

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Biomedicina

Efecto de la administración de un siRNA específico para *TC20108* sobre la tasa de mortalidad y ganancia de peso durante la alimentación a repleción, oviposición y eclosión de los huevos de *Rhipicephalus microplus*.

TESIS

Como requisito para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias en Biomedicina

Presenta:
Ing. Bt. Nancy Aguayo Ramos

Dirigido por:
D. en C. Ricardo Francisco Mercado Curiel



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias en Biomedicina

Efecto de la administración de un siRNA específico para *TC20108* sobre la tasa de mortalidad y ganancia de peso durante la alimentación a repleción, oviposición y eclosión de los huevos de *Rhipicephalus microplus*.

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

Ing. Bt. Nancy Aguayo Ramos

Dirigido por:

D. en C. Ricardo Francisco Mercado Curiel

D. en C. Ricardo Francisco Mercado Curiel
Presidente

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Secretario

Dra. Ma. Elena Villagrán Herrera
Vocal

Dra. Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea
Suplente

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra
Suplente

Dr. Javier Ávila Morales
Director Facultad de Medicina

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Mercedo Curiel Ricardo Fr
Firma

[Signature]
Firma

[Signature]
Firma

[Signature]
Firma

[Signature]
Firma

[Signature]

Marzo de 2017

RESUMEN

Las garrapatas (*Acari: Ixodidae*) son ectoparásitos hematófagos que se encuentran implicados en el mantenimiento y transmisión de diferentes tipos de patógenos de importancia clínica. Además la infestación por garrapatas sobre el ganado vacuno ocasiona pérdidas económicas excesivas debidas a los daños que ocasiona en el animal, como el detrimento significativo de peso y el deterioro considerable en la piel. Es necesario el desarrollo de estrategias alternas que contribuyan al control simultáneo de las garrapatas y los patógenos transmitidos.

TC20108, homólogo de una proteína A de unión a inmunoglobulina G (IGBP), fue identificada en el 2011 por Mercado-Curiel y cols. al observar su sobreexpresión durante la alimentación de *Rhipicephalus microplus*. Las IGBPs se unen a la región constante (Fc) de los anticuerpos dirigiéndolos a las glándulas salivales para ser expulsados del cuerpo de la garrapata, actuando así como un sistema de defensa contra las inmunoglobulinas ingeridas del vacuno durante la alimentación.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración de un siRNA específico para *TC20108* sobre algunos parámetros biológicos indicativos de la aptitud biológica de la garrapata *Rhipicephalus microplus*, tales como la tasa de mortalidad y ganancia de peso durante la alimentación a repleción en la etapa adulta, la oviposición y la eclosión de las larvas.

La administración de un siRNA específico para *TC20108* tuvo efectos deletéreos sobre el ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus*. La tasa de mortalidad fue de 65% y 20% en el grupo tratado y control, respectivamente. La oviposición disminuyó de manera estadísticamente significativa en el grupo tratado con respecto al control sin que hubiera efecto deletéreo aparente sobre la eclosión subsecuente de las larvas a partir de los huevos ovipuestos por las garrapatas tratadas.

La administración de un siRNA específico para *TC20108* afectó de manera global la aptitud biológica de *Rhipicephalus microplus*, disminuyendo el número de descendientes por generación. Futuros estudios estarán dirigidos a establecer la

relación que existe entre el nivel de expresión de *TC20108* y los efectos deletéreos observados, lo que podría convertir a dicho gen en un posible candidato a antígeno vacunal eficaz para el desarrollo de una nueva vacuna.

(Palabras clave: *Rhipicephalus microplus*, RNAi, Viabilidad biológica)

SUMMARY

Ticks (Acari: Ixodidae) are hematophagous ectoparasites that are involved in the maintenance and transmission of different types of pathogens of clinical importance. In addition, tick infestation of cattle causes excessive economic losses due to damage to the animal, such as significant weight loss and significant skin deterioration. It is necessary to develop alternative strategies that contribute to the simultaneous control of ticks and transmitted pathogens.

TC20108, homologous to an immunoglobulin G binding protein A (IGBP), was identified in 2011 by Mercado-Curiel *et al.* When observing its overexpression during feeding of *Rhipicephalus microplus*. IGBPs bind to the constant region (Fc) of the antibodies by directing them to the salivary glands to be expelled from the body of the tick, thus acting as a defense system against the immunoglobulins ingested from cattle during feeding.

In the present work we evaluated the effect of the administration of a siRNA specific for *TC20108* on some biological parameters indicative of the biological aptitude of the tick *Rhipicephalus microplus*, such as the rate of mortality and gain of weight during the feeding to repletion in the stage adult, oviposition and larval hatching.

Administration of a specific siRNA for *TC20108* had deleterious effects on the life cycle of *Rhipicephalus microplus*. The mortality rate was 65% and 20% in the treated and control groups, respectively. The oviposition decreased statistically significantly in the treated group with respect to the control with no apparent deleterious effect on the subsequent hatching of the larvae from the oviposited eggs by the treated ticks.

Administration of a siRNA specific for *TC20108* globally affected the biological fitness of *Rhipicephalus microplus*, decreasing the number of offspring per generation. Future studies will be aimed at establishing the relationship between the level of expression of *TC20108* and the deleterious effects observed which

could turn the gene into a possible candidate vaccine antigen effective for the development of a new vaccine.

(Key words: *Rhipicephalus microplus*, RNAi, Fitness)

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar le agradezco a Dios, por haberme guiado hasta esta oportunidad y darme la capacidad para adquirir todos los conocimientos aprendidos. Así como cada una de las bendiciones que obtuve en el desarrollo de mi maestría.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Medicina por permitirme ser parte del cuerpo académico y darme la oportunidad de enriquecerme en conocimientos y a nivel personal. Agradezco a cada uno de los docentes y administrativos que se encontraron implicados en la admisión, desarrollo y finalización de mi posgrado, brindándome sus conocimientos y apoyo.

Agradezco principalmente a mi asesor de tesis el Dr. Ricardo Francisco Mercado Curiel por haberme brindado la oportunidad de aprender con él. Aumentar mi capacidad y conocimiento científico con sus orientaciones, manera de trabajar, persistencia, paciencia y motivación en mi formación como investigadora.

Agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), el cual me permitió desarrollarme con tranquilidad a lo largo de la maestría, así mismo, agradezco los productos generados de este proyecto.

Agradezco a cada una de las personas con las que me tope en el desarrollo de mi posgrado, ya que me aconsejaron y apoyaron en todo momento, fomentado mi crecimiento personal y profesional.

Agradezco a mi familia, por estar ahí siempre que lo necesite apoyándome y dándome los ánimos necesarios para seguir adelante e impulsándome en mi desarrollo profesional.

Finalmente le agradezco a mi esposo, por su apoyo incondicional y su comprensión, por acompañarme en las noches de desvelo y en las alegrías que viví a lo largo de la maestría.

TABLA DE CONTENIDOS

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	3
2.- ANTECEDENTES	4
2.1.- <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.2.- MORFOLOGÍA.....	7
2.3.- CICLO BIOLÓGICO	9
2.4.- PARÁMETROS BIOLÓGICOS.....	12
2.5.- MÉTODOS DE CONTROL	14
2.6.- <i>TC20108</i>	20
2.7.- RNA DE INTERFERENCIA	22
2.8.- DETERMINACIÓN DE LA PROBABLE FUNCIÓN DE UN GEN	24
3.-JUSTIFICACIÓN	28
4.-OBJETIVOS	29
4.1.-OBJETIVO GENERAL.....	29
4.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4.3.-HIPÓTESIS	29
5.- METODOLOGÍA.....	30
5.1.- ANIMALES EXPERIMENTALES Y GARRAPATAS	30
5.2.- RNA PEQUEÑO DE INTERFERENCIA	30
5.3.- ADMINISTRACIÓN DE GARRAPATAS CON siRNA.....	31
5.4- EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOLÓGICOS.....	32
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.- CONCLUSIONES.....	43
8.-REFERENCIAS.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación general de las garrapatas.	5
Figura 2. Imagen de los quelíceros e hipostoma de <i>Rhipicephalus microplus</i>	7
Figura 3. Imagen de cuerpo completo de <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
Figura 5. Hembra de <i>Rhipicephalus microplus</i> durante el proceso de alimentación.	12
Figura 6. Situación zoonositaria actual de la campaña contra <i>Boophilus spp</i>	14
Figura 7. Genes de <i>Rhipicephalus microplus</i> altamente regulados positivamente debido a la alimentación.	21
Figura 8. Mecanismo del RNA de interferencia.	24
Figura 9. Impacto global de la administración del siRNA sobre la viabilidad biológica de <i>Rhipicephalus microplus</i>	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Estudios donde se han utilizado RNA de interferencia.	26
Tabla 2. Secuencia del siRNA específico para <i>TC20108</i>	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico 1. Efecto de la administración del siRNA sobre la tasa de mortalidad en hembras adultas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	34
Gráfico 2. Efecto de la administración del siRNA sobre el peso de las hembras de <i>Rhipicephalus microplus</i>	¡Error! Marcador no definido.
Gráfico 3. Efecto de la administración del siRNA sobre la oviposición de hembras alimentadas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	¡Error! Marcador no definido.
Gráfico 4. Efecto de la administración del siRNA sobre la eclosión de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	¡Error! Marcador no definido.

1.- INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son arácnidos hematófagos de la familia *Ixodidae* que parasitan a humanos y animales. Las infestaciones por garrapatas son de gran importancia médica y veterinaria a nivel mundial ya que pueden transmitir una amplia variedad de agentes patógenos a sus hospederos vertebrados (Anderson, 2008) .

Dentro de los agentes patógenos que colonizan o infectan a las garrapatas se encuentran virus, bacterias y protozoos, los cuales se propagan y acumulan en el intestino medio, hemolinfa, glándulas salivales o los ovarios (De La Fuente, y cols., 2005). Esto hace que las garrapatas se constituyan como el grupo más significativo de artrópodos, siendo su importancia vectorial comparable a la de los mosquitos (León, 2011). *Rhipicephalus microplus* es la especie de garrapatas más nociva para la ganadería bovina en México, y está presente en más de la mitad del territorio nacional (SAGARPA 2011; Alonso Díaz y cols., 2012). Se ha documentado que por cada hembra de *Rhipicephalus microplus* alimentada se pierden en promedio 8.9 mL de leche/día y 1 g de peso corporal al día por bovino (Jonsson, y cols., 1998).

El control de la infestación con garrapatas se ha basado principalmente en la aplicación de acaricidas, cuyo uso ocasiona serios inconvenientes como la contaminación de la leche y los productos cárnicos, así como el desarrollo de resistencia y contaminación ambiental (Abbas, y cols., 2014).

La vacunación es otro método de control empleado contra las garrapatas, sin embargo a pesar del impacto de las enfermedades transmitidas por vectores sobre la salud humana y animal, se poseen pocas vacunas eficaces y persisten como las amenazas más importantes para la salud de los animales domésticos (Melendez, 2000).

La identificación de genes esenciales para la supervivencia de la garrapata permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para el control del vector y los patógenos transmitidos. En los últimos años se ha obtenido información valiosa

sobre algunos genes implicados en el desarrollo de las garrapatas, su alimentación y su reproducción.

La alimentación es una de las actividades fundamentales para que la garrapata subsista y se reproduzca, ya que, le permite efectuar cada uno de sus estados de desarrollo. *TC20108*, es un gen homólogo de una proteína A de unión a inmunoglobulina G (IGBP), identificada en el 2011 por Mercado-Curiel y cols. al observar su sobreexpresión durante la alimentación de *Rhipicephalus microplus*. Las IGBP ejercen la función de unirse a la región constante (Fc) de los anticuerpos, una vez unidos, estos son llevados a las glándulas salivales para ser expulsados del cuerpo de la garrapata. Aunque el mecanismo se desconoce, se ha observado su presencia en altas concentraciones en las glándulas salivales a diferencia del intestino medio, actuando así como un sistema de defensa contra las inmunoglobulinas ingeridas durante la alimentación. En este contexto, las IGBPs son moléculas críticas, que pueden contribuir a las estrategias que las garrapatas usan para protegerse de los anticuerpos del huésped durante la alimentación (Wang & Nuttal, 1998).

El estudio de las interacciones y probable función de los genes pueden ser abordados a través de diversas técnicas como la proteómica cuantitativa, los microarreglos de expresión y el RNA de interferencia, mostrando esta última ser prometedora para el desarrollo de estrategias para el control de garrapatas y la prevención de infestas, (Willadsen, 2006).

1.1.- DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Las garrapatas representan un serio problema para la industria ganadera en México y el mundo ya que los acaricidas como método de control no aseguran la disminución de las infestas ni la transmisión de patógenos, además generan resistencia en las poblaciones de garrapatas y la contaminación de los productos obtenidos del bovino. Los costos globales anuales estimados asociados con las garrapatas y los patógenos transmitidos por estas superan los \$14000 millones de dólares (Rosario-Cruz, y cols., 2016).

En 2014 la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en su campaña nacional de control de garrapatas del ganado en México informó que el 65% del territorio nacional está infestado con *Rhipicephalus microplus*. Con base en esta información, el número estimado de bovinos en riesgo de infestación es de 24' 973,983 y la pérdida económica total atribuible a *Rhipicephalus microplus* podría aproximarse a \$573' 608,076 dólares (Rodríguez-Vivas, y cols., 2017).

La identificación de genes esenciales para el desarrollo, crecimiento y reproducción de la garrapata permitirá desarrollar nuevas estrategias de control que disminuyan los daños producidos por las garrapatas al ganado además del índice de las enfermedades transmitidas, y consecuentemente la disminución de la pérdidas económicas en la producción agropecuaria.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- *Rhipicephalus microplus*

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos, capaces de transmitir una amplia variedad de agentes infecciosos a diversos organismos lo que las convierte en un grupo significativo de vectores artrópodos de importancia comparable con la de los mosquitos (León, 2011). Esta característica es conocida como capacidad vectorial y es determinada por múltiples factores propios del vector, del agente, del ambiente y del receptor (Anderson, 2008). De manera particular en las garrapatas, únicamente el 10% de todas las especies conocidas actúa como un reservorio, donde el agente se multiplica y/o se transforma para finalmente transmitirse de generación en generación.

Se conocen aproximadamente 899 especies de garrapatas, las cuales se agrupan en dos grandes familias; garrapatas duras (ixódidos) (**Ver Figura 1**) y blandas (argásidos). Las garrapatas duras, abarcan en su totalidad, a todas las especies transmisoras de enfermedades de importancia clínica (Anderson, 2008), conduciendo a problemas de salud pública como potenciales amenazas de enfermedades zoonóticas (Rodríguez-Vivas, y cols., 2014).

Experimentalmente se ha demostrado que numerosos artrópodos son capaces de transmitir la anaplasmosis; por lo menos, 19 especies de garrapatas la transmiten, la mayoría son únicamente vectores mecánicos: *Boophilus decoloratus*, *Boophilus microplus*, *Dermacentor variabilis*, *Hyalomma lusitanicum*, *Hyalommastia aegyptium*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*, *Ornithodoros lahorensis*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus evertsi*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Argas persicus* (Gasque, 2008).

Rhipicephalus microplus es una garrapata dura considerada como el vector principal de patógenos como *Anaplasma marginale* y *Babesia bovis*. Son las infecciones más frecuente del ganado en el mundo donde la anaplasmosis es responsable de al menos 50,000-100,000 muertes por año, con pérdidas económicas que van desde 30 hasta 60 millones de dólares (USDA, 1999), ya

que, causa una enfermedad hemolítica que va de leve a severa (Kocan, y cols., 2010).

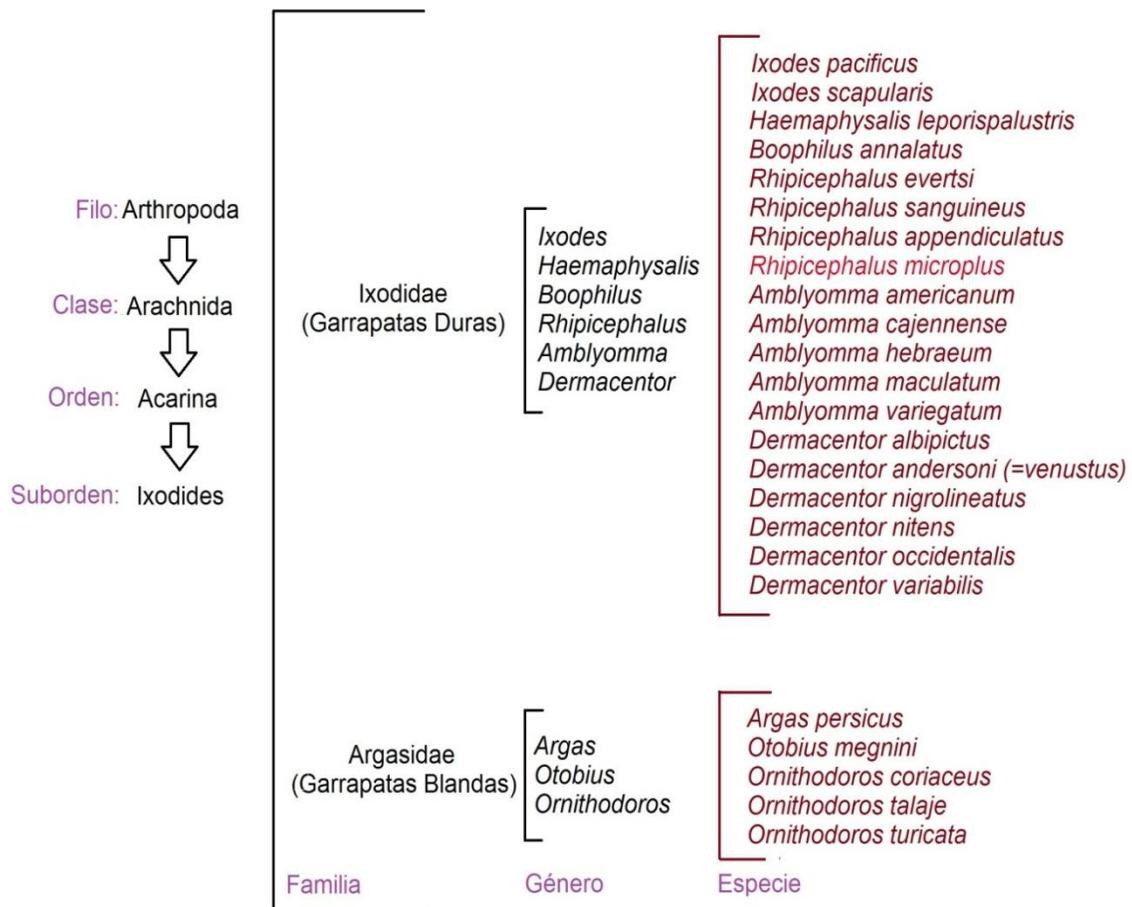


Figura 1. Clasificación general de las garrapatas.

Las garrapatas duras son las que principalmente se encuentran implicadas en el mantenimiento y transmisión de diferentes tipos de patógenos de interés clínico y económico. *Rhipicephalus microplus* es una garrapata dura considerada como el vector principal de patógenos como *Anaplasma marginale* y *Babesia bovis*. (Strickland, y cols., 1976).

Por ello de vital importancia es la capacidad de muchos artrópodos de actuar como vectores biológicos y anfitriones intermediarios en la transmisión y el desarrollo de los ciclos vitales de virus, bacterias y protozoos.

Rhipicephalus microplus es la principal amenaza económica para la industria ganadera en las zonas tropicales, subtropicales y templadas del mundo (Rodríguez-Vivas, y cols., 2010). Causa grandes pérdidas económicas a los

productores de ganado a través de efectos físicos directos sobre el animal parasitado e indirectamente a través de la transmisión de enfermedades de los agentes infecciosos tales como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Solorio-Rivera, y cols., 1999). Además de los costos elevados de los productos químicos, mano de obra, equipos, mantenimiento de las zonas y límites libres de garrapatas y las pérdidas de producción asociados con el tratamiento (White, y cols., 2003).

En el último estudio publicado en México, el costo estimado de las pérdidas de producción y el control de *Rhipicephalus microplus* así como sus enfermedades de transmisión se estimó en \$10 mil millones de dólares por año (Rodríguez-Vivas, y cols., 2017).

Cada garrapata hembra alimentada de *Rhipicephalus microplus* puede reducir 0.6 gramos de peso corporal en el ganado, de los cuales el 65% se atribuye a la infestación por garrapatas (estrés y la anorexia a causa de la irritación por la garrapata) y el 35% a la pérdida de sangre tomada por las garrapatas. Se estima que cada hembra alimentada es responsable de la pérdida de 8.9 ml de producción diaria de leche (Jonsson, y cols., 1998).

Las garrapatas como otros muchos parásitos, pueden dispersarse fácilmente mediante sus hospederos, puesto que permanecen sobre ellos durante largos periodos, siendo así transportadas a distintos lugares (Strickland, y cols., 1976). Tras alimentarse, se desprenden del hospedero en un nuevo lugar, pueden mudar y reproducirse allí, alimentarse sobre los hospedero locales y generar una nueva población. Ello tiene gran relevancia en la dinámica de las enfermedades que transmiten y el riesgo de incursión de nuevos patógenos en áreas donde antes no estaban presentes (Sonenshine, 1991).

Entre otros factores, el cambio climático puede tener un efecto adverso sobre la distribución de las garrapatas. Se prevé que más del 50% de las especies de garrapatas del género *Rhipicephalus* podría ampliar su presencia, con más del 70% de esta expansión con especies de importancia económica tales como

Rhipicephalus appendiculatus, *Rhipicephalus microplus*, o *Rhipicephalus decoloratus* (White, y cols., 2003).

Independientemente de la familia a la que pertenezca la garrapata, la mayoría se caracteriza por presentar ciclos de vida complejos, donde la alimentación es necesaria para desarrollar cada una de sus etapas de crecimiento y para la reproducción una vez iniciado su etapa adulta (Anderson, 2008).

2.2.- MORFOLOGÍA

El cuerpo de la garrapata se caracteriza por la fusión de la mayoría de los segmentos en dos partes. La cabeza (**Ver Figura 2**) se compone de las partes de la boca (hipostoma y quelicera) y palpos, en donde los quelíceros están adaptados para perforar y desgarrar la piel del hospedador, el hipostoma ayuda a mantener fuertemente fijadas a las garrapatas y los palpos son de uso sensorial para poder diferenciar géneros y especies.

El idiosoma o cuerpo de la garrapata, incluye la región a la que se unen las patas, el poro genital, y la abertura anal (Sonenshine, 1991). Desarrollan un cuerpo aplanado con distinta superficie dorsal y ventral sin una sutura lateral que divida las partes superior e inferior (Dantas-Torres, 2010).



Figura 2. Imagen de los quelíceros e hipostoma de *Rhipicephalus microplus*.

Microscopía electrónica de la región ventral del condilo de la hembra adulta de *Rhipicephalus microplus* a una escala de 50 μm . P= palpo, C= quelíceros, H= hipostoma (Anderson, 2008).

Una cutícula extensible que a menudo es muy esculpida (**Ver Figura 3**) cubre las partes superior e inferior de la garrapata generalmente con una cutícula dura representada por pequeños discos que sirven como sitios de unión para los músculos. La cabeza está situada ventralmente hacia la parte anterior del cuerpo en adultos y frecuentemente en ninfas. Por otro lado se coloca apicalmente en larvas y algunas ninfas. Las larvas tienen seis patas, y las ninfas y adultos tienen ocho patas (Anderson, 2008).

Las garrapatas adultas macho y hembra son claramente diferentes. Un escudo de la cutícula dura cubre un tercio de la parte superior del cuerpo de garrapatas hembras, en el macho toda la superficie dorsal está cubierta por la cutícula dura. Las larvas y las ninfas tienen superficies dorsales similares a las hembras adultas, excepto el escudo endurecido que tiende a ser más grandes y las hembras adultas aumentan de tamaño enormemente durante la alimentación. Hay pocos cambios en la longitud del cuerpo en machos adultos después de la alimentación (Randolph, 1998).

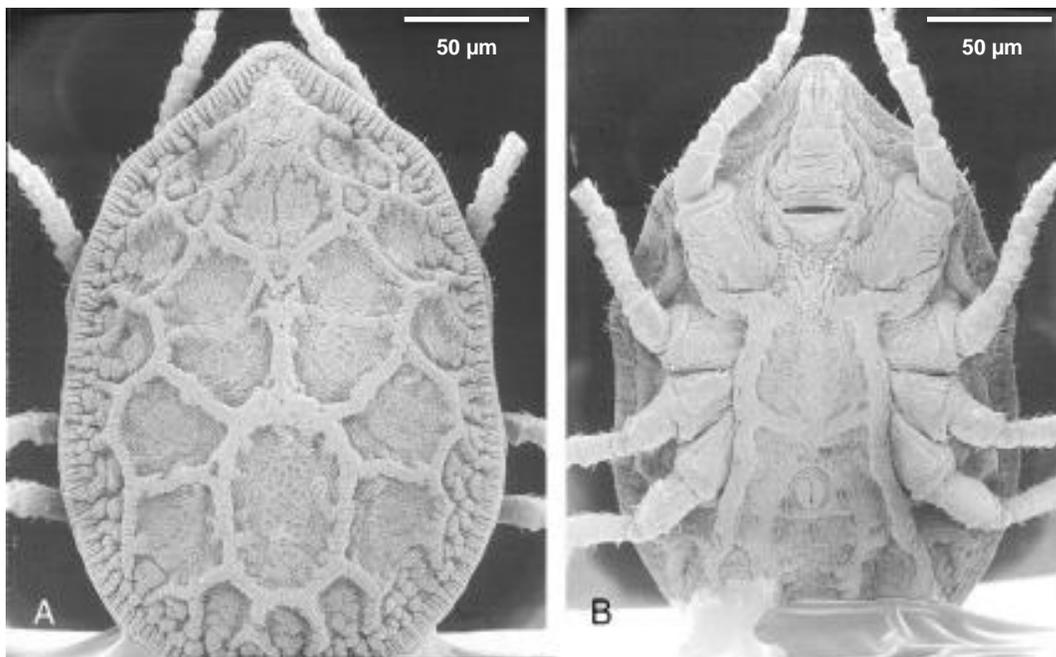


Figura 3. Imagen de cuerpo completo de *Rhipicephalus microplus*. Microscopía electrónica de la región dorsal (A) y ventral (B) a una escala de 50 µm. (Anderson, 2008).

2.3.- CICLO BIOLÓGICO

Está constituido por cuatro estados de desarrollo (huevos, larvas, ninfas y adultos), siendo todos ellos, excepto los huevos, parásitos hematófagos. Existen 3 tipos de ciclos biológicos: trifásico, difásico y monofásico (Anderson, 2008). En el ciclo trifásico hay tres hospederos para cada generación de garrapatas y una única fase de alimentación por estado, la cual es seguida por la caída de la garrapata al suelo y la fase de muda. El nuevo estado recién surgido espera a que un hospedero pase para continuar el ciclo de desarrollo. En el ciclo difásico hay dos hospederos para cada generación de garrapatas. La larva muda a ninfa en el primer hospedero. Finalmente en el ciclo monofásico todas las mudas se producen en el mismo hospedero. La duración del ciclo biológico varía de una especie a otra según el clima y el comportamiento del hospedero (Dantas-Torres, 2010).

La mayor parte de las garrapatas, presentan un comportamiento de búsqueda que consiste en escalar sobre la vegetación, extender sus extremidades anteriores y esperar a que los hospederos pasen y se rocen con la vegetación. Cuando esto sucede, la garrapata se libera de la vegetación y se arrastra sobre el hospedero. Pese a que pueden adherirse sobre cualquier lugar del animal, los sitios más comunes son áreas de piel fina como la cabeza (particularmente las orejas), la espalda, la región inguinal y escrotal, y las axilas (Anderson, 2008).

Rhipicephalus microplus tiene un ciclo biológico monofásico (**Ver Figura 4**), donde, las tres primeras etapas de desarrollo; larvas, ninfas y adultos (machos y hembras), se alimentan, mudan y copulan sobre el mismo individuo, además de una fase de vida libre que se cumple fuera del hospedero en las pasturas (Nava, y cols., 2010).

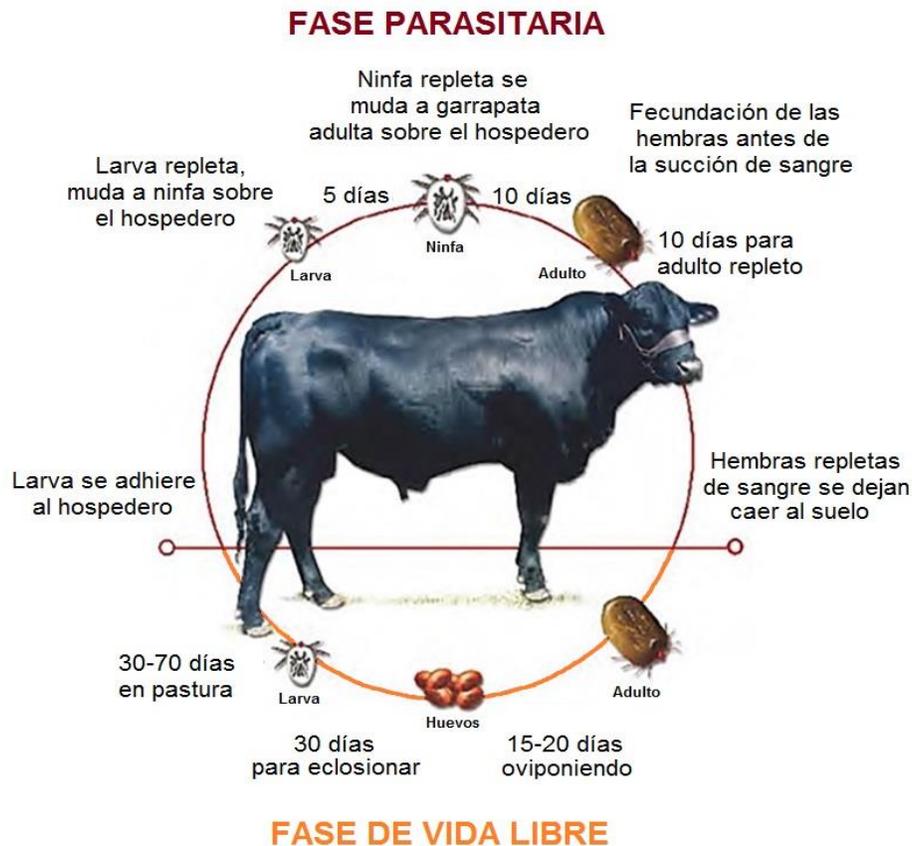


Figura 4. Ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus*.

Los tres estadios parasitarios; se alimentan, mudan y copulan sobre el mismo individuo. La fase de vida libre se cumple fuera del hospedero en las pasturas.

Las larvas son pequeñas, de color marrón, provistas de 3 pares de patas con un pequeño escudo en la parte dorsal del cuerpo. Sobre el bovino las larvas comienzan a alimentarse para mudar al estado siguiente de ninfa. Estas últimas tienen 4 pares de patas, son de color marrón claro y hacia el día 12 aproximadamente se ingurgitan con sangre completamente (metaninfa). Las ninfas mudan sobre el hospedero a adultos (machos y hembras), estos copulan, las hembras se ingurgitan con sangre y finalmente caen al suelo para desovar (Anderson, 2008).

Las etapas de desarrollo sobre el hospedero tienen una duración normal de 23 días. La duración del período de alimentación varía según el estado de desarrollo, la especie de garrapata y el hospedero (Randolph, 1998). Siguiendo el

patrón de alimentación de una hembra como modelo descriptivo, se pueden diferenciar dos etapas: la etapa lenta y la etapa rápida.

La etapa lenta puede durar varios días en algunas especies. Se produce un aumento de peso de 2 a 50 mg y de 4 veces en tamaño. La etapa rápida se produce de 12 a 36 horas antes del desprendimiento. Se alternan fases de succión y salivación con regurgitación, siendo procesos de gran importancia para la transmisión de patógenos. El peso aumenta de 50 a 250 mg (a menudo la hembra aumenta 100 veces su peso corporal) y el tamaño se incrementa 15 veces (**Ver Figura 5**). Hay una absorción de 4.000 mg de sangre, dependiendo la etapa de desarrollo, además de que se produce una adaptación corporal al gran volumen ingerido.

La fase de vida libre comienza cuando las hembras alimentadas (teleoginas) se desprenden del bovino y caen al suelo para poner sus huevos. Esta fase se subdivide en tres períodos:

- El periodo de pre-oviposición, el cual define el espacio de tiempo transcurrido entre la caída de la hembra alimentada y la oviposición de los primeros huevos, que normalmente es de 2 a 6 días, aunque puede extenderse hasta un mes en otoño o invierno (Nava, y cols., 2010).
- El periodo de oviposición abarca desde que las teleoginas comienzan la oviposición hasta que ponen su último huevo. Las teleoginas habitualmente ponen en el suelo entre 2.000 y 3.000 huevos, en sitios protegidos de las radiaciones solares directas (Nava, y cols., 2010).
- El periodo de incubación es aquel que transcurre desde la oviposición hasta la eclosión de las larvas, cuya duración puede variar entre 20 y 45 días dependiendo mayormente de la temperatura ambiente (Nava, y cols., 2010).



Figura 5. Hembra de *Rhipicephalus microplus* durante el proceso de alimentación.

Aumento de tamaño de la hembra de *Rhipicephalus microplus* durante su alimentación; la sangre ingerida pasa a cada uno de los órganos que posee la garrapata. (León, 2011).

Las larvas que se encuentran en la vegetación ascienden a un bovino, para continuar con su ciclo biológico, que a diferencia de la fase de vida libre, es escasamente influida por las condiciones ambientales (Randolph, 1998).

2.4.- PÁRAMETROS BIOLÓGICOS

Los parámetros biológicos pueden considerarse como elementos relevantes que pueden examinarse durante el desarrollo de un ser vivo. Para comprender un poco más la definición de parámetro biológico, el concepto de “aptitud biológica” resulta muy útil porque reúne en una sola idea la importancia en la selección natural de la supervivencia, del encontrar pareja y de la reproducción (Orr, 2009). Es decir, el individuo más apto no es necesariamente el más fuerte, el más rápido ni el más grande, si no aquel con la capacidad de sobrevivir, encontrar una pareja y producir descendientes dejando sus genes en la siguiente generación (Sober, 2001).

La selección natural es un fenómeno que establece que las condiciones de un medio ambiente pueden favorecer o dificultar la reproducción de los organismos vivos según sean sus habilidades o características (Haldane, 1957). Los organismos pueden sobrevivir en un ambiente determinado porque poseen diversas capacidades, es decir, diversos rasgos que afectan positivamente a su aptitud biológica. Para que un ser vivo transmita sus genes a la descendencia, debe crecer hasta llegar al tamaño adulto, ser capaz de sobrevivir hasta el momento de reproducción y reproducirse (Sober, 2001).

Los organismos disponen de una serie de recursos (energía, nutrientes, sustancias orgánicas) para llevar a cabo sus funciones vitales. Estos recursos deben repartirse en el mantenimiento, crecimiento y reproducción (Orr, 2009).

En el caso particular de *Rhipicephalus microplus* se pueden considerar algunos puntos relevantes durante su ciclo de vida, los cuales pueden ser medidos y que se requieren cumplir de manera adecuada para que las poblaciones prevalezcan en el tiempo.

- Tasa de mortalidad. Específica la proporción de garrapatas que mueren después del periodo de alimentación. Disminuyendo las poblaciones del vector en caso de presentarse de manera prominente.
- Alimentación. Es importante, ya que el ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus* depende de esta acción. Cada una de sus etapas de desarrollo las ejecuta en un único hospedero, obteniendo así los nutrientes necesarios para pasar a cada una de ellas.
- Repleción. Alude a la acción que realizan las garrapatas hembra en la etapa adulta para el llenado de sangre.
- Oviposición. La garrapata hembra debe ser capaz de formar los huevos y de ovipositarlos o en caso contrario simplemente no habrá descendencia.
- Eclosión. La viabilidad de los huevos culmina con la eclosión de larvas para comenzar un nuevo ciclo.

Significa entonces que durante el ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus* se cuenta con parámetros biológicos cuantificables que nos permiten tener idea del grado de cumplimiento del propósito fundamental de la “aptitud biológica”: la reproducción. En conjunto estos parámetros nos permiten evaluar la viabilidad y el desarrollo de la garrapata.

2.5.- MÉTODOS DE CONTROL

Las garrapatas son un problema constante tanto para los grandes productores de ganado como para los pequeños agricultores familiares. El control se ha intentado principalmente mediante la aplicación de acaricidas (**Ver Figura 6**), un método acompañado de graves inconvenientes, tales como la contaminación ambiental, de los alimentos, la seguridad de los trabajadores, los crecientes costos y la selección de poblaciones de garrapatas resistente a los acaricidas.

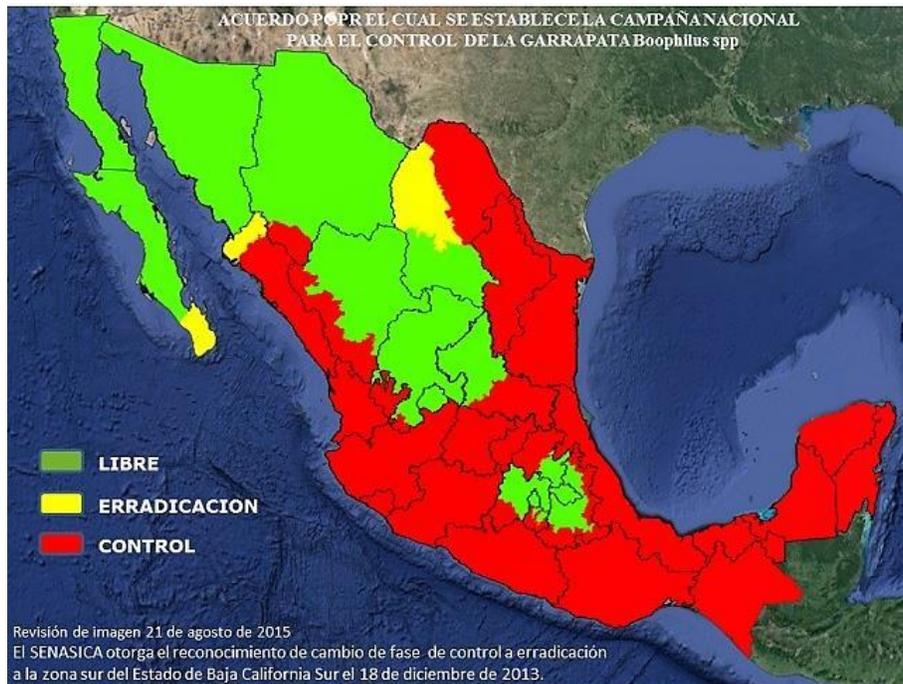


Figura 6. Situación zoonosanitaria actual de la campaña contra *Boophilus spp*

Zonas en fase libre.- ocupa una porción importante del norte del país, así como áreas del centro; comprende 94.4 millones de hectáreas las cuales equivalen al 47.88% del territorio nacional. Zonas en fase de erradicación.- cuentan con 1.1 millones de hectáreas que se ubican en las áreas en las cuales el parásito ha

sido eliminado por efectos de la campaña y representan un 0.57%. Zonas en fase de control.- alcanzan una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país (SAGARPA, 2014).

El control químico es el método más utilizado en la mayoría de los casos debido a la disposición con la que se encuentra para el productor. El control de patógenos se ha centrado en cualquiera de los insecticidas que matan el propio vector o antimicrobianos para los vacunos infectados. La limitación de la primera es que se dirige tanto a los vectores infectados y no infectados y selecciona a las poblaciones resistentes mientras que el segundo requiere un diagnóstico rápido y preciso.

Se han utilizado muchas clases de fármacos como acaricidas para tratar las garrapatas de ganado, esto incluye organofosfatos (OP), piretroides sintéticos (SP), amidinas y lactonas macrocíclicas (MLs).

Los organofosfatos son ésteres neutros de ácido fosfórico o su análogo y actúan inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa (AChE). El OP imita la estructura de la acetilcolina (Ach) y cuando se une a la AChE causa la transfosforilación de la enzima. La AChE transfosforilada es incapaz de romper la acumulación de Ach en la membrana post-sináptica que conduce a la parálisis neuromuscular (Taylor, 2001).

El término "piretroide" se usa comúnmente para designar un insecticida sintético que se deriva estructuralmente de las piretrinas naturales. El modo de acción de los piretroides ha sido estudiado usando preparaciones de nervios vertebrados y no invertebrados.

Colectivamente, estos estudios muestran que los piretroides causan la apertura prolongada de los canales de sodio en los nervios, músculos y otras células excitables, principalmente inhibiendo la desactivación del canal y estabilizando la configuración abierta del canal de sodio. La actividad letal de SP parece implicar la acción en neuronas periféricas y centrales (Soderlund, y cols., 2002).

Las amidinas son antagonistas de los receptores de la octopamina en el cerebro de los parásitos: provocan hiperexcitabilidad y seguidamente parálisis y muerte. La excitación hace también que las garrapatas no logren fijarse al hospedador para chupar sangre. También poseen un cierto efecto repelente lo que hace que muchas garrapatas se desprendan del hospedador antes de morir, o que ni siquiera se suban al animal tratado (Rodríguez-Vivas, y cols., 2010).

Los LM son fármacos antiparasitarios de amplio espectro, ampliamente utilizados en medicina veterinaria. Se conocen como compuestos "endectocidas" basados en su única actividad contra parásitos externos e internos.

Las avermectinas, milbemicinas y espinosinas se denominan colectivamente MLs que comprenden varias clases de productos químicos derivados de cultivos de microorganismos del suelo (Soberanes, y cols., 2002).

Específicamente en México, la industria farmacéutica informó (Organización de las Naciones Unidas, 2003) que la ivermectina es el antihelmíntico preferido para controlar las garrapatas en el ganado. Sin embargo, la resistencia a los acaricidas organofosforados (OP) se desarrolló por primera vez en la década de 1980, y la resistencia a la piretroides sintéticos (SP) surgió en la década de 1990. Existen reportes de poblaciones de *Rhipicephalus microplus* resistentes a la ivermectina en Brasil, Uruguay y México (Klafke, y cols., 2006).

El "Amitraz" se introdujo junto con SP para controlar las garrapatas resistentes a OP en 1986. Inicialmente, "Amitraz" no fue utilizado ampliamente, debido a su alto costo, pero su uso se hizo más frecuente e intensivo después de la resistencia a los SP en 1993 (Fragoso-Sanchez, y cols., 2011).

En México el primer caso de resistencia al "Amitraz" en *Rhipicephalus microplus* fue confirmado en el 2001 en un rancho en el estado de Tabasco (Soberanes, et al., 2002). Así mismo en el 2013 se reportó la resistencia de *R. microplus* al fipronil en los Estados del Norte (Miller, y cols., 2013).

En el 2006 Rodríguez-Vivas y colaboradores, estudiaron 98 poblaciones de campo de *Rhipicephalus microplus* en Yucatán, México, y se encontró que el 63, 61 y 59% de las poblaciones de garrapatas fueron resistentes a flumetrina, deltametrina y cipermetrina, respectivamente. Además, en el 2007 Rodríguez-Vivas y colaboradores estudiaron 217 poblaciones de *Rhipicephalus microplus* y determinaron la prevalencia (medida por bioensayos) de la resistencia a MSF, PO y “Amitraz” en el sur de México, además de que también encontraron la resistencia a SP como la deltametrina, cipermetrina y flumetrina. Fue considerado uno de los problemas más graves en el trópico mexicano (66-96% de fincas mostró resistencia a los SP).

Hasta el 2012, en México, no había informes de una población de *Rhipicephalus microplus* resistentes a las principales de acaricidas (OP, SP y AM) y lactonas macrocíclicas (ML) (Fernández-Salas, y cols., 2012). Sin embargo, ha desarrollado resistencia a todas las principales clases de acaricidas en las últimas décadas debido a su uso intensivo (Rodríguez-Vivas, y cols., 2012).

Se han reportado diversas formas de resistencia que poseen las garrapatas. Actualmente se considera que en México *Rhipicephalus microplus* es resistente a la mayoría de los acaricidas, ya que se han reportado la presencia de garrapatas dobles resistentes, siendo dos grupos específicos: uno que incluyen a los acaricidas organoclorados y organofosforados [OP], y otro que incluye a los piretroides sintéticos [SP] y OP. También se han reportado garrapatas triple resistentes que incluyen a los OP, SP y las amidinas [AM] (Abbas, y cols., 2014). Lo anterior pone de relieve la gravedad de la situación y la importancia de tener una estrategia de manejo (Rodríguez-Vivas, y cols., 2014).

La vacunación es otro método de control empleado contra las garrapatas, varias enfermedades de animales domésticos han sido controladas y erradicadas a través de la aplicación de los programas de vacunación sostenidos con éxito. A diferencia de estas victorias de control sobre las enfermedades virales, varias enfermedades hemoparasitarias y sus vectores en los trópicos aún persisten como

las amenazas más importantes para la salud de los animales domésticos (Melendez, 2000).

La vacunación es una alternativa ecológica para el control de vectores que permite el control de varias enfermedades afectando únicamente a su vector común. A pesar del impacto de las enfermedades transmitidas por vectores sobre la salud humana y animal, se poseen pocas vacunas eficaces (Rodríguez-Vivas, y cols., 2014).

La primera vacuna contra la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*, fue desarrollada, patentada y comercializada en Australia en 1994 bajo el nombre de “TickGARD” (Willadsen, y cols., 1995), utilizando como antígeno una glicoproteína del intestino medio; conocida como “Bm86”. El lanzamiento del producto tomó más de 12 años de desarrollo y ensayos con aproximadamente 18.000 bovinos.

Una vacuna similar usando básicamente el mismo antígeno se desarrolló en Cuba, también en la década de 1990, bajo el nombre comercial de “Gavac” (Canales, y cols., 1997). Resultados desfavorables para “TickGARD” llevaron a que años más tarde ya no estuviera disponible comercialmente. Sin embargo, “Gavac” sigue comercializándose hoy en día, sobre todo en América del Norte y del Sur, a pesar de que los resultados de eficacia son muy variables y la aceptación de este producto no está muy extendida.

Las vacunas basadas en antígenos de *Rhipicephalus microplus*; Bm86 y Bm95 demostraron su eficacia para el control de infestaciones y la transmisión de patógenos en algunas regiones. Sin embargo, el efecto en la transmisión de patógenos es el resultado de la reducción de las poblaciones de garrapatas y no un efecto sobre la capacidad vectorial de la garrapata (De La Fuente, 2012).

En el 2010 Almazan y cols., informaron de una eficacia del 51% en un ensayo de vacunación en México que evaluó “Subolesin” recombinante expresada en *Escherichia coli*. Probando simultáneamente con el antígeno Bm86 produjo una eficacia del 60%. En el mismo estudio, la eficacia de “Subolesin y Bm86” contra

una segunda especie de garrapata, *Rhipicephalus annulatus*, reportó un 60% y un 100%, respectivamente. Los autores observaron respuestas de anticuerpos subóptimas de los bovinos vacunados y concluyeron que los animales no estaban en las mejores condiciones de salud para una prueba de evaluación de la vacuna.

Los resultados se seguirían considerando bajos, lo que implicaría sólo una mejora marginal sobre el rendimiento del antígeno basado en Bm86. En el 2012, el mismo grupo informó de mejoras en las condiciones de expresión y purificación de antígenos que mejoraron la eficacia hasta un 81% contra *Rhipicephalus microplus* (Almazan, y cols., 2012).

Este nivel de eficacia presentó a “Subolesin” como el antígeno más viable para la generación de una vacuna para *Rhipicephalus microplus*. Aunque la función exacta de “Subolesin” no se conoce con precisión, se sugiere que tiene un papel en el mantenimiento de la inmunidad innata de la garrapata contra patógenos específicos (Zivkovic, y cols., 2010). Los resultados aguardan a ser validados en diferentes regiones del mundo.

Aunque las vacunas basadas en Bm86 presentan variabilidad en eficacia documentada en el campo, han demostrado ser útiles en programas de gestión integrada pudiendo reducirse el uso de acaricidas.

Ferritina 2 es otro antígeno que se ha evaluado en ensayos de ganado. Es una proteína de almacenamiento de hierro secretada predominantemente en el intestino. El tratamiento mediante RNA de interferencia mostró un impacto significativo en la alimentación, la oviposición así como la eclosión de las larvas. Los autores reportaron 64% de eficacia contra *Rhipicephalus microplus* y el 72% de eficacia contra *Rhipicephalus annulatus* en los ensayos de vacunación de ganado en México. En los mismos ensayos, Bm86 tenía 60% y 100% de eficacia contra *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus*, respectivamente (Hajdusek, y cols., 2009).

Se espera que la identificación de nuevos genes esenciales permita el desarrollo de vacunas contra las garrapatas, los cuales pueden reducir las

poblaciones de vectores y/o su competencia vectorial, disminuyendo el daño debido a la infesta y a la transmisión de patógenos en el hospedero mamífero.

2.6.- TC20108

El genoma de *Rhipicephalus microplus* no se encuentra secuenciado, sin embargo, la información que aporta una librería de cDNA normalizada que nos permite tener una pauta para conocer el repertorio de genes que se expresan en dicho organismo. La secuencia del gen *TC20108* muestra homología a una proteína A de unión a inmunoglobulina G (IGBPA) (Guerrero, y cols., 2005) y se ha observado una regulación positiva de su expresión en respuesta a la alimentación de *Rhipicephalus microplus* (Mercado-Curiel, y cols., 2011).

Para la construcción de la librería llamada BmiGI V2.1 (*Boophilus microplus Gene Index Version 2.1*), garrapatas de ambos sexos en diferentes estadios de desarrollo fueron sometidas a diferentes tratamientos, incluyendo la exposición a acaricida, choque térmico y la infección con *Babesia bovis*, con la intención de que estuviera representado de la mejor manera el repertorio completo de genes que se expresan en cualquier momento en dicho organismo (Guerrero, y cols., 2005). BmiGI V2.1 contiene 14.586 secuencias únicas, incluyendo 9.851 secuencias consenso (TC) y 4.735 “secuencias únicas” que se generaron a partir de la secuenciación de un total de 42,852 clonas.

Mercado-Curiel, et al., 2011 tomaron como base los datos de BmiGI V2.1 para el diseño de un microarreglo de DNA que permitió evaluar los perfiles de expresión de 14.447 genes para los cuales fue posible el diseño de 8 sondas específicas por gen. En ese estudio se observó una respuesta dramática durante la alimentación con cientos de genes regulándose en el intestino medio y en la glándula salival, de manera particular 464 genes altamente regulados positivamente con un factor de cambio entre los 8 y 293, además de 88 genes altamente regulados negativamente. Entre este conjunto de genes se identificó a *TC20108* que presenta una regulación positiva de 29.4 veces en el intestino medio (**Ver Figura 7**).

IGBPs podrían estar implicadas en la excreción de IgGs de la sangre del vacuno como un mecanismo de defensa a través de la saliva de la garrapata en etapas p... de la alimentación. La sangre ingerida contiene inmunoglobulinas específicas que pueden unirse a las proteínas de las garrapatas. Estas inmunoglobulinas son potencialmente dañinas ya que cruzan la barrera intestinal y entran en la hemolinfa, manteniendo su función biológica (Wang & Nutall, 1999). Las IGBPs se unen a la cadena pesada dentro de la región constante de los anticuerpos, lo cual dificulta la fagocitosis.

EST ID	Description	Fold change
TC20108	016012, Immunoglobulin G binding protein A (<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>)	29.4
TC20431	039781, Membrane glycoprotein (<i>Equid herpesvirus 1</i>)	20.2
TC21571	016012, Immunoglobulin G binding protein A (<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>)	15.9
CV437130	016012, Immunoglobulin G binding protein A (<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>)	15
CV443901	A3JTP3, Sensor protein (<i>Rhodobacterales bacterium HTCC2150</i>)	13
TC24722	Q4RY30, Chromosome 3 (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	11.4
TC22265	Q3VIT7, Rhodanese-like precursor (<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme BU-1</i>)	10.9
CK189840	Q7ZXB1, DNA replication licensing factor mcm7-B (<i>Xenopus laevis</i>)	8.8
TC20839	Q0D7N6: OS07g0228700 protein (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)	8.7
TC16327	A8MKG5, RNA polymerase, (<i>Alkaliphilus oremlandii OhILAs</i>)	8.6
CK174619	Q301D1, Carbohydrate kinase, PikB (<i>Streptococcus suis 88/1591</i>)	8.5

Figura 7. Genes de *Rhipicephalus microplus* altamente regulados positivamente debido a la alimentación. Genes obtenidos en la investigación de Mercado-Curiel y cols., 2011, cada uno con su número de secuencia, descripción y factor de cambio.

Se han encontrado IGBPs en especies de garrapata como *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* e *Ixodes hexagonus*, de diferentes tamaños moleculares y subtipos. Se ha descrito que se unen a diversos tipos de IgG y fueron clasificadas por su peso molecular en MA, MB Y MC. La proteína más grande, IGBP-MA (29 kDa) y posiblemente IGBP-MB (25 kDa) se une a las IgG de cuyo, mientras que la IGBP-MC (21 kDa) se une a las IgG de cuyo, humano y bovino (Wang & Nuttall, 1995).

La saliva de las garrapatas contiene productos vasoactivos, anestésicos, antiinflamatorios, inmunosupresores, anticoagulantes, citolíticos y quimiotácticos. De esta manera se suprimen la respuesta inmunitaria e inflamatoria del hospedero permitiendo a la garrapata permanecer fija alimentándose durante un periodo extenso de tiempo. Aumentando también el riesgo de transmisión y establecimiento de los agentes patógenos. Los componentes de la saliva también intervienen en el proceso de osmorregulación de la garrapata, mantenimiento de un ambiente hipertónico en el interior de la garrapata en comparación con la sangre del hospedero (Anderson, 2008).

Durante el período de alimentación, las hembras reciben ayuda de las garrapatas machos, un papel conocido como "protección del compañero" (Wang & Nuttall, 1998). Este proceso consiste en que después del apareamiento, las garrapatas machos se vuelven a pegar en estrecha proximidad con su pareja. En esta etapa, la secreción de la saliva de garrapata macho parece afectar el sitio de alimentación de la garrapata hembra (Wang & Nuttall, 1999). En el 2014, Gong, et al., encontraron un homólogo de IGBP-MB en la garrapata *Rhipicephalus haemaphysaloides* que detectaron predominantemente en las glándulas salivales de garrapatas machos.

Este tipo de estudios nos evidencian la importancia de las IGBPs en diversas especies de garrapatas. En *Rhipicephalus microplus* la inhibición de la función inmunoevasiva de las IGBPs podría tener efectos perjudiciales en el desarrollo de su ciclo de vida y podría ser un paso inicial hacia el desarrollo de una vacuna contra las garrapatas.

2.7.- RNA DE INTERFERENCIA

Está presente en todos los organismos eucariotas (excepto en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*). Se denomina quelling en hongos, silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) en plantas y RNA de interferencia (RNAi) en animales. Participa en la defensa contra virus y viroides, protege el genoma de transposones y regula la expresión génica. (Baulcombe, 2004).

Resultados recientes han proporcionado evidencia que sugiere que si bien muchos de los mecanismos básicos del RNAi son conservados evolutivamente, el papel de determinados componentes de la maquinaria del RNAi pueden variar de un organismo a otro. Los precursores de RNA de doble cadena se procesan a dúplex de RNA pequeños de interferencia (siRNA) o microRNA (miRNA) por una enzima RNasa-III como Dicer. Los dúplex de RNA son posteriormente montados en complejos efectores: RISC (Complejo de Silenciamiento inducido por RNA) que actúa a nivel citoplasmático degradando el mRNA diana, RIST (Complejo de Silenciamiento Transcripcional Inducido por RNA) cuya actividad se localiza en el núcleo celular modificando la cromatina o miRNP (Complejo ribonucleoproteico de ensamble de miRNA) que reprime la traducción del mRNA.

Saccharomyces pombe, *Caenorhabditis elegans* y los mamíferos sólo tienen un gen Dicer (Meister & Tuschli, 2004). El organismo más estrechamente relacionado con las garrapatas en el que el mecanismo de RNAi se ha caracterizado es *Drosophila melanogaster* (Nijhof, y cols., 2007).

Los siRNAs son un intermediario del mecanismo del RNAi (T. McManus & A. Sharp, 2002) y una potente secuencia específica para la degradación del mRNA (Mello & Conte, 2004).

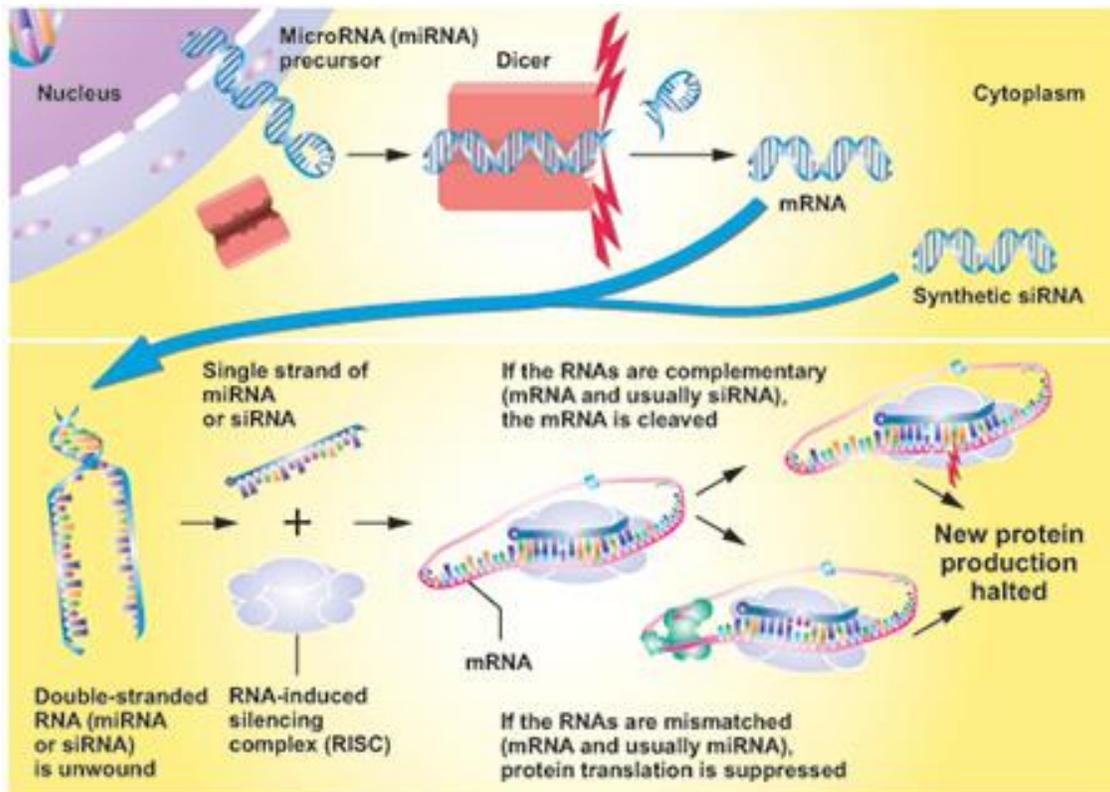


Figura 8. Mecanismo del RNA de interferencia.

Inicia mediante un precursor de RNA doble cadena o RNA de horquilla corta (dsRNA o shRNA). La enzima dicer actúa para degradar al precursor hasta generar los siRNA. Los siRNA resultantes son incorporados a un complejo denominado RISC (RNA-induced silencing complex). Durante este proceso una cadena guía antisentido se mantiene asociada al mRNA provocando su degradación.

Los precursores de DNA doble cadena son procesados por la enzima dicer. Los siRNA resultantes siguen un proceso de incorporación al RISC que se encuentra acoplado a la separación de las dos cadenas, donde solo una cadena conocida como guía, se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar el mRNA con la secuencia complementaria. Cuando las moléculas del mRNA complementarias son encontradas, la interacción entre el siRNA y este mRNA genera el corte y degradación del mRNA (**Ver Figura 8**).

2.8.- DETERMINACIÓN DE LA PROBABLE FUNCIÓN DE UN GEN

El RNAi ha demostrado ser una herramienta valiosa para el estudio de la función de los genes individuales de la garrapata y permite la identificación de moléculas esenciales para la supervivencia de las garrapatas (Wilson & Doudna,

2013), además de que aporta conocimiento de la interfaz garrapata-patógeno (De La Fuente, y cols., 2007). El RNAi se ha convertido en la técnica más utilizada y prometedora en las garrapatas y otros organismos por el desarrollo de estrategias de control por encima de otros enfoques alternativos para la manipulación genética (Willadsen, 2006).

El silenciamiento de los genes diana mediado por RNAi es incompleto (un "knock-down", no un "knockout"), aunque en algunos casos, el mRNA objetivo es indetectable incluso con ensayos de PCR ultrasensible. Los siRNAs pueden ser sintetizados química o enzimáticamente o por transfección de sistemas de vectores basados en DNA que codifican los RNA de horquilla corta (shRNAs) que se procesan de forma intracelular en siRNAs (Dykxhoorn & Lieberman, 2005).

Se han empleado diferentes métodos para administrar dsRNA en las garrapatas: la microinyección, el remojo y la producción de virus de dsRNA. La microinyección de dsRNA en las garrapatas se ha hecho de forma manual (De La Fuente, y cols., 2007, T. McManus & A. Sharp, 2002, Nijhof, y cols., 2007, Mercado-Curiel, y cols., 2014). El remojo o incubación con dsRNA ha sido utilizado con tejidos o células de garrapata en experimentos *ex vivo*, *in vivo* e *in vitro* (Nijhof, y cols., 2007). El método *ex vivo* del remojo de los órganos de garrapatas en soluciones de dsRNA ha sido ampliamente utilizado para el estudio de *Amblyomma americanum* a partir de la glándula salival de la garrapata (Bowman & Sauer, 2004). La producción de virus de dsRNA se realiza mediante la infección de las células de garrapatas con los virus de RNA (García, y cols., 2006).

Los métodos de RNAi descritos anteriormente tienen ventajas y desventajas, que dependerá del diseño y los objetivos experimentales. En particular, la inyección de dsRNA en garrapatas podría llegar a ser el método universal para el mecanismo de RNAi *in vivo* en las garrapatas, con la posibilidad de generar un elevado número de individuos tratados.

En la última década, mediante el uso del silenciamiento génico, se ha generado información valiosa sobre la función de genes implicados en el

desarrollo de la garrapata, su alimentación y su reproducción (**Tabla 1**). La identificación de genes del vector relacionados con el desarrollo de la infección y la viabilidad del vector son pasos iniciales en el descubrimiento de nuevas dianas para inhibir el desarrollo del patógeno y la subsiguiente transmisión (Mercado-Curiel, y cols., 2014).

Tabla 1. Estudios donde se han utilizado RNA de interferencia.

AUTORES	HALLAZGO
De La Fuente, y cols., 2006	Validación de la función del gen 4D8 y proposición del nombre genérico “Subolesin”.
Nijhof y cols., 2007	La administración de siRNA específico para Bm86, Bm91 y Subolesin; presenta efectos significativos en el desarrollo de los huevos y la generación de larvas.
Bastos, y cols., 2009	La administración de siRNA específico para los genes Imp, SPI o Lpc disminuye la aptitud de las hembras alimentadas con <i>Rhipicephalus microplus</i> durante la infección aguda de <i>Babesia bovis</i> en los ovarios de garrapatas y la progenie de las larvas.
Kurscheid y cols., 2009	Indica que las vías de señal de ARNi pueden diferir de la de otros artrópodos tales como insectos.
Kocan y cols., 2009	La administración de siRNA para genes funcionalmente importantes para el desarrollo del patógeno sugiere un papel para estas moléculas durante el ciclo de vida del patógeno en las garrapatas.
Zivkovic y cols., 2010	Los experimentos de ARNi demostraron el gen de “Subolesin” en las garrapatas puede afectar a la infección por patógenos directamente mediante la reducción de la inmunidad innata.

Almazán y cols., 2010	El RNA podría ser utilizado para la selección de candidatos a antígenos protectores de garrapatas. Sin embargo, los ensayos de vacunación son necesarios para evaluar el efecto de los antígenos recombinantes.
Fabres, y cols., 2010	GSK-3 es una proteína esencial implicada en procesos embrionarios y por esta razón ya se ha sugerido como un posible candidato antígeno para el control de garrapatas.
Lew-Tabor y cols., 2011	Ubiquitin-63E se sugiere como un posible candidato antígeno para el control de garrapatas.
Bifano y cols., 2014	El primer informe que demuestra que RNAi de un gen garrapata se asocia la inhibición de la transmisión de <i>A. marginale</i> .
Stephen Lu y cols., 2014	Los datos sugieren fuertemente un papel importante de cistatina-3 en la inmunidad de garrapatas.
Mercado-Curiel y cols., 2014	La administración de siRNA específico para CK187220, CV437619 y TC18492 disminuye la tasa de infección de las garrapatas con <i>A. marginale</i> , mientras para TC22382, TC17129 y TC16059 la incrementa.

3.-JUSTIFICACIÓN

La presencia de *Rhipicephalus microplus*, constituye un serio problema ya que suele causar grandes pérdidas económicas a los productores de ganado bovino a través de efectos físicos directos sobre el animal parasitado e indirectamente a través de la transmisión de enfermedades.

Se han desarrollado diferentes métodos de control entre los cuales el uso de acaricidas es muy frecuente, sin embargo gran parte de las poblaciones de *Rhipicephalus microplus* se han vuelto resistentes a las tres clases principales de acaricidas. Por otro lado, las vacunas desarrolladas a la fecha no brindan protección completa, lo que pone de relieve la gravedad de la situación y la importancia de tener nuevas estrategias de manejo.

La sobreexpresión *TC20108* debida a la alimentación de *Rhipicephalus microplus* ha sido descrita anteriormente (Mercado-Curiel, y cols., 2011) y su secuencia presenta homología con la proteína A de unión a inmunoglobulina G (IGBP) en *Rhipicephalus appendiculatus* (Wang, y cols., 2007). IGBP se une a la región Fc de los anticuerpos, lo cual podría dificultar la opsonización y la fagocitosis del antígeno. Estas IGBPs fueron descubiertas cuando se observó que las garrapatas excretan inmunoglobulinas en su saliva durante la alimentación. Las IGBPs actúan como un sistema de "defensa propio" contra inmunoglobulinas ingeridas y podrían ser determinantes durante el desarrollo del ciclo biológico de la garrapata.

El RNA de interferencia es una poderosa herramienta molecular que permite la identificación de genes de *Rhipicephalus microplus* que son esenciales para la supervivencia de la garrapata. Esto permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para interferir en la viabilidad y el desarrollo de la garrapata, impidiendo que genere daños físicos a los hospederos mamíferos e impidiendo a la vez la transmisión de patógenos.

4.-OBJETIVOS

4.1.-OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración de un siRNA específico para *TC20108* sobre algunos aspectos de la viabilidad y el desarrollo de *Rhipicephalus microplus* tales como la tasa de mortalidad y ganancia de peso durante la alimentación a repleción, oviposición y eclosión de los huevos.

4.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar dúplex siRNA específico para *TC20108*.
2. Evaluar el efecto de la administración de un siRNA específico para *TC20108* sobre la tasa de mortalidad y la ganancia de peso durante la alimentación a repleción de hembras adultas de *Rhipicephalus microplus*.
3. Evaluar el efecto de la administración de un siRNA específico para *TC20108* sobre la oviposición de hembras de *Rhipicephalus microplus* adultas tratadas y alimentadas a repleción.
4. Evaluar la eclosión de huevos ovipuestos por hembras adultas de *Rhipicephalus microplus* repletas administradas con un siRNA específico para *TC20108*.
5. Estimar el efecto neto de la administración de un siRNA específico por *TC20108* sobre la aptitud biológica de *Rhipicephalus microplus*.

4.3.-HIPÓTESIS

La administración del siRNA específico para *TC20108* tiene un efecto neto deletéreo sobre la aptitud biológica de *Rhipicephalus microplus*.

5.- METODOLOGÍA

5.1.- ANIMALES EXPERIMENTALES Y GARRAPATAS

Dos terneros Holstein, de 4 meses de edad, sin previa exposición a garrapatas fueron utilizados para este estudio. En el primer ternero fue colocado 1 gramo de larvas de *Rhipicephalus microplus* (cepa La Joya) hasta completar la muda a la etapa de ninfa. Las ninfas se recogieron manualmente del lomo del animal, y se incubaron a 26°C y 95% de humedad para completar la muda a la etapa adulta. Se formaron grupos de 60 garrapatas hembras las cuales fueron inyectadas y colocadas en el segundo ternero para completar su alimentación a repleción acompañados de un número equivalente de machos. Los experimentos con animales están aprobados por el Comité de Bioética en Investigación de la Facultad de Medicina y de la Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Medicina, Querétaro.

5.2.- RNA PEQUEÑO DE INTERFERENCIA

Un siRNA de doble hebra fue específicamente diseñado para *TC20108* y sintetizado químicamente (Integrated DNA Technologies, Inc). El dúplex corto de RNA tiene dos bases no apareadas que sobresalen en el extremo 3' de la hebra antisentido y es romo en el extremo 5'. La cadena sentido tiene en el extremo 3' dos bases de DNA en lugar de RNA (**Ver Tabla 2**). El siRNA se suspendió a una concentración de 10 pmol/μL en un tampón dúplex libre de nucleasas (Integrated DNA Technologies, Inc) conforme a lo descrito previamente por Mercado-Curiel y cols., 2014.

El diseño de un siRNA se debe efectuar usando las reglas estándar de diseño. Se considera la estabilidad termodinámica de los extremos dsRNA. El extremo 5' de la hebra que tiene que poseer la termodinámica menos estable para que pueda incorporarse en el RISC. El sustrato de Dicer se genera extendiendo el sitio diana del dsRNA, se añaden 4 bases al extremo 3' de la hebra de sentido y 6 bases al extremo 5' de la hebra antisentido para crear una molécula asimétrica con un extremo romo. Sustituir las dos bases finales de RNA en el extremo 3' de la

cadena sentido por bases de DNA. Esta modificación ayuda a dirigir el corte, así como el diseño asimétrico con 2-bases 3'-overhang en un lado y romo en el otro.

El siRNA debe consistir en una cadena sentido de 25 bases y una cadena antisentido de 27 bases que cuando actúa con la enzima Dicer se convertiría en el reactivo dsRNA maduro y se espera que tenga la cadena antisentido incorporada en el RISC maduro. Adicionalmente, la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' en la cadena sentido será necesaria para la entrada al RISC y su adicional síntesis, además de que puede mejorar la potencia (Reynolds, et al., 2004).

Tabla 2. Secuencia del siRNA específico para *TC20108*.

Gen	Secuencia siRNA (5'-3')
<i>TC20108</i>	A: rUrArUrCrGrArUrGrCrUrUrGrUrUrUrUrGrGrUrCrUrGrGrCrArGrArA S: rCrUrGrCrCrArGrArCrCrArArArArCrArGrCrArUrCrGrATA

Secuencia A= Antisentido; S= Sentido.

5.3.- ADMINISTRACIÓN DE GARRAPATAS CON siRNA

Las garrapatas hembras adultas recién mudadas fueron inyectadas con 0.5 µL de la solución madre del dúplex de siRNA. El grupo control fue inyectado con un volumen equivalente del buffer dúplex libre de nucleasas (Integrated DNA Technologies, Inc). La inyección se realizó empleando una jeringa de 10 µl (Hamilton) con una aguja metálica de calibre 34 (Hamilton). El volumen administrado se maneja por el controlador del inyector Micro4 UMP3 Microjeringa (World Precision Instruments). La inyección se llevó a cabo en la base de la cuarta pata izquierda a través de la membrana coxal. No se observó reflujo de la solución, hemolinfa o tejido en el sitio de la punción cuando la aguja fue cuidadosamente retirada.

5.4- EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOLÓGICOS.

La evaluación de los parámetros biológicos de *Rhipicephalus microplus*, se realizó mediante un seguimiento individual diario en cada una de las garrapatas. Considerando que la alimentación, repleción, oviposición y eclosión son los puntos relevantes durante su ciclo de vida para conocer el efecto de la administración del siRNA específico para *TC20108*, se efectuó lo siguiente:

- Tasa de mortalidad. El efecto de la administración de un siRNA sobre la mortalidad de las garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus* se obtuvo mediante la contabilización de las mismas en cada uno de los grupos, después del periodo de alimentación a repleción.
- La alimentación. Para conocer el efecto de la administración de un siRNA sobre la alimentación de *Rhipicephalus microplus* se pesaron de manera previa a su administración del siRNA cada una de las garrapatas adultas, tanto del grupo control como del grupo tratado. Transcurrido el periodo de alimentación las garrapatas adultas volvieron a ser pesadas, se promediaron y se compararon ambos grupos para poder conocer el aumento obtenido después de alimentarse. Los grupos se colocaron en parches separados sobre un mismo animal, uno de cada costado.
- Repleción. El efecto de la administración de un siRNA sobre la repleción de las garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus* se evaluó mediante un seguimiento individual diario, por 17 días en donde cada una de las garrapatas fueron pesadas realizando este procedimiento en ambos grupos. Esta acción se evaluó en conjunto con la oviposición. Las garrapatas se incubaron a 26°C con 95% de humedad.
- Oviposición. Para conocer el efecto de la administración de un siRNA sobre la oviposición de *Rhipicephalus microplus* se pesaron desde el inicio de la oviposición de cada garrapata de manera diaria los huevecillos obtenidos,

estos eran separados de la garrapata y colocados en viales con algodones que permitieran el ingreso de humedad, para la evaluación de la eclosión. Los huevos ovipositados, se incubaron a 26°C con 95% de humedad.

- Eclosión. El efecto de la administración de un siRNA sobre la eclosión de los huevos de *Rhipicephalus microplus* se evaluó posterior a los 17 días y asegurando que todas las garrapatas habían terminado de oviponer. Se esperó un periodo de 30 días para la eclosión de las larvas, en el cual se observaron de manera semanal por la presencia de eclosiones previas al periodo determinado. Una vez que todas las larvas eclosionaron fueron contadas de manera individual, esto se realizó con la cuantificación de viales obtenidos en cada uno de los grupos analizados (control y tratado). Se les dio un seguimiento por un periodo de 60 días y al finalizarlo las garrapatas fueron contadas nuevamente para evaluar su viabilidad.

Finalmente se hizo una evaluación neta de los efectos obtenidos en el grupo administrado con siRNA. Juntando todos los datos obtenidos en cada uno de los parámetros biológicos, obteniendo un resultado final del daño total efectuado en todo su ciclo de vida.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó el efecto de la administración del RNA corto de interferencia específico para *TC20108* sobre algunos parámetros biológicos de *R. microplus*.

6.1. Tasa de mortalidad de garrapatas hembras adultas durante la alimentación a repleción.

La tasa de mortalidad observada fue de 65% y 20% en el grupo tratado con el siRNA y el control, respectivamente. (Gráfico 1).

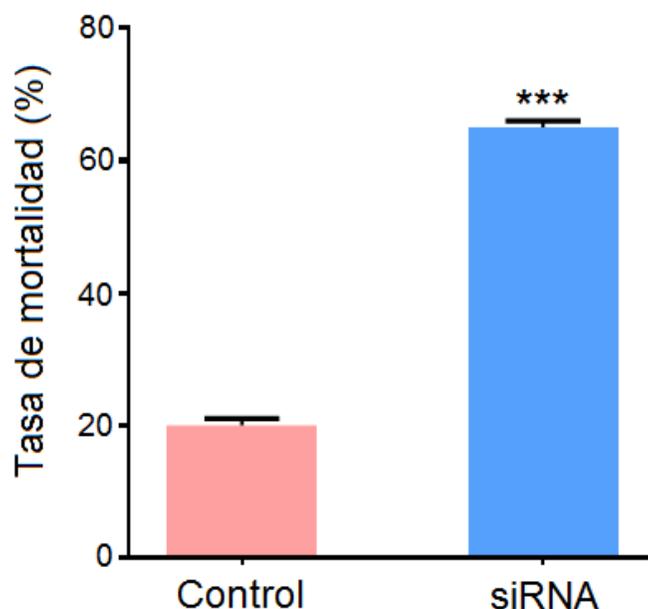


Gráfico 1. Efecto de la administración del siRNA específico para TC20108 sobre la tasa de mortalidad en hembras adultas de *Rhipicephalus microplus* durante la alimentación a repleción. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.001$) determinada mediante la prueba t pareada.

El 20% de mortalidad en nuestro grupo control estuvo acorde con estudios previos (Almazán, y cols., 2010 y Mercado-Curiel, y cols., 2014) que han reportado una mortalidad de entre el 20% y el 27% en garrapatas adultas manipuladas de diversas maneras (inyectadas, amputación de una pata, o disminución de los días de alimentación).

El incremento en la tasa de mortalidad se puede adjudicar al posible bloqueo de la función de *TC20108*, ya que la anulación de la función de una IGBPA en la garrapata podría derivar en el aumento de anticuerpos del hospedero en la

garrapata. La respuesta del bovino contra las garrapatas es más evidente en aquellos animales que han experimentado exposición previa a garrapatas ya que estos desarrollan una respuesta inmune específica contra antígenos de la garrapata, por lo que en estos casos la función protectora de las IGBPA en las garrapatas es aún más relevante.

6.2. Ganancia de peso de garrapatas hembras adultas durante la alimentación a repleción.

Habiendo observado el incremento de la tasa de mortalidad de las garrapatas hembras adultas durante el periodo de alimentación a repleción debido a la administración del siRNA específico para TC20108, se determinó el efecto de dicho tratamiento sobre el peso de aquellas garrapatas que habían logrado sobrevivir. Para ello se pesaron individualmente cada una de ellas a partir del momento de caer repletas del animal y durante todo el periodo de oviposición. Se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la ganancia de peso en el periodo de repleción (**Gráfico 2**). El peso promedio en el grupo tratado fue de 0.3 ± 0.040 g con respecto a 0.29 ± 0.030 g en el grupo control.

El aumento de peso observado en nuestro estudio es acorde con lo descrito previamente (Almazán y cols., 2010) en donde se evaluó el peso corporal a repleción en garrapatas sin ningún tratamiento, obteniendo un resultado de 0.288 ± 0.072 g.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa en el peso a partir del día 15 ya durante el periodo de oviposición (**Gráfico 2**). El peso de las garrapatas mostró una reducción que se relacionó con la puesta de huevos. El peso promedio de las garrapatas al final del periodo de oviposición fue de 0.150 ± 0.049 g y de 0.250 ± 0.015 g en el grupo control y en el grupo tratado con el siRNA, respectivamente.

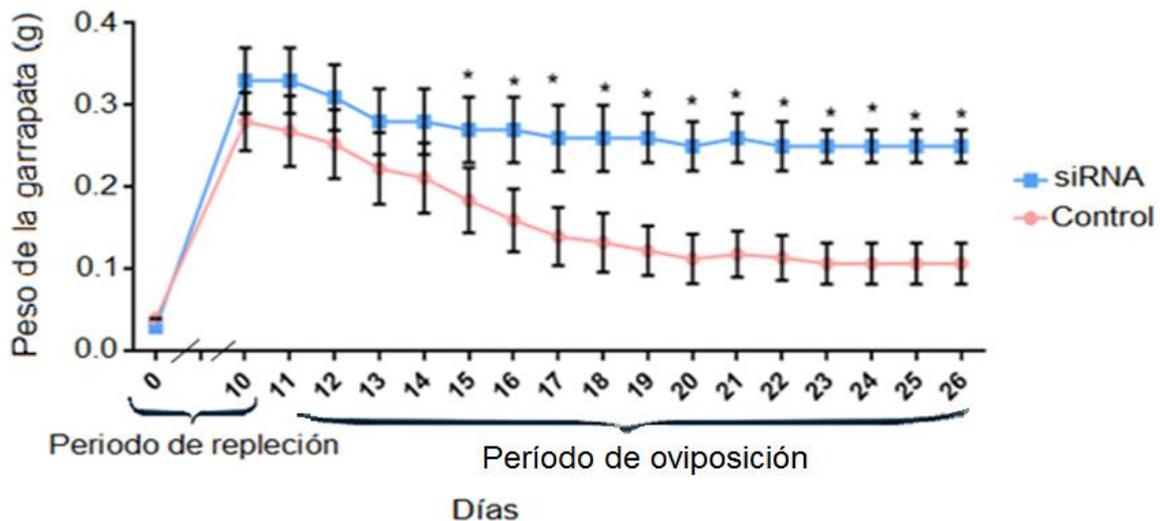


Gráfico 2. Efecto de la administración del siRNA específico para TC20108 sobre el peso de las hembras de *Rhipicephalus microplus* adultas durante el periodo de alimentación y oviposición hasta su deceso. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre el grupo tratado con siRNA y el grupo control como se determinó mediante la prueba de Bonferroni.

6.3. Oviposición de hembras adultas repletas.

A diferencia de los estudios previos realizados en que la masa de huevecillos es pesada de una sola vez al final del periodo de oviposición (Almazán, y cols., 2010, De La Fuente, y cols., 2005 y Nijhof, y cols., 2007), en el presente estudio se presenta por primera vez un monitoreo diario de cómo se va incrementando el peso de los huevecillos ovipuestos durante 16 días medido en cada una de las garrapatas individuales hasta su deceso y representado en forma grupal (**Gráfico 3**).

A partir del día 19 se observó una diferencia estadísticamente significativa en el peso de los huevecillos puestos en el grupo tratado con el siRNA con respecto al control siendo el peso final acumulado de 0.060 ± 0.007 g y 0.15 ± 0.010 g, respectivamente. Lo anterior representa una disminución del 60% de la oviposición en el grupo tratado con el siRNA con respecto al grupo control.

La diferencia estadísticamente significativa en la reducción de peso entre garrapatas adultas repletas del grupo tratado con el siRNA y del control fue a partir del día 15 (**Gráfico 2**), lo cual puede ser explicado por el hecho de que el peso de

la garrapata es mayor que el peso de la masa de huevecillos y la variación de cada medición individual con respecto al valor medio representa una menor desviación.

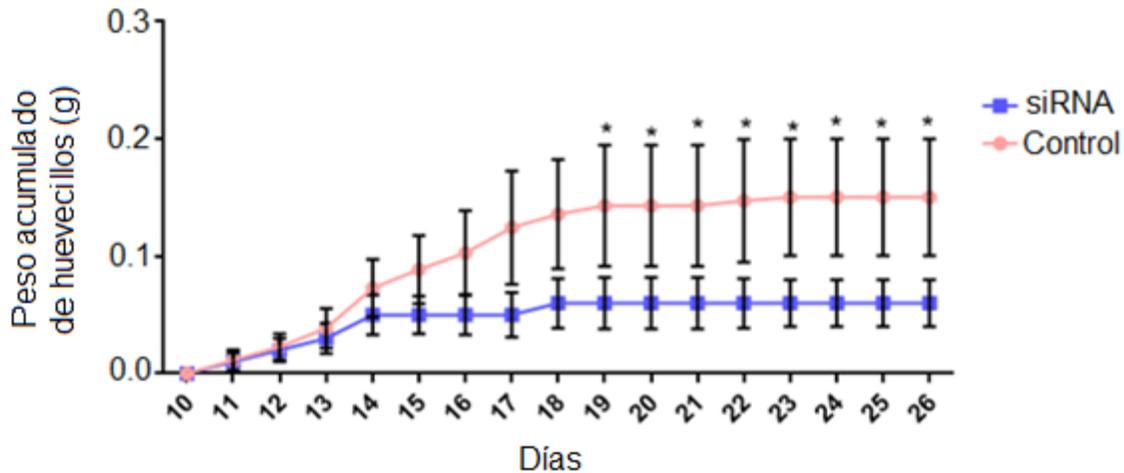


Gráfico 3. Efecto de la administración del siRNA específico para TC20108 sobre la oviposición de hembras adultas repletas de *Rhipicephalus microplus*. Se representa el peso de la masa de los huevecillos a lo largo del período de oviposición como el promedio de pesos individuales con el error estándar indicado con barras de error. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre el grupo tratado con siRNA y el grupo control como se determinó mediante la prueba de Bonferroni.

Al igual que lo que ha sido reportado en estudios previos (Nava, y cols., 2010), las garrapatas hembras repletas tuvieron un periodo de alrededor de 3 días (pre-oviposición) a partir del día en que cayeron repletas del animal hasta antes de la primera puesta de huevecillos. Cada garrapata individual depositó alrededor de 9 mg de huevecillos cada día independientemente del grupo al que perteneciera, sin embargo, las garrapatas en el grupo tratado solamente permanecieron activas oviponiendo durante 5 días. Posterior a ese tiempo el peso acumulado de los huevecillos ovipuestos en el grupo tratado con el siRNA permaneció constante (**Gráfico 3**). El peso acumulado de los huevecillos ovipuestos por cada garrapata individual al final del periodo de oviposición fue de 60 ± 7 mg y 150 ± 10 mg en el grupo tratado y en el control, respectivamente. Lo anterior representa una disminución del 73.33% en la cantidad neta de huevos puestos como efecto de la administración del siRNA específico para TC20108.

Garrapatas de ambos grupos fueron disectadas al final del periodo de oviposición, pudiéndose observar que las garrapatas en el grupo tratado con el siRNA contenían en su interior los huevos que habían sido incapaces de depositar durante el periodo de oviposición (**Figura 9**).

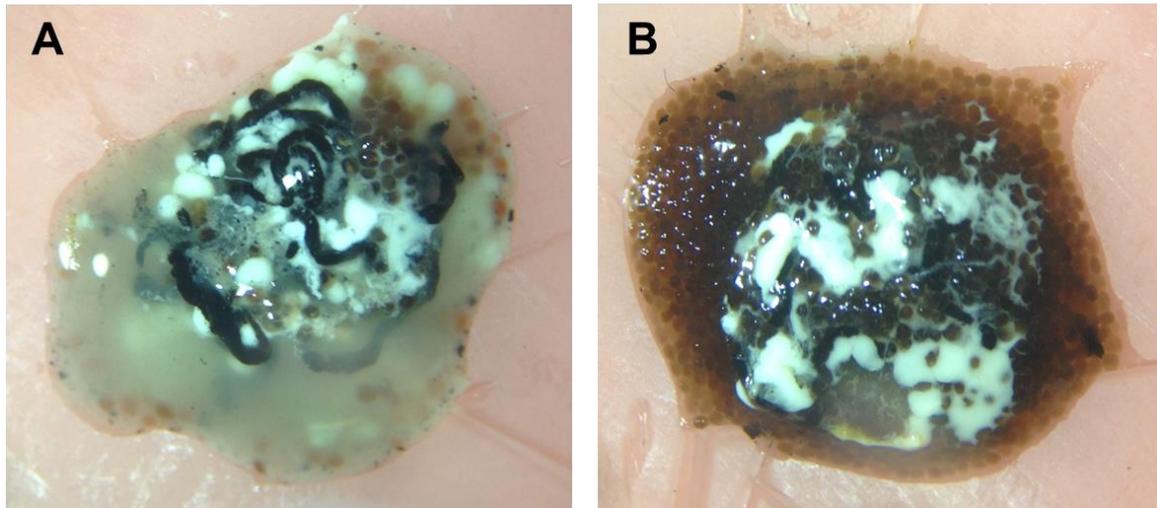


Figura 9. Disección de *Rhipicephalus microplus* hembras repletas al final del periodo de oviposición. Al exponer el contenido de las garrapatas se pueden apreciar diferencias en la cantidad de huevos que están presentes. **A.** Grupo tratado con el siRNA específico para *TC20108*. **B.** Grupo control administrado con siRNA Dúplex Buffer.

Aunque no se conocen con exactitud los factores que originan la degeneración de los huevos en *R. microplus*, ha sido reportado anteriormente (Saito, y cols., 2005) que cuando hay alguna alteración en la alimentación, algunos nutrientes son recuperados de los huevos al sometidos a autólisis sin ser fagocitados y sin participación de células de la hemolinfa, lo cual interrumpe la deposición de yema y promueve la lisis de los gránulos existentes, derivando en la deformación de los ovocitos, impidiéndoles llegar al tracto genital para ser ovipositados (Denardi, y cols., 2004).

En el presente estudio se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la ganancia de peso de las hembras alimentadas a repleción en el grupo tratado con el siRNA respecto al grupo control (**Gráfico 2**), lo cual implicaría que la cantidad de sangre obtenida del animal es esencialmente la misma, sin

embargo, esta no puede ser aprovechada adecuadamente por la garrapata hembra para la adecuada ovogénesis y posterior oviposición, probablemente por el efecto deletéreo de la actividad de las inmunoglobulinas del vacuno sobre la garrapata, al no contar con la actividad adecuada de la IGBPA *TC20108*. Se requieren futuros estudios para poder corroborar lo anterior.

Independientemente de no conocer el mecanismo exacto por el cual la oviposición disminuye en el grupo tratado con el siRNA, lo que es un hecho es que como en cualquier otro organismo, cuando sus procesos biológicos se alteran sustancialmente, el organismo no necesariamente muere inmediatamente, sino uno de los procesos que inicialmente se ve afectado es la reproducción.

6.4. Eclosión de los huevos ovipuestos por hembras adultas repletas.

Se determinó la tasa de eclosión ya que otro aspecto importante que determina la aptitud biológica global en la garrapata es la viabilidad de los huevecillos que han sido puestos por la hembra, los cuales idealmente deberán dar lugar a nuevas larvas que eclosionen de ellos para continuar con el ciclo de vida.

El porcentaje de eclosión en el grupo tratado con siRNA fue de 72% en tanto que en el grupo control fue de 75%, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (**Gráfico 4**).

Nuestros resultados son acordes con lo descrito anteriormente (Benitez, *y cols.*, 2012) que establece que de manera natural un porcentaje (70%) de huevecillos puestos no son viables y no eclosionan en nuevas larvas.

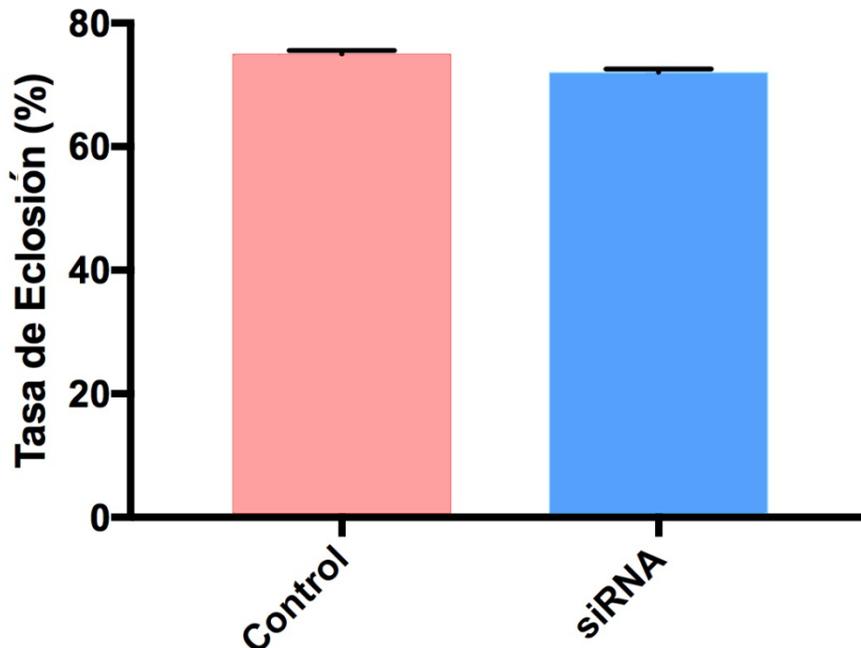
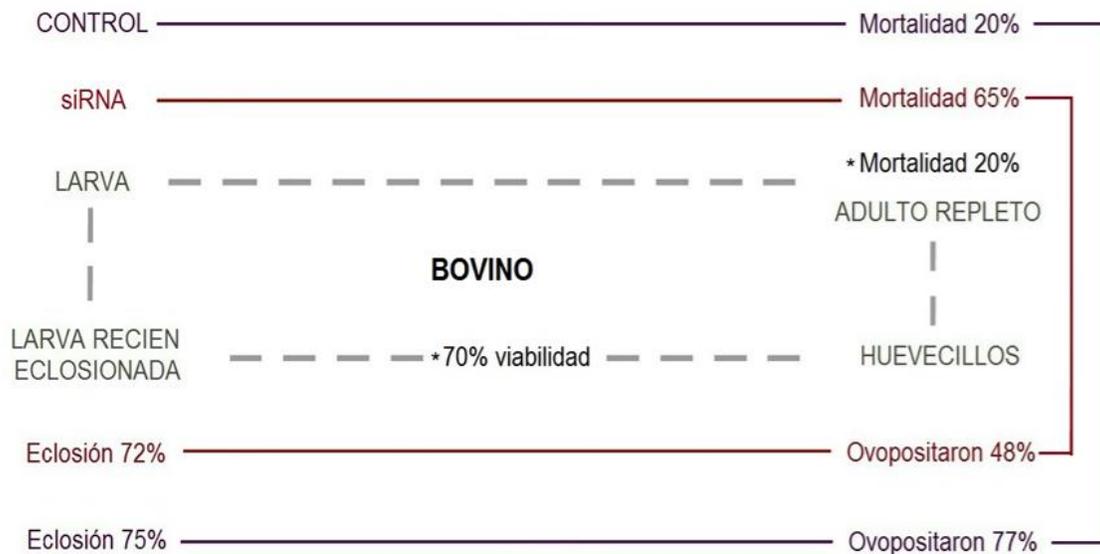


Gráfico 4. Efecto de la administración del siRNA específico para TC20108 sobre la eclosión de huevos en larvas de *Rhipicephalus microplus*. Los datos se presentan como el porcentaje de eclosión de los huevos. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa para estos resultados.

6.5. Impacto global sobre la aptitud biológica.

En base a estudios previos (Mercado-Curiel, y cols., 2014) de manera general en condiciones experimentales controladas se considera que 1 g de larvas de *R. microplus* contiene aproximadamente 20,000 larvas. Aproximadamente un 10% de ellas sobrevive logrando llegar a la etapa adulta, las cuales son hembras y machos en la misma proporción. Durante la alimentación a repleción en la etapa adulta hay aproximadamente un 20% de mortalidad. Por lo que finalmente de un gramo de larvas se obtienen aproximadamente 800 hembras adultas repletas que se encuentran en condiciones de comenzar la oviposición. Cada hembra pone aproximadamente 2,000 huevos de los cuales aproximadamente el 70% son viables y eclosionan de ellos nuevas larvas. Globalmente se estarían obteniendo un total de 1'120,000 larvas F1 a partir de 1 g de larvas F0. Desde luego este número no considera por ejemplo condiciones ambientales o disponibilidad de hospederos mamíferos que puedan hacer que el número efectivo de larvas F0 sea menor (**Figura 10**).



*Datos Obtenidos de: Mercado-Curiel, y cols., 2014 y Benitez, y cols., 2012

Figura 10. Impacto global de la administración del siRNA sobre la aptitud biológica de *Rhipicephalus microplus*. Se muestran los puntos determinantes del ciclo de vida que como parámetros biológicos fueron medidos en el presente estudio.

En el presente estudio en el grupo tratado con el siRNA específico para *TC20108* el porcentaje de mortalidad durante la alimentación a repleción en la etapa adulta se incrementó del 20% al 65%. Por lo que de un gramo de larvas puestas sobre el vacuno se obtendrían 350 hembras adultas repletas. Adicionalmente la oviposición en el grupo tratado con el siRNA disminuyó un 60% con respecto al grupo control, por lo que de 350 hembras adultas repletas se estarían obteniendo únicamente 280,000 huevos en vez de 700,000. No se observó diferencia en la viabilidad y eclosión de larvas F1 de alrededor del 70% debido al tratamiento con el siRNA, por lo que el número de global final de larvas F1 a partir de 1 g de larvas F0 sería de 196,000.

Tomando todo lo anterior en conjunto, el tratamiento con el siRNA específico para *TC20108* representa una disminución del 82.5% del número de descendientes en la población de garrapatas tratadas con respecto al control.

Futuras investigaciones deberán determinar si el efecto de la administración del siRNA específico para *TC20108* observado en el presente estudio se debe a la disminución del nivel de expresión de dicho gen.

Se ha observado que las IGBPs se encuentran presentes en todas las etapas de desarrollo (Rodríguez-Valle y cols., 2010) y se ha descrito la posible presencia de más de una IGBPA en *R. microplus* (Mercado-Curiel, y cols., 2011, Gong, y cols., 2014 y Wang & Nuttall, 1995). Aunque estas diversas formas de IGBPAs no se encuentran caracterizadas, se puede prever un posible efecto de compensación funcional.

Las hembras reciben la ayuda de las garrapatas macho durante su alimentación (Wang & Nuttall, 1998) y se considera que podrían colaborar con las hembras en la disminución de anticuerpos del vacuno al ingerir la sangre y regurgitarla manera directa en las hembras. En machos de *Rhipicephalus haemaphysaloides* se describió la presencia de IGBPAs predominantemente en glándulas salivales sin embargo su silenciamiento no tuvo ningún efecto evidente en las hembras (Gong, y cols., 2014).

La eventual utilidad de *TC20108* como un antígeno vacunal eficaz para el control de *R. microplus* aguarda por futuras investigaciones, sin embargo a la fecha, los resultados son alentadores.

7.- CONCLUSIONES

La administración de un siRNA específico para *TC20108* de *Rhipicephalus microplus* tiene un efecto deletéreo sobre su aptitud biológica incrementando la tasa de mortalidad de las garrapatas hembras adultas durante el periodo de alimentación a repleción y disminuyendo la oviposición.

8.-REFERENCIAS

Abbas, R. Z. y otros, 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 03(06), pp. 6-20.

Almazán, C. y otros, 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research*, Volumen 106, pp. 471-479.

Almazan, C. y otros, 2012. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*, Volumen 30, pp. 265-272.

Anderson, J., 2008. The natural history of ticks. *Medical Clinics of North America*, pp. 205-218.

Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants.. *Nature*, pp. 356-363.

Benitez, D., Cetrá , B. & Florin-Christensen, M., 2012. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks can complete their life cycle on the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Buffalo Science*, 1(2), pp. 193-197.

Bowman, A. S. & Sauer, J. R., 2004. Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology*, Issue 129, pp. 67-81.

Canales, M. y otros, 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine*, Volumen 15, pp. 414-422.

Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3(26), pp. 1-11.

De La Fuente, J., 2012. Vaccines for vector control: exciting possibilities for the future. *Veterinary Journal*, Volumen 138, pp. 161-168.

De La Fuente, J. y otros, 2005. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol Res*, Issue 96, pp. 137-141.

De La Fuente, J., Kocan, K. M., Almazán, C. & Blouin, E. F., 2007. RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *TRENDS in Parasitology*, 23(9), pp. 427-432.

Denardi, S. E. y otros, 2004. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, Volumen 125, pp. 379-395.

Dykxhoorn, D. M. & Lieberman, J., 2005. The silent revolution: RNA Interference as Basic Biology, Research Tool, and Therapeutic. *Annual Review of Medicine*, Volumen 56, pp. 401-23.

Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R. I. & Alonso-Díaz, M. A., 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in te Mexican tropics.. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), pp. 338-342.

Fragoso-Sanchez, H. y otros, 2011. Response of Mexican *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks to selection by amitraz and genetic analysis of attained resistance. *Journal of Entomology*, 8(3), pp. 1812-5670.

Garcia, S. y otros, 2006. Viral suppressors of RNA interference impair RNA silencing induced by a Semliki Forest virus replicon in tick cells. *Journal of General Virology*, Issue 87, pp. 1985-1989.

Gasque, R., 2008. Anaplasmosis. En: *Enciclopedia Bovina*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pp. 91-93.

Gong, H. y otros, 2014. Inmunoglobulin G binding protein (IGBP) from *Rhipicephalus haemaphysaloides*: identification, expression, and binding specificity. *Parasitology Research*, Volumen 113, pp. 4387-4395.

Guerrero, D. F. y otros, 2005. BmiGI: A data base of cDNAs expressed in *Bophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Volumen 32, pp. 585-595.

Guerrero, F. D., Miller, R. J. & Perez de León, A. A., 2012. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge?. *International Journal For Parasitology*, Volumen 42, pp. 421-427.

Hajdusek, O. y otros, 2009. Knock-down of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development.. *Proceedings of the national academy of sciences*, Volumen 106, pp. 1033-8.

Haldane, J. B., 1957. The Cost of Natural Selection-The Causes of Evolution. En: *The Cost of Natural Selection*. Calcutta: University College, London, and Indian Statistical Institute, Calcutta, pp. 511-524.

Jonsson, N. y otros, 1998. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, pp. 1-10.

Klafke, G. M. y otros, 2006. Lavar immersion tests with ivermectin populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 142(3-4), pp. 386-390.

Kocan, K. y otros, 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. Elsevier. *Veterinary Parasitology*, pp. 95-107.

León, M., 2011. Garrapatas (*Ixodidae*) 1: Anatomía, biología y ecología.. *Consulta de Difusión Veterinaria.*, pp. 29-34.

Meister, G. & Tuschli, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, Volumen 431, pp. 343-349.

Melendez, D. R., 2000. Future perspectives on veterinary hemoparasite research in the Tropics at the start of this century. *Annals New York Academy of Sciences*, pp. 253-258.

Mello, C. & Conte, D. J., 2004. Revealing the world of RNA interference.. *Nature*, Issue 431, pp. 338-342.

Mercado-Curiel, R. F., Ávila-Ramírez, M. L., Palmer, G. H. & A. Brayton, K., 2014. Identification of *Rhipicephalus microplus* Genes that modulate the infection rate of the Rickettsia *Anaplasma marginale*. *PLoS One*, pp. 1-9.

Mercado-Curiel, R. F., H. Palmer, G., D. Guerrero, F. & A. Brayton, K., 2011. Temporal characterisation of the organ-specific *Rhipicephalus microplus* transcriptional response to *Anaplasma marginale* infection.. *International Journal for Parasitology*, pp. 851-860.

Miller , R. J. y otros, 2013. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of México. *Veterinary Parasitology*, 191(1-2), pp. 97-101.

Nava, S., Mastropaolo, M. & Mangold, A. J., 2010. Ficha N°5. Garrapata común del bovino [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*]. *Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de carne del área central de la Argentina*, pp. 1-9.

Nijhof, A. M. y otros, 2007. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *International Journal for Parasitology*, Volumen 37, pp. 653-662.

Organización de las Naciones Unidas, p. I. A. y. I. A., 2003. *Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina*, s.l.: s.n.

Orr, A. H., 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Genetics*, Volumen 10, pp. 531-539.

Ramakrishnan, V. G., Aljamali, M. N., Sauer, J. R. & Essenberg, R. C., 2005. Application of RNA Interference in Tick Salivary Gland Research. *Journal of Biomolecular Techniques*, Issue 16, pp. 297-305.

Randolph, S., 1998. Ticks are not Insects: Consequences of Contrasting Vector Biology for Transmission Potential. *Parasitology Today*, 14(5), pp. 186-192.

Reynolds, A. y otros, 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology*, 22(3), pp. 326-330.

Rodríguez-Valle, M. y otros, 2010. Comparative microarray analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *BMC Genomics*, 11(437), pp. 1-17.

Rodríguez-Vivas, R. I. y otros, 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatan, México. *Veterinary Parasitology*, 136(3-4), pp. 335-442.

Rodríguez-Vivas, R. I. y otros, 2010. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3), pp. 115-123.

Rodríguez-Vivas, R. I. y otros, 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria*, 8(1), pp. 61-74.

Rodríguez-Vivas, R. I., Hodgkinson, J. E. & Trees, A. J., 2012. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, Volumen 3, pp. 9-24.

Rodríguez-Vivas, R. I. y otros, 2014. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of México. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 23(2), pp. 113-122.

Rosario-Cruz, R., Domínguez-García, D. I. & Torres-Agatón, F., 2016. Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(9), pp. 1-12.

SAGARPA, 2014. *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)*. [En línea] Available at: <http://www.senasica.gob.mx> [Último acceso: 24 Noviembre 2015].

Saito, C. y otros, 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, Volumen 129, pp. 299-311.

Soberanes, N. C., Santamaría, M. V., Fragoso, H. S. & García, V. Z., 2002. First case reported of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* in México. *Técnica Pecuaria en México*, 40(1), pp. 81-92.

Sober, E., 2001. The Two Faces of Fitness. In R. Sin. En: *Thinking About Evolution. Historical, Philosophical, and Political Perspectives*. United States of America: Cambridge University Press, pp. 309-321.

Soderlund, D. M. y otros, 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, pp. 3-59.

Solorio-Rivera, J. L., Rodríguez-Vivas, R. I., Pérez-Gutierrez, E. & Wagner, G., 1999. Management factor associated with Babesia bovis seroprevalence in cattle from eastern Yucatán, México. *Preventive Veterinary Medicine*, 40(3-4), pp. 261-269.

Sonenshine, D. E., 1991. *Biology of Ticks*. s.l.:Oxford University Press.

Strickland, R. K., Gerrish, R. R., Hourrigan, J. L. & Schubert, G. O., 1976. Classification and description of ticks. En: *Ticks of veterinary importance*. Washington D.C.: Agriculture Handbook, pp. 9, 33-35.

T. McManus, M. & A. Sharp, P., 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Reviews Genetics*, pp. 737-747.

Taylor, M. A., 2001. Recent Developments in Ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*, Volumen 161, pp. 253-268.

USDA, 1999. *National Agricultural Statistics Service: Meat animals-Production, disposition and income*, Washington DC: Agricultural Statistics Board.

Wang, H. & Nuttall, P. A., 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Volumen 56, pp. 286-195.

Wang, H. & Nuttall, P. A., 1995. Immunoglobulin G binding proteins in male *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasite Immunology*, Volumen 17, pp. 517-524.

Wang, H. & Nuttall, P. A., 1998. Male ticks help their mates to feed. *Nature*, Volumen 391, p. 753.

Wang, M., Guerrero, F. D., Perteza, G. & Nene, V. M., 2007. Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BioMed Central Genomics*, 8(368), pp. 1-14.

White, N., Sutherst, R. W., Hall, N. & Wish-Wilson, P., 2003. The vulnerability of the Australian beef industry to impacts of the cattle tick (*Boophilus microplus*) under climate change. *Climatic Change*, 61((1-2)), pp. 157-190.

Willadsen, P., 2006. Tick control: thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*, Issue 132, pp. 205-215.

Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G. S. & Hungerford, J., 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, Volumen 110, pp. 43-50.

Wilson, R. C. & Doudna, J. A., 2013. Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annual Review Biophys*, Volumen 42, pp. 217-39.

Zivkovic, Z. y otros, 2010. Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. *BMC Genomics*, Issue 186, pp. 1-12.