prurito, dermatitis, estrés y anemia. En casos severos en los que la parasitemia es masiva, puede generar la muerte del individuo (Oteo, 2016; Rodríguez *et al.*, 2019). De modo indirecto, pueden ser un riesgo potencial para la salud humana y animal, gracias a la capacidad que presentan de transmitir agentes patógenos como bacterias, parásitos o virus (Sonenshine, 1991).

Existen tres familias de garrapatas: *Ixodidae* (comprenden más de 900 especies a nivel mundial, conocidas como ixódidos o garrapatas duras), *Argasidae* (descritas más de 190 especies a nivel mundial, nombradas como garrapatas blandas o argásidos) y *Nuttalliellidae* (una sola especie reportada) (Romero *et al.*, 2022; Oteo, 2016). Sin embargo, únicamente las familias *Ixodidae* y *Argasidae* representan importancia en la salud humana y veterinaria (Krantz y Walter, 2009). En la República Mexicana se han reportado más de 100 especies pertenecientes a las familias *Ixodidae* y *Argasidae* (Rodríguez *et al.*, 2019).

Los géneros de garrapatas que pertenecen a la familia *Ixodidae* generalmente son las responsables de transmitir las enfermedades infecciosas, son los vectores de mayor importancia en enfermedades de países desarrollados y los segundos a nivel mundial, tan solo después de los mosquitos (Oteo, 2016).

### Importancia de las garrapatas

Debido a las pérdidas económicas que ocasionan en la producción pecuaria, así como su actividad como potenciales vectores biológicos de múltiples enfermedades que afectan a la

salud humana y animal, las garrapatas representan una importancia significativa en todo el mundo (Guglielmone *et al.*, 2010). En México se reporta constantemente la transmisión de agentes patógenos en consecuencia de la picadura de una garrapata, tales como la anaplasmosis, rickettsiosis, babesiosis o ehrlichiosis (Vargas *et al.*, 2018). Estas enfermedades pueden generar graves consecuencias para la salud humana y veterinaria, incluyendo manifestaciones clínicas, pérdidas económicas, reducción de la producción o la muerte en casos severos si no se diagnostican a tiempo (Solís *et al.*, 2007). La creciente alteración a los hábitats y el cambio climático son factores que influyen en la abundancia y distribución de las garrapatas, así como de las enfermedades que transmiten (Ogden *et al.*, 2006).

### **Anatomía de las garrapatas duras**

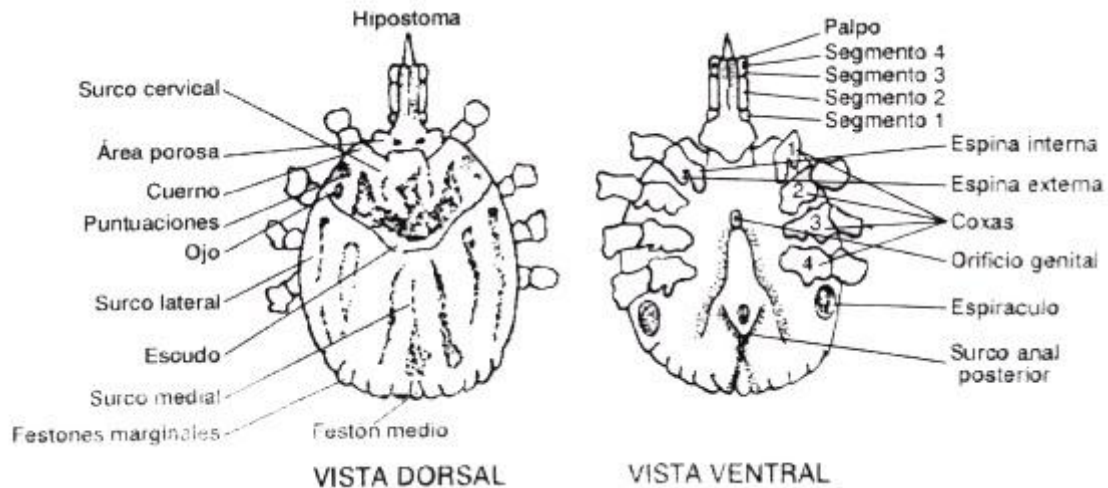
Las garrapatas duras exhiben una anatomía especializada que facilita su modo de vida como parásito hematófago, es el resultado de múltiples adaptaciones evolutivas que les permite ser parásitos de una gran variedad de seres vivos. Su cuerpo está constituido fundamentalmente por dos regiones: el gnatosoma y el idiosoma (Wall y Shearer, 2001; Krantz y Walter, 2009).

El gnatosoma es la parte anterior de la garrapata, comprende todas las piezas bucales. En esta región se localiza el hipostoma (es la estructura central que le permite la adhesión al hospedante), los quelíceros (apéndices situados en ambos lados del hipostoma que laceran la piel del hospedante) y los palpos (apéndices sensoriales que pueden percibir cambios ambientales) (Bowman y Lynn, 2020; Sonenshine, 1991; Wall y Shearer, 2001).

De manera caudal se localiza el idiosoma que representa la parte posterior de la garrapata y es la que comprende los órganos internos, es la de mayor tamaño. En su superficie dorsal, las garrapatas de la familia *Ixodidae* cuentan con una placa quitinosa dura que le brinda protección conocida como “escudo”, cubre en su totalidad el idiosoma en los machos, mientras que en las hembras y en las fases juveniles solamente cubre una pequeña porción (Bowman y Lynn, 2020; Krantz y Walter, 2009). La elasticidad del idiosoma a través de su cutícula permite su distensión para el almacén de sangre obtenida durante la alimentación (Sonenshine, 1991). En la región ventral del idiosoma de encuentran la abertura anal, la abertura genital y los espiráculos respiratorios (Bowman y Lynn, 2020).

Las garrapatas en su fase de ninfas y de adultas tienen cuatro pares de patas, mientras que las larvas tienen tres pares de patas. Cada una está segmentada y finaliza en tarsos con ganchos o ventosas, las cuales facilitan el desplazamiento y la adhesión al hospedante (Krantz y Walter, 2009). En múltiples especies se puede presentar un órgano quimiorreceptor y

mecanorreceptor altamente especializado conocido como órgano de Haller, este es un elemento sensorial localizado en el tarso que facilita la detección del hospedante (Wall y Shearer, 2001; Sonenshine, 1991).



**Figura 1.** Morfología general de las garrapatas *Ixodidae*. Vista dorsal y ventral (Parra *et al.*, 1999).

Dentro del idiosoma las garrapatas alojan múltiples sistemas; el sistema nervioso central concentrado en una masa ganglionar cefálica, el sistema digestivo altamente especializado debido a la ingesta y procesamiento de altos volúmenes de sangre, el sistema circulatorio abierto, un sistema excretor compuesto por túbulos de Malpighi y un sistema reproductor que será diferente entre machos y hembras, siendo las hembras capaces de ejecutar una masiva oviposición posterior a la alimentación (Bowman y Lynn, 2020; Wall y Shearer, 2001).

### **Género *Amblyomma***

Las garrapatas del género *Amblyomma* se distribuyen principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo las de la República Mexicana (Guglielmone *et al.*, 2010). A causa del cambio climático y el desplazamiento de muchas especies animales, las garrapatas pertenecientes a este género han sufrido expansiones en el rango geográfico que habitan, representando una preocupación creciente debido a que es favorecida la distribución de enfermedades ausentes en una región determinada (Ogden *et al.*, 2006). Este género, con sus excepciones en algunas especies, tiene un escudo dorsal ornamentado con distintivos entre cada especie (Krantz y Walker, 2009), desde puntuaciones, estrías o patrones de coloración específicos. Es un elemento útil para la identificación de las especies y su clasificación

taxonómica (Guglielmone *et al.*, 2010). Los palpos de la garrapata *Amblyomma* presentan un segundo segmento alargado y expandido lateralmente característico para la identificación del género (Estrada *et al.*, 2014). También cuentan con ojos ubicados dorsolateralmente a la base del gnatosoma, una particularidad ausente en otros géneros de la familia *Ixodidae* (Bowman y Lynn, 2020). En la región más posterior del idiosoma, múltiples especies de *Amblyomma* cuentan con hendiduras o segmentaciones conocidas como *festones*, cuya forma y número pueden variar (Wall y Shearer, 2001).

Existe una gran cantidad de hospedantes que puede parasitar, incluyendo humanos, ganado, reptiles o aves en sus diferentes estadios de vida (larva, ninfa y adulto) (Estrada *et al.*, 2014). La falta de especificidad al parasitar un hospedante favorece su diseminación e incrementa su potencial como vector de múltiples agentes patógenos; tiene gran significancia en la salud pública y veterinaria, y en esto radica la principal importancia del género (Parola *et al.*, 2013). Se estima que el género *Amblyomma* comprende un total de 132 especies a nivel mundial, cifra a la que se han añadido tres especies descritas en años recientes: *A. interandinum*, *A. patinoi* y *A. tonelliae* (Guglielmone y Nava, 2014).

En México, especies como *Amblyomma cajennense sensu lato*, *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma parvum* y *Amblyomma imitator* son de importancia en la salud pública debido a su elevada tasa de infestación a animales de producción, su amplia distribución y la alta capacidad de transmitir patógenos (Vargas *et al.*, 2018). En casos en los que las parasitosis son masivas, pueden causar estrés, anemia, infecciones secundarias y pérdidas económicas significativas (Solís *et al.*, 2007).



**Figura 2. Garrapata de Cayena. (A) Hembra adulta y (B) macho adulto de *Amblyomma cajennense* (vista dorsal) (Beati *et al.*, 2013).**

## Clasificación taxonómica de *Amblyomma*

La clasificación taxonómica del género *Amblyomma* se enmarca dentro de la jerarquía biológica determinada para todos los seres vivos. Las garrapatas de este género se clasifican de acuerdo al Cuadro 1 (Krantz y Walter, 2009).

**Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género *Amblyomma* (Krantz y Walter, 2009).**

<b>Dominio</b>	Eukaryota	Eucariontes
<b>Reino</b>	Animalia	Animales
<b>Filo</b>	Arthropoda	Artrópodos
<b>Subfilo</b>	Chelicerata	Quelicerados
<b>Clase</b>	Arachnida	Arácnidos
<b>Subclase</b>	Acari	Ácaros
<b>Orden</b>	Parasitiformes	
<b>Suborden</b>	Ixodida	Garrapatas
<b>Familia</b>	<i>Ixodidae</i>	Garrapatas duras
<b>Género</b>	<i>Amblyomma</i>	

El grupo de garrapatas pertenecientes al género *Amblyomma* son de los más diversos de la familia *Ixodidae*, abarcan un elevado número de especies que se localizan de manera global especialmente en regiones tropicales y subtropicales (Guglielmone *et al.*, 2010). Se identifican y clasifican de acuerdo a la morfología de sus larvas, ninfas y adultos, así como su anatomía distinguible a otros géneros de la familia *Ixodidae* (Estrada *et al.*, 2014; Sonenshine, 1991). Gracias a técnicas moleculares que analizan las secuencias de DNA de genes nucleares y mitocondriales, se ha logrado establecer la relación filogenética entre las especies (Mangold *et al.*, 1998) y a clarificar relaciones evolutivas entre los grupos de especies pertenecientes al género (Sonenshine, 1991).

## Distribución geográfica

Las garrapatas del género *Amblyomma* tienen una distribución global con una notable heterogeneidad, la cual se ve influenciada según la densidad, distribución y disponibilidad de sus hospedantes, así como de factores ambientales que auxilian su establecimiento (Zannou *et al.*, 2021). Existen áreas que cuentan con las condiciones adecuadas para su colonización, sin embargo, no en todas se han establecido. Zannou y colaboradores (2021) identificaron una gran concentración de especies de *Amblyomma* en África y América, contrastando una menor concentración en Europa. *A. variegatum* emerge en Sudáfrica como una de las especies más estudiadas a causa de su papel en la transmisión de patógenos como *Ehrlichia ruminantium* (Zannou *et al.*, 2021). En América existe una gran cantidad de especies de *Amblyomma*, las cuales se han adaptado a múltiples condiciones ecológicas del continente (Almazán *et al.*, 2016). *Amblyomma americanum* es considerada de gran relevancia para la salud pública y veterinaria en Estados Unidos (Ma *et al.*, 2021). *A. maculatum*, la cual se distribuye desde el centro de Estados Unidos hasta México y en diversas regiones de América del Sur también implica gran importancia médica (Wall y Shearer, 2001). Se ha identificado la presencia del complejo *A. cajennense sensu latu* en distintas localizaciones del continente americano, desde el sur de Texas en Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Nava *et al.*, 2014). Dentro de este complejo, *A. cajennense sensu stricto* se restringe a la Rondonia, la Amazonía brasileña y la Guayana Francesa. *A. sculptum* se distribuye en el norte de Bolivia, Paraguay, Argentina y la costa centro oeste de Brasil, mientras que *A. tonelliae* se ubica en la región del Chaco, extendida desde el centro norte de Argentina hasta Paraguay y Bolivia. *A. patinoi* se ha descrito en la cordillera este de Colombia, *A. interandinum* en Perú y *A. mixtum*, localizada desde el sur de Texas hasta Ecuador (Almazán *et al.*, 2016; Estrada *et al.*, 2014). Gracias a recientes investigaciones con análisis morfológicos y moleculares se ha confirmado la presencia de *A. mixtum* en Colombia (Rivera *et al.*, 2016).



**Figura 3. Distribución de las 6 especies del Complejo *Amblyomma cajennense* en América (Nava *et al.*, 2014).**

### **Importancia e impacto económico**

A nivel mundial, las garrapatas pertenecientes al género *Amblyomma* implican notables efectos económicos, principalmente en la producción pecuaria y, en menor medida a la salud humana y de otras especies (Guglielmone *et al.*, 2010). Ocasionan efectos negativos en sus hospedantes a través de su alimentación masiva de sangre al producir anemia, estrés fisiológico y en animales de producción una disminución en la producción de carne y leche (Jonsson *et al.*, 2000; Solís *et al.*, 2007). También pueden generar lesiones cutáneas a través de sus prominentes piezas bucales y provocar infecciones secundarias. Los gastos que están asociados al control de estas poblaciones, incluyendo la mano de obra y los acaricidas utilizados forzan una significativa presión financiera sobre los productores (Wall y Shearer, 2001).

Impactos de la garrapata *Amblyomma*:



Merma en la producción pecuaria: Las infestaciones por *Amblyomma* se pueden convertir en una reducción en la producción láctea (hasta el 42% de pérdidas estimadas), menor ganancia diaria de peso en el ganado y una amplia susceptibilidad de adquirir otras patologías, ocasionando notables pérdidas económicas a los ganaderos (MAG, s.f.).

Costos en el control de infestaciones: Los costos operativos en las producciones de bovinos se ven incrementados exponencialmente debido a la necesidad de mano de obra y la implementación de tratamientos acaricidas, así como la creciente problemática de resistencia a dichos acaricidas que imponen la búsqueda de alternativas más costosas y en múltiples ocasiones, menos eficaces (MAG, s.f.; Rodríguez *et al.*, 2018).

Deterioro en la calidad del cuero: Las prominentes piezas bucales de las garrapatas *Amblyomma* pueden generar heridas profundas a través de su picadura que comprometen la calidad del cuero y disminuyen su valor comercial (UNACH, 2019).

Transmisión de enfermedades: Las enfermedades transmitidas al ganado han sido causa de notables pérdidas en la producción pecuaria e incluso han resultado en la muerte de los animales si no son tratados adecuadamente (CYTED, s.f.).

Impacto de algunas especies del género *Amblyomma*:

*Amblyomma cajennense* (complejo de seis especies): Ocasiona daños directos y cumple su papel como un vector transmisor de enfermedades en la producción bovina y equina. Su distribución abarca América Latina, incluyendo México (Estrada *et al.*, 2014; UNACH, 2019).

*Amblyomma americanum*: Afecta la producción ganadera, así como también reviste importancia en la salud humana debido a su capacidad de transmitir múltiples agentes patógenos, tales como *Ehrlichia chaffeensis*. También se ha reportado su posible asociación con el síndrome alfa-gal. Su distribución se da principalmente en Estados Unidos (Childs y Paddock, 2003).

*Amblyomma hebraeum* y *Amblyomma variegatum*: Se ha reportado su presencia en África, así como su capacidad de transmisión de algunas enfermedades como la fiebre botonosa africana. Son responsables de grandes pérdidas económicas en la ganadería (Wall y Shearer, 2001).

*Amblyomma mixtum*: A pesar de que la garrapata *Rhipicephalus microplus* es históricamente la de mayor importancia económica en la ganadería bovina mexicana, este género ha conseguido gran relevancia en las regiones tropicales y subtropicales de la república,

manifestando un desafío cada vez más alto para su control y prevención (Solís *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2018).

### ***Amblyomma mixtum***

La garrapata *Amblyomma mixtum* es una garrapata dura que previamente fue clasificada como parte del complejo de *Amblyomma cajennense*, sin embargo, en la actualidad ya se conoce que representa una especie diferente. Tiene gran importancia en la salud pública y veterinaria, se distribuye en la región Neotropical, abarcando desde el sur de Estados Unidos hasta Ecuador (Estrada *et al.*, 2014; Aguilar *et al.*, 2021). En México, es catalogada como la segunda garrapata de mayor importancia para la producción bovina, tan solo después de *Rhipicephalus microplus* (Rodríguez *et al.*, 2014).

Esta especie tiene la capacidad de parasitar múltiples especies animales en sus distintas etapas de vida (larva, ninfa y adulto) (Guglielmone *et al.*, 2010). En la República Mexicana se ha identificado una mayor preferencia por el ganado bovino y los equinos, sin embargo, se ha descrito su presencia en otros hospedantes, tales como humanos, fauna silvestre, caninos, reptiles o aves (Rodríguez *et al.*, 2016; Aguilar *et al.*, 2019; Romero *et al.*, s.f.).

La primera vez que se describió e identificó esta especie fue por Koch (1844), él se basó en el material depositado en el Museo für Naturkunde de Berlín el cual incluía especímenes provenientes del territorio mexicano (Nava *et al.*, 2014a). Es importante mencionar que Neumann (1899) determinó que *A. mixtum* era un sinónimo de *A. cajennense*, así como también de la garrapata *A. tenellum* e *Ixodes herrerae*.

Durante muchos años la taxonomía de la especie *Amblyomma cajennense* fue un tema de discusión, pues los estudios morfológicos concluían opiniones distintas. Múltiples investigadores mencionaban la presencia de variantes fenotípicas que identificaban varias especies dentro del complejo *A. cajennense*, mientras que, otros autores conferían que las variaciones morfológicas correspondían a un polimorfismo intraespecífico (Beati *et al.*, 2013). En 1953, Argão y Fonseca clasificaron a todas las especies relacionadas como sinónimos de *Amblyomma cajennense*. En 1958, Kohls analizó los mismos especímenes de Koch y concluyó lo mismo que Argão y Fonseca (1953), atribuyendo a la especie *Amblyomma mixtum* como un sinónimo de *Amblyomma cajennense*.

Investigaciones más recientes han evaluado el cruzamiento de especies de garrapatas identificadas como *Amblyomma cajennense* provenientes de Argentina y de Brasil, los resultados de las fecundaciones resultaron extremadamente bajos. Esto sugirió que *A.*

*cajennense* podría tratarse de un complejo de unidades taxonómicas distintas, en la que su diferenciación estaba ligada a la localización geográfica de los especímenes (Mastropaolo *et al.*, 2011; Beati *et al.*, 2013). En 2013, Beati y colaboradores concluyeron a partir de un análisis de DNA nuclear y mitocondrial que *Amblyomma cajennense* es un complejo de seis especies distintas que han logrado evolucionar de manera independiente durante trece millones de años aproximadamente (13.2 m.d.a.), desde la época del Mioceno. A partir de esto, se sabe que seis especies componen al complejo denominado *A. cajennense sensu lato*, mientras que, *Amblyomma mixtum* y *Amblyomma sculptum* se restablecieron como especies independientes (Nava *et al.*, 2014b; Almazán *et al.*, 2016).

### **Distribución geográfica de *Amblyomma mixtum***

La garrapata *Amblyomma mixtum* tiene un rango de distribución bastante amplio, abarcando desde el sur de Texas, en Estados Unidos, hasta el este de Ecuador (Aguilar *et al.*, 2021). En México, es común encontrarla parasitando tanto a bovinos como a equinos, y no es raro que las personas dedicadas a la ganadería tengan contacto con ella (Almazán *et al.*, 2016). Illoldi y colaboradores (2012) profundizaron en su distribución y sus preferencias climáticas en México; encontraron a *A. mixtum* en casi todos los estados, con excepción de Aguascalientes, Ciudad de México, Morelos y Tlaxcala. Presenta mayor distribución en Veracruz y Tamaulipas, esto debido a su preferencia a las zonas cálidas. Además tiene mayor predilección a altitudes entre los 0 y 2800 metros sobre el nivel del mar, aunque su punto ideal está entre los 200 y 1000 metros. Esta garrapata suele encontrarse en lugares con temperaturas altas y constantes, con un rango que oscila de los 13° a los 26°C y una media ideal de 16°C (Aguilar *et al.*, 2021b). En 2021, Aguilar y colaboradores diseñaron un mapa de la posible distribución de *A. mixtum* en México, basándose en registros y características como la temperatura anual promedio, el rango diurno y la temperatura estacional. El resultado fue que esta garrapata podría encontrarse prácticamente en todo el país, con excepción de Baja California, Baja California Sur, Sonora y algunas regiones del sureste. Tiene mayor preferencia a los estados de la costa del Golfo de México y un poco menos hacia los del Pacífico. La distribución geográfica de *Amblyomma mixtum* es especialmente notoria en las regiones tropicales y subtropicales del país, aunque también aparece con menor frecuencia en otras zonas (Guglielmone *et al.*, 2010; Romero *et al.*, s.f.). Algunos estudios de modelado ecológico sugieren que, con el cambio climático su distribución podría ampliarse, lo que nos obliga a entender mejor cómo se comporta esta especie de garrapata (Aguilar *et al.*, 2021).

Fuera de México, *A. mixtum* está bien establecida en Centroamérica, en países como Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. También se relaciona con infestaciones en el ganado y la fauna silvestre. En América del Sur se ha reportado su presencia en Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Guayana Francesa, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y el norte de Argentina (Guglielmone *et al.*, 2010; Nava *et al.*, 2014). Dentro de cada país, su presencia puede variar según el clima, la disponibilidad de animales que parasita y las características del hábitat. En Argentina y Uruguay se ha confirmado su presencia y se han analizado sus hospedantes y el ADN para distinguirla de otras especies (Nava *et al.*, 2014).

La distribución de *A. mixtum* está directamente influenciada por distintos factores ecológicos. La temperatura, la humedad y la vegetación son la clave para su supervivencia (Estrada *et al.*, 2014). La presencia de ganado bovino y equinos, que son sus hospedantes principales en muchas áreas, también juega un papel fundamental en el número y localización de las garrapatas, además del desplazamiento de especies de animales domésticos y silvestres para que esta garrapata se disperse a nuevas zonas (Aguilar *et al.*, 2019).



**Figura 4. Distribución geográfica de *Amblyomma mixtum* en América. Las marcas verdes son las regiones donde se ha registrado (Aguilar *et al.*, 2021).**

### **Signología general**

Debido al gran tamaño de la garrapata *Amblyomma mixtum*, esta tiene la capacidad de generar notables efectos en sus hospedantes. Las hembras adultas pueden ingerir en un período de 3 a 4 semanas hasta 3 ml de sangre. Cuando se presentan casos de altas parasitosis la pérdida de sangre se ve altamente incrementada, así como también las lesiones que ocasionan en la piel

(Quijada *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2017). Al momento de la ingesta de sangre, esta garrapata puede ocasionar daños físicos a partir de sus prominentes piezas bucales, estructuras altamente desarrolladas que perforan la piel, pudiendo desencadenar hemorragias o necrosis dérmica focal, así como también respuestas inflamatorias que involucran eosinofilia. También pueden manifestarse signos en el hospedante como fiebre, debilidad o en casos muy severos la muerte del individuo. Es común la presencia de infecciones secundarias por múltiples bacterias (como *Staphylococcus* spp.) resultando en abscesos cutáneos localizados, piemia o predisponer a infestaciones por miasis (Almazán *et al.*, 2016; Taylor *et al.*, 2017). El conjunto de toda esta signología puede implicar de manera negativa la capacidad productiva del ganado, disminuyendo la producción cárnica, la producción láctea o el peso corporal de los individuos. Se han reportado dermatitis generadas por mordeduras, reducción en la calidad de vida de un hato o anemia en infestaciones masivas (Jongenjan y Uilenberg, 2004; Polanco y Ríos, 2016; Lagunes y Bautista, 2020).

La presencia de garrapatas en el país es un riesgo para la producción nacional bovina de carne, estimada en 2.027 millones de toneladas con un valor aproximado de 139,612 millones de pesos (MXN), así como para la producción de leche, con 12,275 millones de litros y un valor cercano a los 79,597 millones de pesos (MXN), además de afectar 4.5 millones de empleos directos e indirectos generados por este sector. Es importante mencionar que estos parásitos ponen en peligro el inventario nacional de 35,224,960 cabezas de ganado bovino, con un valor estimado de 563,880.55 millones de pesos (MXN) (SENASICA, 2021). La distribución de esta garrapata representa un problema de salud pública para los trabajadores involucrados en actividades ganaderas en México y otros países con problemas de infestaciones mixtas, quienes se exponen a este tipo de parásitos (Aguilar *et al.*, 2021).

Además de los efectos directos que la garrapata *Amblyomma mixtum* ocasiona, también actúa como un potencial vector de diversos patógenos de importancia. En México el conocimiento sobre los patógenos que pueden estar involucrados con *A. mixtum* no es muy estudiado, sin embargo, se ha confirmado su efecto como vector de distintas enfermedades para animales y humanos (Vargas *et al.*, 2018; Romero *et al.*, s.f.). Se ha reportado su capacidad vectorial de *Rickettsia rickettsii*, el agente causal de la Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas (FMMR), así como otros patógenos de importancia como algunas especies de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia chaffeensis*, *Borrelia* spp., *Coxiella burnetii* y el virus de la Encefalomielitis Venezolana equina (Aguilar *et al.*, 2021b; Beck y Orzco, 2015). En Cuba se ha reportado la presencia de *Coxiella burnetii* en garrapatas hembra de *A. mixtum* localizadas en caballos (Noda *et al.*, 2016); también se han recolectado ejemplares con *Rickettsia*

*amblyommatis* en Panamá (Chitimia *et al.*, 2020). Se ha identificado la presencia de *Rickettsia typhi* en *A. mixtum*, lo que sugiere su posible participación en la transmisión del tifus murino (Becerra *et al.*, 2020). También se sospecha de la capacidad vectorial de algunos otros agentes patógenos como *Brucella* y *Trypanosoma cruzi* (UNACH, 2019), así como de piroplasmosis en el ganado (Romero *et al.*, s.f.; Noda *et al.*, 2016; UNACH, 2019).

Es importante no dejar de lado la capacidad de la garrapata para parasitar una gran cantidad de hospedantes, por lo que su potencial en la transmisión de agentes patógenos cada vez se ve más implicada en el desarrollo de estas mismas, así como de algunas enfermedades reemergentes (Rodríguez *et al.*, 2016).

### **Ciclo de vida de *Amblyomma mixtum***

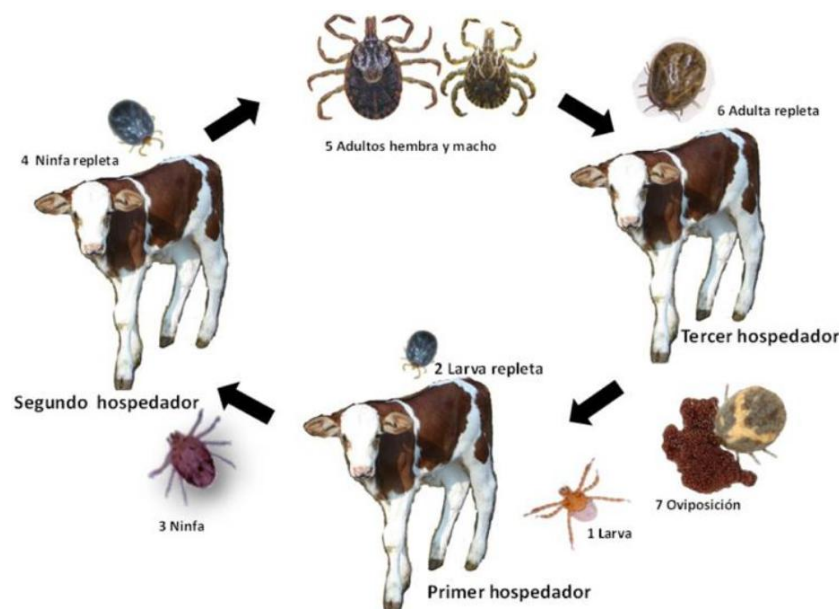
Existen cuatro fases continuas en el desarrollo del ciclo de vida de la garrapata *Amblyomma mixtum*: huevo, larva, ninfa y adulto. Para que el ciclo biológico pueda completarse son necesarios tres hospedantes en los que la duración en cada uno de ellos se verá influenciado por circunstancias ambientales como la disponibilidad de los animales que hospedará, la humedad y la temperatura ambiental (Almazán *et al.*, 2016; Barradas *et al.*, 2017).

Las hembras repletas, alimentadas por sangre de su tercer hospedante se desprenden del animal y depositan miles de huevos en el suelo, preferencialmente en sitios oscuros con un elevado porcentaje de humedad. Bajo condiciones adecuadas la incubación de los huevos puede desarrollarse en humedades relativas del 80% y temperaturas de 27°C, con una duración entre 8 y 12 días. Posterior a estos días, eclosionan larvas hexápodas (que poseen seis patas), las cuales se dirigen a la búsqueda de su primer hospedante, que puede ser en el caso de *A. mixtum*, desde bovinos, aves o pequeños mamíferos. Al identificar el primer hospedante se anclan en la piel del animal y se alimentan por un período de 3 a 5 días, cuando finalizan este periodo y logran la repleción, se desprenden, caen al suelo y mudan a su siguiente estadio de desarrollo entre 21 y 30 días post repleción. Una vez que eclosionan las ninfas octópodas (con ocho patas), comienzan su búsqueda al siguiente hospedante, que puede ser un bovino, aves o mamíferos. Se alimentarán de sangre en un periodo de 3 a 6 días hasta que se repletan, para posteriormente desprenderse del animal y caer al suelo para mudar a su siguiente fase de desarrollo (adulto) en un período de 20 a 28 días (Almazán *et al.*, 2016a).

Una vez que los adultos muden a esta fase, las hembras y los machos se dedicarán a identificar el tercer hospedante en su ciclo de vida, siendo el bovino y el equino los principales.

Las hembras precisan de una ingesta importante de sangre para permitir la maduración de los huevos, los machos se alimentan de forma discontinua. Este periodo puede durar entre 7 y 12 días, en el que la cópula ocurrirá sobre el hospedante. Cuando la hembra finaliza su repleción cae al suelo y comienza la oviposición, que ocurre en un periodo entre 25 a 29 días. La hembra muere al finalizar la oviposición de su progenie (Almazán *et al.*, 2016a).

En condiciones de laboratorio controladas, el ciclo de vida de *A. mixtum* puede durar entre 79 y 88 días utilizando bovinos y conejos como hospedantes respectivamente (Barradas *et al.*, 2017). Sin embargo, cuando las condiciones son naturales, el ciclo tiende a aumentar porque la disponibilidad de los hospedantes puede ser inestable o pueden intervenir los cambios medioambientales, valorándose entre 133 y 193 días en la región noreste de México (Almazán *et al.*, 2016b).



**Figura 5.** Ciclo biológico de *A. mixtum* (Almazán *et al.*, 2016).

## Métodos para el control y erradicación de garrapatas

El control y la erradicación de las garrapatas implica un reto considerable debido a múltiples factores como su ciclo de vida, la gran variedad de animales que parasitan y su capacidad para sobrevivir en distintos ambientes, que hacen que eliminarlas por completo en grandes extensiones sea casi imposible. Por esta razón, la finalidad es mantener el control de las poblaciones por debajo de niveles que sean capaces de generar pérdidas económicas importantes o comprometan la salud de sus hospedantes (Wall y Shearer, 2001; Bowman y Lynn, 2020). Ante la creciente resistencia a los ixodicidas, se ha buscado el desarrollo de

alternativas que permitan esta estrategia poblacional. Se han ideado alternativas como la selección y la cría de animales con resistencia genética natural, prácticas de manejo del entorno como rotación o descanso de praderas, quemas controladas o manipulación de la vegetación. También se han propuesto alternativas de control biológico utilizando feromonas o depredadores naturales y/o el desarrollo de vacunas contra garrapatas (Prevot *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2014; Lagunes y Bautista, 2020).

Métodos farmacológicos: Es el método más utilizado actualmente y de acción rápida a partir de la aplicación de ixodicidas (elementos químicos diseñados para interrumpir el ciclo biológico de las garrapatas). Pueden administrarse a través de inyecciones, derrames en el dorso, collares impregnados o baños de aspersión (Lagunes y Bautista, 2020). A pesar de que estos reactivos actúan rápidamente contra las garrapatas, su eficacia se ha visto limitada en poblaciones resistentes, además de la generación de residuos en el medio ambiente, siendo un potencial contaminante de subproductos destinados al consumo humano (Lagunes y Bautista, 2020). En la República Mexicana, los ixodicidas de elección incluyen piretroides sintéticos, organofosforados, amidinas (como el amitraz), fenilpirazolonas (como el fipronil), inhibidores del desarrollo y lactonas macrocíclicas (como ivermectina y doramectina) para controlar las infestaciones por estos parásitos (Rodríguez *et al.*, 2014b). La elección del acaricida utilizado depende del tipo de animal, la intensidad de la infestación, la especie de garrapata, el costo y la disponibilidad en las instalaciones donde se encuentre el animal. Es indispensable seguir las recomendaciones establecidas por el fabricante para garantizar la eficacia del tratamiento, así como reducir los riesgos de toxicidad para el medio ambiente y los animales (Rodríguez *et al.*, 2018; Jonsson *et al.*, 2000).

Eficacia de acaricidas contra *Amblyomma mixtum*: La mayoría de los programas de control contra garrapatas se enfocan principalmente en la garrapata *Rhipicephalus microplus*, por lo que la eficacia científica de estos elementos para el control de *Amblyomma mixtum* no es muy conocida. En Veracruz se estudió la efectividad de diversos acaricidas en diferentes fases de *A. mixtum*, mostrando que en algunos piretroides tienen capacidades prometedoras del 40% en adultos y 2.2% en larvas. En el caso de la resistencia a amidinas se determinó con una efectividad del 0% contra adultos (Higa *et al.*, 2020).

Ante la creciente problemática de resistencia en múltiples especies de garrapatas, la utilización de alternativas como los productos naturales emerge como una alternativa para el control. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones acerca del potencial acaricida de las



plantas se centra principalmente en *R. microplus*. Por ello, es necesario generar investigaciones que evalúen la ecología de la garrapata *A. mixtum* y programas para el control que puedan preservar la salud humana y animal, minimizando el riesgo de desarrollo de resistencia a largo plazo a estas poblaciones de garrapatas para diseñar programas de control que preserven la salud animal y humana, mitigando el riesgo de desarrollo de resistencia a largo plazo en estas poblaciones (Rodríguez *et al.*, 2014b).

Métodos biológicos: La composición y el tipo de plantas en un área determinada influyen exponencialmente en la supervivencia y el control biológico de las garrapatas en sus distintas etapas de vida. Se sabe que algunas leguminosas pueden atrapar larvas de garrapatas a través de sus secreciones pegajosas (Rodríguez *et al.*, 2014a). Algunas gramíneas forrajeras como *Melinis minutiflora* y *Andropogon gayanus* limitan las infestaciones al liberar metabolitos secundarios viscosos y pegajosos que tienen un olor fuerte o son tóxicos. Esto genera un ambiente en el que la búsqueda de los hospedantes se ve limitada por parte de las garrapatas, disminuyendo el riesgo de que los animales se infesten (Fernandez *et al.*, 2004). También se ha estudiado la acción de diversos organismos para combatir a las garrapatas, tales como bacterias, nematodos y hongos entomopatógenos, o depredadores como insectos.

- Bacterias: Especies como *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans* o *Cedecea lapagei* han sido estudiadas para el control de las poblaciones de garrapatas (Rodríguez *et al.*, 2014).
- Hongos entomopatógenos: Especies como *Beauveria* spp. o *Metarhizium* spp. han demostrado efectos prometedores (Rodríguez *et al.*, 2014; Samish y Rehacek, 1999). Las esporas en estas especies tienen la capacidad de adherirse a la cutícula de la garrapata, proliferar, penetrar su cuerpo y eventualmente causarle la muerte (Fernandes *et al.*, 2012).
- Nematodos entomopatógenos: Géneros como *Heterorhabditidae* y *Steinernematidae* pueden parasitar y eliminar garrapatas en el ambiente (Rodríguez *et al.*, 2014; Samish y Rehacek, 1999).
- Insectos y otros depredadores: Algunas especies de hormigas como *Camponotus rengira*, *Solenopsis germinata*, *S. saevissima* y *Ectatomma quadridens*, han demostrado su capacidad de mantener el control de poblaciones (Rodríguez *et al.*, 2014). Fomentar la presencia de mamíferos o aves que se alimentan de garrapatas en el entorno también

puede contribuir a un control a largo plazo, aunque su impacto podría ser menor (Krantz y Walter, 2009).

Manejo del ambiente: Es una estrategia que puede reducir la abundancia y supervivencia de las garrapatas, incluye diferentes prácticas como: eliminar matorrales y maleza para disminuir los sitios donde las garrapatas esperan a sus hospedantes (Wall y Shearer, 2001), conservar los pastos cortos reduciendo las condiciones favorables en las garrapatas y facilitando la aplicación de tratamientos acaricidas (Jonsson *et al.*, 2000), controlar la poblaciones de hospedantes silvestres que contribuyan al ciclo de vida de las garrapatas (Bowman y Lynn, 2020) o utilizar barreras físicas que impidan la migración de las garrapatas de un sitio a otro (Stafford, 2007).

Métodos inmunológicos: La vacunación contra garrapatas es un área de investigación altamente estudiada, la cual se ha basado principalmente en la identificación de antígenos presentes en la saliva del parásito o en sus proteínas intestinales. La eficacia de estas vacunas están centradas en reducir la alimentación y reproducción de la garrapata, así como de evitar la transmisión de agentes patógenos (de la Fuente *et al.*, 2016). Sin embargo, desarrollar vacunas efectivas y con la capacidad de intervenir en múltiples especies de garrapatas es un desafío actual que continúa en constante cambio (Rodríguez *et al.*, 2014).

Control integrado de garrapatas: Es la estrategia más efectiva. Implica la utilización de dos o más métodos de control de forma sistemática, de tal manera que, se combinen los efectos de cada elemento para mantener en un nivel controlado de estos individuos (Rodríguez *et al.*, 2014). Monitorear de forma constante las poblaciones de garrapatas en sus hospedantes y el entorno es necesario para evaluar la eficacia de las intervenciones (Wall y Shearer, 2001).

Debido a múltiples factores como la constante presencia de los parásitos en el ambiente, la capacidad de la garrapata hembra de ovipositar miles de huevos y la presencia de hospedantes silvestres, es extremadamente difícil lograr la erradicación total de las garrapatas. Los programas de erradicación de garrapatas que han resultado prósperos están restringidos a regiones geográficas limitadas que involucran el tratamiento de los hospedantes susceptibles y la gestión del ecosistema, son un esfuerzo continuo y de constante organización (Simonsen *et al.*, 2017).

## Vacunación contra garrapatas

La vacunación es una estrategia prometedora para el control de infestaciones por garrapatas y las enfermedades que transmiten (Lagunes y Bautista, 2020).

Historia y evolución de las vacunas contra garrapatas: La estrategia del desarrollo de vacunas contra garrapatas surgió en los años 80's a partir de proteínas de extractos crudos como antígenos (Lagunes y Bautista, 2020). Wikel (1981) logró resultados prometedores con proteínas provenientes de las glándulas salivales de la garrapata *Dermacentor andersoni* en cobayos. En 1984, Brown y colaboradores identificaron en la garrapata *Amblyomma americanum* una proteína de la saliva asociada con el cemento de adhesión de esta misma. A finales del siglo pasado, Mulenga y colaboradores (1999) caracterizaron la proteína p29 en *Haemaphysalis longicornis*, la cual demostró reducciones en la repleción de larvas y ninfas, aumentando su mortalidad.

Las primeras vacunas comerciales se basaron en el antígeno Bm86, TickGard® en Australia (1993) y Gavac® en América Latina (1997) contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* Actualmente continúa la investigación de esta proteína y ortólogos en otras especies como *Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum*, entre otras, señalando algunos efectos de reactividad cruzada y potencial protector (Patel *et al.*, 1994). Estudios más recientes (Rodríguez *et al.*, 2020) han evaluado el péptido pP0 como un candidato vacunal contra la garrapata *Amblyomma mixtum* en el conejo como modelo animal, resultando en un 54% de eficacia contra las fases juveniles (larvas).

Mecanismo de acción y tipos de antígenos: El efecto esperado en este tipo de vacunas contra garrapatas es generar una respuesta inmunológica en el hospedante que sea capaz de interferir con la biología del artrópodo al momento de su alimentación, reduciendo así su reproducción, capacidad de transmitir agentes patógenos y la supervivencia de estas o de su progenie (Bowman y Lynn, 2020). Este tipo de vacunas pueden basarse en la administración de antígenos específicos de las garrapatas (como proteínas del intestino, proteínas salivales, proteínas de la hemolinfa, proteínas del tegumento o proteínas ováricas) que sean esenciales para su alimentación y supervivencia. De esta manera, la respuesta inmunológica desarrollada por parte del hospedante podría irrumpir los procesos biológicos de la garrapata, como la disminución del peso y tamaño tras alimentarse (de la Fuente *et al.*, 2007), la reducción de la

oviposición y la fertilidad en hembras vacunadas (García *et al.*, 1999), la reducción de la fijación y la eficiencia de la alimentación (Jonsson *et al.*, 2000) o la interferencia con la adquisición o transmisión de patógenos (de la Fuente *et al.*, 2016).

Antígenos más estudiados:

- Antígenos salivales: Son proteínas esenciales para la ingesta y transmisión de agentes patógenos de importancia, cuya finalidad es reducir la fijación de los parásitos, el período de alimentación y la transmisión de patógenos. Se han identificado proteínas de unión a la fibronectina, factores inmunomoduladores e inhibidores de la coagulación (Chmelar *et al.*, 2011).
- Antígenos del intestino medio: Proteínas como la Bm86 o la glicoproteína Bm91/95 en la garrapata *Rhipicephalus microplus* interviene en la endocitosis de todas las fases de desarrollo de la garrapata (Willadsen *et al.*, 1989).
- Antígenos de la hemolinfa: La subolesina es un potencial prometedor como un antígeno de amplio espectro contra múltiples especies de garrapatas como *Amblyomma americanum*, *Rhipicephalus microplus* o *Ixodes scapularis* y las enfermedades que transmiten (Almazán *et al.*, 2003; de la Fuente *et al.*, 2007).
- Antígenos ováricos: Proteínas como la vitelina, relacionada con la reproducción de las garrapatas, ha sido estudiada debido a que la garrapata, al ingerir anticuerpos propios del hospedante parasitado, puede ser afectada en la fecundidad y viabilidad de sus ovocitos (Tellam, 2002).
- Antígenos de la superficie de la garrapata: Proteínas situadas en la membrana celular o cutícula de la garrapata son estudiadas por su potencial para influir en la integridad estructural o las funciones específicas de la superficie de la garrapata (Jaramillo, 2022).
- Antígenos quiméricos y multiepitópicos: Hay estrategias que no se limitan a las vacunas desarrolladas con base en un solo antígeno, sino que combinan epítomos protectores de diversos antígenos en una sola molécula. La finalidad de esto es la creación de vacunas con mayor eficacia y de amplio espectro que sean capaces de generar una respuesta inmunológica contra diversas especies de garrapatas o múltiples etapas en su ciclo de vida (Jaramillo, 2022).

Desafíos y perspectivas futuras: La generación de vacunas eficaces contra garrapatas es una alternativa altamente estudiada en la que se han conseguido avances prometedores, sin embargo, continúa la presencia de desafíos significativos como la alta variabilidad genética

entre poblaciones de la misma especie, la diversidad de especies y de antígenos, los costos de las investigaciones, el desarrollo y su producción, y la logística de administración y cobertura en las extensas poblaciones de animales.

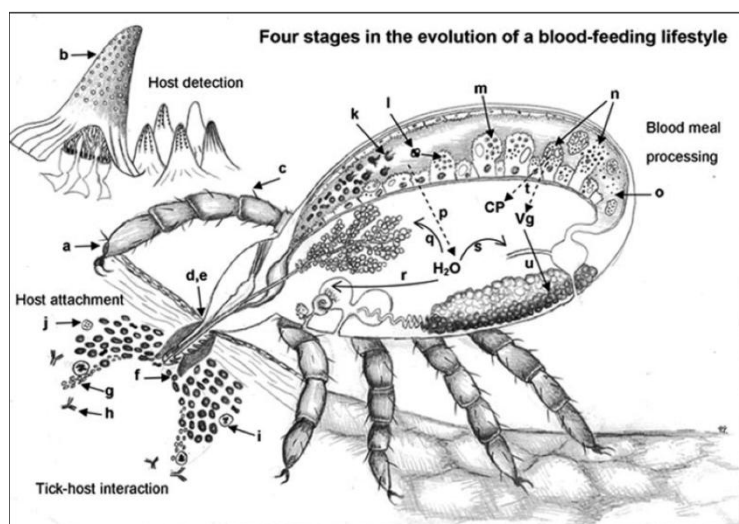
La vacunación es una estrategia prometedora a largo plazo, sobre todo en programas de manejo integrado en los que combinan múltiples tácticas de control y de prevención como el uso estratégico de acaricidas, la vacunación y el manejo del entorno (Jaramillo, 2022). Futuras investigaciones se basarán en la identificación de antígenos con potencial vacunal, el desarrollo de sistemas de administración más eficaces y el estudio de la efectividad de las vacunas en múltiples contextos epidemiológicos y ecológicos (Díaz *et al.*, 2015).

### **Digestión en garrapatas**

Debido a que la sangre de los animales es rica en proteínas pero medianamente escasa en otros nutrientes esenciales, las garrapatas evolucionaron con un sistema digestivo particular que optimiza la identificación de nutrientes y la eliminación de residuos eficazmente (Krantz y Walter, 2009), por esto, el proceso que ocurre durante la digestión de las garrapatas es altamente eficiente y especializado (Sonenshine, 1991).

Este proceso comienza mediante la ingesta de sangre por parte de la garrapata, la cual ocurre con la adhesión a través del hipostoma en la piel del hospedante. La sangre es ingerida, pasa por el esófago y es impulsada hasta desembocar en el intestino medio mediante una bomba faríngea muscular (Bowman y Lynn, 2020). El intestino medio es el sitio principal donde se da la digestión y absorción de nutrientes, la cual se da fundamentalmente a través de enzimas digestivas que secretan las células epiteliales que revisten el intestino. Estas enzimas pueden incluir proteasas, lipasas o carbohidrasas. En múltiples especies de garrapatas de la familia *Ixodidae*, esta región mantiene una organización compleja con múltiples divertículos o ciegos gástricos que incrementan las superficies disponibles para la digestión y el almacenamiento de los elevados volúmenes sanguíneos ingeridos (Balashov, 1972; Kemp *et al.*, 1982). Cuando se genera la digestión extracelular, los nutrientes que resultan de esta acción son absorbidos por las células epiteliales del intestino medio a través de diversos mecanismos de transporte. El exceso de agua, sales o los productos de desecho que se generan mediante la digestión son excretados por medio de los túbulos de Malpighi que desembocan en el intestino posterior (recto).

Las garrapatas carecen de un sistema de excreción de líquidos separado de las heces, pues el recto interviene en la reabsorción de agua y de sales esenciales (Sauer y Hair, 1986). La guanina y otros elementos nitrogenados de desecho son eliminados con los restos no digeridos de la sangre. Para el manejo de la gran cantidad de hierro adquirido en la digestión de la hemoglobina, este es almacenado en forma de ferritina en algunas células del intestino medio u otros tejidos para prevenir su toxicidad y ser utilizado para la oviposición y nutrición de la prole (Kaufman, 1976).



**Figura 6. Interacción parásito-hospedante y el proceso de digestión de la garrapata (Sonenshine y Roe, 2014).**

### **Antígenos expuestos y ocultos: claves en el desarrollo de vacunas**

Al momento en el que una garrapata introduce sus piezas bucales en el hospedante, comienza una compleja respuesta inmunológica que incluye células inmunitarias y anticuerpos para defenderse contra este artrópodo (Rodríguez, 2000; de la Fuente *et al.*, 2016). No obstante, las garrapatas han ido perfeccionando múltiples mecanismos para la modulación y evasión de dichas defensas, por lo que desarrollar una respuesta inmune natural completa es altamente complejo. Cuando se busca realizar una vacuna contra una especie de garrapata, la mayoría de estas se basan en dos tipos de antígenos: los expuestos y los ocultos (Barragán, 2014).

Los antígenos expuestos son moléculas de la garrapata que tienen contacto directo con el sistema inmunológico del hospedante al momento de la ingesta. Estas pueden ser proteínas presentes en la cutícula, en la saliva u otras regiones específicas del parásito (Barragán, 2014; Nutall *et al.*, 2006). Si el hospedante recibe una inmunización previa con este tipo de antígenos,

se da una exposición natural a la garrapata por lo que su sistema inmunológico es estimulado. La desventaja de este tipo de blancos es que los parásitos pueden generar fácilmente mecanismos de evasión inmunológica contra el hospedante (Manzano, 2014).

Un ejemplo muy común es el análisis de diversas proteínas salivales de importancia en la interacción parásito-hospedante y la transmisión de agentes patógenos (Díaz *et al.*, 2015; Chmelar *et al.*, 2011). En 2008, Kotsyfakis y colaboradores inmunizaron cobayos con un antígeno salival, sialostatina L2, para disminuir la capacidad de ingesta de fases juveniles de la garrapata *Ixodes scapularis*. Otro modelo es la investigación de la proteína Salp15 como antígeno candidato vacunal por su efecto implicado en la transmisión de *Borrelia burgdorferi* en la garrapata *Ixodes scapularis* (Ramamoorthy *et al.*, 2005).

Por otra parte, los antígenos ocultos son aquellos que no son reconocidos por el sistema inmunológico del hospedante al momento de la ingesta del parásito (Willadsen *et al.*, 1988; Barragán, 2014). La mayoría de estos elementos son desarrollados en el intestino de las garrapatas o son generados a través de ingeniería genética. Esto permite que, al no ser reconocidos por el hospedante, la probabilidad de que se genere una resistencia contra ellos es mucho menor (Barragán, 2014), resultando en blancos mucho más prometedores para el desarrollo de vacunas. Generalmente requieren inmunizaciones repetidas para mantener un nivel adecuado de anticuerpos, pues para que sean candidatos vacunales eficaces deben ser sumamente antigénicos y deben asociarse a una función biológica fundamental para la garrapata (Nuttall *et al.*, 2006). Cuando el parásito ingiere la sangre de su hospedante que previamente fue inmunizado con un antígeno oculto, los anticuerpos ya están presentes circulando la sangre, por lo que, cuando la garrapata se alimenta también adquiere los anticuerpos desarrollados contra sus proteínas internas. Estos anticuerpos interfieren en estructuras importantes dentro de la garrapata (Jonsson *et al.*, 2000; de la Fuente *et al.*, 1999; Barragán, 2014).

El antígeno Bm86 es una glicoproteína ubicada en el intestino medio de la garrapata *Rhipicephalus* spp., este elemento es el principal en las vacunas comerciales de Gavac™ y TickGard®. A pesar de que su eficacia puede ser diferente entre regiones y cepas, estas se basan en perjudicar el intestino del parásito, resultando en una significativa disminución de las infestaciones por garrapatas, menor peso en la repleción de las garrapatas y disminución de la producción de huevos y la viabilidad de las larvas eclosionadas (Barragán, 2014; Rodríguez *et al.*, 2005; Galván *et al.*, 2023; Jonsson *et al.*, 2000; de la Fuente *et al.*, 1999; Lagunes y

Bautista, 2020). Otro ejemplo el cual ha demostrado efectos prometedores es la proteína subolesina, la cual se conserva en múltiples especies de garrapatas (Almazán *et al.*, 2003). Se han señalado efectos en los parásitos si un hospedante es inmunizado con esta, como reducciones en la fijación, supervivencia, peso corporal y reproducción de los artrópodos, así como la transmisión de agentes patógenos de importancia (de la Fuente *et al.*, 2007; Barragán, 2014).

El éxito de las vacunas que sean desarrolladas contra garrapatas se basan en generar una respuesta inmunológica tan fuerte que sea capaz de interferir con el desarrollo biológico del artrópodo. Identificar antígenos ocultos conservados en múltiples especies de garrapatas es un paso fundamental para desarrollar vacunas polivalentes con una protección más duradera y amplia (de la Fuente *et al.*, 2007).

### **Vitelogenina**

La vitelogenina (Vg) es un glucoproteína precursora fundamental de las proteínas de la yema de los huevos. Es necesaria para la reproducción de la mayoría de las especies ovíparas y de los mamíferos monotremas. Su presencia es esencial para la formación de los óvulos y el desarrollo embrionario (Tufail y Takeda, 2008). Es una molécula compleja de gran tamaño, cuyo peso molecular es de 190 a 600 kDa, dependiendo la especie que la presente (Raikhel y Dhadialla, 1992; Xavier *et al.*, 2018). A pesar de que su estructura primaria puede ser diversa, existen múltiples regiones y motivos funcionales que a través de la evolución se han mantenido conservados, particularmente en los extremos N-terminal y en la región alfa-helicoidal, incluyendo a los artrópodos (Smolenaars *et al.*, 2007).

La mayor parte de la síntesis de la Vg en las garrapatas ocurre en el cuerpo graso de las hembras adultas al finalizar la alimentación de sangre y la recepción de señales hormonales muy específicas, como la ecdisona y la hormona juvenil. En algunas especies de garrapatas el intestino medio también contribuye a su síntesis al finalizar la alimentación, como en el caso de *Ornithodoros moubata* y *Rhipicephalus microplus* (Chinzei *et al.*, 1991).

La hormona 20-hidroxiecdisona (20E) es la que regula la expresión del gen de la vitelogenina y su síntesis en las garrapatas. Al momento en el que es sintetizada y liberada a la hemolinfa del artrópodo, los ovocitos la capturan a través de los *receptores de vitelogenina*, que son altamente específicos (Raikhel *et al.*, 1999). Este proceso le concede a la Vg su



transporte a los gránulos de yema donde es almacenada. Al introducirse al ovocito, esta molécula sufre cortes proteolíticos que resultan en proteínas constitutivas de la yema, principalmente fosvitina y lipovitelininas (Byrne *et al.*, 1989), las cuales son la principal reserva de nutrimentos para la progenie y su desarrollo. Inhibir la captación de la vitelogenina resulta en la producción nula o deficiente de huevos, comprometiendo la correcta reproducción de las garrapatas (Tufail y Takeda, 2008). Además de su importancia en el proceso del desarrollo embrionario, múltiples investigaciones han demostrado más funciones de la vitelogenina en diferentes organismos, como la modulación de la longevidad, la influencia en el comportamiento social en insectos o su participación de las respuestas inmunitarias (Amdam y Omholt, 2003; Seehuus *et al.*, 2006). Poco se ha estudiado acerca de la función en los machos, pero se ha observado su presencia en algunos estudios (Wheeler, 1996).

Debido a su importancia en la reproducción de las garrapatas, la vitelogenina es un blanco molecular potencial para la generación de vacunas que buscan el control de estos parásitos. Interrumpir en la producción de la vitelogenina o en su unión al receptor en los ovocitos podría disminuir la fecundidad de las garrapatas, sin embargo, no existen vacunas comerciales que se basen la vitelogenina que presenten resultados prometedores (Almazán *et al.*, 2016).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las garrapatas son artrópodos ectoparásitos que presentan una problemática tanto en la salud animal y humana, están implicadas en todas las regiones del mundo (Fernandes *et al.*, 2012). La garrapata *Amblyomma mixtum* está distribuida en el Neotrópico, desde el sur de Texas, Estados Unidos hasta el oeste de Ecuador, incluyendo su presencia en México (Estrada *et al.*, 2014; Aguilar *et al.*, 2021). En México, *A. mixtum* es posicionada como la segunda garrapata de mayor importancia en la producción bovina, tan solo después de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Se sabe que las pérdidas económicas en el ganado bovino que se han asociado a las parasitosis por *Amblyomma mixtum* son significativas; entre ellas se incluyen los tratamientos acaricidas utilizados para su control, la disminución de la carne y leche, el daño al cuero o las infecciones secundarias transmitidas al momento de la alimentación (Jonsson *et al.*, 2000). A pesar de que de manera tradicional el control de esta especie se basa en el uso de tratamientos farmacológicos como los acaricidas o la diseminación de poblaciones resistentes a la garrapata, es un desafío creciente mantener las poblaciones controladas, por lo que la exploración de nuevas estrategias de control que sean específicas y sostenibles es un reto altamente demandado (Polar *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2014).

En este contexto, el estudio y desarrollo de vacunas contra garrapatas surge como una herramienta prometedora dentro de un esquema de control integrado (Prevot *et al.*, 2007). El efecto de las vacunaciones contra estos artrópodos se puede basar en la generación de una respuesta inmunológica en el hospedante para que, al momento de que las garrapatas se alimenten del animal, este pueda interferir en la fisiología del parásito, comprometiendo diversos parámetros como la alimentación, el crecimiento, la fijación, la reproducción y la transmisión de agentes patógenos (de la Fuente *et al.*, 2016). En los últimos años, múltiples investigaciones se han enfocado en la identificación y evaluación de antígenos con potencial vacunal, especialmente con proteínas propias de la garrapata (Almazán *et al.*, 2003).

Dentro de estos antígenos evaluados la vitelogenina ha ganado particular interés. En las hembras adultas, el proceso de síntesis y acumulación de vitelogenina en los ovocitos se le denomina *vitelogénesis*, la cual es fundamental para que la reproducción sea favorable, pues asegura la administración de nutrientes necesarios para el desarrollo de los embriones y evita la acumulación de hierro en la garrapata hembra adulta. Incidir en este proceso a través de la generación de una respuesta inmunológica contra la vitelogenina podría incidir en la fecundidad de las hembras y por ende en el control de las poblaciones de garrapatas (Almazán

*et al.*, 2016). También podría desencadenar una acumulación de hierro en la garrapata adulta hembra generando toxicidad y muerte (Coons *et al.*, 1989). Un estudio realizado por Tellam y colaboradores (2002) evaluó garrapatas alimentadas de ovejas inmunizadas con vitelina, un elemento derivado de la vitelogenina. Los resultados del experimento indicaron una disminución en el peso de los huevos y una oviposición reducida. Por ello, se propone que la vitelogenina podría ser un candidato prometedor al ser una proteína con dominios funcionales más accesibles para la identificación de péptidos que puedan ser altamente inmunogénicos y sean capaces de generar una respuesta protectora sin incidir efectos perjudiciales en el hospedante. La utilización de péptidos sintéticos basados en regiones inmunodominantes de la proteína vitelogenina podría representar una estrategia más segura y específica para el desarrollo de vacunas.

La información sobre antígenos como candidatos potenciales vacunales en la especie *Amblyomma mixtum* es limitada. A pesar de la relevancia que implica su presencia en la ganadería bovina en el territorio nacional, es muy escasa la investigación que busca identificar estrategias de control inmunológico contra este parásito. Identificar los péptidos inmunogénicos derivados de la vitelogenina podrían ser nuevas alternativas contra el desarrollo de una vacuna específica, la cual contribuiría de manera significativa al control de las poblaciones de garrapatas, disminuyendo la dependencia a los acaricidas químicos, las pérdidas económicas en la ganadería y la generación de prácticas de control más sostenibles para el medio ambiente.

Considerando lo anteriormente mencionado, es necesaria la exploración de alternativas de control contra la garrapata *Amblyomma mixtum*. Evaluar la inmunogenicidad de péptidos basados en la proteína Vitelogenina de *A. mixtum* puede ser un área de investigación prometedora para el desarrollo de candidatos vacunales. Identificar péptidos que generen una respuesta inmunológica elevada y sostenida pueden originar las bases para el diseño de una vacuna eficaz.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Nueve péptidos sintéticos basados en la proteína Vitelogenina de la garrapata *Amblyomma mixtum* inducirán una respuesta inmunológica humoral significativa en el conejo vacunado, lo que se manifestará a través de la producción de anticuerpos específicos, sugiriendo su potencial como candidatos vacunales para el control de esta garrapata.

## **V. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Evaluar la capacidad antigénica de nueve péptidos sintéticos basados en la proteína vitelogenina con la generación de anticuerpos en el conejo como modelo animal.

### **Objetivos específicos**

- Constatar el estado de salud de los conejos experimentales y realizar criterios de inclusión y exclusión para su inmunización.
- Generar dosis vacunales a partir de nueve péptidos sintéticos basados en la proteína vitelogenina.
- Inmunizar 20 conejos experimentales con vacunas basadas en péptidos sintéticos.
- Extraer el suero sanguíneo de los animales inmunizados veintiún días después de cada inmunización.
- Estandarizar la metodología utilizada en la técnica de ELISA indirecta.
- Determinar la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos mediante la técnica de ELISA indirecta.
- Realizar un análisis estadístico a través de gráficas representativas que reflejen la respuesta inmunológica en los conejos, basados en la densidad óptica de las placas de ELISA. Comparar las medias de los resultados a través de una prueba de ANOVA.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto experimental fue realizado con la previa autorización del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, con número de aprobación 009FCN2024.

### Péptidos experimentales

Se seleccionaron nueve péptidos sintéticos basados en la proteína Vitelogenina para la experimentación, estos se obtuvieron a partir del proyecto de investigación realizado por Guerrero-Solorio (investigación en curso aún no publicada), los cuales corresponden a Vg1Amix1, Vg2Amix2, Vg1Amix4, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5. Dichos péptidos se mandaron a sintetizar químicamente a la empresa Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) en el sistema multi antigénico de 8 brazos (MAP-8). En el Cuadro 2 se muestran las características de los péptidos.

**Cuadro 2. Características de los péptidos sintéticos basados en la proteína Vitelogenina (Guerrero Solorio, investigación no publicada).**

Nombre del péptido	Número de aminoácidos	Peso molecular
Vg1 Amix 1	25 aa	3023 g/mol
Vg1 Amix 2	25 aa	2885 g/mol
Vg1 Amix 4	23 aa	2624 g/mol
Vg1 Amix 5	26 aa	3082 g/mol
Vg2 Amix 1	25 aa	2897 g/mol
Vg2 Amix 2	25 aa	2953 g/mol
Vg2 Amix 3	25aa	2918 g/mol
Vg2 Amix 4	22 aa	2523 g/mol
Vg2 Amix 5	28 aa	3177 g/mol

### **Animales de experimentación. Criterios de inclusión y exclusión.**

Para el análisis de la inmunogenicidad de los péptidos se utilizaron 20 conejos raza Nueva Zelanda para inocular las dosis vacunales. Dichos animales localizados en un sistema de producción intensivo con jaulas para su alojamiento permanente, con un peso aproximado de 2.5 kg, se dividieron en grupos de dos conejos, cada uno por cada péptido sintético evaluado, además de dos conejos más como grupo control (inmunizados con solución PBS y el adyuvante comercial Montanide™ ISA 71 (Seppic, París, FRA).

Se realizaron análisis clínicos de los conejos para determinar su estado de salud. Se realizó un examen químico sanguíneo, una biometría hemática y múltiples exámenes coproparasitoscópicos (prueba de flotación y concentración) semanales, también se realizó diariamente una evaluación del estrés en los conejos mediante la observación del comportamiento de los animales, se buscaron signos de incomodidad o estrés como chillar, echar orejas hacia atrás, encogerse, permanecer inmóvil o acicalamiento constante. También se evaluaron las muecas del conejo como aplanamiento de mejillas, tensión orbital, posición de las orejas, posición de los bigotes y la forma de las fosas nasales. Se puntuó cada acción en una escala del 0 al 2 según la intensidad detectada. En el Cuadro 3 se señala la codificación de acción facial.

**Cuadro 3. Codificación de Acción Facial en Conejos de Experimentación (Rabbit Grimace Scale Manual, 2012).**

<b>Codificación de Acción Facial</b>	<b>Escala</b>
No presente	0
Moderadamente presente	1
Evidentemente presente	2

### **Preparación de dosis vacunales**

Las dosis vacunales fueron elaboradas en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la Universidad Autónoma de Querétaro. Para la preparación de las dosis vacunales se solubilizaron los péptidos sintéticos con PBS estéril (pH 7.4), ácido acético e isopropanol dentro de una campana de bioseguridad. Se realizó la agitación

de los péptidos mediante un vórtex para resuspenderlos con mayor eficacia y posteriormente se etiquetaron para su identificación. Se determinó la concentración de los péptidos para su posterior uso en la elaboración de las dosis vacunales.

Las formulaciones vacunales se realizaron a una dosis de un mililitro cuyo 50% constó de la suspensión de PBS estéril y el péptido sintético previamente solubilizado (100µg), y el otro 50% con el adyuvante comercial Montanide™ ISA 71 (Seppic). Para alcanzar la correcta homogeneización de las vacunas se utilizó un sonicador con pulsaciones de 100 amplitudes con repeticiones cada 10 segundos, se realizaron cuatro ciclos de diez minutos cada uno con la finalidad de obtener micelas menores a 5 µm. En el Cuadro 4 se describe la formulación de las dosis vacunales del grupo de animales inmunizados y el grupo control.

**Cuadro 4. Formulación de dosis vacunales de péptidos sintéticos.**

Grupo animal	Porción de los elementos de las dosis vacunales por animal		
	PBS estéril (ml)	Péptido sintético suspendido en PBS estéril (ml)	Adyuvante (ml)
Grupo control	0.5	0	0.5
Grupo inmunizado	0.45	100 µg de péptido sintético suspendido en 0.05 ml	0.5

### **Inmunización de animales**

Para el análisis de la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos se utilizaron dos conejos para cada uno, además de dos conejos como grupo control (inmunizados con solución PBS estéril y el adyuvante comercial Montanide™ ISA 71. La administración de las vacunas fue vía subdérmica en la región dorsal de los animales con jeringas de 3ml con agujas calibre 23. Se administraron cuatro dosis vacunales en cada conejo en un intervalo de veintiún días entre cada una, correspondiente a los días 1, 21, 42 y 63.



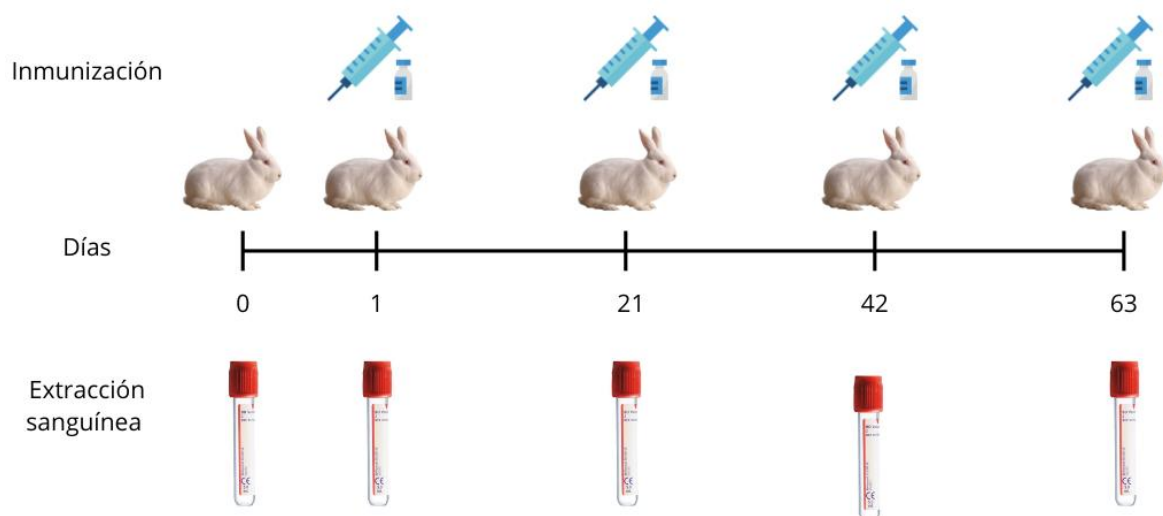
El traslado de las vacunas desde el laboratorio de elaboración hasta la unidad de producción se realizó con una hielera y refrigerantes en su interior, asegurándose que la temperatura de las vacunas no superaran los 4°C.

### **Obtención de suero de animales inmunizados**

Para la obtención del suero de los animales inmunizados, se realizó la recolección de la sangre de los conejos a partir del método de extracción de sangre en conejos: la sujeción debe ser suave y firme (evitar inseguridad y forcejeo). Es necesario ubicar al conejo a la orilla de una mesa y posicionarlo al cuerpo de la persona que lo manipula, abrazarlo con la región del codo y retener su cabeza con la mano. Debe procurarse la mayor asepsia posible para las muestras serológicas mediante venopuntura, desinfectando con alcohol al 96% la región de la oreja. Para la extracción de sangre utilizar una aguja del orden 23G x 32mm. Localizar de manera exacta la arteria auricular y su dilatación antes de pinchar el vaso. Perforar la piel y la arteria con la aguja en un solo movimiento, dirigiendo la punta de la aguja un poco más arriba de la arteria, de manera que el ángulo de penetración sea casi paralelo a la arteria. Recolectar la sangre en un tubo Vacutainer, al finalizar la extracción, mantener una presión suave con un algodón limpio en el lugar y retirar la aguja, presionar durante 30-60 segundos aproximadamente, hasta detener el sangrado. Corroborar que no vuelva a producir sangrado, devolver al animal a su jaula y supervisarlo en los próximos 10-15 minutos. Una vez obtenida la sangre en el tubo Vacutainer™, se realizó un ciclo de centrifugación a 3600 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Posteriormente se colectó el suero sanguíneo en tubos de 1.5ml en los cuales se identificó el animal perteneciente y se congelaron a -20°C.

En la Figura 7 se esquematizan las inmunizaciones aplicadas a los conejos experimentales y los días de extracción sanguínea para la obtención de suero.

**Figura 7. Calendario de inmunizaciones y extracción sanguínea en conejos experimentales.**



### **Determinación de la inmunogenicidad**

Se evaluó la eficiencia antigénica de cada péptido sintético mediante el monitoreo de los anticuerpos producidos por los animales inmunizados a través de la técnica de ELISA indirecta. La estandarización de la técnica se describe en la sección de **APÉNDICES**.

### **Técnica de ELISA indirecta para determinación de anticuerpos**

Para realizar la técnica de ELISA indirecta, se utilizó la metodología descrita en el protocolo “Determinación de la generación de anticuerpos en individuos inmunizados con péptidos mediante ELISA indirecta” del Laboratorio de Investigación de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro (2021). Se sensibilizaron las placas de ELISA con 100 microlitros de Buffer de carbonatos y de los péptidos previamente estandarizados, así como en los grupos control, se dejaron reposar a 4°C durante 16 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados en cada uno de los pocillos con 200 microlitros de PBS-T 0.05%. Se secaron los pocillos y se procedió al bloqueo, en el cual se añadieron 200 microlitros de leche 5% en PBS-T 0.05% y se ingresaron a una incubadora a 37°C en agitación durante una hora. Al finalizar nuevamente se realizó una serie de tres lavados con 200 microlitros de PBS-T 0.05% en cada pocillo y se secó. Se añadió el anticuerpo primario en cada pocillo correspondiente, con 100 microlitros del anticuerpo diluido en Buffer PBS previamente estandarizado. Se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación. Se lavaron los pocillos en tres ciclos con PBS-T 0.05% y se secó. Se añadió el anticuerpo secundario en una

solución de leche al 2% en PBS-T 0.05%, se añadieron 100 microlitros por cada pocillo y se incubó a 37°C en agitación durante 1 hora. Se realizó un último ciclo de tres lavados con PBS-T 0.05% en los pocillos y su posterior secado. Se reveló la placa de ELISA añadiendo a los pocillos experimentales 100µl de la solución de revelado compuesta por 0.1M Ácido Cítrico (5 mililitros), 0.1M Citrato Sódico (5 mililitros), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 micrómetros), diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) (4 microgramos). Se estableció 15 minutos como el tiempo de alcance para la lectura de la placa para así leer la absorbancia en el lector de placas con un filtro de 450 nm, agitando la placa a velocidad lenta durante 3 segundos antes de cada lectura. Se guardaron los datos revelados con respecto a la absorbancia de las placas.

### **Análisis estadístico**

Para determinar la producción de anticuerpos generado por cada animal, se realizaron gráficas representativas incluyendo la desviación estándar de los tres pocillos utilizados por cada suero y su densidad óptica de las placas de ELISA para evaluar la respuesta antigénica y realizar un análisis de los péptidos que generaron valores representativos de la experimentación y aquellos que no lo hicieron. Para las gráficas realizadas se utilizó el programa PRISM de GraphPad. Se evaluó la diferencia estadística entre los sueros de los conejos inmunizados para cada péptido y el grupo control mediante un análisis ANOVA (Armstrong *et al.*, 2002).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Animales de experimentación. Criterios de inclusión y exclusión

Se utilizaron 20 conejos raza Nueva Zelanda como modelo animal para la evaluación de los péptidos sintéticos. La utilización de estos animales se basa en la susceptibilidad a las inmunizaciones y su tamaño accesible para la aplicación de las vacunas, así como la obtención de muestras sanguíneas (Hau y Gittleman, 1984). Al momento de realizar los estudios clínicos de los animales (biometría hemática, química sanguínea y exámenes coproparasitológicos) no se encontraron resultados sugerentes a una enfermedad o afección clínica. El monitoreo del estrés de los animales de manera constante determinó que los animales no se encontraban estresados, a excepción de los períodos entre el día 30 y el día 35. A pesar de los reportes de estrés mencionados anteriormente, se confirmó el estado de salud de los veinte animales, determinados como “aptos para continuar”. Esta selección disminuye la posibilidad de que la presencia de enfermedades clínicas o estrés fisiológico puedan intervenir en la respuesta inmunológica de los hospedantes tras ser inmunizados con los péptidos vacunales (Morton y Griffiths, 1985). La ausencia de señales clínicas de enfermedad y los resultados negativos en los exámenes de laboratorio son indicativos de una población experimental saludable y homogénea. Es un control necesario para garantizar que el efecto inmunológico observado en la técnica de ELISA a través de anticuerpos sea atribuible a la inmunización con los péptidos sintéticos y no a la presencia de otras alteraciones patológicas que pudieran alterar la inmunocompetencia de los animales (Zimmermann *et al.*, 2010).

Además de los efectos inmunológicos, evaluar constantemente el estrés en los animales de experimentación es un compromiso necesario con el bienestar animal de los individuos. Minimizar el estrés en los animales es necesario no solo por la capacidad de potenciar la respuesta inmunológica (debido a que el estrés crónico puede modular la respuesta inmunológica, afectar la función de las células inmunitarias y la producción de anticuerpos), sino también por consideraciones éticas hacia los animales (Dhabhar, 2014).

Uno de los conejos que se utilizó para evaluar la capacidad antigénica del péptido Vg2Amix2 a través de la generación de anticuerpos murió por razones *no reconocidas* en el día 34 de la experimentación.

## Preparación de dosis vacunales

Para realizar las dosis vacunales fue necesaria la previa solubilización de los péptidos sintéticos mediante PBS estéril (pH 7.4), ácido acético e isopropanol, dependiendo de las características ácido-básicas de la molécula. Esto con la finalidad de asegurar la correcta dispersión y estabilidad de los péptidos para su posterior formulación vacunal (Wang *et al.*, 2015). La agitación con un vórtex contribuyó a una eficiente resuspensión, esto es un paso esencial para lograr la concentración homogénea del antígeno en la solución. En el Cuadro 5 se describe la concentración de los péptidos diluidos y los reactivos utilizados para dicho procedimiento.

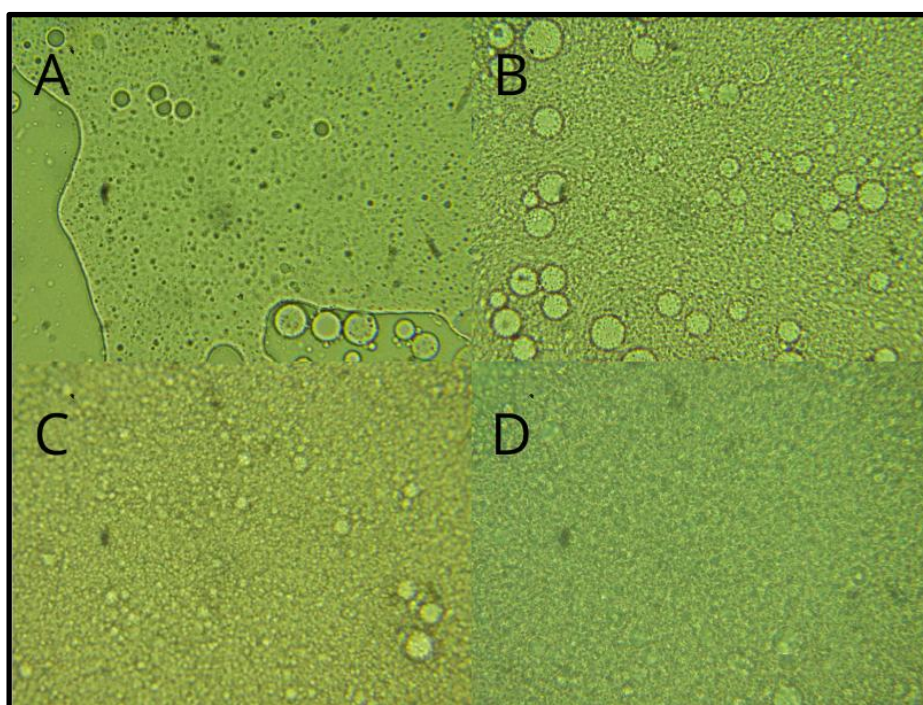
**Cuadro 5. Péptidos resuspendidos y su concentración final.**

Péptido	Cantidad inicial	Reactivos utilizados	Concentración final
Vg1 Amix1	10 mg	4 ml PBS + 4 ml isopropanol	1250 µg / ml
Vg1 Amix2	10 mg	3 ml PBS + 1 ml ácido acético	2500 µg / ml
Vg1 Amix4	10 mg	3 ml PBS	3333 µg / ml
Vg1 Amix5	10 mg	3 ml PBS + 0.5 ml ácido acético	2857 µg / ml
Vg2 Amix1	10 mg	4 ml PBS	2500 µg / ml
Vg2 Amix2	10 mg	4 ml PBS	2500 µg / ml
Vg2 Amix3	10 mg	4 ml PBS	2500 µg / ml
Vg2 Amix4	10 mg	3.5ml PBS + 0.5ml ácido acético	2500 µg / ml
Vg2 Amix5	10 mg	5 ml PBS + 5 ml isopropanol	1000 µg / ml

Para la preparación de las dosis vacunales se ajustó la cantidad de péptido resuspendido para que las vacunas estuvieran a una concentración de 100µg de péptido por dosis final (1 mililitro por animal), por lo que se diluyó el péptido con mayor cantidad de PBS para obtener el 50% de la vacuna (0.5 mililitros) y el adyuvante comercial Montanide™ ISA 71 como el otro 50% (0.5 mililitros). Este adyuvante fue elegido debido a su capacidad de generar emulsiones estables y aumentar la respuesta inmunológica a antígenos peptídicos

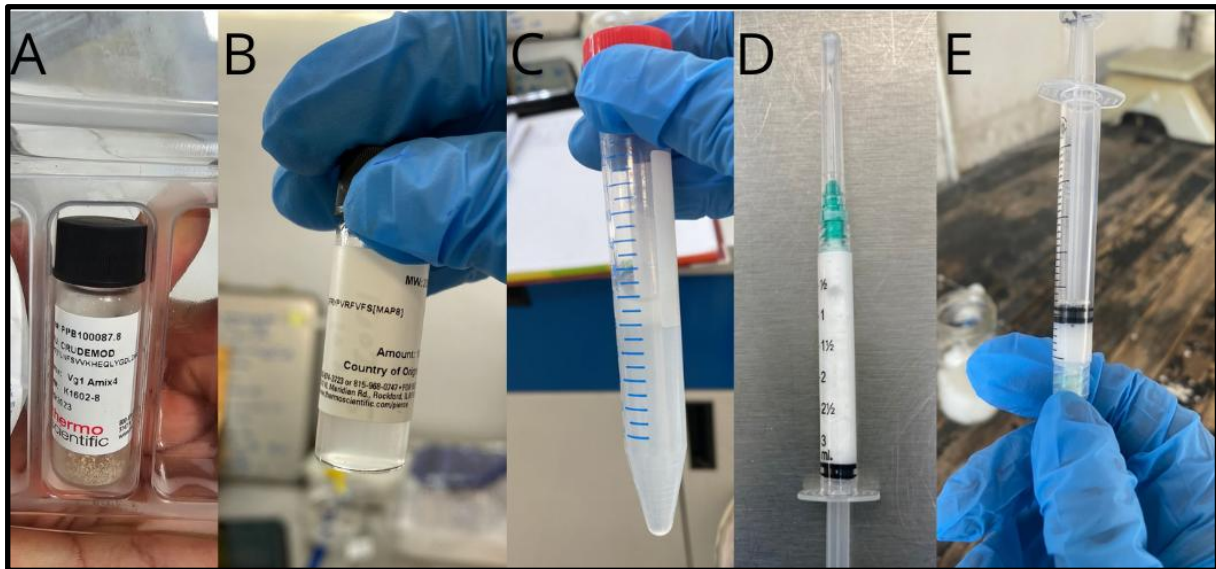
(Didierlaurent *et al.*, 2009). Tiene la característica de formar un depósito del antígeno en el sitio de la aplicación, permitiendo que la liberación de esta sea lenta y sostenida, facilitando que las células presentadoras de antígeno reconozcan estos elementos, además estimula la activación inmunológica induciendo una respuesta inflamatoria local (Guy, 2007).

Fue necesaria la homogeneización de las vacunas a través de cuatro ciclos de diez minutos en el sonicador, esto permitió la obtención de las micelas vacunales menores a 5  $\mu\text{m}$ . Este es un aspecto de importancia al momento de realizar las vacunas y para la eficacia de la inmunización, pues las micelas con diámetros entre 1-2  $\mu\text{m}$  presentan un tamaño adecuado para la fagocitosis por parte de las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas o los macrófagos (Lindblad, 2004). Que los antígenos sean reconocidos por estas células es esencial para su procesamiento y presentación a los linfocitos T, que desencadenarán una respuesta inmunológica adaptativa (Pulendran y Ahmed, 2011). En la Figura 8 se observa el progreso de las micelas evaluadas en el microscopio tras cada ciclo en el sonicador.



**Figura 8. Vacuna elaborada visualizada en microscopio óptico aumento 100X. (A) Micelas tras 1 ciclo en sonicador. (B) Micelas tras 2 ciclos en sonicador. (C) Micelas tras 3 ciclos en sonicador. (D) Micelas tras 4 ciclos en sonicador.**

Una vez finalizada la elaboración de las dosis vacunales, se almacenaron a 4°C en una hielera con refrigerantes para su traslado a la unidad de producción en donde los animales estuvieron alojados para su aplicación.



**Figura 9. Elaboración de dosis vacunales. (A) Péptido sintético sin resuspender. (B) Péptido sintético resuspendido. (C) Proceso de elaboración de la vacuna. (D) Vacuna finalizada. (E) Aplicación a conejo experimental.**

## **Inmunización de animales**

Para la administración de las dosis vacunales en los animales de experimentación, se aplicó vía subdérmica en la región dorsal de los conejos. Esta vía es comúnmente utilizada por su accesibilidad y cercanía a las células presentadoras de antígeno de la dermis, facilitando su captación del inmunógeno y el inicio de la respuesta inmunológica (O'Hagan, 2001). La utilización de jeringas de 3 ml y agujas calibre 23 minimizaron el malestar en los animales de experimentación y aseguraron la precisa administración del volumen de la vacuna. La aplicación de cuatro dosis vacunales con intervalos de veintiún días entre cada una fue esquematizada con la finalidad de producir una respuesta inmunológica primaria robusta y producir una memoria inmunológica mediante las dosis 2, 3 y 4. Este diseño de inmunización es similar a otros estudios de desarrollo de vacunas en modelos animales, en los que potencian la magnitud de la respuesta inmunológica, promueven la maduración de la afinidad de los anticuerpos y la duración de la respuesta de anticuerpos a través de múltiples dosis de refuerzo (Plotkin *et al.*, 2017). El intervalo de tres semanas entre las dosis permite un tiempo suficiente para el desarrollo de la respuesta inmune primaria antes de la administración del refuerzo, optimizando la activación de las células de memoria.

Es necesario el acompañamiento de un grupo control inmunizado con 50% de PBS y 50% del adyuvante para establecer una línea base de la respuesta inmunológica no específica,



de esta manera poder discernir en la respuesta generada por los péptidos sintéticos. Comparar a los animales inmunizados con péptidos sintéticos con los del grupo control permite establecer la inmunogenicidad específica de cada péptido evaluado.

Para el traslado de las vacunas desde el laboratorio hasta la unidad de producción se utilizó una hielera con refrigerantes en su interior. Este paso es importante para mantener la temperatura adecuada de las vacunas y así proteger su integridad y estabilidad, pues la temperatura tiene la capacidad de modificar la conformación y actividad de los péptidos sintéticos y el adyuvante, comprometiendo la eficacia de la vacunación (Maa y Hsu, 1997). La ausencia de signología adversa ante la aplicación de las vacunas respalda la seguridad de las dosis vacunales, esto es importante, pues según la descripción del adyuvante utilizado confirma la seguridad de las emulsiones cuando son aplicadas correctamente (Klimka *et al.*, 2015). La ausencia de reacciones locales o sistémicas sugiere una buena tolerancia de los conejos a las formulaciones vacunales empleadas.



**Figura 10. Vacunación de conejo en región dorsal. (a) Conejo en jaula previo a la inmunización. (b) Conejo con sitio de aplicación desinfectado con alcohol al 96%. (c) Aplicación de dosis vacunal en región dorsal del conejo vía subdérmica.**

### **Obtención de suero de animales inmunizados**

Según diversos autores (Abbas *et al.*, 2018), la reacción máxima de respuesta de anticuerpos en los animales se da entre 7 y 14 días después de cada inmunización, pero puede verse modificada según el animal, el antígeno y el adyuvante utilizado. Las extracciones de sangre para la obtención del suero se realizaron a los 21 días tras cada inmunización para permitir que la respuesta inmunológica humoral se desarrollara y madurara específicamente para la generación de anticuerpos específicos contra los péptidos sintéticos inoculados,



asegurando la correcta evaluación de los anticuerpos (Janeway *et al.*, 2005). La metodología empleada para la extracción sanguínea fue adecuada para la obtención del suero, se realizó esta metodología durante todas las extracciones. Este método es adecuado porque, además de ser una técnica que implica el mínimo estrés para los animales de experimentación disminuyendo la liberación de hormonas estresantes que pudieran verse involucradas en los resultados inmunológicos, también es sencilla y fácil para el manejo de los animales (Harkness *et al.*, 2010). Es una técnica adecuada debido a que no se genera un daño excesivo al vaso sanguíneo utilizado, además de que se optimiza la recolección de la sangre debido al flujo sanguíneo de la arteria. En todo momento se utilizaron las medidas de asepsia necesarias para evitar cualquier tipo de contaminación hacia los animales o las muestras recolectadas, incluyendo la desinfección de la zona con alcohol al 96%, la utilización de agujas nuevas para cada animal y tubos nuevos para la recolección de las muestras sanguíneas. Se aplicó presión con un algodón limpio en la zona al finalizar la recolección para frenar el sangrado y prevenir complicaciones, además se supervisó al animal durante 15 minutos después para asegurar su bienestar y recuperación al procedimiento ejecutado.

Las muestras sanguíneas fueron trasladadas inmediatamente tras su recolección al laboratorio. Se centrifugaron a 3600 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Esta metodología permite la correcta separación del suero sanguíneo con los otros componentes celulares de la sangre (Burnouf, 2007). Se alicuotaron los sueros en tubos de 1.5 ml identificando cada uno. Se congelaron a -20°C para mantener la estabilidad a largo plazo de los anticuerpos presentes hasta el momento de su uso en la técnica de ELISA indirecta y no comprometer los resultados (Goding, 1996).



**Figura 11. Extracción sanguínea a partir de arteria auricular.**

## Determinación de la inmunogenicidad

La detección y cuantificación de los anticuerpos específicos generados por los animales inmunizados fue la estrategia por la cual se evaluó la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos, esto a través de la técnica de ELISA indirecta. Esta técnica es utilizada para la detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos en muestras biológicas (Crowther, 2009). Además de que su ejecución es relativamente fácil, es altamente específica y sensible, por lo que resulta en una herramienta valiosa al momento de evaluar la respuesta humoral en animales de experimentación (Matsuura, 2013). El principio de la técnica es la detección de anticuerpos presentes en el suero de un animal que se unirán a un antígeno inmovilizado en la superficie de los pocillos de la placa. Esta unión se muestra a través de la adición de un anticuerpo secundario específico para la inmunoglobulina del conejo y conjugado a una enzima. Al añadir un sustrato enzimático produce un cambio de coloración que refleja la intensidad proporcional a la cantidad de anticuerpos primarios unidos al antígeno, permitiendo cuantificar la respuesta inmunológica (The Immunoassay Handbook, 2013).

Se evaluó la cinética de la respuesta inmunológica mediante el monitoreo de los anticuerpos en un periodo prolongado de tiempo, se incluyó la respuesta inmunológica previa a las inmunizaciones, la respuesta primaria inicial y la respuesta de memoria producida por las dosis de refuerzo. Con esta información se puede comprender la magnitud y durabilidad de la respuesta inmunológica en cada animal. La detección de anticuerpos específicos en el suero de los conejos inmunizados señala que el sistema inmunológico fue capaz de reconocer los péptidos como extraños, por lo que montó una respuesta para neutralizarlos o identificarlos para su eliminación. Esto señala la eficiencia antigénica de los péptidos sintéticos.

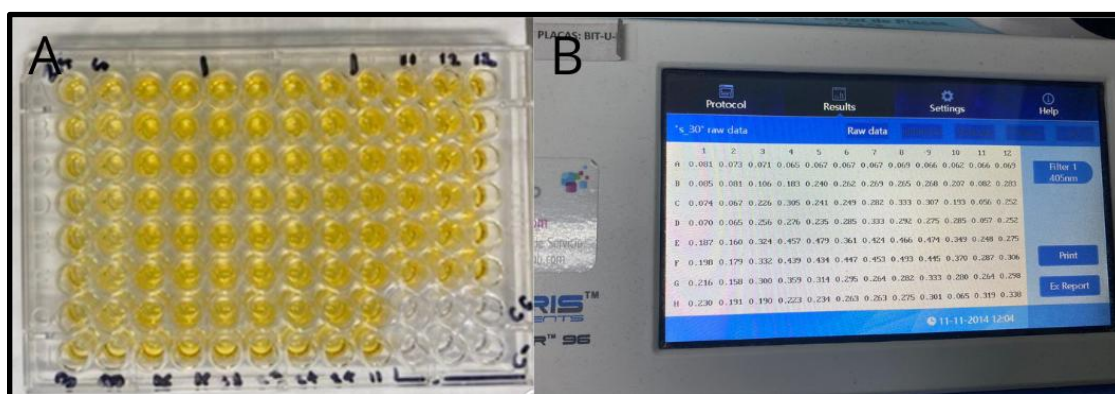


Figura 12. Densidad óptica de la placa ELISA y su lectura. (A) Placa de ELISA 15 minutos después de adicionar solución de revelado. (B) Densidad óptica señalada por lector de placas (espectrofotómetro).

## **Estandarización de la concentración de péptido y anticuerpo primario**

La estandarización de la concentración del péptido en la sensibilización, la dilución del anticuerpo primario, así como del tiempo de revelado para la lectura de la densidad óptica de la placa, son elementos necesarios para que los resultados de la ELISA indirecta sean válidos, pues aseguran que las absorbancias identificadas reflejen con exactitud los niveles de anticuerpos específicos producidos por cada péptido sintético, es decir, aumentan la sensibilidad y reproducibilidad de la metodología (Clark y Engvall, 2014). Si la concentración de un antígeno no es la adecuada, puede visualizarse una señal débil que no permita cuantificar correctamente los valores, a diferencia que, una concentración muy alta, puede reducir la especificidad de la muestra al potenciar el ruido de fondo. La concentración utilizada correspondió a 2.5 µg/µl de péptido sintético para la sensibilización de las placas, estas son similares a estudios previos que utilizaron valores parecidos en estudios dirigidos a detectar anticuerpos anti proteínas de la garrapata o anticuerpos anti garrapata (Robles, 2020; Patarroyo *et al.*, 2002; Tafúr *et al.*, 2020), esto sugiere que la concentración empleada está dentro de un rango óptimo para la detección de anticuerpos en esta investigación. La dilución del anticuerpo primario empleado en la técnica de ELISA correspondió a 1:200. Identificar la concentración adecuada es necesario ya que optimiza la señal de ELISA y disminuye la posibilidad de visualizar un resultado falso positivo o negativo de los sueros inmunes (Rojas *et al.*, 2005). Cuando las concentraciones son muy bajas puede resultar en uniones no específicas o el aumento del ruido de fondo. Cuando las concentraciones son muy altas pueden resultar en señales débiles o indetectables. Se determinó la dilución óptima para generar una buena relación señal-ruido para los péptidos evaluados. Finalmente se determinó el tiempo de revelado de la placa de ELISA tras añadir la la solución de revelado y leer la densidad óptica en el espectrofotómetro. Este paso es importante para que la lectura de la absorbancia sea adecuado, pues si el tiempo es demasiado alto o demasiado bajo puede saturar o impedir la señal ejecutada y dificultar la adecuada cuantificación de los anticuerpos específicos (Ngo y Lenhoff, 1980). Se estableció un periodo de 15 minutos para el revelado de la placa para producir lecturas dentro de un rango dinámico adecuado.

## **Técnica de ELISA indirecta para determinación de anticuerpos**

Los resultados de la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos a través de la técnica de ELISA indirecta fueron variables entre cada uno ellos.

Para los conejos inmunizados con los péptidos Vg1Amix1 y Vg1Amix4 no hubo una diferencia significativa entre la densidad óptica producida por sus anticuerpos específicos y la de los conejos pertenecientes al grupo control (valores menores a 0.1). Esto sugiere que dichos péptidos no generaron una respuesta inmunológica humoral detectable en los conejos según las condiciones del ensayo experimental empleadas. La falta de inmunogenicidad de los péptidos podría ser el resultado de una pobre capacidad para su procesamiento por las células presentadoras de antígeno, una baja afinidad por las moléculas del MHC o por la ausencia de epítomos T o B de relevancia en el conejo (Janeway *et al.*, 2005). Además, se realizó un análisis bioinformático con las secuencias de aminoácidos pertenecientes a las especies del conejo y del bovino para conocer si comparten homologías en cinco o más aminoácidos contiguos que pudieran sugerir una interferencia debido a que los epítomos predichos no son específicos, pudiendo resultar en una tolerancia a los antígenos propuestos Ortega *et al.*, 2020), sin embargo, no se demuestran las causas de la falta de respuesta inmunológica por parte de los individuos.

Se decidió descartar estos péptidos para futuras investigaciones debido a la ausencia de una respuesta inmunológica humoral significativa. A pesar de que su ausencia no descarta en su totalidad el potencial como candidato vacunal, los resultados sugieren que según las condiciones empleadas en esta investigación, es menos probable que los péptidos sean candidatos vacunales prometedores para la garrapata *Amblyomma mixtum*.

Los conejos inmunizados con los péptidos sintéticos Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5 sí demostraron una diferencia significativa en la producción de anticuerpos en comparación con los animales del grupo control. Estos valores son indicativos de que las regiones de la proteína vitelogenina que fueron utilizadas para la generación de estos péptidos tienen la capacidad de ser reconocidas por el sistema inmunológico de los conejos, induciendo una producción de anticuerpos específicos. A pesar de esto, la variabilidad de la magnitud de respuesta entre los péptidos sintéticos y los animales sugiere que cada una de las regiones de la proteína vitelogenina tiene distintos niveles de inmunogenicidad a diferencia de otras.

La cinética de la respuesta inmunológica fue diferente entre cada péptido. La mayor parte de los péptidos inmunogénicos demostraron que el nivel más alto de estos se generaba tras la segunda inmunización (Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5), es decir, al día 42. Además, dichos niveles se mantuvieron en el mismo rango hasta la cuarta inmunización. Esto sugiere que existe una respuesta de memoria adecuada y una persistencia humoral tras las dosis de refuerzo aplicadas. El péptido Vg2Amix1 demostró una cinética diferente a los otros péptidos inmunogénicos, pues se detectó un aumento progresivo en los niveles de anticuerpos generados y el punto máximo lo alcanzó tras la cuarta inmunización. Esto señala que la respuesta es diferente a los péptidos mencionados anteriormente y señala una respuesta tardía que podría deberse a una presentación antigénica o una activación de células B más lenta. Se sugiere que el sistema inmunológico estableció una respuesta sostenida a los antígenos debido a que los niveles de anticuerpos se mantuvieron en su pico más alto después de alcanzarlo.

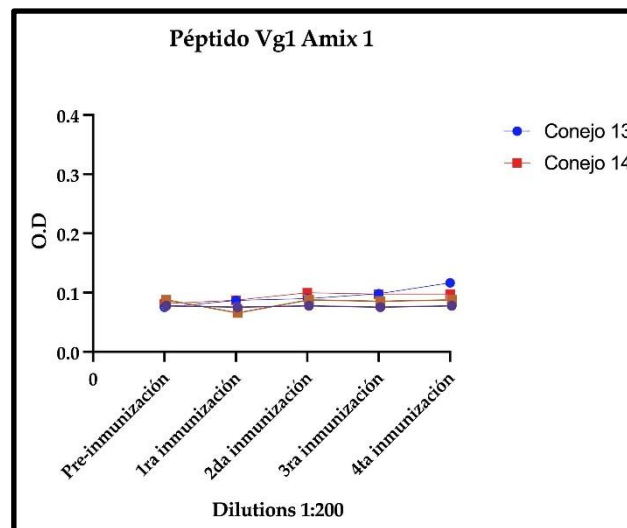
La escasa información acerca de los inmunógenos potenciales existentes contra la garrapata *Amblyomma mixtum* para idear estrategias en el control de estas poblaciones, así como de la prevención de las enfermedades que transmiten, señalan la necesidad de realizar estudios que profundicen la biología de estos parásitos y la evaluación de moléculas para su control (Sonenshine, 1991; Eloisi *et al.*, 2004). Se hipotetiza que los péptidos sintéticos que demostraron un efecto inmunogénico en los conejos como modelo animal son candidatos prometedores para futuras investigaciones en el diseño de una vacuna, esperando que puedan interferir con la biología de la garrapata a lo similar observado por Tellam *et al* (2002).

### **Análisis estadístico**

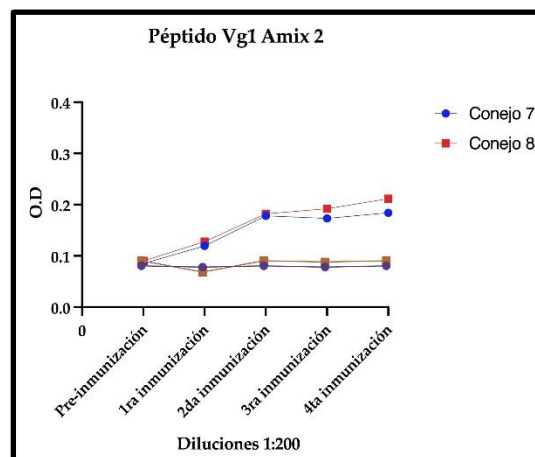
Para la obtención de las gráficas representativas de los resultados arrojados en las ELISA indirectas se utilizó el software estadístico Prism de GraphPad. Este tipo de programas permiten la visualización de la densidad óptica generada en cada muestreo de los animales, por lo que la visualización y comparación de los resultados de la respuesta inmunológica es más sencilla. Es una técnica comúnmente utilizada para analizar los anticuerpos y su densidad óptica en la técnica de ELISA (Motulsky, 2018). Las gráficas obtenidas se visualizan en las Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22.

Es importante incluir la desviación estándar de los tres pocillos utilizados para cada suero debido a que con ellos se puede evaluar la confiabilidad y variabilidad de las mediciones

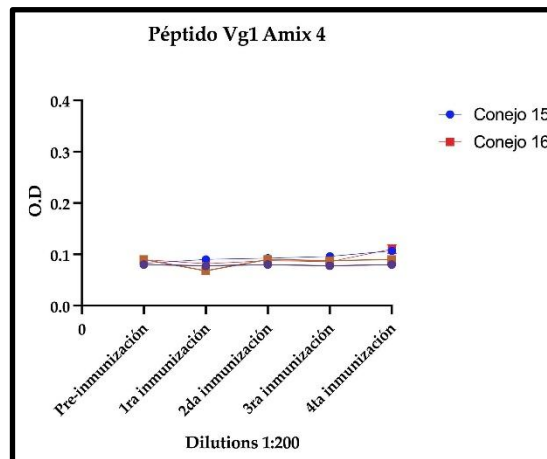
de las placas de ELISA. Cuando la desviación estándar es baja indica que la técnica fue realizada con una buena precisión y homogeneidad en las uniones antígeno-anticuerpo, por lo que es más confiable la representatividad del valor promedio de la densidad óptica de cada muestra. Cuando la desviación estándar es alta sugiere lo contrario, es decir, aumenta la probabilidad de problemas al momento de realizar la técnica de ELISA o una gran variabilidad biológica de las réplicas en los pocillos (Taylor, 1997).



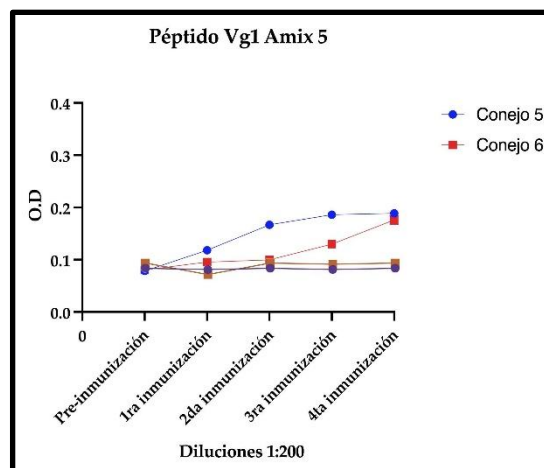
**Figura 13.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg1Amix1 en los conejos experimentales 13 y 14. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.



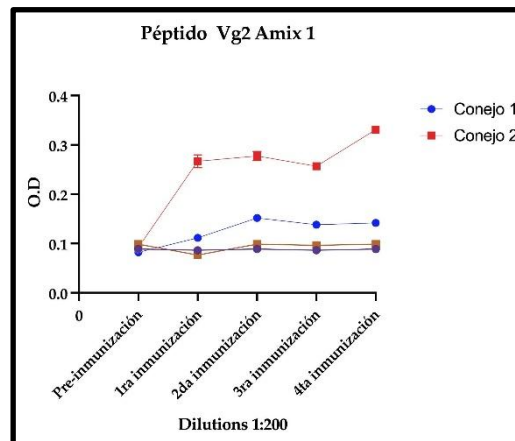
**Figura 14.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg1Amix2 en los conejos experimentales 7 y 8. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.



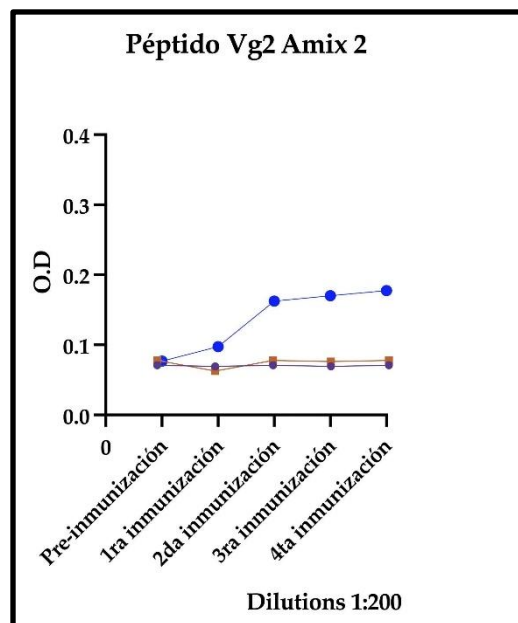
**Figura 15.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg1Amix4 en los conejos experimentales 15 y 16. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.



**Figura 16.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg1Amix5 en los conejos experimentales 5 y 6. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.

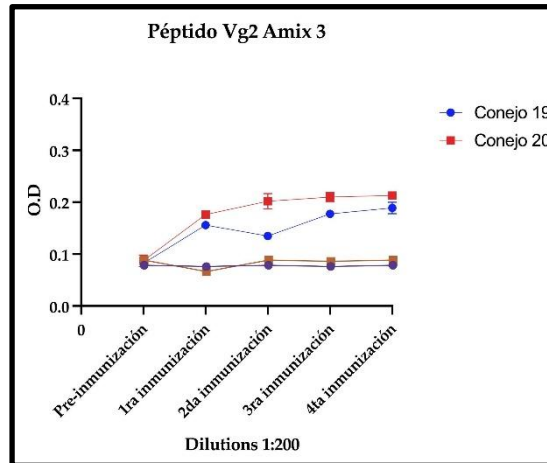


**Figura 17.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix1 en los conejos experimentales 1 y 2. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.

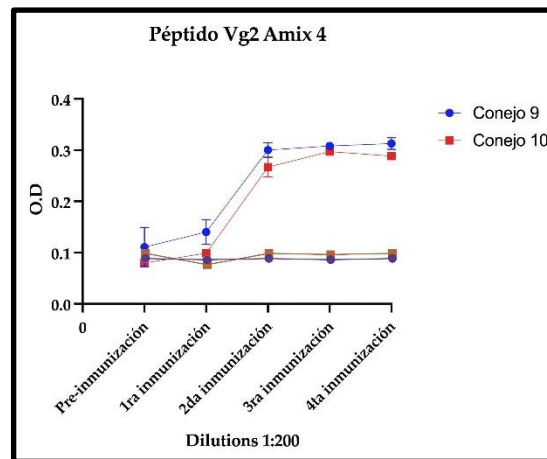


**Figura 18.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix2 en el conejo experimental 16. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.

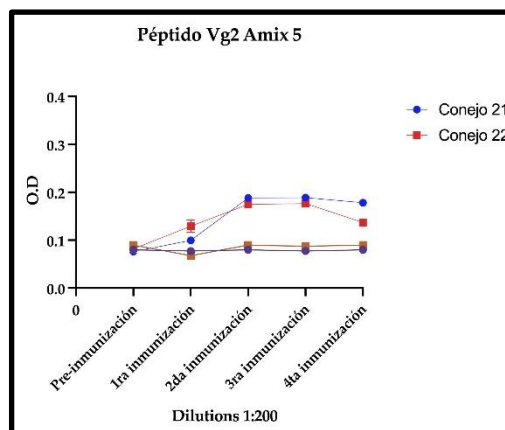




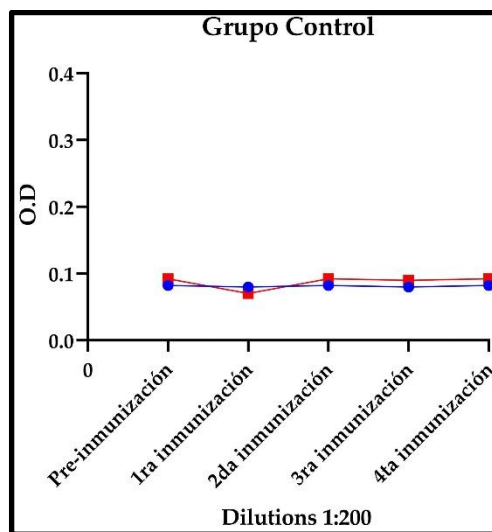
**Figura 19.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix3 en los conejos experimentales 19 y 20. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.



**Figura 20.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix4 en los conejos experimentales 9 y 10. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.



**Figura 21.** Gráfica de la respuesta antigénica del péptido Vg2Amix5 en los conejos experimentales 21 y 22. Dilución 1:200. De color naranja y morado se visualizan los anticuerpos de los conejos del grupo control.



**Figura 22. Gráfica de la respuesta antigénica del grupo control en los conejos experimentales C1 y C2.**  
**Dilución 1:200.**

Los análisis visuales a través de gráficas permiten identificar de forma más clara la cinética de la respuesta humoral inducida por los animales experimentales, es decir, el análisis del momento en que se alcanzaron los niveles más altos de anticuerpos, la magnitud de la respuesta y la persistencia de estos durante el periodo del estudio. Toda esta información es necesaria para entender el perfil inmunogénico de los péptidos y su posible rol como candidatos vacunales en el diseño de una vacunación en futuras investigaciones. Los péptidos sintéticos que demostraron su potencial antigénico a través de la producción de anticuerpos de manera significativa comparados con los animales del grupo control, fueron evidenciados con una densidad óptica más alta y una clara separación entre la línea base del control, resultando en los péptidos Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5. Los péptidos cuya densidad óptica fue similar a la de los animales del grupo control se categorizaron como péptidos no inductores de una respuesta inmunológica humoral detectable, por lo que se descartaron para futuras investigaciones, los cuales correspondieron a Vg1Amix1 y Vg1Amix4.

## VIII. CONCLUSIÓN

Al momento de realizar el proyecto de investigación se logró cumplir el objetivo general de evaluar la capacidad antigénica de nueve péptidos sintéticos basados en la proteína vitelogenina con la generación de anticuerpos en el conejo como modelo animal. También se ejecutaron los objetivos específicos en su totalidad.

A través de la técnica de ELISA indirecta se identificó que los péptidos sintéticos Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5 son capaces de inducir una respuesta inmunológica humoral en los conejos utilizados para la experimentación, a diferencia de los péptidos Vg1Amix1 y Vg1Amix4 que no demostraron una respuesta significativa a comparación de los conejos pertenecientes al grupo control. Esto sugiere que no todas las regiones de la proteína vitelogenina son igual de inmunogénicas que otras, a lo mismo que la cinética entre cada una de estas es diferente.

Los péptidos inmunogénicos son candidatos prometedores para futuras investigaciones cuya finalidad sea evaluar su eficacia protectora contra la infestación por la garrapata *Amblyomma mixtum*, sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para determinar la eficacia protectora de los anticuerpos producidos y establecer los parámetros claves para su evaluación.

## IX. LITERATURA CITADA

Abbas, A., Lichtman, A. y Pillai, S. (2018). *Cellular and molecular immunology* (9th ed.). Elsevier.

Aguilar *et al.* (2019). Ectoparasites of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Yucatán, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 44(2), 445-452.

Aguilar *et al.* (2021a). Potential distribution of *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) in climate change scenarios in the Americas. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(6), 101812.

Aguilar, M., Reyes, E., Torres, M., Moo, D. y Beaty, B. (2021b). Ecological niche modeling of *Amblyomma mixtum* under current and future climate change scenarios in Mexico. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(1), 101586.

Aguilar *et al.* (2021c). Morphometrics of *Amblyomma mixtum* in the State of Veracruz, México. *Pathogens*, 10(5), 533. doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens10050533>

Akov, S. (1982). Blood digestion in ticks. *Israel Journal of Entomology*, 16, 1-12.

Almazan, C., Aguilar, G., Rodriguez, S., Mosqueda, J. y Perez, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 23(8), 1535–1551. doi:<https://doi.org/10.2741/4659>

Almazán, C., Blouin, E., de la Fuente, J. y Kocan, K. (2003a). Subolesina: A common tick protein with protective capabilities against tick infestations. *Experimental & Applied Acarology*, 31(3-4), 161–172.

Almazán, C., Canals, A., Estrada, A., Kocan, K. y de la Fuente, J. (2016). Reverse vaccinology for the identification of protective antigens for control of tick infestations. *Veterinary Parasitology*, 220, 114-121.

Almazán *et al.* (2003b). Subolesin-based vaccine against *Boophilus* spp. ticks. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 92(1-2), 1-13.

Almazán *et al.* (2003c). The tick protein subolesin protects cattle against infestations of *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*. *Vaccine*, 21(25-26), 3143-3151.

Almazán, C. y de la Fuente, J. (2016). Vaccination against ticks: current status and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 185.

Almazán, C., Torres, A., Torres, L., Soberanes, N. y Ortiz, M. (2016). Aspectos Biológicos de *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) en el Noreste de México. *Quehacer Científico en Chiapas*, 11(2), 10-19.

Amdam, G. y Omholt, S. (2003). Social life extends lifespan in ants. *Naturwissenschaften*, 90(8), 377-379.

Aragão, H. y Fonseca, F. (1953). Notas de ixodología: V - A propósito da validade de algumas espécies do género *Amblyomma* do continente americano (Acari: Ixodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 51, 485-492. doi:<https://doi.org/10.1590/S0074-02761953000100014>.

Balashov, Y. (1972). *Bloodsucking ticks (Ixodoidea)—vectors of diseases of man and animals*. Entomological Society of America.

Barradas *et al.* (2017). Life cycle of *Amblyomma mixtum* (Acari: Ixodidae) parasitizing different hosts under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*, 73(3), 257-267.

Barragán, C. (2014). *Análisis funcional preliminar de genes de la garrapata Rhipicephalus microplus expresados diferencialmente durante la infección con Anaplasma marginale* (Tesis de Maestría). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C.

Bartley, J., Kotsyfakis, M. y Nuttall, P. (2009). The role of tick salivary proteins in the host-tick interface and vaccine development. *Trends in Parasitology*, 25(8), 357–364.

Beati *et al.* (2013). *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol* 13, 267. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-267>

Becerra, E., Belem, M., Gordillo, G., Torres, M. y Romero, D. (2020). Detección de *Rickettsia typhi* en *Rhipicephalus sanguineus* s.l. y *Amblyomma mixtum* en el sur de México. *Salud Pública de México*, 62(4), 358-360.

Bowman, D. y Lynn, R. (2020). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (11th ed.). Elsevier.

Burnouf, T. (2007). Processing of blood for transfusion. In *Textbook of transfusion medicine* (pp. 105-118). Blackwell Publishing.

Byrne, B. y Wright, I. (1989). Isolation and partial characterization of vitellin from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry*, 19(8), 703-710.

Childs, J. y Paddock, C. (2003). The ecologic role of *Amblyomma americanum* as a vector of *Ehrlichia chaffeensis*. *Annual Review of Entomology*, 48, 61-81.

Chinzei, Y., Yano, I. y Takahashi, M. (1991). Vitellogenesis in ticks. *Advances in Disease Vector Research*, 8, 91-130.

Chmelar *et al.* (2011a). The sialome of the hard tick *Ixodes ricinus*: Identification of novel proteins with potential roles in host-pathogen interactions. *BMC Genomics*, 12(1), 1-17.

Chmelar, J., Kotál, J., Kovářová, Z. y Grubhoffer, L. (2011b). Tick salivary proteins and their role in tick-host interaction. *Frontiers in Physiology*, 2, 58.

Childs, J. y Paddock, C. (2003). The ecologic role of *Amblyomma americanum* as a vector of *Ehrlichia chaffeensis*. *Annual Review of Entomology*, 48, 61-81.

Chinzei, Y., Yano, I. y Takahashi, M. (1991). Vitellogenesis in ticks. *Advances in Disease Vector Research*, 8, 91-130.

Clark, B. y Engvall, E. (2014). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Theoretical and practical aspects. In *Methods in enzymology* (Vol. 546, pp. 3-22). Academic Press.

Crowther, J. (2009). *ELISA: theory and practice*. Humana Press.

Consortio Iberoamericano para la Ciencia y la Tecnología. (s.f.). LAGAR - Pautas de control químico y vacunal de las garrapatas del vacuno en América latina. Consorcio Iberoamericano para la Ciencia y la Tecnología.

Davies, J. (2000). Avoidance of autoimmunity by vaccines. *Vaccine*, 18(16), 1585-1591.

de la Fuente *et al.* (2007a). A vaccine against ticks and tick-borne diseases based on the Bm86 antigen. *Expert Review of Vaccines*, 6(5), 721–728.

de la Fuente, J., Almazán, C., Canals, A., Pérez, R. y Kocan, K. (2016a). A ten-year update on vaccines for control of tick infestations. *Parasitology*, 143(3), 259-273.

de la Fuente, J., Estrada, A., Cabezas, A. y Almazán, C. (2007b). An overview of the global status of ticks and tick-borne diseases. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 1(1), 3-15.

de la Fuente, J., Estrada, A. y Kocan, K. (2016b). Tick-borne diseases: New challenges, new solutions. *Trends in Parasitology*, 32(12), 920–929.

de la Fuente, J., Kopacek, P. y Villar, M. (2016c). Vaccination for the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitology*, 143(1), 3-14.

de la Fuente, J., Merino, O., Pérez, J., Almazán, C. y Kocan, K. (2007c). Vaccine candidates for control of ticks and tick-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*, 145(1-2), 3-22.

Dhabhar, F. (2014). Neuroendocrine mechanisms in stress-induced alterations of immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(Supplement\_1), 10309-10316.

Díaz, V., Manzano, R., Oleaga, A. y Pérez, R. (2015a). Recent advances in the development of anti-tick vaccines. *Research in Veterinary Science*, 98, 1–7.

Díaz, V., Manzano, R., Obolo, P., Oleaga, A. y Pérez, R. (2015b). Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: An update. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6(4), 427-437.

Didierlaurent *et al.* (2009). Montanide™ ISA 71 VG: a versatile adjuvant for veterinary vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1-3), 89-91.

Eloisi, S., Ribeiro, M. y Famadas, K. (2004). Morfologia do sistema reprodutor feminino de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13(3), 117-121.

Estrada, A., de la Fuente, J. y Guglielmone, A. (2014a). *Ticks on the World: Biology, Systematics, Identification, Ecology, and Distribution*. Springer.

Estrada *et al.* (2014b). Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *Int. J. Parasitol.*, 14(14), 1081-1089. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.007>

Estrada *et al.* (2014c). *Ticks of domestic animals in the Neotropical region: biology, distribution and hosts*. Editorial Académica Española.

Faccini, J. (2013). *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 267. doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-267>

Fernandes, A., Soares, C., Rangel, H., Moraes, G. y Roberts, D. (2012). Entomopathogenic fungi for tick control. *Experimental Parasitology*, 130(3), 492-498.

Galván *et al.* (2023). Proteína Bm86 y su potencial uso como vacuna contra garrapatas en el ganado bovino. Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 14(3), 672-695.

García *et al.* (1999). иммунизация крупного рогатого скота против клещей *Boophilus* spp. с рекомбинантным антигеном Bm86. *Ветеринарная паразитология*, (3), 25-33.

Goding, J. (1996). *Monoclonal antibodies: principles and practice* (3rd ed.). Academic Press.

Gregersen, J., Mehlsen, J., Sorensen, P. y Clausen, J. (2006). Peptide-based vaccines: challenges and solutions. *Current Drug Targets*, 7(2), 169-177.

Guglielmone *et al.* (2010). Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical zoogeographic region. *Zootaxa*, 2524(1), 1–163.

Guy, B. (2007). The perfect vaccine adjuvant: more than a dream. *Nature Reviews Microbiology*, 5(9), 637-643.

Harkness, J., Turner, P. y Vandewoude, S. (2010). *Harkness and Wagner's biology and medicine of rabbits and rodents* (5th ed.). Blackwell Publishing.



Hau, J. y Gittleman, J. (1984). The rabbit as a model for immunological research. *Advances in Immunology*, 34, 1-58.

Higa, Y., Aguilar, M., Moo, D., Torres, M. y Romero, D. (2020). *Amblyomma mixtum*: la otra garrapata del bovino. *Bioagrociencias*, 13(2), 101-104.

Illoldi *et al.* (2012). Species distribution, models and ecological suitability analysis for potential tick vectors of Lyme Disease in México. *J Trop Med.*, 2012, 959101. doi:<https://doi.org/10.1155/2012/959101>

Jaramillo, D. (2022). Importancia de la vacunación dentro del manejo integrado de *Rhipicephalus microplus* en bovinos. *Revista Sistemas de Producción Agroecológicos*, 13(1), 47-63.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M. y Shlomchik, M. (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease* (6th ed.). Garland Science.

Jonsson, N., Cutts, I. y Jorgensen, W. (2000a). The effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen on the population dynamics of *Boophilus microplus* in *Bos indicus* cattle. *Veterinary Parasitology*, 94(1-2), 143–155.

Jonsson, N., Hope, M. y Roberts, J. (2000b). Productivity and health of cattle in tick-infested environments. *Veterinary Parasitology*, 90(1-4), 1–14.

Jonsson, N., Matschoss, A. y Miller, R. (2000c). Evaluation of a Bm86-based vaccine in controlled infestations of *Boophilus microplus* on Brahman cross cattle in central Queensland. *Veterinary Parasitology*, 93(3-4), 293-302.

Kaufman, W. (1976). The role of salivary fluid in the feeding of *Ixodes holocyclus* and the reversal of paralysis by antibody. *Experimental Parasitology*, 40(3), 379-392.

Kemp, D., Stone, B. y Binnington, K. (1982). Tick attachment and feeding: salivary and cement functions. *International Journal for Parasitology*, 12(5), 463-498.

Klimka, E., Haupenthal, S. y Goebel, W. (2015). Safety aspects of adjuvants used in human and veterinary vaccines. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 1012-1021.

Kohls, G. (1958). *Amblyomma imitator*, a new species of tick from Texas and México, and remarks on the synonymy of *A. cajennense* (Fabricius) (Acarina- Ixodidae). *J. Parasitol.*, 44(4), 430-433. doi:<https://doi.org/10.2307/3274329>

Kotsyfakis, M., Sa, A. y Andersen, J. (2008). Tick salivary proteins and their role in tick-host interaction. *Trends in Parasitology*, 24(10), 441–446.

Krantz, G. y Walter, D. (2009). *A Manual of Acarology* (3rd ed.). Texas Tech University Press.

Labruna *et al.* (2011). *Amblyomma cajennense* (sensu lato) is a valid species complex. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2(3), 145-156.

Lagunes, R. y Bautista, C. (2020). Control inmunológico: Una alternativa contra garrapatas del ganado bovino. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(1), e2263.

Lindblad, E. (2004). Aluminium adjuvants – in retrospect and prospect. *Vaccine*, 22(27-28), 3658-3668.

Ma *et al.* (2021). Predicting the potential global distribution of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) under near current and future climatic conditions, using the Maximum Entropy Model. *Biology*, 10, 1057. doi:<https://doi.org/10.3390/biology10101057>

Maa, Y. y Hsu, C. (1997). Protein aggregation: mechanisms, characterization, and minimization. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(1), 1-12.

Mangold, A., Guglielmone, A. y Beati, L. (1998). *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): phylogeny of 19 South American species inferred from mitochondrial 12S rDNA sequences. *Experimental and Applied Acarology*, 22(2), 111-129.

Manzano, R. (2014). *Vacuna anti-Ornithodoros erraticus* (Tesis doctoral). Digital CSIC.

Mastropaolo, M., Nava, S., Guglielmone, A. y Mangold, A. (2011). Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Exp Appl Acarol*, 53, 371–375. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-010-9404-6>

Matsuura, E. (2013). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In *Diagnostic microbiology and infectious diseases* (pp. 555-563). Springer.

Monroy, L. (2022). *Identificación del gen hrf (histamine release factor) de Amblyomma mixtum (Koch, 1884) y la evaluación de su transcripción*. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro.

Morton, D. y Griffiths, P. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and their assessment. *The Veterinary Record*, 116(16), 431-436.

Motulsky, H. (2018). *GraphPad Prism 8 statistics guide*. GraphPad Software.

Nava *et al.* (2014a). Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3), 252-276. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>

Nava *et al.* (2014b). *Amblyomma cajennense* (sensu lato) and *Amblyomma mixtum* in Argentina and Uruguay: hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1-9.

Ngo, T. y Lenhoff, H. (1980). Enzyme-mediated immunoassay. In *Enzyme-mediated immunoassay* (pp. 1-36). Plenum Press.

Nutall, P., Trimnell, A. y Jones, L. (2006). Tick-borne diseases: New challenges for vaccine development. *Parasitology*, 133(S2), S165-S180.

O'Hagan, D. (2001). Subcutaneous and intramuscular routes of vaccine delivery: current status and future trends. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(8), 921-931.

Parasuraman, S. (2011). Experimental animal: Selection criteria and care. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2(1), 34-37.

Parra *et al.* (1999). Manejo integrado de garrapatas en bovinos. *Publicación CORPOICA*, 1999.

Patarroyo *et al.* (2002). Serological evidence of arbovirus infections in humans and equines from Córdoba, Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(6), 769-774.

Plotkin, S., Orenstein, W. y Offit, P. (2017). *Plotkin's vaccines* (7th ed.). Elsevier.

Raikhel, A. y Dhadialla, T. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 217-251.

Raikhel, A., Sappington, T. y Zhou, E. (1999). Molecular mechanisms of endocytosis in insect oocytes. *International Review of Cytology*, 186, 227-324.

Ramamoorthy, R., Narasimhan, S. y Conlon, P. (2005). *Borrelia burgdorferi* OspC and Salp15 target the C4b-binding protein and inhibit the host complement pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3508–3516.

Robles, C. (2020). *Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular inducida por proteínas recombinantes de Anaplasma marginale en bovinos naturalmente infectados* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Yucatán.

Rodríguez, R., Méndez, F. y Hernández, J. (2005). La vacuna Bm86 como una estrategia de control de garrapatas: Eficacia en el estado de Yucatán, México. *Veterinaria México*, 36(3), 277–288.

Rodríguez *et al.* (2018). Efficacy of different acaricides for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle in the Mexican tropics. *Journal of Economic Entomology*, 111(4), 1946-1951.

Rodríguez, M. (2000). Respuesta inmunológica contra garrapatas. *Biotechnología Aplicada*, 17(2), 85-91.

Rojas, M., Fuks, R., Méndez, O. y Viotti, R. (2005). Standardization of an indirect ELISA for the detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology International*, 54(2), 107-111.

Romero, D., Bravo, J. y Sánchez, S. (s.f.). *Ambylomma mixtum*: la otra garrapata del bovino. *Revista de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*.

Samish, M. y Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 159-182.

Simonsen, B., Gray, J. y Ogden, N. (2017). Eradication of ticks: lessons from the past and implications for the future. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1-12.

Solís, D., Fragoso, H., Santamaría, V., Rosario, R. y Fabela, F. (2007). Economic impact of cattle tick infestations in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 146(1-2), 152–156.

Sonenshine, D. (1991). *Biology of Ticks, Volume 1*. Oxford University Press.

Stafford, K. (2007). *Tick management handbook: an integrated guide for homeowners, pest control operators, and public health officials*. The Connecticut Agricultural Experiment Station.

Tafúr, J., Betancourt, O., Miranda, J. y Valbuena, G. (2020). Seroprevalencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* en bovinos de explotaciones doble propósito en el departamento del Cesar, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 33(1), 39-47.

Taylor, J. (1997). *Quality assurance of chemical measurements*. CRC Press.

Tellam, R., Bowman, A., Eisemann, C., Riding, G. y Willadsen, P. (2001). Vaccination of sheep with vitellin antigens derived from *Boophilus microplus* reduces tick fecundity. *International Journal for Parasitology*, 31(8), 753-761.

UNACH (Universidad Autónoma de Chiapas). (2019). Aspectos biológicos de *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) en el noreste de México.

Vargas, M., Gordillo, G., Arroyo, S., Méndez, A. y Torres, J. (2018). Rickettsial diseases in Mexico: a systematic review. *Parasites & Vectors*, 11(1), 409.

Wall, R. y Shearer, D. (2001a). *Veterinary Entomology: Arthropod Ectoparasites of Domestic Animals*. Blackwell Science.

Wall, R. y Shearer, V. (2001b). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control* (2nd edition). Editorial Blackwell Science Ltd.  
doi:<https://doi.org/10.1002/9780470690505>

Willadsen, P., Riding, G. y McKenna, R. (1988). Immunization against ticks. *International Journal for Parasitology*, 18(4), 541–551.

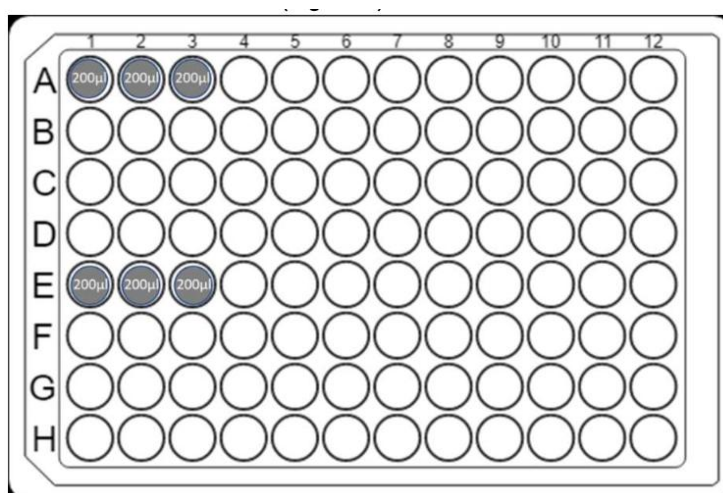
Zannou *et al.* (2021). Models for studying the distribution of ticks and tick-borne diseases in animals: a systematic review and a meta- analysis with a focus on Africa. *Pathogens*, 10, 893. doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens10070893>

## X. APÉNDICES

### **Estandarización de la concentración del péptido sintético, anticuerpo primario y tiempo de revelado en la técnica de ELISA indirecta.**

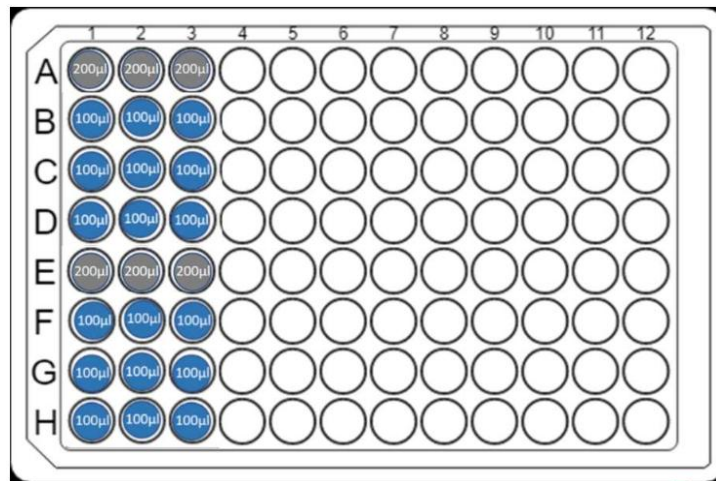
#### Titulación de la concentración de péptidos y tiempo de revelado.

Para sensibilizar la placa de ELISA se estandarizó la concentración de péptido adecuada mediante el protocolo “Titulación de la concentración de péptidos para la detección de anticuerpos específicos en individuos inmunizados con péptidos mediante ELISA indirecta” del Laboratorio de Investigación de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se colocaron 200  $\mu$ l de la solución de Buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.6 y el péptido sintético a una concentración de 10  $\mu$ g/ml de manera seriada por triplicado según lo esquematizado en la Figura 32.



**Figura 23. Diagrama de placa de 96 pocillos con 200 $\mu$ l de buffer de carbonatos y 10  $\mu$ g/ml de péptido sintético.**

En los siguientes pocillos inferiores se colocaron 100  $\mu$ l de solución Buffer de carbonatos 0.1 M pH 9.6. En la Figura 33 se observan los pocillos llenados con esta solución.

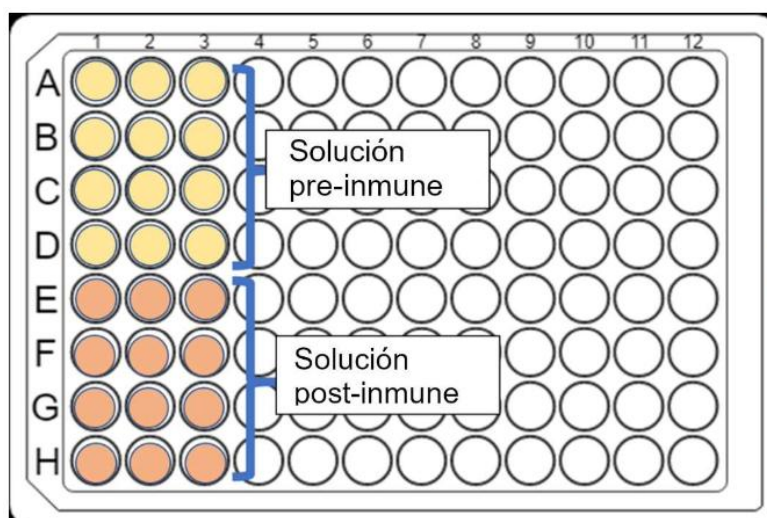


**Figura 33. Diagrama de placa de 96 pocillos con 200µl de buffer de carbonatos y 10 µg/ml de péptido sintético en la fila A y E. 100 µl de buffer de carbonatos en los pocillos de las filas B, C, D, F, G y H.**

Se realizaron diluciones seriadas tomando 100 µl de la solución de péptido sintético concentrado a 10 µg/ml de la fila A y se depositaron en la fila inferior. Se homogeneizó el contenido de los pozos recuperándolo y volviéndolo a depositar tres veces usando una pipeta multicanal. Este paso se realizó de las filas A a la B, B a la C, C a la D, E a la F, F a la G y G a la H. Al momento de finalizar las diluciones seriadas, se tomaron 100 µl de las filas D y H y se descartó junto con las puntas de la pipeta multicanal (para que los pozos tengan el mismo volumen).

La placa se incubó a 4°C durante 16 horas para posteriormente desechar el líquido de la placa. Se realizó el primer ciclo de lavado de la placa con PBS-T 0.05%, se agitó la placa mediante golpeteos laterales durante 30 segundos y se desechó el líquido y se secó la placa. Se repitió este procedimiento 3 veces en total. Posteriormente se realizó el bloqueo de la placa, en el cual se añadió 200 µl de solución de bloqueo (PBS-T 0.05% con leche descremada al 5%) en todos los pozos experimentales. Se incubó la placa a 37°C con agitación orbital a 200 RPM durante 1 hora. Se descartó la solución de los pozos de la placa y se repitió el mismo proceso de lavado y secado mencionado anteriormente. Posteriormente se colocaron 100 µl del suero pre inmunización en los pozos de las filas A-D en una dilución de 1:500 en PBS-T 0.05% y 100 µl de suero obtenido a los 21 días de la segunda inmunización en los pocillos de las filas E-H. Este paso se visualiza en la Figura 34.





**Figura 34. Diagrama de placa de 96 pocillos con solución preinmune y solución postinmune.**

La placa se incubó a 37°C en agitación con oscilación de 200 rpm durante una hora, al finalizar se repitió el mismo proceso de lavado y secado. Luego se agregó 100 µl del anticuerpo secundario en dilución 1:6000 en PBS-T 0.05% para incubarlo a 37°C con agitación de 200 rpm durante una hora. Posteriormente se repitió el proceso de lavado y secado. Finalmente se añadieron 100 µl de solución de revelado (0.1M Ácido Cítrico (5 mililitros), 0.1M Citrato Sódico (5 mililitros), H2O2 (4 microlitros), OPD (4 microgramos)) en los pocillos, se esperaron 15, 20, 25 y 30 minutos para leer la placa en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm con agitación de 5 segundos y así evaluar la concentración del péptido y tiempo de lectura en el cual se presentó la menor variación en la densidad óptica entre cada triplicado y aquella que presentó mayor variedad entre las medias de los triplicados del suero pre inmunización respecto al post inmunización.

#### Titulación de anticuerpo primario.

Para determinar la cantidad de anticuerpos generados en los animales inmunizados, se llevó a cabo un ensayo de ELISA individual para cada uno. Este análisis comparó el nivel de anticuerpos presentes en el suero obtenido tras la segunda inmunización con el nivel basal detectado en el suero previo a la inmunización. Cada placa de ELISA se preparó recubriendo los pocillos con 100 µl de una solución del péptido sintético a una concentración previamente estandarizada, utilizando un buffer de carbonato/bicarbonato a pH 9.6. Como control para verificar la correcta función del conjugado, se preparó una dilución de suero en buffer de carbonato/bicarbonato a pH 9.6 en una proporción de 1:500. Se dispensaron 100 µl de esta solución por triplicado en la placa, la cual se cubrió con plástico y se incubó durante toda la

noche en refrigeración. Tras la incubación, la placa se lavó con una solución de PBS-Tween 0.05% a pH 7.4 y se bloqueó utilizando el mismo buffer con la adición de leche descremada al 5%, siguiendo un procedimiento similar al descrito previamente.

Para analizar los sueros inmunes, se prepararon diluciones 1:125 de los sueros correspondientes a la segunda inmunización. Se depositaron 200 µl de estas diluciones por triplicado en los pocillos F1, G1 y H1 de la placa. De manera análoga, los sueros pre-inmunización se diluyeron a la misma concentración y se colocaron en los pocillos A1, B1 y C1. Posteriormente, se añadieron 100 µl de buffer PBS-Tween 0.05% pH 7.4 a los pozos restantes de la placa.

A continuación, se realizaron diluciones seriadas de la siguiente manera: se tomaron 100 µl de los pocillos que contenían 200 µl del suero diluido y se transfirieron a los pocillos inmediatamente a la derecha, mezclando mediante pipeteo. Este proceso se repitió, tomando 100 µl de los pocillos de la columna 2 y transfiriéndolos a la columna 3, y así sucesivamente hasta la columna 12, de la cual se descartaron 100 µl. De esta forma, cada pocillo contenía 100 µl de suero con una concentración específica cada una. Las placas con los sueros se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, se añadió el anticuerpo secundario diluido 1:6000 y la solución de revelado, siguiendo las indicaciones descritas en la sección anterior.