



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

**Evaluación de la eficacia vacunal de péptidos de VDAC, voraxina y  
chitinasa contra *Rhipicephalus microplus***

Tesis

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

Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z Daniel Gustavo López Díaz

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Presidente

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez  
Secretaria

MSPAS. Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio  
Vocal

Dra. Elba Rodríguez Hernández  
Suplente

Dra. María Martina Esperanza Pérez Soria  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro

Noviembre 2022

México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Evaluación de la eficacia vacunal de péptidos de  
VDAC, voraxina y chitinasa contra *Rhipicephalus*  
microplus

**por**

Daniel Gustavo López Díaz

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNMAC-300586

## RESUMEN

El control de la garrapata *Rhipicephalus microplus* representa uno de los principales desafíos que enfrenta la ganadería de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Estas garrapatas transmiten microorganismos que causan enfermedades graves para el ganado bovino. La utilización de vacunas contra garrapatas se considera una herramienta importante dentro de los programas de control integrado, que buscan disminuir las poblaciones de garrapatas de forma eficaz y sustentable. Un importante reto en el desarrollo de vacunas antigarrapatas es la identificación de antígenos protectores, los cuales deben cumplir características de relevancia biológica y eficacia vacunal. Recientemente, se demostró una alta conservación (>99%) en alelos que codifican proteínas de *R. microplus* con potencial vacunal y se identificaron péptidos con epítomos B predichos, los cuales son parte del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), voraxina y chitinasa. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia vacunal de doce péptidos de estas proteínas. Primero, se evaluó la inmunogenicidad individual de cada péptido al vacunar bovinos con los péptidos sintetizados en sistema MAP-8. La generación de anticuerpos fue estadísticamente significativa a partir de la segunda inmunización, pero únicamente con cuatro péptidos, los títulos de anticuerpos se mantuvieron o incrementaron con cada inmunización. Los péptidos VDAC 3, Chitinasa 3, Voraxina 3 y Voraxina 4 fueron seleccionados para continuar con el ensayo de eficacia vacunal. El péptido Chitinasa 3 tuvo la mayor eficacia (71%), y además disminuyó significativamente el peso de las garrapatas repletas, mientras que se obtuvieron porcentajes de eficacia inferiores con los péptidos Voraxina 3 (51%), VDAC 3 (40%) y Voraxina 4 (27%). Con este trabajo se demostró que existen péptidos con epítomos B inmunogénicos que afectan significativamente parámetros biológicos de *R. microplus*.

**Palabras clave:** *Rhipicephalus microplus*, voraxina, chitinasa, VDAC, eficacia vacunal.

## ABSTRACT

Control of *Rhipicephalus microplus* represents one of the main challenges for the world's tropical and subtropical livestock industry. These ticks are vectors of pathogenic microorganisms that cause serious cattle diseases. The use of antitick vaccines is considered an important tool for the integrated control programs, which seek to reduce tick populations effectively and sustainably. The identification of protective antigens is an important problem to address, mainly because these proteins must fulfill the characteristics of biological relevance and vaccine efficacy. Recently, a high level of allelic conservation (>99%) was demonstrated and B epitopes were predicted in *R. microplus* proteins with vaccine potential, like the voltage dependent anionic channel (VDAC), voraxin and chitinase. The objective of this study was to evaluate the vaccine efficacy of twelve peptides of these proteins. First, the peptides immunogenicity was evaluated by inoculating cattle with the peptides synthesized in the MAP-8 system. The antibody response was significant after the second immunization but only with four peptides the response stood the same or increased with every boost. The VDAC 3, Chitinase 3, Voraxin 3 and Voraxin 4 peptides were selected to continue with the vaccine efficacy experiment. Chitinase 3 had the higher efficacy (71%), also significantly reducing the weight of engorged ticks. Lower efficacy percentages were obtained with Voraxin 3 (51%), VDAC 3 (40%) and Voraxin 4 (27%). With this work, it was demonstrated the existence of peptides with immunogenic B epitopes that severely affect biological parameters of *R. microplus*.

**Key words:** *Rhipicephalus microplus*, VDAC, voraxin, chitinase, vaccine efficacy.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por siempre apoyarme y alentarme en todos mis proyectos y sueños.  
Ustedes son mi gran motivación e inspiración.

A ti papá, gracias por tu infinito amor y respaldo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante estos dos años de estudio.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y la Facultad de Ciencias Naturales, por aceptarme como alumno en este programa educativo.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, por su dirección, paciencia y confianza para realizar este trabajo.

Al Dr. Rafael Jiménez Ocampo de INIFAP, por permitirme el acceso a sus instalaciones y animales para la realización de los experimentos.

A la Dra. Martina, por sentar las bases de este proyecto.

A mi comité de asesores de tesis, por sus consejos, puntos de vista y apoyo para continuar con el proyecto.

A todos mis compañeros y amigos de LINVAS, por apoyarme en la realización de mis experimentos.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Importancia de las garrapatas.....	3
2.2 Generalidades de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	3
2.2.1 Clasificación taxonómica.....	5
2.2.2 Características anatómicas.....	6
2.2.3 El proceso de digestión en garrapatas .....	8
2.2.4 El proceso de reproducción en garrapatas.....	9
2.2.5 El sistema tegumentario y el proceso de ecdisis.....	10
2.2.6 Ciclo biológico .....	11
2.3 Situación nacional: Impacto de <i>Rhipicephalus microplus</i> en México .....	13
2.3.1 Impacto económico .....	14
2.3.2 Impacto zoonosanitario .....	15
2.4 Estrategias de control .....	16
2.4.1 Control químico .....	16
2.4.2 Control biológico.....	18
2.4.3 Control inmunológico.....	19
III. JUSTIFICACIÓN .....	28
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVOS .....	30
5.1 Objetivo General .....	30
5.2 Objetivos Específicos.....	30

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
6.1 Péptidos experimentales.....	31
6.2 Preparación de vacunas e inmunización de animales. ....	32
6.3 Obtención de sueros inmunes. ....	33
6.4 Determinación de inmunogenicidad.....	34
6.4.1 Titulación de la concentración de péptidos.....	34
6.4.2 Titulación de anticuerpo primario. ....	37
6.4.3 ELISA indirecta para determinación de anticuerpos.....	39
6.4.4 Análisis estadístico .....	40
6.5 Análisis bioinformático de los péptidos .....	40
6.6 Desafío biológico .....	40
<u>6.6.1</u> Preparación de vacunas e inmunización.....	41
<u>6.6.2</u> Infestación con larvas <i>R. microplus</i> .....	42
<u>6.6.3</u> Colecta de garrapatas y obtención de datos.....	42
6.7 Efecto sobre parámetros biológicos y cálculo de eficacia vacunal.....	43
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1 Elaboración de vacunas e inmunización de animales.....	45
7.2 Determinación de inmunogenicidad.....	47
7.3 Análisis bioinformático .....	57
7.4 Desafío biológico e infestación experimental .....	65
8. CONCLUSIONES.....	81
9. LITERATURA CITADA.....	82
10. APÉNDICE.....	96



## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Categorías taxonómicas de <i>R. microplus</i>	6
2	Eficacia de rBmVDAC sobre <i>R. microplus</i>	25
3	Péptidos seleccionados para el experimento	31
4	Formulación de las vacunas de péptidos sintéticos	32
5	Concentraciones de péptidos de garrapata utilizados para sensibilizar placas de ELISA	47
6	Eficacia de los péptidos evaluados	77
7	Eficacia de otros péptidos candidatos vacunales	78
8	Comparativa de la eficacia vacunal del experimento coctel respecto a un control	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Mapa de distribución mundial de <i>R. microplus</i>	4
2	Anatomía externa de <i>R. microplus</i> .	7
3	Órganos y funciones fisiológicas de las garrapatas	9
4	Ciclo biológico de <i>R. microplus</i> .	12
5	Mapa de distribución de <i>R. microplus</i> en México	14
6	Línea del tiempo de las vacunaciones efectuadas para el experimento de determinación de inmunogenicidad	33
7	Esquematización del primer paso de la titulación de péptido	34
8	Segundo paso de la titulación de péptido	35
9	Concentración de péptidos en la placa de ELISA	35
10	Diseño de la placa de ELISA con los sueros de pre-inmunización y post-inmunización para titulación de péptidos.	36
11	Esquematización de una placa de ELISA con diluciones seriadas para titulación de sueros inmunes	38
12	Diseño de la placa de ELISA con los sueros de bovinos no inmunizados e inmunizados	39
13	Conformación de los animales utilizados en el experimento de infestación	41
14	Emulsificación de la vacuna vista al microscopio	45
15	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido VDAC 3	49
16	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Chitinasa 3	49
17	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Voraxina 3	50
18	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Voraxina 4	50

19	Gráfica de inmunogenicidad del péptido VDAC 1	51
20	Gráfica de inmunogenicidad del péptido VDAC 2	51
21	Gráfica de inmunogenicidad del péptido VDAC 4	52
22	Gráfica de inmunogenicidad del péptido Voraxina 1	52
23	Gráfica de inmunogenicidad del péptido Voraxina 2	53
24	Gráfica de inmunogenicidad del péptido Chitinasa 1	53
25	Gráfica de inmunogenicidad del péptido Chitinasa 2	54
26	Gráfica de inmunogenicidad del péptido Chitinasa 4	54
27	Análisis BLAST del péptido VDAC 1	57
28	Análisis BLAST del péptido VDAC 2	58
29	Análisis BLAST del péptido VDAC 3	58
30	Análisis BLAST del péptido VDAC 4	59
31	Análisis BLAST del péptido Voraxina 1	60
32	Análisis BLAST del péptido Voraxina 2	60
33	Análisis BLAST del péptido Voraxina 3	61
34	Análisis BLAST del péptido Voraxina 4	61
35	Análisis BLAST del péptido Chitinasa 1	62
36	Análisis BLAST del péptido Chitinasa 2	63
37	Análisis BLAST del péptido Chitinasa 3	63
38	Análisis BLAST del péptido Chitinasa 4	64
39	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido VDAC 3 antes de la infestación	65
40	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Chitinasa 3 antes de la infestación	66
41	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Voraxina 3 antes de la infestación	66
42	Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Voraxina 4 antes de la infestación	67
43	Número de garrapatas recolectadas	68

44	Número de garrapatas recolectadas por día durante la infestación	70
45	Peso promedio de las garrapatas recolectadas.	71
46	Efecto sobre la oviposición individual	73
47	Masa de oviposición obtenida de las garrapatas recolectadas	73
48	Índices de viabilidad y fertilidad de los huevos	75
49	Apariencia externa de garrapatas recolectadas de los bovinos inmunizados con Chitinasa 3	79
50	Carta de aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales	97

## I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son parásitos hematófagos de humanos y animales, responsables de causar muchos perjuicios sanitarios y de ocasionar millonarias pérdidas económicas. La principal especie que afecta al ganado bovino es *Rhipicephalus microplus*, la cual se distribuye en casi todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Barker & Walker, 2014; Sonenshine & Roe, 2014).

En México, *R. microplus* está presente en más del 60% del territorio nacional y es vector de microorganismos patógenos como *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*, capaces de afectar severamente la salud de los animales, e incluso causarles la muerte (Almazán *et al.*, 2018; SENASICA, 2021).

Los métodos químicos de control, basados en la utilización de moléculas sintéticas denominadas acaricidas, son efectivos para eliminar los distintos estadios de las garrapatas de manera rápida. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha provocado que las garrapatas se adapten y generen resistencia por el fenómeno de presión de selección (George *et al.*, 2004; Abbas *et al.*, 2014). Además, los residuos químicos conllevan un efecto bioacumulativo en el ambiente y en los subproductos del animal (Willadsen *et al.*, 1995; Graf *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2015; Almazán *et al.*, 2018).

Una alternativa sustentable al uso de acaricidas, por tener un menor impacto ambiental y no generar resistencia en el parásito, es el empleo de vacunas antigarrapata. Las primeras vacunas comerciales contra *R. microplus* aparecieron en la década de 1990, utilizando como antígeno protector a la glicoproteína intestinal Bm86, obtenida de forma recombinante. Este producto tuvo algunos efectos positivos como la reducción del uso de acaricidas, una menor transmisión de microorganismos patógenos y la afectación directa sobre el desarrollo, fertilidad y supervivencia de las garrapatas (Willadsen *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 1999; Willadsen, 2004; de la Fuente *et al.*, 2007).

Una particularidad que ha limitado la eficacia de las vacunas antigarrapata es la frecuencia en las variaciones alélicas en el gen que codifica la proteína Bm86. Estos cambios en la proteína, incluso en porcentajes tan bajos como 3.4%, impiden una adecuada respuesta inmunitaria (García-García *et al.*, 1999; Almazán *et al.*, 2018).

Se ha hipotetizado que una vacuna antigarrapata puede tener mejores resultados al combinar dos o más antígenos biológicamente significativos para el parásito, aumentando el daño que recibe la garrapata (de la Fuente & Konan, 2006; Willadsen, 2008; de la Fuente *et al.*, 2015). Además, las vacunas multiantigénicas quiméricas han demostrado tener alta eficacia protectora frente a ciertos agentes infecciosos (Guirakhoo *et al.*, 2004; Almazán *et al.*, 2012; Meza *et al.*, 2017).

Un estudio realizado en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas demostró que los genes de las proteínas VDAC, voraxina y quitinasa están altamente conservados en cepas mexicanas de *R. microplus* (Pérez-Soria, 2020).

La principal ventaja de la evaluación de subunidades de antígenos individuales permitirá continuar con la investigación y desarrollo de una vacuna multiantigénica y multiepitópica contra *R. microplus*, la cual podría tener una mejoría en eficacia respecto a las vacunas de un solo antígeno. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia vacunal de péptidos componentes de las proteínas VDAC, voraxina y chitinasa de *R. microplus*, al comparar los efectos biológicos obtenidos en garrapatas que parasitan bovinos vacunados con péptidos frente a garrapatas que infestan bovinos vacunados con adyuvante sin antígeno.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Importancia de las garrapatas.

Las garrapatas son parásitos hematófagos pertenecientes al grupo taxonómico de los artrópodos y se encuentran distribuidas en todo el mundo, desde las zonas tropicales hasta las regiones subárticas (Anderson & Magnarelli, 2008; Sonenshine & Roe, 2014).

La diversidad de garrapatas es muy grande, pues se ha descrito la existencia de más de 950 especies distintas de ellas, cada una con sus propias características biológicas y morfológicas (Dantas-Torres *et al.*, 2019).

Al tener un ciclo de vida parásito, requieren de un hospedero del cual obtener refugio y alimento, y que puede ser una persona, mamífero, ave o incluso reptiles y anfibios (Anderson & Magnarelli, 2008; Barker & Walker, 2014). Sin embargo, su necesidad de alimentarse directamente de la sangre de su hospedero las convierte en una severa amenaza para la salud de personas y animales, ya que causan el deterioro de su salud y son vectores de una gran cantidad de agentes infecciosos causantes de enfermedades graves e incluso mortales. Así, se considera que son el principal vector de enfermedades en el área de medicina veterinaria (Anderson & Magnarelli, 2008; Nicholson *et al.*, 2019).

### 2.2 Generalidades de *Rhipicephalus microplus*

La especie *Rhipicephalus microplus* es una de las garrapatas más estudiadas y es de especial interés en el área de salud y producción animal debido a las afectaciones que provoca en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Jongjean & Uilenberg, 2004; Almazán *et al.*, 2018). *R. microplus* fue identificada por primera vez a finales del siglo XIX (Canestrini, 1888).

Los principales hospederos de *R. microplus* son las especies de bovinos *Bos taurus* y *B. indicus*, no obstante, otras especies como los caprinos, ovinos, camellos, rumiantes de vida silvestre y conejos, pueden ser parasitados por esta

garrapata, permitiendo que aumenten sus posibilidades de supervivencia en el ambiente y experimentalmente (Walker *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2016).

*R. microplus* es originaria del sureste asiático, desde donde se distribuyó al resto del mundo mediante el transporte de ganado con fines comerciales. Actualmente, se reporta la presencia de este parásito en Australia, norte y oeste de África, Asia, Sudamérica, Centroamérica y México (Jongjean & Uilenberg, 2004; Barré & Uilenberg, 2010; Madder *et al.*, 2011; Mohamed & Elshahawy, 2018). Las regiones del mundo afectadas por esta garrapata se pueden apreciar en la Figura 1.



**Figura 1. Mapa de distribución mundial de *R. microplus*. En color café se muestran los territorios afectados por esta garrapata (imagen propia).**



La distribución de *R. microplus* está determinada por factores climáticos, la disponibilidad y susceptibilidad de posibles hospederos y por la cantidad de vegetación de la zona. Las condiciones ambientales que permiten la reproducción y viabilidad de estas garrapatas son la temperatura cálida, alrededor de los 24 a 28 °C, precipitación superior a 110 mm anuales y alta humedad relativa, superior al 70% (Walker *et al.*, 2003; Estrada-Peña *et al.*, 2006; Barker & Walker, 2014, Benavides *et al.*, 2016; Leal *et al.*, 2020). Temperaturas de entre 19 y 23 °C alargan la duración del ciclo biológico de *R. microplus*, mientras que una temperatura inferior a 18°C y humedad menor al 65% son condiciones suficientes para detener el desarrollo de estas garrapatas (Snowball, 1957; Benavides *et al.*, 2016; Leal *et al.*, 2020).

Las características biológicas de *R. microplus* permiten que pueda adaptarse a entornos ecológicos cambiantes (Barré & Uilenberg, 2010). Aunado a esto, el cambio climático definido por el incremento en la temperatura del planeta, facilita la invasión de la garrapata a nuevas zonas geográficas anteriormente libres de ella y de las enfermedades que transmiten (Benavides *et al.*, 2016). Se ha establecido que incluso pequeñas variaciones en las variables ambientales modifican la biología del vector e impactan en su supervivencia y abundancia, y con las estimaciones actuales que proyectan un aumento sostenido de la temperatura hasta de 5°C en 2050, generan un preocupante problema presente y futuro (McMichael *et al.*, 2003; dos Santos, 2010; Benavides *et al.*, 2016).

### **2.2.1 Clasificación taxonómica**

Las garrapatas se encuentran clasificadas dentro de tres familias taxonómicas, que son Argasidae, Ixodidae y Nuttalliellidae, las cuales se diferencian con base en sus características moleculares, morfológicas y biológicas (Horak *et al.*, 2002; Guglielmone *et al.*, 2010; Berry, 2017).

*R. microplus* pertenece a la familia Ixodidae, que es la más numerosa, con 14 géneros y 736 especies (Guglielmone *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2019). Esta especie era anteriormente conocida como *Boophilus microplus*, pero estudios

moleculares y filogenéticos mostraron evidencia suficiente para reclasificar el taxón *Boophilus* como un subgénero dentro de *Rhipicephalus* (Murrell *et al.*, 2000; Murrell & Barker, 2003). La taxonomía extendida de *R. microplus* se presenta en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Categorías taxonómicas de *R. microplus* (Barker & Walker, 2014; Nava *et al.*, 2017).**

<b>Taxones de <i>R. microplus</i>.</b>	
<b>Filo</b>	Arthropoda
<b>Subfilo</b>	Chelicerata
<b>Clase</b>	Arachnida
<b>Subclase</b>	Acari
<b>Superorden</b>	Parasitiformes
<b>Orden</b>	Ixodida
<b>Familia</b>	Ixodidae
<b>Género</b>	<i>Rhipicephalus</i>
<b>Subgénero</b>	<i>Boophilus</i>
<b>Especie</b>	<i>Rhipicephalus microplus</i>

*R. microplus* está emparentada con otras especies que afectan a los bovinos, como *R. australis*, *R. annulatus* y *R. decoloratus*, pues todas pertenecen al subgénero *Boophilus*, y comparten muchas características morfológicas, sin embargo, la evidencia molecular reciente ha ratificado que son especies distintas (Berry, 2017).

### **2.2.2 Características anatómicas**

En general, las garrapatas se caracterizan por presentar un cuerpo segmentado, exoesqueleto quitinoso y extremidades articuladas. Además, se

pueden apreciar dos secciones corporales importantes, el gnatosoma o capítulo y el idiosoma (Taylor *et al.*, 2007; Sonenshine & Roe, 2014).

El cuerpo de *R. microplus* tiene una forma ovalada, con morfología hexagonal en el extremo anterior y un escudo que recubre gran parte de su superficie dorsal. En los machos, el escudo reviste toda la superficie, pero en los estadios de larva, ninfa y hembras adultas, recubre únicamente la mitad anterior (Walker *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007; Bowman, 2014).

Al ser parásitos hematófagos, necesitan un sistema bucal fuerte, y este se compone de tres estructuras. El hipostoma es un aparato royo y relativamente corto que permite que la garrapata se alimente y proyecte sus dientes y dentículos que se anclan a la piel del hospedador. A cada lado de la porción anterior del hipostoma se encuentran los quelíceros, que son extensiones cortantes capaces de romper la continuidad de la piel. Externamente se localizan los palpos, órganos sensoriales segmentados que asisten en la búsqueda del hospedero y se anclan a la epidermis durante la alimentación, y cuya longitud es menor a la del hipostoma (Walker *et al.*, 2003; Barker & Walker, 2014; Nava *et al.*, 2017). Las características externas de *R. microplus* se pueden apreciar en la Figura 2.



**Figura 2. Anatomía externa de un macho *R. microplus*. A) Vista dorsal. B) Vista ventral. Fotografía propia (López-Díaz)**

### **2.2.3 El proceso de digestión en garrapatas**

Las garrapatas, a diferencia de otros artrópodos hematófagos, ingieren grandes cantidades de sangre por tiempos prolongados y con una digestión de tipo intracelular. Los órganos involucrados en la alimentación son el aparato bucal, la faringe, esófago, intestino y glándulas salivales (Anderson & Magnarelli, 2008; Sonenshine & Roe, 2014).

Cuando la garrapata rompe la continuidad de la piel del hospedero con sus quelíceros, la sangre comienza a fluir y el parásito a alimentarse. La faringe permite una succión intermitente de la sangre desde el sitio de la herida hasta el intestino de la garrapata, mientras que, en sentido opuesto, se expulsa saliva en dirección al hospedero, la cual contiene proteínas anticoagulantes inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Anderson & Magnarelli, 2008; Sonenshine & Roe, 2014).

Una vez que la sangre entra en la cavidad intestinal, la porción líquida y los iones presentes en la sangre, atraviesan el epitelio y se concentran en las glándulas salivales para ser secretadas de vuelta al hospedero. En el intestino, comienzan a proliferar células digestivas no diferenciadas y se convierten en células secretoras o digestivas maduras. Estas células secretan hemolisinas que destruyen los eritrocitos ingeridos, liberando hemoglobina, la cual es la principal fuente de alimento del parásito (Cupp, 1991; Sonenshine, 1991; Sonenshine & Roe, 2014).

La hemoglobina atraviesa la membrana peritrófica, la cual es una barrera quitinosa que separa a las células del lumen intestinal, y entra a las células por endocitosis. La digestión de la hemoglobina ocurre dentro de vesículas lisosomales ácidas y por la acción de una serie de peptidasas activas a pH bajo. Durante la repleción en hembras fecundadas, el lumen intestinal permanece como reservorio de alimento y el proceso digestivo continúa gradualmente (Horn *et al.*, 2009; Sonenshine & Roe, 2014).

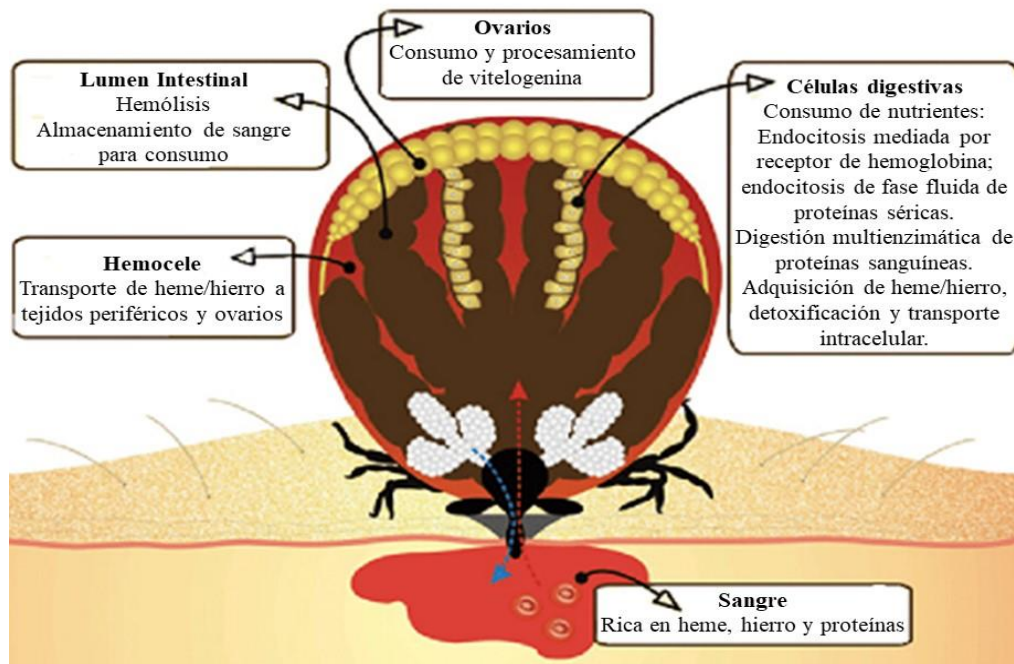


Figura 3. Órganos y funciones fisiológicas de las garrapatas (adaptado de Kopacek *et al.*, 2018).

#### 2.2.4 El proceso de reproducción en garrapatas

El aparato reproductor de las hembras ixódidas consiste en un ovario, un par de oviductos, un útero, un tubo muscular conector, vagina, un receptáculo seminal dos glándulas accesorias y una apertura genital. Adicionalmente, en la parte externa se encuentran poros a través de los cuales fluyen secreciones que envuelven los huevos que son ovopositados. El aparato reproductor del macho, por otra parte, se forma por un par de testículos o testes, un par de *vas deferens*, una vesícula seminal, una glándula accesorio y un ducto eyaculatorio conectado al poro genital (Anderson & Magnerelli, 2008; Sonenshine & Roe, 2014).

Casi inmediatamente después que el macho muda de ninfa a adulto y empieza a alimentarse, se considera listo para copular. La conducta sexual está determinada por la acción de feromonas, como el 2-6-diclorofenol. Antes de copular, el macho identifica la apertura genital de la hembra al detectar las feromonas específicas de la hembra, lo que estimula la formación del espermatozoido, el cual

consiste en espermatozoides producidos por los testículos y proteínas producidas por la glándula accesoria. Durante la cópula, el macho transfiere el espermatóforo de su poro genital al de la hembra (Sonenshine & Roe, 2014).

Una vez que el espermatóforo emerge del poro genital, el macho con sus quelíceros lo deposita a través del poro genital hacia el receptáculo seminal de la hembra. Adicionalmente, la salivación del macho previene que el espermatóforo quede pegado en la cutícula. La porción externa del espermatóforo, el ectoespermatóforo, queda en la superficie externa del poro genital de la hembra, y la porción interior, el endoespermatóforo alcanza el vestíbulo vaginal y el semen es liberado. El ectoespermatóforo se seca y cae al exterior (Cupp, 1991; Sonenshine & Roe, 2014).

Los espermatozoides migran hacia el oviducto y en dirección al ovario para fertilizar los ovocitos que aún se encuentran en este órgano. Una vez realizada la fertilización, la cubierta de los ovocitos se endurece para comenzar el proceso de oviposición y embriogénesis (Sonenshine & Roe, 2014).

La oviposición comienza cuando los ovocitos fertilizados pasan de los ovarios, a través de los oviductos, y llegan al útero y la vagina, donde por contracciones musculares los huevos son expulsados a través del poro genital. Una vez que están expuestos, son capturados por el aparato bucal para que el órgano de Guebe los recubra con una mezcla de grasas y carbohidratos que protegen estos huevos (Anderson & Magnarelli, 2008; Sonenshine & Roe, 2014).

### **2.2.5 El sistema tegumentario y el proceso de ecdisis**

El tegumento de las garrapatas ixódidas comprende la epidermis y la cutícula, y esta última a su vez se divide en epicutícula y procutícula. La cutícula es formada por una estructura polimérica de quitina (Sonenshine & Roe, 2014).

La ecdisis es el proceso por el cual una cutícula vieja es reemplazada por una nueva. El comienzo de esta fase de muda se da a nivel endocrino, con la síntesis y acción de los ecdisteroides. Posteriormente, ocurre una fase llamada

apólisis, en la cual las células epidérmicas se separan de la capa quitinosa. Para que esto sea posible, se secreta un fluido de muda con altas concentraciones de quitinasas, glicohidrolasas y beta-N-acetilglicosaminidasa, las cuales degradan el esqueleto quitinoso y las proteínas de unión a la epidermis, y se forma una membrana de ecdisis. Posteriormente, se activan genes de sintetetas de quitina que formarán el nuevo exoesqueleto (Arakane & Muthukrishnan, 2010; Moussian, 2013; Sonenshine & Roe, 2014).

### **2.2.6 Ciclo biológico**

*R. microplus* tiene tres etapas de desarrollo, que son las fases de larva, ninfa y adulta. Son garrapatas de un solo hospedero y su ciclo biológico puede ser dividido en dos etapas, una de vida libre en la cual la garrapata se encuentra en el suelo, y otra de vida parásita, abarcando esta segunda todo el proceso que ocurre con el parásito sobre el hospedero (Taylor *et al.*, 2007; Benavides *et al.*, 2016; Berry, 2017).

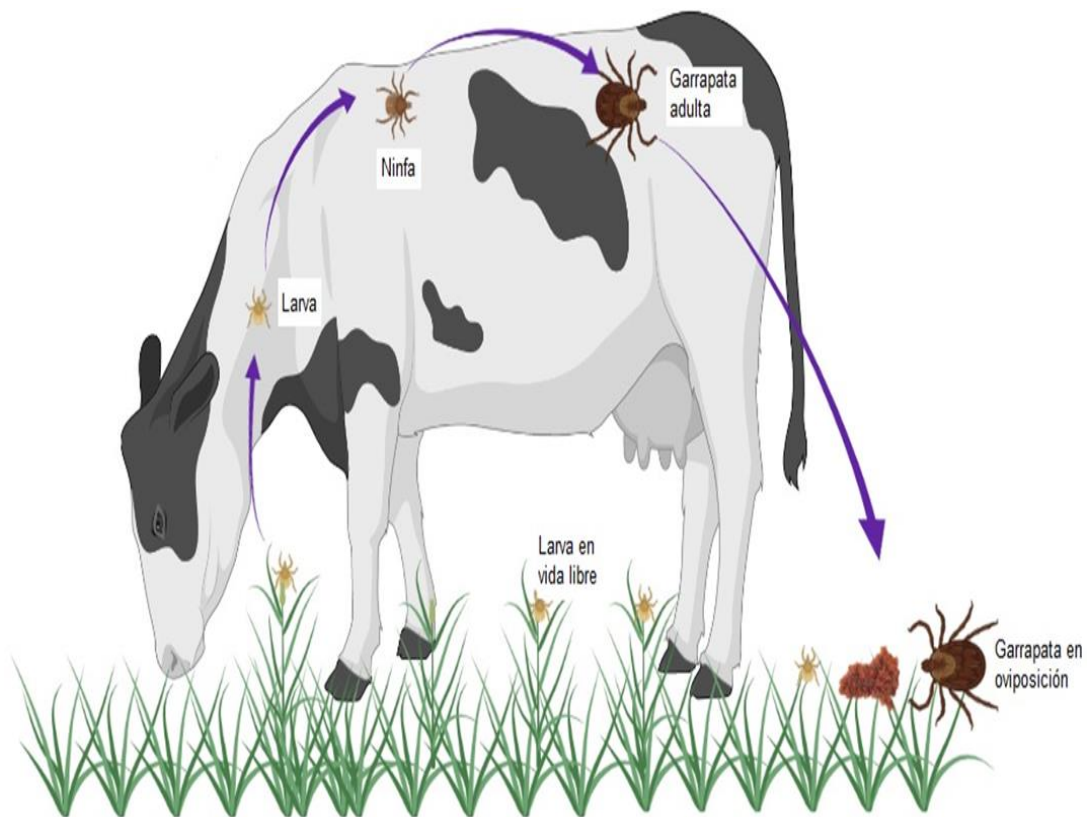
#### **Fase no parasítica.**

La fase no parasítica comienza cuando una hembra adulta fecundada oviposita en el suelo y se incuban los huevos. Posteriormente, tras 21 días aproximadamente, las larvas eclosionan y se esconden en la vegetación en espera de su hospedero, pudiendo sobrevivir hasta 20 semanas en esta condición (Benavides *et al.*, 2016; Nava *et al.*, 2017).

#### **Fase parasítica.**

La larva invade al hospedero utilizando sus patas frontales para trepar y recorrer el cuerpo del animal hasta encontrar un sitio al cual anclarse. Se alimenta durante 3-5 días, y muda a la fase de ninfa (Benavides *et al.*, 2016). La ninfa repite el proceso de alimentación en un lapso de 4-8 días, y se desarrolla hacia un adulto macho o hembra. Los adultos se reproducen, completando el ciclo cuando la hembra abandona el hospedero para ovipositar en el suelo. Los machos permanecen sobre el bovino por mayor tiempo debido a que se reproducen varias

veces antes de finalmente caer y morir en el suelo (Barker & Walker, 2014). La hembra tiene la capacidad de ovipositar un total de 1500 a 4000 huevos (Cupp, 1991; Berry, 2017). En condiciones de temperatura y humedad propicias, la duración del ciclo es de 21-23 días para la alimentación y 1-2 meses para la oviposición y desarrollo de las larvas. Se ha descrito que, en las regiones tropicales, puede haber hasta 5 generaciones de garrapatas por año (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005). En épocas de temperaturas frías, el tiempo se puede alargar hasta los 3 meses (Walker *et al.*, 2003; Nava *et al.*, 2017). Los factores abióticos, como la temperatura y la vegetación, determinan la duración de la fase no parasítica y el número de generaciones de garrapatas por año. Una esquematización del ciclo biológico de *R. microplus* se muestra en la Figura 4.



**Figura 4. Ciclo biológico de *R. microplus***  
(Imagen creada en BioRender por López-Díaz, 2021).



### **2.3 Situación nacional: Impacto de *Rhipicephalus microplus* en México**

En el país se han identificado 100 especies de garrapatas. Aquellas que representan una problemática para la ganadería bovina nacional son *R. microplus*, *R. annulatus* y *Amblyomma mixtum*. Estas garrapatas comparten hábitat en algunas zonas del país y, en el caso de ambas *Rhipicephalus*, pueden ser identificadas erróneamente y ser confundidas. *R. microplus* se encuentra en casi todo el país, abarcando las zonas tropicales y subtropicales, mientras que *R. annulatus* soporta condiciones de temperatura y humedad más bajas y se distribuye principalmente en la zona norte del país (Pérez *et al.*, 2014; Almazán *et al.*, 2018). A pesar de que son dos garrapatas estrechamente relacionadas tanto en características físicas y biológicas, se ha documentado que existe una separación entre las poblaciones de ambas especies debido a preferencias ambientales e inviabilidad biológica para reproducirse, ya la cruce de estas especies produce individuos híbridos estériles (Graham *et al.*, 1972; Lohmeyer *et al.*, 2011).

Se considera que por su amplia distribución y por las enfermedades que transmite, así como por sus características de adaptabilidad, *R. microplus* es la garrapata de mayor importancia para la ganadería bovina mexicana. Debido a esto y a los reportes emergentes de resistencia a acaricidas, en el año 1995 se estableció la Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* spp (Graham & Hourrigan, 1977; Estrada-Peña *et al.*, 2006; Almazán *et al.*, 2018).

El 30.6% del territorio mexicano se reporta como libre de garrapatas del subgénero *Boophilus*, abarcando los estados de Baja California, Sonora, Tlaxcala y Aguascalientes, y gran parte de Baja California Sur y Chihuahua. Adicionalmente, en el centro del país, se contempla una región libre de garrapatas, ya que sus características naturales impiden la presencia de estos parásitos (SENASICA, 2021). El resto del país es territorio afectado, lo que implica que alrededor de 25 millones de cabezas de ganado estén en riesgo de padecer infestaciones por estas garrapatas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017; SENASICA, 2020). La distribución de *R. microplus* en México se puede apreciar en la Figura 5.



**Figura 5. Mapa de distribución de *R. microplus* en México (SENASICA, 2021).**

### 2.3.1 Impacto económico

La producción de ganado bovino es una de las principales actividades de la industria alimentaria del país. En el año 2020, se superaron los 2 millones de toneladas de carne de bovino y 12 mil millones de litros de leche. Además, se espera que este rubro mantenga un crecimiento sostenido en los próximos años (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017; SADER, 2020; SIAP, 2021).

A nivel nacional, las garrapatas *R. microplus* provocan pérdidas en la productividad de los animales, limitan la introducción de ganado especializado y limitan el comercio internacional de ganado vivo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017; Almazán *et al.*, 2018). A pesar de esto, no hay suficientes estudios que determinen el impacto monetario que tienen estas garrapatas sobre la producción ganadera anual, esto en cuanto a gastos de control químico y de mortalidad de animales.

Rodríguez-Vivas *et al.* (2017), estimaron las pérdidas económicas alrededor de los 573 millones de dólares anuales.

### 2.3.2 Impacto zoonosario

Los efectos de *R. microplus* sobre el ganado se puede clasificar en impactos directos e indirectos. El impacto directo se observa en presencia de infestaciones descontroladas, en las cuales el gran número de garrapatas alimentándose del hospedero provoca pérdida de peso y sangre, reacciones alérgicas, disminución de la producción de leche y daños en la piel del animal, la cual puede perder hasta el 30% de su valor (Graham & Hourrigan, 1977; Jongjean & Uilenberg, 2004; Tabor *et al.*, 2017). No obstante, los efectos más graves son los indirectos, ya que estas garrapatas son vectores de microbios patógenos, como los protozoarios *Babesia bovis* y *B. bigemina*, y la bacteria *Anaplasma marginale*. Estos son microorganismos patógenos, capaces de multiplicarse dentro de eritrocitos y provocar complicaciones graves para el bovino (Almazán *et al.*, 2018). Otro microorganismo transmitido por esta garrapata es *Coxiella burnetti*, pero la enfermedad que causa, llamada fiebre Q, es muy rara en México (Araujo *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013).

*B. bovis* y *B. bigemina* son responsables de causar babesiosis bovina, también llamada piroplasmosis. Esta enfermedad se caracteriza porque los animales presentan fiebre de 41-42°C, pérdida del apetito, cese de movimientos ruminales, dificultad en la respiración, anemia hemolítica, ictericia, hemoglobinuria y emaciación progresiva, además de algunos trastornos de movimiento a consecuencia de afectación neurológica. En la mayoría de los casos, este conjunto de signos clínicos resulta en la muerte del animal (Bock *et al.*, 2004; Mohamed & Elshahawy, 2018).

La anaplasmosis bovina es provocada por la rickettsia intracelular *A. marginale*, que provoca una enfermedad de curso parecido a la babesiosis. Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, anemia, ictericia, debilidad, severa pérdida de peso, aborto en el último tercio de gestación y finalmente la muerte del animal,

especialmente en aquellos mayores de dos años (Kocan *et al.*, 2003; Aubry & Geale, 2011).

## **2.4 Estrategias de control**

Los primeros intentos enfocados a la erradicación de poblaciones de *R. microplus* datan de finales del siglo XIX y principios del siglo XX, en países como Australia, Estados Unidos y Uruguay (Angus, 1996; Mirabelles & Riet, 2018). Aunque al comienzo eran métodos con severas limitaciones, se desarrollaron nuevos productos, tecnologías y estrategias que podían combatir eficientemente a las garrapatas (Angus, 1996; Graf *et al.*, 2004; Willadsen, 2004).

Los programas de control actuales tienen por objetivo reducir los niveles poblacionales de las garrapatas hasta números que sean tolerables por los animales y no causen una merma significativa en la producción. Esta estrategia se conoce como control integrado y requiere conocimientos sobre la biología del parásito, sus interacciones con otras especies, el uso racional de acaricidas y la incorporación de vacunas y métodos biológicos y ecológicos (Tabor *et al.*, 2017). Una gran ventaja de este control integrado es la relacionada con el aspecto económico, determinándose que puede reducirse hasta en un 70% los costos destinados a combatir garrapatas (Domínguez *et al.*, 2016).

### **2.4.1 Control químico**

El control de las garrapatas se ha basado durante mucho tiempo en la utilización de acaricidas, es decir, de sustancias químicas capaces de eliminar las fases de vida parasítica del artrópodo. Sin embargo, su uso desmedido causa efectos indeseables que reducen su eficacia (Graf *et al.*, 2004; Reck *et al.*, 2014).

Los primeros tratamientos con acaricidas empezaron con la implementación de baños para ganado, los cuales involucraban sumergir al bovino en una mezcla de aceites minerales, queroseno o arsénicos, sustancias caracterizadas por tener una eficacia media-baja contra las garrapatas y alta probabilidad de causar efectos tóxicos en los animales. Posteriormente, el desarrollo de otros productos, como el

dicloro difenil tricloroetano o DDT y otros organoclorados, permitió implementar exitosamente programas de erradicación de garrapatas, como el ocurrido en Estados Unidos que finalizó en 1960 (Graham & Hourrigan, 1977; Angus, 1996; Graf *et al.*, 2004; Chevillon *et al.*, 2012).

Otros grupos de acaricidas que se desarrollaron y comercializaron masivamente incluyen organofosforados, organoclorados, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazoles y reguladores del crecimiento. El éxito de estos productos se basó en la diversificación de presentaciones, facilidad de utilización y administración, y las pocas restricciones para su venta (Graf *et al.*, 2004; Almazán *et al.*, 2018).

El principal problema generado por el sobreuso de acaricidas es el fenómeno de resistencia, definida como una condición genética que le otorga al parásito la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en un ambiente tóxico por la presencia de una concentración letal de un fármaco (Rosario-Cruz *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2014). La resistencia no es un problema nuevo, ya que los reportes de resistencia a acaricidas aparecieron en el mundo a mediados de la década de 1930, cuando se descubrieron garrapatas resistentes a los derivados de arsenicales (Angus, 1996; George *et al.*, 2004).

En México, la primera vez que se reportó resistencia a un acaricida fue en los años 80, al describirse resistencia de la cepa Tuxpan a organofosforados (Aguirre & Santamaría, 1986). Este fenómeno se ha repetido de manera constante a través del tiempo, incrementándose el número de reportes en México y en todo el mundo (Pérez-Cogollo *et al.*, 2010; Fernández-Salas *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013; Reck *et al.*, 2014).

Otro problema asociado con la resistencia a los acaricidas es la constante necesidad de generar productos nuevos. Se estima que el costo para desarrollar un nuevo tratamiento y lanzarlo al mercado es de aproximadamente 100 millones de dólares, siendo grandes costos para productos cuya eficacia dura en promedio diez

años antes de volverse obsoleto y surjan garrapatas resistentes. Por esto y mucho más, se consideran a los acaricidas como productos no renovables (Graf *et al.*, 2004; Willadsen, 2004).

Además, el uso de acaricidas se relaciona con problemas de contaminación, pues las sustancias químicas se acumulan en los productos derivados del animal y en el ambiente. Asimismo, ya que los acaricidas son pesticidas y deben ser tóxicos para la garrapata, también pueden tener efectos de toxicidad sobre el bovino, sobre otros organismos que entren en contacto con estos residuos y para las personas que manipulan estos productos (Graf *et al.*, 2004; Kiss *et al.*, 2012).

#### **2.4.2 Control biológico**

Aunque este método es, probablemente, el que tiene mayor tiempo de ser conocido, su desarrollo moderno data de la década de 1950 (Kiss *et al.*, 2012). Esta estrategia busca controlar las poblaciones de garrapatas mediante el aprovechamiento de extractos naturales, pastos, árboles, hongos y animales que afecten a las fases libres de la garrapata. Ejemplos de enemigos naturales son las aves, arañas, avispas, nemátodos y hormigas; algunos pastos con efectos antigarrapatas son el pasto Gordura (*Melinis minutiflora*) y el pasto Insurgente (*Brachiaria brizantha*); algunos de los hongos más estudiados que tienen acción contra garrapatas son el *Beauveria bassiana*, *Akanthomyces lecanii* y *Metarhizium anisopliae* (Samish *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2012).

La utilización de hongos entomopatógenos es uno de los mecanismos biológicos más prometedores y viables que se han estudiado. Estos organismos tienen como características el ser saprófitos, distribuirse y adaptarse a gran variedad de ecosistemas y que existen muchas especies que afectan la viabilidad de las garrapatas (Rajaula *et al.*, 2020; Alonso-Díaz & Fernández-Salas, 2021). Además, debido a que estos hongos actúan de forma mecánica, enzimática y toxicológica, es improbable que las garrapatas desarrollen resistencia (Srinivasan *et al.*, 2019; Alonso-Díaz & Fernández-Salas, 2021).

Debido al creciente interés en la producción de alimentos libres de contaminantes y al aumento de la resistencia de las garrapatas frente a acaricidas químicos, el control biológico se ha convertido en un área atractiva de estudio. Este planteamiento tiene la ventaja de tener un mayor costo-beneficio que los tratamientos químicos, con pocos o nulos efectos secundarios sobre los bovinos u otros animales y la ausencia de residuos químicos en el ambiente (Porfirio & Schwentesius, 2016; Alonso-Díaz & Fernández-Salas, 2021). Sin embargo, aún se sigue investigando la forma en que podría implementarse eficientemente en un sistema de producción, ya que los resultados obtenidos muestran inconvenientes como falta de efectos contra todas las fases de las garrapatas o dificultad de siembra de plantas con los efectos deseados de letalidad o repelente en algunas zonas del mundo (Samish *et al.*, 2004; Kiss *et al.*, 2012).

#### **2.4.3 Control inmunológico**

El control inmunológico de *R. microplus* se basa en la utilización de animales genéticamente resistentes que toleren las infestaciones de garrapatas y tienen diferentes mecanismos de barrera, como en el caso de la especie *B. indicus*, y que puedan montar respuestas efectivas contra larvas, además del desarrollo de inmunidad mediante la aplicación de vacunas (Willadsen & Kemp, 1986; Willadsen, 2004).

Las garrapatas tienen diversas estrategias que favorecen su viabilidad sobre el hospedero, incluyendo proteínas inmunomoduladoras en su saliva que permiten evadir respuestas inmunitarias del hospedero, Esto provoca que la generación de inmunidad natural sea limitada y restringida a ciertas razas cuya evolución fue paralela con la garrapata (Wharton, 1975; Titus *et al.*, 2006; Kiss *et al.*, 2012).

Una alternativa factible es generar inmunidad mediante el uso de vacunas constituidas de antígenos denominados ocultos, nombrados así porque en una infestación normal, el sistema inmunitario del hospedero no entra en contacto con estos compuestos (Willadsen & Kemp, 1988). Las experiencias obtenidas con el

empleo de vacunas han demostrado que son una alternativa factible, sustentable y más barata que los tratamientos químicos, además que se considera poco probable que pudiera surgir resistencia a las vacunas (Graf *et al.*, 2004; Willadsen, 2004; Kiss *et al.*, 2012). No obstante, obtener una vacuna antigarrapata exitosa involucra una larga y complicada serie de etapas de identificación de antígenos candidatos, comprobación de que estos sean inmunogénicos, determinación de una respuesta inmunitaria protectora, validación de eficacia en condiciones de campo y la generación industrial o masificada (Willadsen, 2004).

#### **2.4.3.1 Estudios de inmunidad antigarrapatas.**

La inmunidad contra garrapatas se ha reportado en cueros, conejos y en bovinos. Se ha documentado que esta protección orgánica es distinta en los animales dependiendo de factores de especie y raza (de la Fuente & Contreras, 2015; Tabor *et al.*, 2017). Esta inmunidad natural se dirige principalmente contra las larvas, expresándose como reacciones de hipersensibilidad que rechazan la invasión larvaria (Roberts, 1968; Willadsen & Kemp, 1988).

La inducción de inmunidad contra garrapatas por medio de vacunas comenzó a estudiarse desde la década de 1970, hipotetizándose que algunos anticuerpos podrían ser ingeridos por las garrapatas y dañar órganos internos. En estas primeras investigaciones se utilizaron vacunas generadas a partir de órganos macerados de la garrapata y se obtuvieron resultados como retraso en la muda, disminución en la cantidad de hembras que se repletan, daño orgánico y disminución de la población de garrapatas. Además, a diferencia de la inmunidad natural, se encontró que la inmunidad adquirida se dirige contra fases adultas del parásito (Allen & Humphreys, 1979; Johnston *et al.*, 1986; Kemp *et al.*, 1986).

De acuerdo con Tabor *et al.* (2017), para que un organismo se considere resistente o con inmunidad antigarrapatas, se deben comprobar parámetros como una disminución en el peso del parásito, corta duración sobre el hospedero, decremento en el número de garrapatas adheridas al hospedero, disminución en la masa total de huevos y del éxito entre mudas. Otros factores que se consideran son



el número de garrapatas repletas, el peso de hembras grávidas y efectos sistémicos en las garrapatas vistos desde el punto de vista histológico (Tafúr-Gómez *et al.*, 2019). Este tipo de inmunidad es mediada por las inmunoglobulinas IgG, las cuales, al ser ingeridas durante la alimentación de la garrapata, son capaces de unirse a proteínas específicas y desencadenar daños en órganos internos (Tabor *et al.*, 2017).

#### **2.4.3.2 El antígeno Bm86 y las vacunas antigarrapatas comerciales.**

En la década de 1990 aparecieron las primeras vacunas antigarrapatas comerciales, TickGard en Australia y GAVAC de Cuba, utilizando la glicoproteína intestinal Bm86 como antígeno recombinante (Cobon *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 1999). Actualmente, únicamente permanecen como opción inmunológica la GAVAC en algunos países latinoamericanos, y en México se comercializa el biológico Bovimune Ixovac® (Schetters *et al.*, 2016; Lapisa, 2017).

Bm86 es una glicoproteína compuesta por aproximadamente 650 aminoácidos y con peso molecular de 89 kDa, con dominios de crecimiento epidérmico, péptido señal y con funciones relacionadas con el proceso de repleción y endocitosis digestiva de la garrapata. Cuando Bm86 es bloqueada e inactivada por anticuerpos y el sistema del complemento, el intestino de la garrapata es dañado y por consecuencia ocurre una deficiente alimentación y la capacidad reproductiva es afectada (Willadsen *et al.*, 1989; Willadsen, 2004; de la Fuente & Contreras, 2015). Esta proteína fue aislada a partir del intestino de la cepa Yeerongpilly, a fines de la década de 1980 (Willadsen *et al.*, 1989). Proteínas similares a Bm86, con al menos 50% de identidad se han encontrado en *R. decoloratus*, *R. annulatus*, *R. sanguineus*, *R. appendiculatus* y *Hyalomma anatolicum*, y la vacuna de Bm86 recombinante puede también afectar a estas especies de garrapata (de Vos *et al.*, 2001).

Aunque la vacuna de Bm86 tiene efectos positivos al afectar directamente a las garrapatas y se puede reducir la frecuencia de uso de acaricidas, no tienen acción de derribe y su efecto es gradual sobre las poblaciones de garrapatas. A

pesar de lo anterior, se ha observado que variaciones alélicas en el gen que codifica a Bm86, incluso en porcentajes tan bajos como 3.4%, es suficiente para impedir una adecuada respuesta inmunitaria. Así, el principal problema encontrado al vacunar con Bm86, es que la inmunidad no se presenta de la misma manera en cepas de todas las áreas geográficas, con eficacias reportadas de hasta 90% en Australia y Cuba, de menos de 10% en Argentina, y entre 50 y 90 % en México, infiriéndose una relación directa entre la eficacia de la vacuna y el grado de conservación de la proteína (García-García *et al.*, 1999; de la Fuente *et al.*, 2006; Almazán *et al.*, 2018).

#### **2.4.3.3 Identificación de nuevos candidatos vacunales.**

A pesar de que las vacunas se han propuesto como una alternativa para el control de las garrapatas, aún es necesario encontrar nuevos antígenos y combinaciones de éstos que sean más eficientes (de la Fuente *et al.*, 2020). De acuerdo con la normativa nacional, para que una vacuna antigarrapata pueda ser comercializada, debe tener una eficacia mínima de 80% para el control de *R. microplus*. Además, para cumplir con el porcentaje de potencia, debe proteger al 80% de los animales desafiados (NOM-006-ZOO-1993; NOM-063-ZOO-1999).

Las condiciones que se deben cumplir para que un antígeno sea candidato vacunal incluyen la generación de anticuerpos en cantidades suficientes para poder alcanzar su molécula blanco, formación de complejos antígeno-anticuerpo que bloqueen las funciones de la proteína y que los epítomos sean conservados en varias especies o subespecies de garrapatas (de la Fuente & Contreras, 2015).

Una de las corrientes inmunológicas actuales incluye la vacunación con subunidades, principalmente con péptidos recombinantes y sintéticos, los cuales han demostrado que pueden ser inmunogénicos y eficaces para disminuir la viabilidad de las garrapatas, además de poder ser identificados mediante herramientas moleculares y de bioinformática (Patarroyo *et al.*, 2002; Almazán *et al.*, 2005; Patarroyo *et al.*, 2020). Una gran ventaja de estudiar subunidades antigénicas, es que se pueden combinar y desarrollar vacunas multiantigénicas, multiepítópicas y quiméricas, las cuales se han propuesto que tengan mayor eficacia

al dañar a las garrapatas en distintos órganos, estadios y funciones fisiológicas (Willadsen, 2008; Almazán *et al.*, 2012).

En un estudio previo, Patarroyo *et al.*, 2002, diseñaron y sintetizaron péptidos de 40 aminoácidos derivados de Bm86, los cuales demostraron tener una eficacia de hasta el 75%. En otros ensayos, se han identificado y utilizado péptidos con epítomos B predichos de las proteínas P0, ATAQ y acuaporina de *R. microplus*, algunos con mayor eficacia vacunal que el antígeno Bm86 recombinante comercial. Lo anterior, ha demostrado que puede ser posible utilizar péptidos cortos como antígenos en una vacuna contra *R. microplus* (Rodríguez *et al.*, 2015; Rangel-Aguirre *et al.*, 2016; Scoles *et al.*, 2022).

Pérez-Soria (2020) identificó *in silico* péptidos con epítomos B predichos en nueve antígenos de *R. microplus*, y conservados en cepas mexicanas de esta garrapata, lo cual demanda pruebas *in vivo* para determinar su inmunogenicidad y eficacia vacunal. Estos péptidos obtenidos corresponden a las proteínas Bm86, Bm95, VDAC, subolesina, voraxina, quitinasa, vitelogenina, glutatión-transferasa y serpina.

#### **2.4.3.4 Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)**

VDAC es una porina de 30 kDa localizada en la membrana mitocondrial externa de células eucariontes, pero también presente en las membranas citoplasmáticas. La estructura primaria es altamente variable en las distintas especies de organismos eucariontes, pero la estructura secundaria y sus propiedades funcionales se mantienen conservadas (Colombini *et al.*, 1996).

Morfológicamente, VDAC es un canal con forma de barril anclado dentro de las membranas celulares, y formado por una estructura de 19 láminas beta unidas entre sí por asas flexibles de 8 aminoácidos y una alfa hélice N-terminal de 25 aminoácidos localizada en el interior del poro. Sus medidas son de 3.1-3.5 nm de diámetro por 4 nm de tamaño vertical (Colombini *et al.*, 1996; Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010). Debido a que la estructura se ha comprobado altamente similar en

humanos y levaduras, se ha propuesto que está conservada entre todos los organismos eucariontes (Colombini, 2004).

Se ha descrito que esta proteína participa en roles fisiológicos como la regulación del flujo de iones y metabolitos entre las mitocondrias y el citosol. VDAC se mantiene abierto a potenciales de membrana bajos (10 mV) y es selectivo a aniones, como el cloro. A voltajes altos (30mV), el poro se cierra y es selectivo solamente a cationes, por ejemplo ATP, ADP, calcio, potasio y sodio (Thinnes *et al.*, 1992; Colombini *et al.*, 1996). También se ha encontrado que forma parte del sistema apoptótico de las células, ya que permite la traslocación del factor apoptótico citocromo c de la mitocondria hacia el citosol (Shimizu *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha reportado la existencia de tres isoformas de esta proteína que se obtienen por la expresión de genes diferentes o por splicing alternativo. Aunque cada isoforma tiene diferentes efectos fisiológicos, ninguna es indispensable para la viabilidad celular (Colombini, 2004).

Una proteína similar a VDAC, con peso molecular de 31 kDa y un total de 282 aminoácidos, fue identificada en el intestino de *R. microplus* y denominada BmVDAC. Se demostró que participa activamente durante procesos invasivos de *B. bigemina*, ya que se sobre expresa a nivel de transcripción y traducción en condiciones de infección con este protozooario (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015).

Esta proteína se ha estudiado como antígeno recombinante (rBmVDAC) en vacunas contra *R. microplus* y contra *B. bigemina*. En un estudio desarrollado por Ortega-Sánchez *et al.* (2020), se demostró que rBmVDAC genera anticuerpos específicos contra la proteína de la garrapata y estos tienen un efecto de bloqueo sobre la transmisión de *B. bigemina*. Además, este antígeno tiene efectos de reducción sobre el total de garrapatas repletas que completan el ciclo biológico, se obtiene una menor masa de oviposición y una menor eclosión de larvas viables. En total, se calculó una eficacia de 82% contra *R. microplus*. La eficacia de la inmunización con rBmVDAC sobre el parásito se muestra en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Eficacia de rBmVDAC sobre *R. microplus* (Ortega-Sánchez *et al.*, 2020).**

DT (Reducción en la supervivencia)	DW (Reducción en el peso)	DO (Reducción en la oviposición)	DF (Reducción en la fertilidad)	Eficacia vacunal
38%	5%	54%	55.8%	82%

#### **2.4.3.5 Voraxina**

La voraxina es una proteína producida por las gónadas de los machos adultos. Inicialmente fue descrita como un factor de ingurgitación o repleción, que forma parte del espermátforo de los machos, siendo transferido y liberado dentro de las hembras durante la cópula (Pappas & Oliver, 1972; Weiss & Kaufman, 2004; Sonenshine & Roe, 2014).

La proteína fue caracterizada primeramente en la especie *A. hebraeum*, como una molécula proteica formada por la dimerización de dos péptidos, que por sí solos no tienen actividad funcional. El primero es un péptido de 16.1 kDa y 111 aminoácidos, mientras que el segundo peso 11.6 kDa y tiene 71 aminoácidos. Fisiológicamente, es un factor proteico necesario para estimular la repleción de la hembra después de la cópula, aumentando su peso más allá de un peso crítico necesario para que las hembras ovipositen. Aunque su mecanismo de acción no ha sido esclarecido, se cree que una vez dentro de la hembra se libera y llega al singanglion, que a su vez libera un péptido que estimula la producción de ecdisteroides por mecanismo de segundo mensajero (Lomas & Kaufman., 1992; Weiss & Kaufman, 2004).

En el estudio de Weiss & Kaufman (2004), se describió que la voraxina recombinante es inmunogénica y provoca que las hembras tengan una disminución del 72% en el peso que alcanzan, y que alrededor del 75% no sobrepasen el peso crítico para que ovipositen. Además, hubo un retraso de tres días en el periodo de alimentación de las hembras.

Adicionalmente, la subunidad alfa de voraxina ha sido identificada en *Dermacentor variabilis* y caracterizada y evaluada como candidato vacunal en *R. appendiculatus*. En esta última especie, se describió como una proteína de 153 aminoácidos y peso molecular de 16.1 kDa. Se describió que el gen que codifica esta proteína se expresa predominantemente en el testículo y *vas deferens* de ninfas y adultos machos de cuatro días de alimentación. Como antígeno vacunal, se obtuvo una reducción del 50% de la capacidad de alimentación de las hembras, y afectando directamente su peso, reducción de 42%, y oviposición, 38.6% de garrapatas no ovipositaron y se redujo en un 56% la masa de oviposición individual (Yamada *et al.*, 2009). En el caso particular de *R. microplus*, se ha identificado una proteína similar a voraxina que guarda un 96% de similitud. Aún con esto, no se han desarrollado estudios de eficacia vacunal en esta especie (Kumar & Gosh, 2014).

Otro tipo de ensayo con el que se ha estudiado voraxina ha sido el silenciamiento de genes mediante ARN de interferencia. Sin embargo, utilizando esta técnica no se tuvieron efectos sobre la mortalidad, repleción de hembras o fertilidad en las especies *D. variabilis* y *A. hebraeum*, contrario a lo obtenido mediante vacunación con la proteína recombinante (Donohue *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009).

#### **2.4.3.6 Quitinasa (Chitinasa)**

Las quitinasas son una familia de enzimas ampliamente estudiadas en artrópodos debido a su importante rol en el desarrollo y crecimiento de estos animales. Las quitinasas permiten el éxito en la metamorfosis interestadial al hidrolizar los polímeros de quitina presentes en la cutícula y la membrana peritrófica (Kimura, 1973; Arakane & Muthukrishnan, 2010).

El mecanismo de acción de la mayoría de las quitinasas es de tipo lisozima y endoquitinasa, al romper los enlaces N-acetil glucosamina internos que conforman la quitina. Las quitinasas se dividen en familias 18 y 19 quitinasas, siendo las primeras las más comunes en los seres vivos. Además, existe otro grupo de proteínas denominadas de tipo quitinasa, las cuales cumplen con funciones de

regulación del crecimiento e inmunomoduladoras (Henrissat, 1999; Arakane & Muthukrishnan, 2010).

Estructuralmente, son enzimas con peso molecular de 20 a 90 kDa, con uno a cinco dominios catalíticos glicosil hidrolasa y uno a siete sitios de unión a quitina. Además, en su secuencia tienen un péptido señal que les permite salir al espacio extracelular, ya que el principal lugar donde se concentran es en el fluido de muda (Arakane *et al.*, 2003; Hamid *et al.*, 2013). Las quitinasas de las familias 18 y 19, no comparten similitud en su secuencia de aminoácidos y su estructura tridimensional es diferente (Hamid *et al.*, 2013). Como modelo, una quitinasa perteneciente a la familia 18 tiene forma de barril, con ocho láminas beta constituyendo el centro del barril y ocho alfa hélices en el exterior (Arakane & Muthukrishnan, 2010).

En otros organismos, que incorporan la quitina dentro de su dieta, la quitinasa es fundamental para sus procesos de digestión (Arakane *et al.*, 2003). Otro importante rol en el que participan las quitinasas es en la invasión de algunos microorganismos como *Plasmodium* spp al intestino de su vector, ya que permiten la desintegración de la membrana peritrófica de su intestino. Así, se han hipotetizado como candidatos vacunales para bloquear la transmisión de enfermedades infecciosas (Takeo *et al.*, 2009). Bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Alteromonas*, *Escherichia*, *Aeromonas* y *Serratia* producen quitinasas para establecer infecciones en hospederos (Hamid *et al.*, 2013).

Las quitinasas se han estudiado como candidatos vacunales en la especie asiática *Haemaphysalis longicornis*, demostrándose que se logra una reducción del éxito entre mudas del 20%, se alarga el periodo de alimentación de las larvas en hasta 1.5 días y disminuye el número de huevos ovipositados en un 13% (You *et al.*, 2003; You & Fujisaki, 2009).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las infestaciones por garrapatas *Rhipicephalus microplus* representan un gran problema que limita el crecimiento y desarrollo de la ganadería tropical y subtropical del mundo. Estas garrapatas son responsables pérdidas económicas estimadas en miles de millones de dólares cada año debido al efecto nocivo en la salud de los hospederos y al transmitir microorganismos patógenos que causan enfermedades al ganado bovino. El método tradicional de tratamiento y control de las garrapatas se basa en el uso de acaricidas químicos, los cuales son cada vez menos eficientes debido a la generación de resistencia por parte de las garrapatas y por tener un efecto contaminante en el ambiente. Una alternativa más sustentable es la utilización de un sistema de control integrado, que involucre métodos biológicos e inmunológicos. Las vacunas actuales que utilizan como antígeno a la proteína Bm86 recombinante han mostrado niveles variables de eficacia, generando la necesidad de un producto que tenga mejores resultados. Una de las perspectivas actuales que podría mejorar la eficacia de las vacunas antigarrapatas es el desarrollo de un preparado multiantigénico y multiepitópico, que combine subunidades antigénicas que logren afectar al parásito en distintos procesos fisiológicos, como la alimentación y digestión, desarrollo y crecimiento, reproducción y oviposición, lo que resultaría en un mayor daño a las capacidades orgánicas de la garrapata. Sin embargo, el primer paso para obtener una vacuna es la identificación y evaluación de los antígenos que formen parte de este preparado. La principal ventaja de la investigación y desarrollo de una vacuna eficaz contra *R. microplus* es la reducción gradual en las poblaciones de la garrapata, aminorando las pérdidas económicas y reduciendo el impacto ambiental.



#### IV. HIPÓTESIS

Péptidos de VDAC, voraxina y chitinasa, utilizados como inmunógeno, son capaces de inducir una eficacia vacunal mínima de 80% contra garrapatas *Rhipicephalus microplus*, al afectar parámetros biológicos de su supervivencia, desarrollo, alimentación y fertilidad.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General:

- Evaluar la eficacia vacunal de péptidos de VDAC, voraxina y chitinasa de *Rhipicephalus microplus*.

### 5.2 Objetivos Específicos:

1. Identificar los péptidos inmunogénicos de VDAC, voraxina y chitinasa de *Rhipicephalus microplus*.
2. Obtener la eficacia vacunal de los péptidos inmunogénicos.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó con permiso del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, con número de aprobación 80FCN2020.

### 6.1 Péptidos experimentales.

Los péptidos seleccionados para este trabajo se obtuvieron a partir del estudio realizado por Pérez-Soria (2020), quien obtuvo predicciones de epítomos B correspondientes a nueve proteínas de *R. microplus*.

Se escogieron doce péptidos de las proteínas VDAC, voraxina y chitinasa, cada una con cuatro péptidos. Estos fueron mandados a sintetizar químicamente en el sistema peptídico de 8 ramas (MAP-8) a la empresa Peptide 2.0. Las secuencias de los péptidos se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Péptidos seleccionados para el experimento (Pérez-Soria, 2019).**

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	Número de aminoácidos
VDAC 1	ASLETKYKVPEYGLTLKEK	19
VDAC 2	DNTLSTEICSEEKLARGL	18
VDAC 3	GALKAAYKFDNVHLNGDVDL	20
VDAC 4	HTNVNDGQEFAGSVFQRVNP	20
Voraxina 1	MQSGGGNKTYCISINL	16
Voraxina 2	MNWMTASLKASRKLYTF	17
Voraxina 3	FPSLCVAAFHAELDTVDGEACP	22
Voraxina 4	VDGEACPQSEQYARLL	16
Chitinasa 1	CYYSAWANSRPHANYGIKDV	21
Chitinasa 2	SADRRALFIESVLLWMKEYNLD	22
Chitinasa 3	AYDLRGTWNGVTDVHPLFP	19
Chitinasa 4	LKGNWKREFDDEGKCPVYYR	21

## 6.2 Preparación de vacunas e inmunización de animales.

La inmunogenicidad de los péptidos sintéticos fue verificada al formular cada péptido en dosis vacunales y aplicarlos a 26 bovinos de raza europea, localizados en una zona libre de garrapata y con un peso inicial aproximado de 240 kg. Por cada péptido analizado se inmunizaron dos bovinos, y dos animales fueron usados como tratamiento control.

Las vacunas se prepararon en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Aeropuerto. Cada vacuna consistió en la emulsificación de 100 µg de cada péptido de interés solubilizado en PBS 1x pH 7.4 estéril y adyuvante comercial Montanide™ ISA 201 VG (Seppic, Francia) en proporción 50:50. Para alcanzar la correcta homogenización de la mezcla, se utilizó un protocolo de sonicación con pulsaciones de 100 amplitudes, repitiéndose cada 10 segundos. La emulsificación se finalizó cuando se observó con el objetivo 100x del microscopio la presencia de micelas con un diámetro de 1µm. El Cuadro 4 muestra los detalles de la formulación de vacunas de control de adyuvante y de las vacunas de péptidos.

**Cuadro 4. Formulación de las vacunas de péptidos sintéticos.**

Grupo vacunal	Cantidad de ingrediente de la vacuna por animal		
	PBS estéril (ml)	Péptido en PBS estéril (ml)	Adyuvante (ml)
Grupo control	0.5	0	0.5
Grupo inmunizado	0.45	0.05	0.5

La inmunización de los animales se realizó en el Campo Experimental “Valle del Guadiana”, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en el municipio de El Mezquital, Durango, localizado en las coordenadas Norte 23° 59' y Oeste 104° 37'. Los bovinos recibieron cuatro inmunizaciones vía subcutánea en los días 0, 21, 42 y 63 del experimento,

alternando el lado en que se realizó la inoculación. Para aplicar las vacunas, se utilizaron jeringas de 3 ml con agujas calibre 18G.

### 6.3 Obtención de sueros inmunes.

De cada individuo inmunizado, se obtuvieron muestras de sangre en tubos vacutainer sin anticoagulante. Las muestras se colectaron de la vena yugular de los bovinos antes de cada inmunización y 14 días posteriores a la última vacunación.

El suero fue separado por centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos. Además, se hicieron alícuotas del suero en tubos de 1.5 ml y rotulados con el número de identificación del animal. La Figura 6 representa la línea del tiempo del experimento y los procesos realizados en cada día.

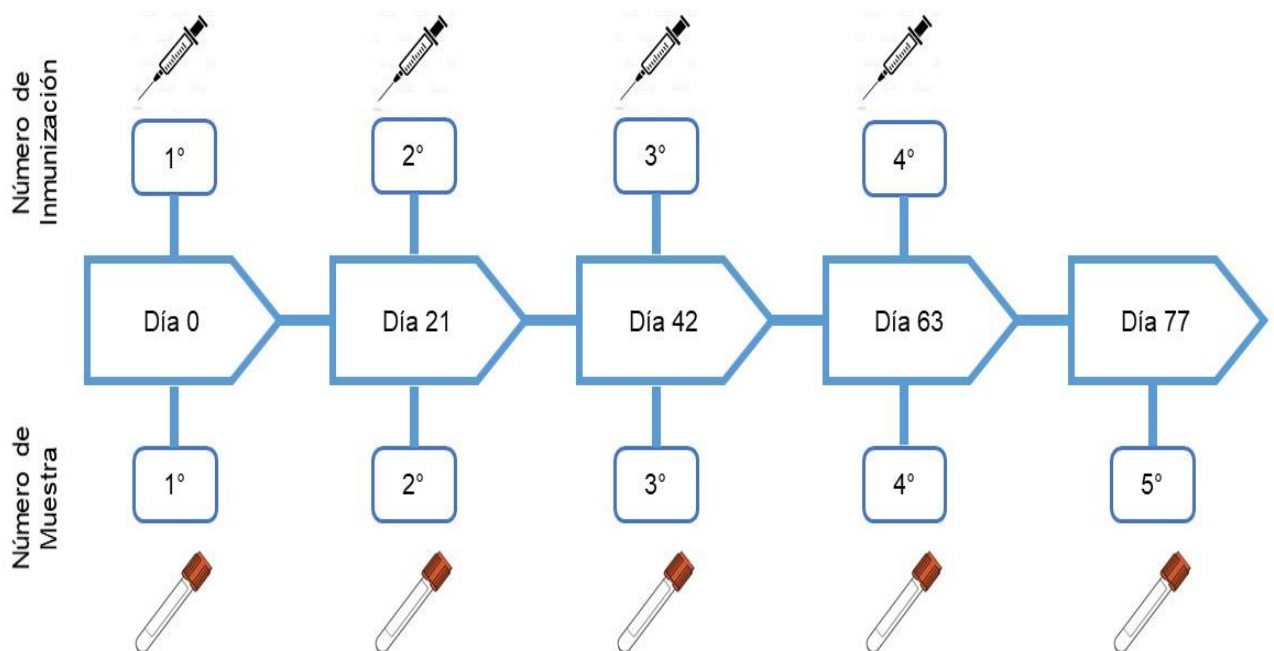


Figura 6. Línea del tiempo de las vacunaciones efectuadas para el experimento de determinación de inmunogenicidad.

#### 6.4 Determinación de inmunogenicidad.

La respuesta inmunitaria de los animales y la producción de anticuerpos fue verificada mediante pruebas de ELISA indirecta, incluyendo los procesos de estandarización. Estos ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Aeropuerto.

##### 6.4.1 Titulación de la concentración de péptidos.

La concentración de péptido adecuada para sensibilizar la placa de ELISA correspondiente, se obtuvo siguiendo un protocolo de titulación de péptidos. Se colocaron 200  $\mu$ l del péptido a titular a una concentración de 8  $\mu$ g/ml de manera seriada por triplicado según lo esquematizado en la Figura 7.

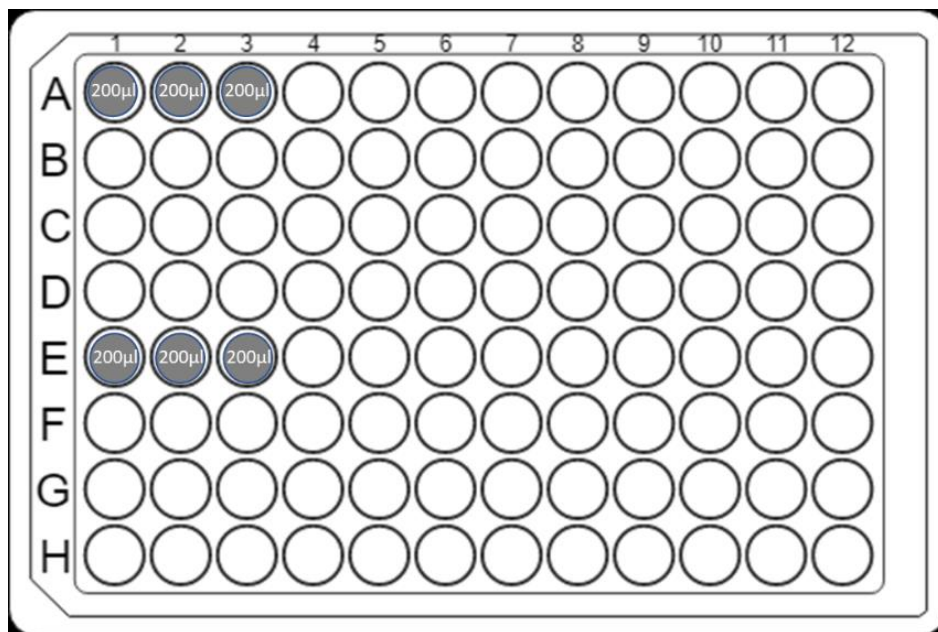


Figura 7. Esquematización del primer paso de la titulación de péptido.

En los siguientes pozos, inferiores y por triplicado, se colocaron 100  $\mu$ l de solución carbonato/bicarbonato 0.1 M pH 9.6. La Figura 8 representa los pozos llenados con esta solución.

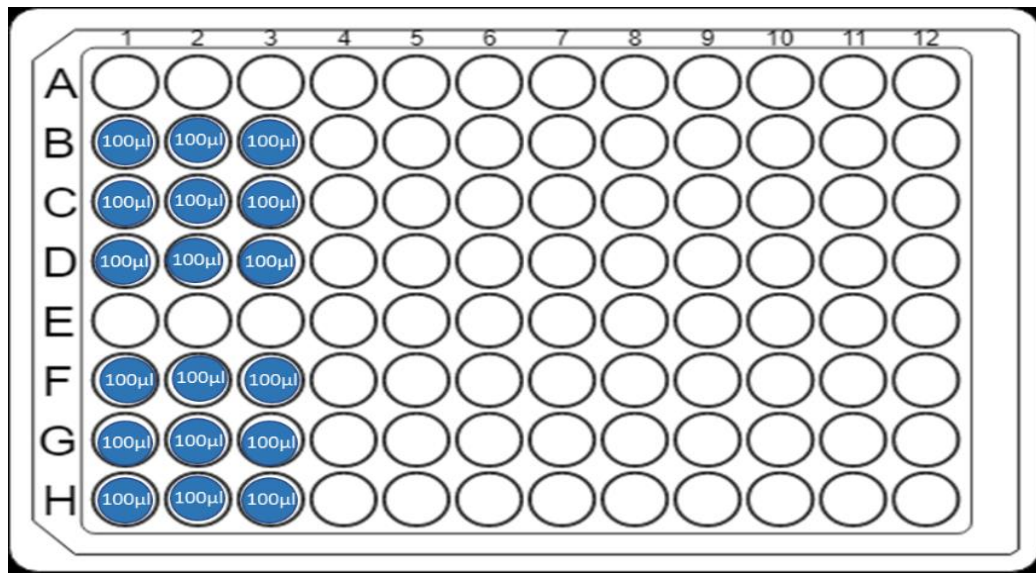


Figura 8. Segundo paso de la titulación de péptido.

Posteriormente, se hicieron diluciones seriadas, tomando 100 µl del péptido concentrado a 8 µg/ml de la fila A y se depositaron en la fila B, homogenizando por pipeteo antes de liberar la solución. Se repitió este paso, tomando 100 µl de la fila B y pasándolo a la fila C, y posteriormente de la fila C a la D. Finalmente, se tomaron 100 µl de la fila D y se desecharon para eliminar el volumen remanente. Este paso se repitió con las filas E-H. Con esto, quedaron pozos con 100 µl de solución de péptido concentrado a 8, 4, 2 y 1 µg/ml. Lo anterior es representado en la Figura 9.

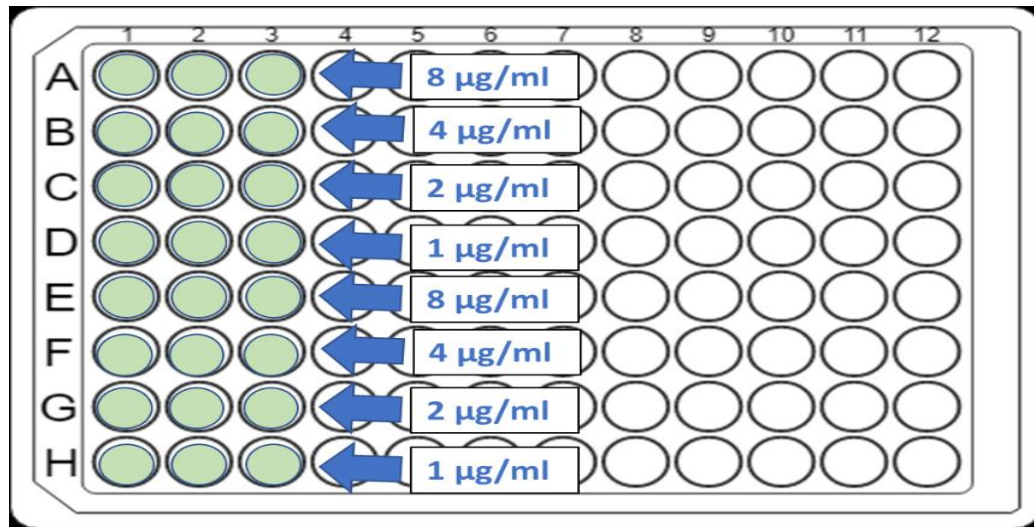
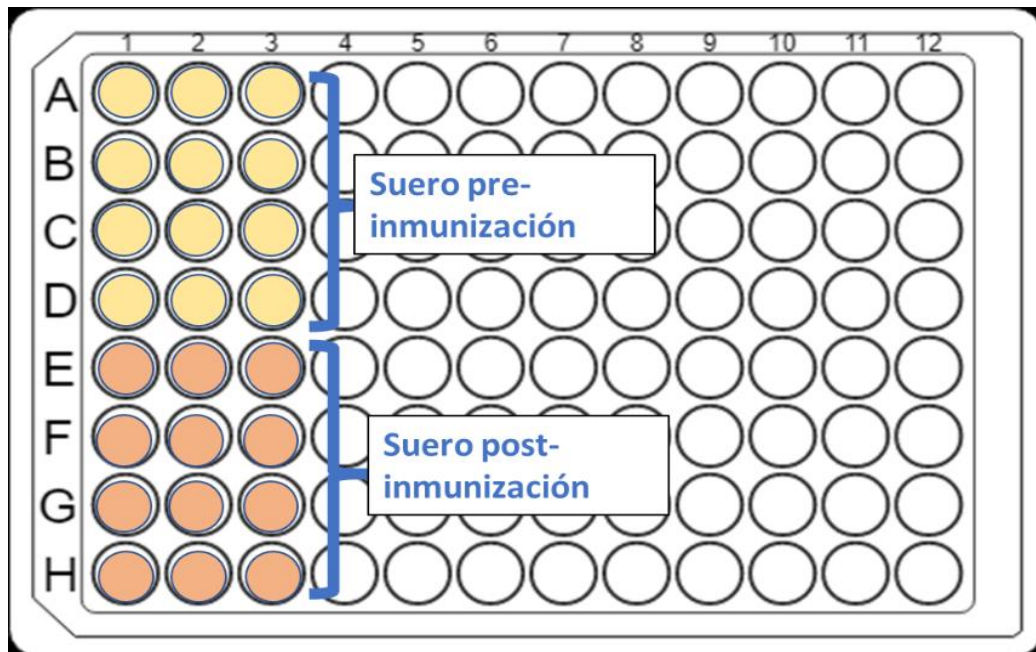


Figura 9. Concentración de péptidos en la placa de ELISA.

La placa de ELISA se cubrió con film plástico y se incubó a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se desechó el líquido de la placa y para proceder con el primer lavado se agregaron 200 µl de PBS-Tween al 0.05% pH 7.4. La placa se agitó mediante golpeteos laterales durante 20 segundos y posteriormente se desechó el líquido y se secó la placa, esta vez con golpeteos sobre una gaza y con la placa volteada hacia abajo. Este paso se repitió un total de 3 veces.

Una vez secas las placas, se realizó el proceso de bloqueo, añadiendo en cada pozo 200 µl de PBS Tween 0.05% con leche descremada al 5%, se envolvió la placa en plástico y se incubó a 37°C durante una hora y con agitación de 200 rpm. Después, se repitió el proceso de lavado y secado explicado anteriormente.

Posteriormente, en los pozos correspondientes a las filas A-D se colocaron 100 µl del suero pre-inmunización en dilución 1:500 en PBS-Tween 0.05%; en las filas E-H se colocaron 100 µl del suero correspondiente a 21 días después de la segunda inmunización. Este paso se esquematiza en la Figura 10.



**Figura 10. Diseño de la placa de ELISA con los sueros de pre-inmunización y post-inmunización para titulación de péptidos.**



La placa se envolvió en plástico y se dejó en una incubadora con agitación, a 37°C durante una hora y con oscilación de 200 rpm. Después, se repitió el proceso de lavado y secado explicado anteriormente.

Posteriormente, en cada pozo se agregaron 100 µl de anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa en dilución 1:2000 en PBS-Tween 0.05%. La placa se envolvió en plástico y se incubó a 37°C durante una hora y con agitación de 200 rpm. Después, se repitió el proceso de lavado y secado explicado anteriormente.

Finalmente, se depositaron en cada pozo 100 µl de solución de revelado consistente de sustrato dihidrocloruro de o-fenilenediamina (OPD) en buffer citrato (ácido cítrico 0.1 M, fosfato de sodio dibásico 0.2 M y 4 µl de peróxido de hidrogeno al 30%), y la placa se leyó en un lector de placas de 96 pozos a una longitud de onda de 450 nm con agitación de 5 segundos. Las lecturas se realizaron a los 15, 20, 25 y 30 minutos, eligiendo la concentración de péptido y tiempo de lectura en la cual hubo menor diferencia de densidad óptica entre cada triplicado y mayor diferencia entre las medias de los triplicados del suero pre-inmunización respecto al post-inmunización.

#### **6.4.2 Titulación de anticuerpo primario.**

Los títulos de anticuerpos de los animales inmunizados fueron obtenidos preparando placas de ELISA individuales por animal y comparando la cantidad de anticuerpos del suero de segunda inmunización respecto al suero de pre-inmunización. Cada placa fue sensibilizada con 100 µl del péptido diluido en solución carbonato/bicarbonato pH 9.6 a la concentración estandarizada.

El control de conjugado se preparó diluyendo suero de bovino en solución carbonato/bicarbonato pH 9.6 en relación 1:500. Se depositaron 100 µl en la placa y por triplicado. La placa se envolvió en plástico y se incubó toda la noche en refrigeración. La placa se lavó con PBS-Tween 0.05% pH 7.4 y fue bloqueada con

buffer PBS-Tween 0.05% con leche descremada al 5%, similar a lo descrito en el punto anterior.

Las diluciones de los sueros inmunes se realizaron de la siguiente forma. Se diluyeron los sueros correspondientes a la segunda inmunización en concentración 1:125 y se depositaron en la placa por triplicado en las posiciones F1, G1 y H1. De la misma forma, los sueros pre-inmunización se diluyeron a la misma concentración y depositaron en las columnas A1, B1 y C1. Posteriormente, en los siguientes pozos se colocaron 100 µl de buffer PBS-Tween 0.05% pH 7.4.

Realizado lo anterior, se procedió a hacer diluciones seriadas de la siguiente manera. Se tomaron 100 µl de los pozos que contienen 200 µl del suero diluido 1:125 y se depositaron en los pozos que se encuentran inmediatamente a la derecha y se homogenizó mediante pipeteo. Se realizó lo mismo tomando 100 µl de los pozos de la columna 2 y depositarlos en los pozos que se encuentran inmediatamente a la columna 3, y sucesivamente hasta llegar a la columna 12, de la cual se desecharon 100 µl. De esta forma quedarían 100 µl en cada pozo con las concentraciones que se muestran en la Figura 11.

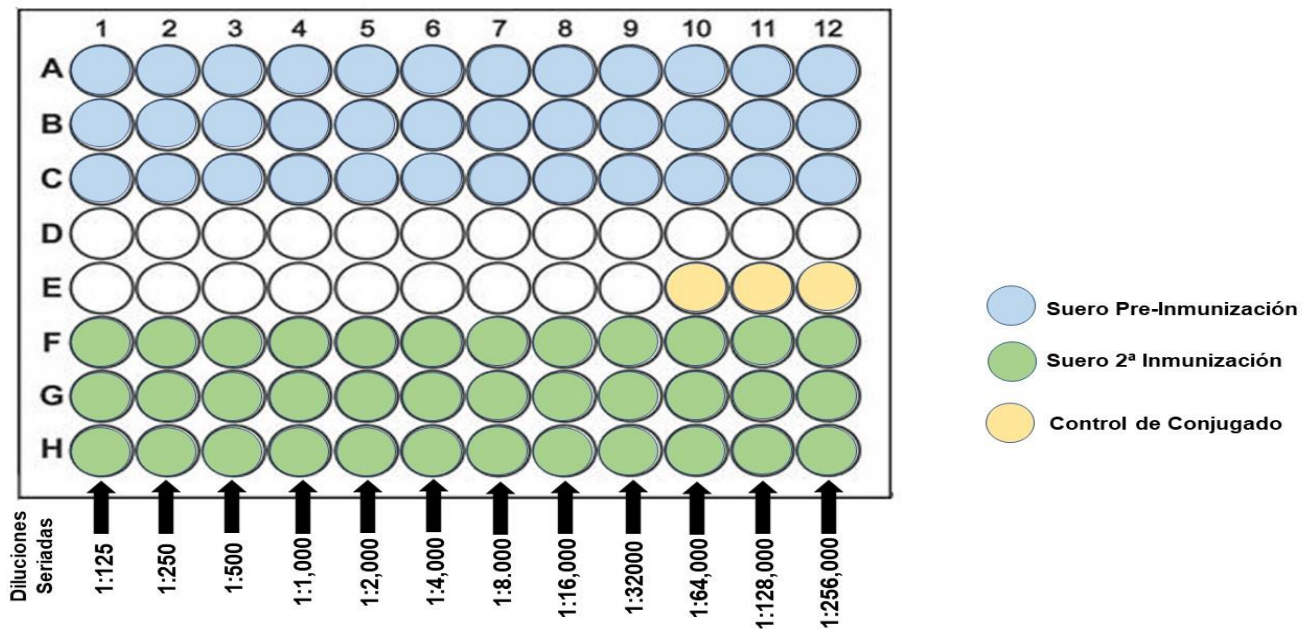


Figura 11. Esquematización de una placa de ELISA con diluciones seriadas para titulación de anticuerpos de sueros inmunes.

Los sueros se incubaron por 1 hora a 37 °C. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario en dilución 1:2000 y la solución de revelado según lo descrito en el punto anterior.

### 6.4.3 ELISA indirecta para determinación de anticuerpos.

Por cada péptido utilizado se ocupó una placa de 96 pozos, la cual se sensibilizó con la concentración de péptido correspondiente diluido en buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6. El control de conjugado fue preparado depositando 100 µl de suero de bovino diluido en buffer carbonato/bicarbonato en concentración 1:500. La placa se envolvió en plástico y se dejó incubar en refrigeración durante toda la noche, y al día siguiente se continuó con el lavado y bloqueo de la placa anteriormente descritos. La Figura 12 esquematiza un ejemplo del acomodo en una placa de ELISA de los sueros de los bovinos vacunados y controles de un grupo de experimentación.

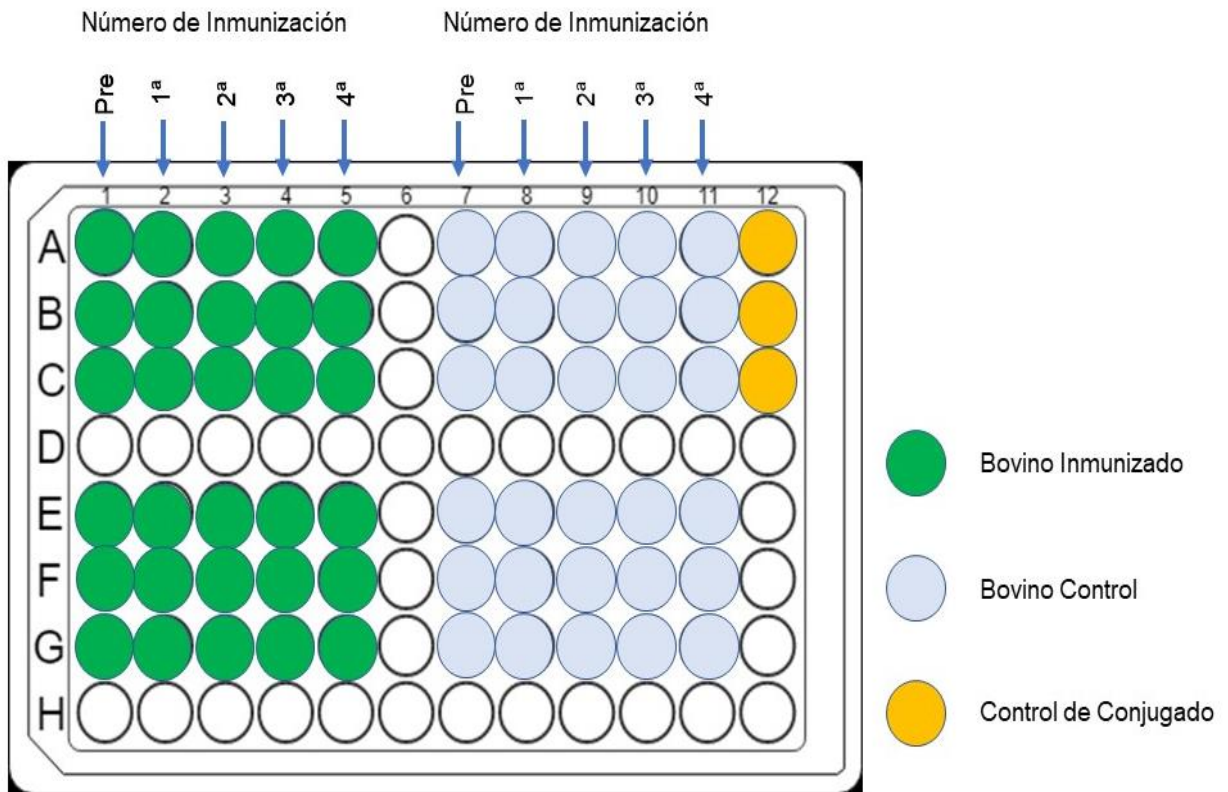


Figura 12. Diseño de la placa de ELISA con los sueros de bovinos no inmunizados e inmunizados. Para cada placa se analizaron muestras de dos bovinos inmunizados y de ambos controles.

Se agregaron 100 µl de suero diluido a concentración de 1:500 en PBS-Tween 0.05% placas se lavaron tres veces con la solución de lavado. El suero fue diluido a 1:500 en PBS Tween 0.5% pH 7.4. La placa se incubó por 1 hora a 37°C, con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se repitió el proceso de lavado y secado de la placa.

Se añadieron 100 µl del anticuerpo secundario de cabra anti-IgG bovina conjugado a peroxidasa en una dilución de 1:2000 en PBS Tween 0.5%, y se dejó incubar por 1 hora a 37°C, con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se repitió el proceso de lavado y secado de la placa.

Finalmente, se agregó en cada pozo 100 µl de la solución de revelado, y la placa se leyó en un lector de placas de 96 pozos a una longitud de onda de 450 nm, con tiempo de 25 minutos y agitación de 5 segundos.

#### **6.4.4 Análisis estadístico**

Las diferencias estadísticas entre los sueros de bovinos inmunizados y no inmunizados fueron determinadas mediante análisis de ANOVA (Armstrong *et al.*, 2002) y una prueba post-Hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ) (Kim, 2015), por cada péptido analizado y en cada uno de los días que se obtuvo suero inmune, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 21.

#### **6.5 Análisis bioinformático de los péptidos**

Se realizaron análisis de alineamiento para verificar que las secuencias de los péptidos no tuvieran homología con proteínas del bovino, utilizando el algoritmo y base de datos del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), de la página del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos se compararon contra las proteínas reportadas de la especie *Bos taurus*.

#### **6.6 Desafío biológico**

El desafío biológico se realizó en las instalaciones del Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, localizadas en el municipio de El

Marqués, Querétaro, ubicado en las coordenadas Norte 21° 40´ y Oeste 100° 36´. Con este experimento se comparó la respuesta entre animales vacunados y animales control cuando fueron infestados con *R. microplus*. Por cada péptido analizado se utilizaron dos animales inmunizados e infestados, además de un par de bovinos inmunizados con 100 µg de cada péptido. Lo anterior se ilustra en la Figura 13.

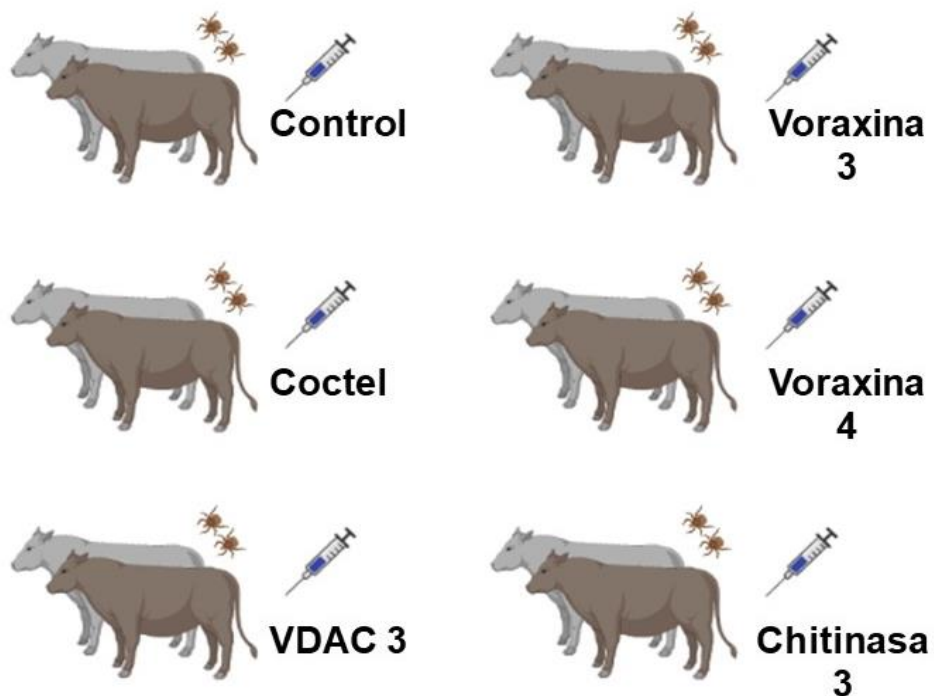


Figura 13. Conformación de los animales utilizados en el experimento de infestación.

### 6.6.1 Preparación de vacunas e inmunización

Las vacunas fueron preparadas siguiendo el protocolo descrito en el punto 6.2. En cada dosis vacunal se incluyeron 100 µg del péptido individual en cuestión, excepto para las preparaciones de control que se formularon con la mezcla de adyuvante y buffer PBS estéril.

Los bovinos inmunizados se mantuvieron en los corrales del Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las características de los

animales incluyeron un peso inicial promedio de 150 kg y de raza europea. Cada animal fue inmunizado en tres ocasiones, con un intervalo de 21 días entre la primera y segunda inoculación, y de 14 días entre la segunda y tercera. La vacuna fue aplicada por vía subcutánea en la región lateral del cuello, alternando el sitio de inoculación.

La respuesta inmunitaria de los bovinos antes de la infestación se verificó mediante ELISAS indirectas similares a las descritas en el punto 6.4.3.

### **6.6.2 Infestación con larvas *R. microplus***

Los becerros fueron trasladados a las jaulas de la Nave de Infectómica Animal, donde fueron inmovilizados en una trampa para limitar sus movimientos. Siete días después de la tercera inmunización, a los animales se les colocó una cámara de alimentación de tela elástica en cada costado. La tela fue pegada por los bordes con adhesivo instantáneo de piel y cuero, y en su interior se liberaron 0.25 g de larvas de *R. microplus* de 30 días de edad, para un total de 0.5 g de larvas por animal.

### **6.6.3 Colecta de garrapatas y obtención de datos**

Una vez que las garrapatas hembra se repletaron, todas fueron recolectadas durante los días 19-26 de la infestación. Una vez separadas e identificadas por grupo, se lavaron en una solución de cloruro de benzalconio al 10% durante 15 minutos.

La primera variable cuantificada fue el número de hembras repletas por grupo experimental, mientras que el segundo dato obtenido para análisis fue el peso promedio de las garrapatas. Posteriormente, las garrapatas se colocaron en cajas Petri a número de 25-30 por caja, y se mantuvieron en una incubadora con condiciones de temperatura de 28°C y 85% de humedad para inducir la oviposición.

La tercera variable obtenida fue la masa total de oviposición, obtenida al pesar todos los huevos depositados por cada garrapata que sobrevive el ciclo de

oviposición de diez días. Además, se calculó el promedio de huevos ovipositados por garrapata.

Los parámetros de fertilidad se obtuvieron separando un gramo de huevos de cada par experimental, juntando 0.5 g de huevos de garrapatas de cada bovino. Los huevos fueron colocados en viales de vidrio y puestos a incubar a 28°C y 85% de humedad durante aproximadamente 21 días hasta la eclosión. Una vez que ocurrió la eclosión, se dejaron en la incubadora 15 días antes de contabilizar por triplicado la cantidad de larvas vivas, larvas muertas y huevos sin eclosionar.

### **6.7 Efecto sobre parámetros biológicos y cálculo de eficacia vacunal**

Los parámetros biológicos se midieron y se hicieron cálculos con los siguientes datos: Número de garrapatas vivas y muertas (DT), peso de las garrapatas repletas (DW), peso y masa de oviposición (DO) y número de larvas viables que eclosionan en 1 g de huevos (DF). La medición y comparación de los parámetros y el subsecuente cálculo de la eficacia vacunal se realizó de acuerdo con lo descrito y utilizado por Canales *et al.*, 1997, Fragoso *et al.*, 1998 y Ortega-Sánchez *et al.*, 2020, y revisado por Cunha *et al.*, 2013.

Las variables y cálculos para obtener los parámetros biológicos se realizaron con las siguientes fórmulas.

- $DT = 100 * [1-(NGT/NGC)]$ , donde NGT = número de garrapatas repletas y recolectadas en los animales tratados, y NGC = número de garrapatas repletas y recolectadas en los animales control.
- $DW = 100 * [1-PGV/PGC]$ , donde PGV = peso promedio de las garrapatas repletas y recolectadas de los animales tratados, y PGC = peso promedio de las garrapatas repletas y recolectadas de los animales control.
- $DO = 100 * [1-PPGV/PPGC]$ , donde PPGV = Promedio del peso de los huevos ovipositados por garrapatas repletas y recolectadas de los animales tratados, y PPGC = peso de los huevos por garrapatas sobrevivientes en el grupo control.

- $DF = 100 * [(HC-HT) / HC]$ , donde HC = índice de viabilidad de los individuos control, y HT = índice de viabilidad de los individuos tratados.

Finalmente, la eficacia vacunal (E) se calculó con la siguiente fórmula:

$$100 [1 - (RGA * RGO * CRF)]$$

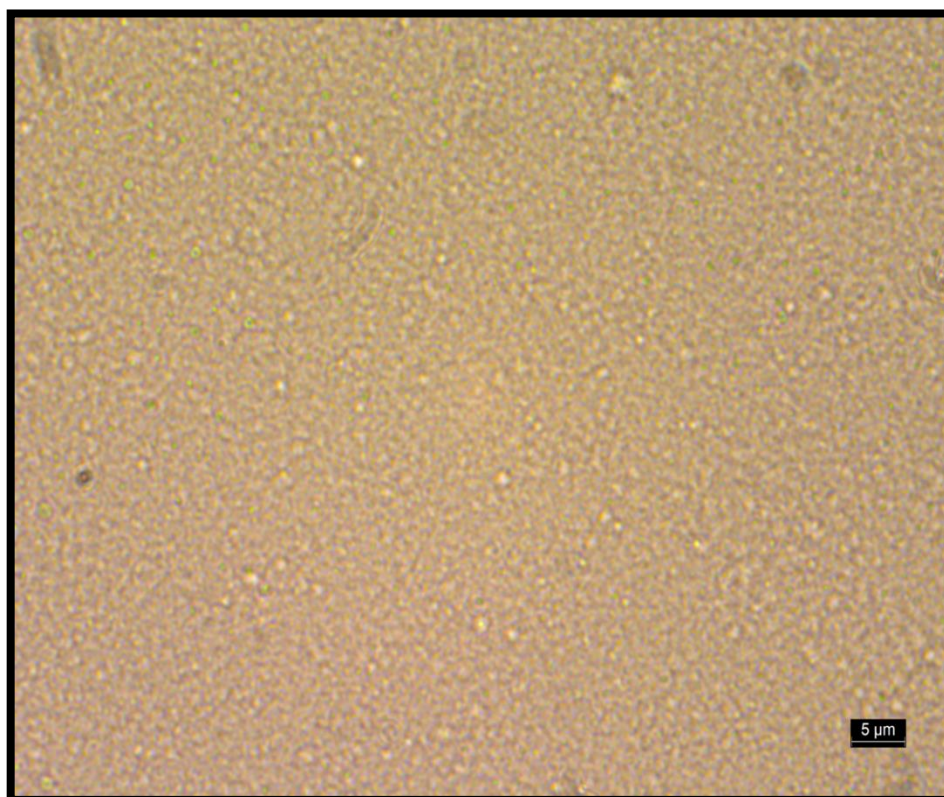
- $RGA = NTV/NTC$  = Reducción del número de garrapatas recolectadas en los animales tratados comparado con el número de garrapatas recolectadas en los animales control.
- $RGO = PATV/PATC$  = Reducción en la masa de oviposición obtenida de las garrapatas recolectadas en los animales tratados comparado con la masa de oviposición obtenida de las garrapatas recolectadas en los animales control.
- $RGF = PPLOV/PPLOC$  = Reducción en la fertilidad de los huevos obtenidos de las garrapatas recolectadas en los animales tratados comparado con la fertilidad de los huevos obtenidos de las garrapatas recolectadas en los animales control.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Elaboración de vacunas e inmunización de animales

Las dosis vacunales fueron elaboradas individualmente por péptido analizado, determinándose listas cuando se observó al microscopio un campo homogéneo de micelas con un tamaño similar o menor a 1  $\mu\text{m}$ . La observación de una vacuna terminada se aprecia en la Figura 14.



**Figura 14. Emulsificación de la vacuna vista al microscopio (objetivo 100).**

Las micelas en las emulsiones obtenidas concuerdan con lo reportado por Vialle *et al.* (2010), quienes reportaron un tamaño similar en las micelas al utilizar un adyuvante de tipo Montanide. Además, las micelas de 1  $\mu\text{m}$  tienen el tamaño adecuado para una efectiva fagocitosis por las células presentadoras de antígeno (Lindblad, 2004). Cabe destacar que los adyuvantes de tipo emulsión están recomendados para evaluar vacunas de péptidos sintéticos y recombinantes (Salvador *et al.*, 2011).

Con respecto a la seguridad de las vacunas elaboradas, en el presente experimento no se presentaron reacciones adversas graves, únicamente se encontraron granulomas en algunos bovinos después de la tercera inmunización. Los bovinos vacunados no manifestaron signología adversa al momento de la inoculación, corroborando la seguridad de las vacunas elaboradas y de sus ingredientes. La formulación de Montanide® ISA 201 como adyuvante mineral agua en aceite en agua (W/O/W), hace que el compuesto sea menos viscoso y genere una menor respuesta inflamatoria. La presencia de únicamente dos bovinos con granulomas y la ausencia de otras reacciones adversas concuerda con lo reportado por Petermann *et al.* (2017), quienes ocuparon el mismo adyuvante. Esta cualidad de inocuidad se cumple según lo requerido por Roth *et al.* (1999), con respecto a las características que debe tener un adyuvante.

Al utilizar péptidos como antígenos vacunales, incluso al sintetizarlos en sistema MAP-8 que aumenta su peso molecular, y por lo tanto su inmunogenicidad, se debe utilizar un buen adyuvante para obtener una mejor respuesta inmunitaria y eficacia. Los adyuvantes oleosos, como los Montanide®, potencian la respuesta inmunitaria al liberar lentamente el antígeno e inducir procesos inflamatorios locales que atraigan células presentadoras de antígeno (Klimka *et al.*, 2015). El adyuvante Montanide® ISA 201 es una emulsión que ha sido utilizada en formulación de vacunas en bovinos, como en el caso de la Fiebre Aftosa. Se ha encontrado que es un adyuvante capaz de desencadenar respuestas inmunitarias protectoras de tipo IgG1 e IgG2 en bovinos, liberando el antígeno de forma rápida y lenta, y con anticuerpos de larga duración (Bozkir & Hayta, 2004; Dar *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2015).

De acuerdo con las respuestas humorales reportadas y la característica de seguridad obtenida, este adyuvante debería funcionar en vacunas contra garrapata. Para conocer su funcionalidad, aún se debe determinar si sus propiedades físico-

químicas son aptas para formar parte de vacunas comerciales, similar a estudios realizados con Montanide® ISA 50 y la vacuna GAVAC, además que se ha descrito que los adyuvantes agua en aceite son más eficaces en formulaciones contra garrapatas (Pérez *et al.*, 2017; Petermann *et al.*, 2017).

## 7.2 Determinación de inmunogenicidad

Durante la estandarización de las pruebas de ELISA, para la concentración de péptido requerido para la sensibilización de las placas, se obtuvieron valores de entre 1 y 8 µg/µl de péptido. Los resultados de la estandarización son similares a los utilizados en los experimentos de Patarroyo *et al.*, 2002 y Tafúr-Gómez *et al.*, 2020 quienes realizaron ELISAS indirectas con cantidades de 0.5 a 5 µg/µl, pero significativamente menor a la cantidad de péptido recombinante reportado por Mendoza-Martínez *et al.*, 2021. El Cuadro 5 compara los resultados obtenidos en este experimento y otros de trabajos similares que estandarizaron ELISAS con péptidos de garrapatas.

**Cuadro 5. Concentraciones de péptidos de garrapata utilizados para sensibilizar placas de ELISA.**

Péptido de estudio	Tipo de péptido	Concentración utilizada (µg/µl)	Referencia
VDAC 1	Sintético	1	Este estudio
VDAC 2	Sintético	4	
VDAC 3	Sintético	1	
VDAC 4	Sintético	8	
Voraxina 1	Sintético	4	
Voraxina 2	Sintético	8	
Voraxina 3	Sintético	8	
Voraxina 4	Sintético	4	
Chitinasa 1	Sintético	8	
Chitinasa 2	Sintético	4	

Chitinasa 3	Sintético	8	
Chitinasa 4	Sintético	4	
SBm4912	Sintético	5	
SBm7462	Sintético	2	Patarroyo <i>et al.</i> , 2002 Tafúr-Gómez <i>et al.</i> , 2020
SBm19733	Sintético	0.2	Mendoza-Martínez, <i>et al.</i> , 2021
Subolesina	Recombinante	0.1	
BD86	Sintético	0.5	Kopp <i>et al.</i> , 2009
ATAQ	Sintético	1	Rangel-Aguirre <i>et al.</i> , 2016
Acuaporina 2	Sintético	1	Scoles <i>et al.</i> , 2022
P0	Sintético	1	Rodríguez-Mallón <i>et al.</i> , 2015

La respuesta inmunitaria de cada animal se pudo monitorear mediante las pruebas de ELISA indirecta. En 10 de los 12 pares de animales inmunizados con los péptidos, se observó un resultado positivo y con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a los controles a partir de la segunda inmunización, mientras que en el caso de los péptidos Chitinasa 3 y VDAC 1, en un bovino fue observado una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) desde la primera inmunización. No obstante, la respuesta inmunitaria de todos los animales decreció hasta niveles inferiores al punto de corte tras la segunda aplicación, con excepción de individuos inmunizados con los péptidos VDAC 3, Voraxina 3, Voraxina 4 y Chitinasa 3, en los cuales se observó un mantenimiento significativo de la respuesta inmunitaria tras aplicar las dosis subsecuentes y por encima del punto de corte. Los sueros de los animales de control se mantuvieron siempre debajo del punto de corte. Los resultados de los péptidos inmunogénicos se muestran en las Figuras 15-18, mientras que las gráficas de aquellos péptidos descartados se muestran en las Figuras 19-26.

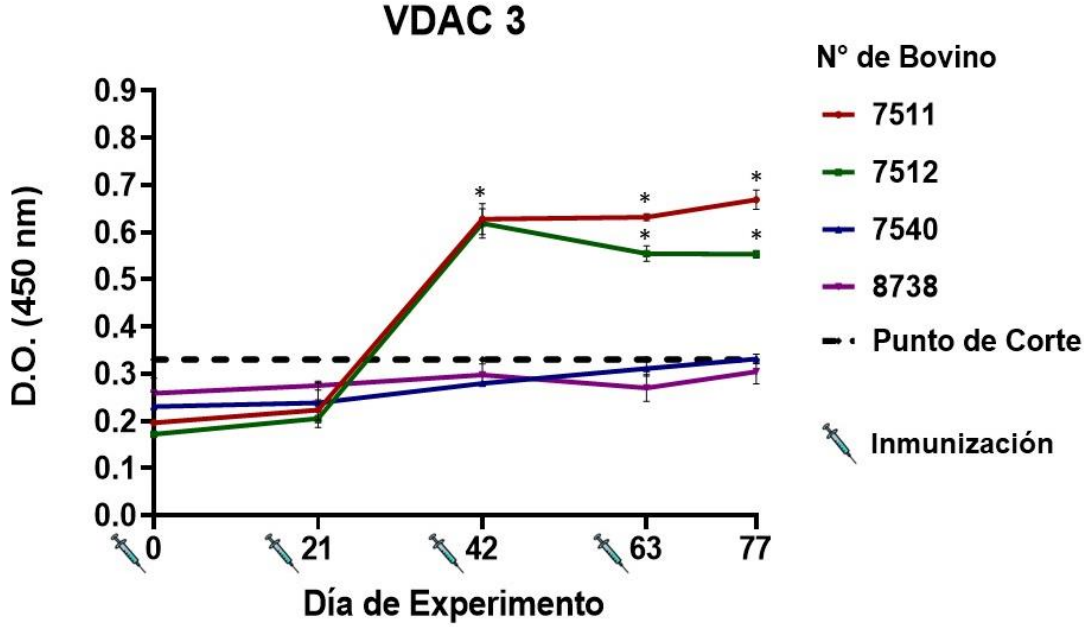


Figura 15. Gráfica de inmunogenicidad del péptido VDAC 3. Dilución 1:500. Bovinos 7511 y 7512 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

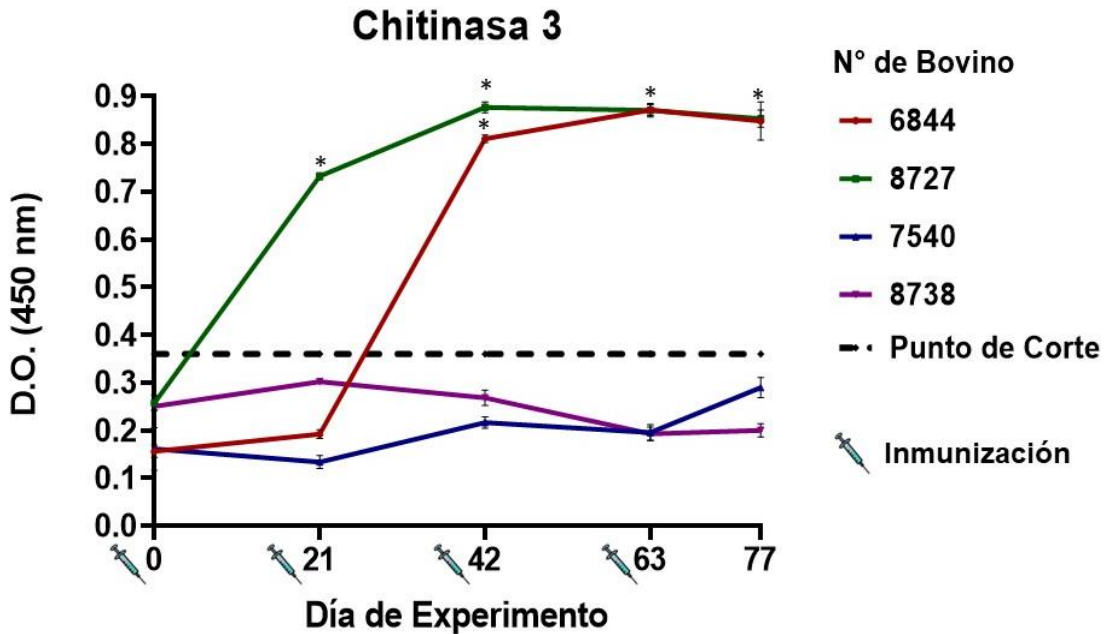


Figura 16. Gráfica de inmunogenicidad del péptido Chitinasa 3. Dilución 1:500. Bovinos 6844 y 8727 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

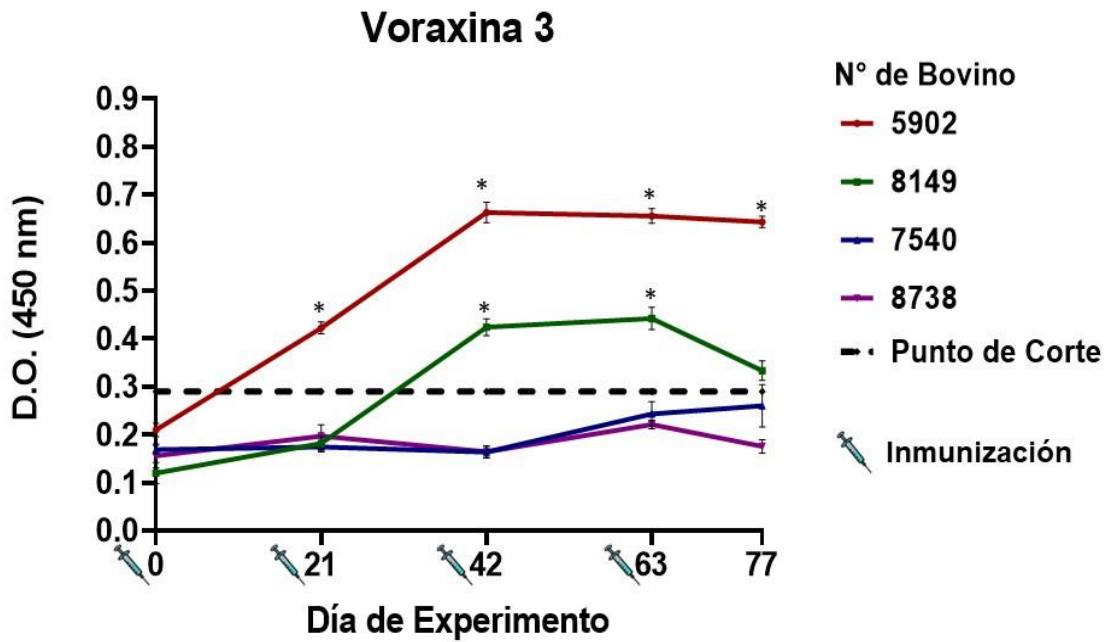


Figura 17. Gráfica de inmunogenicidad del péptido Voraxina 3. Dilución 1:500. Bovinos 5902 y 8149 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

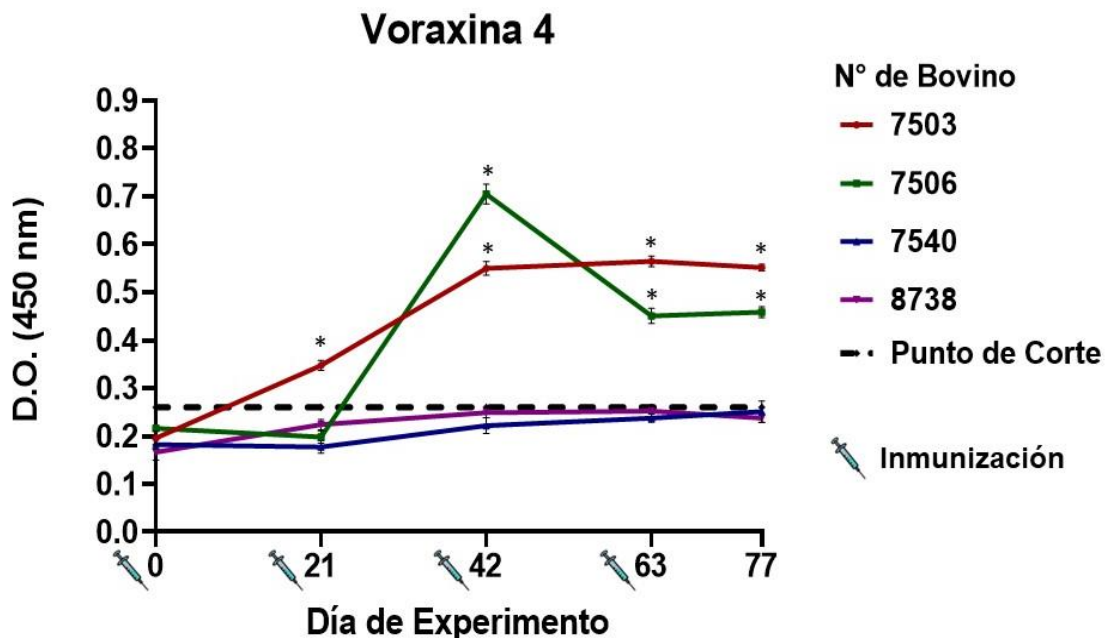


Figura 18. Gráfica de inmunogenicidad del péptido Voraxina 4. Dilución 1:500. Bovinos 7503 y 7506 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

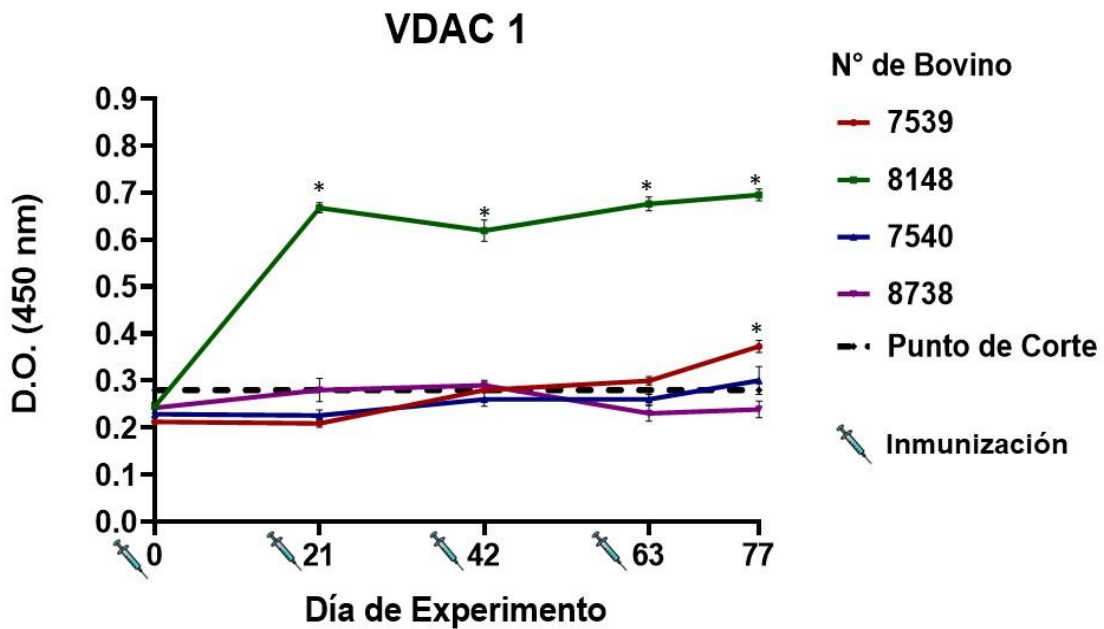


Figura 19. Gráfica de inmunogenicidad del péptido VDAC 1. Dilución 1:500. Bovinos 7539 y 8148 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

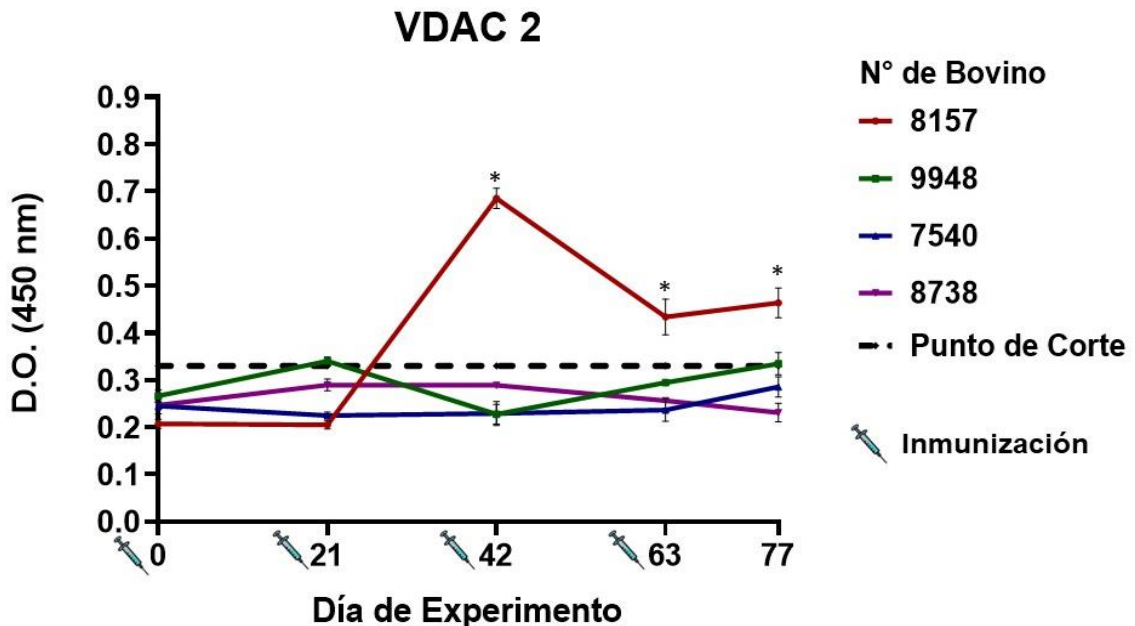


Figura 20. Gráfica de inmunogenicidad del péptido VDAC 2. Dilución 1:500. Bovinos 8157 y 9948 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

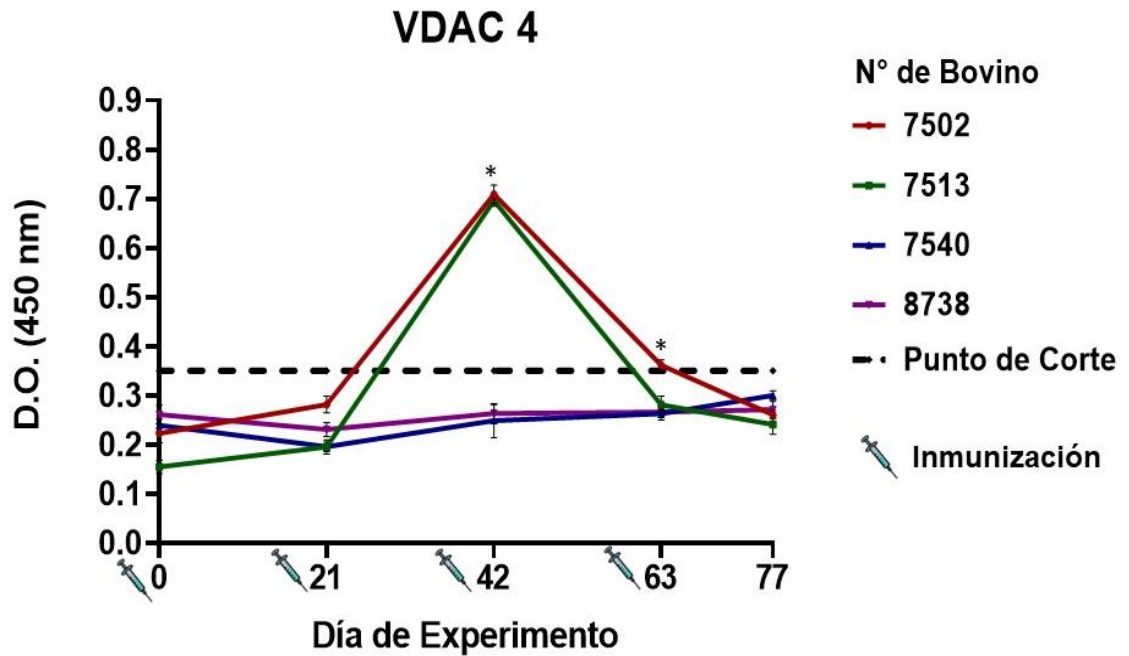


Figura 21. Gráfica de inmunogenicidad del péptido VDAC 4. Dilución 1:500. Bovinos 7502 y 7513 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

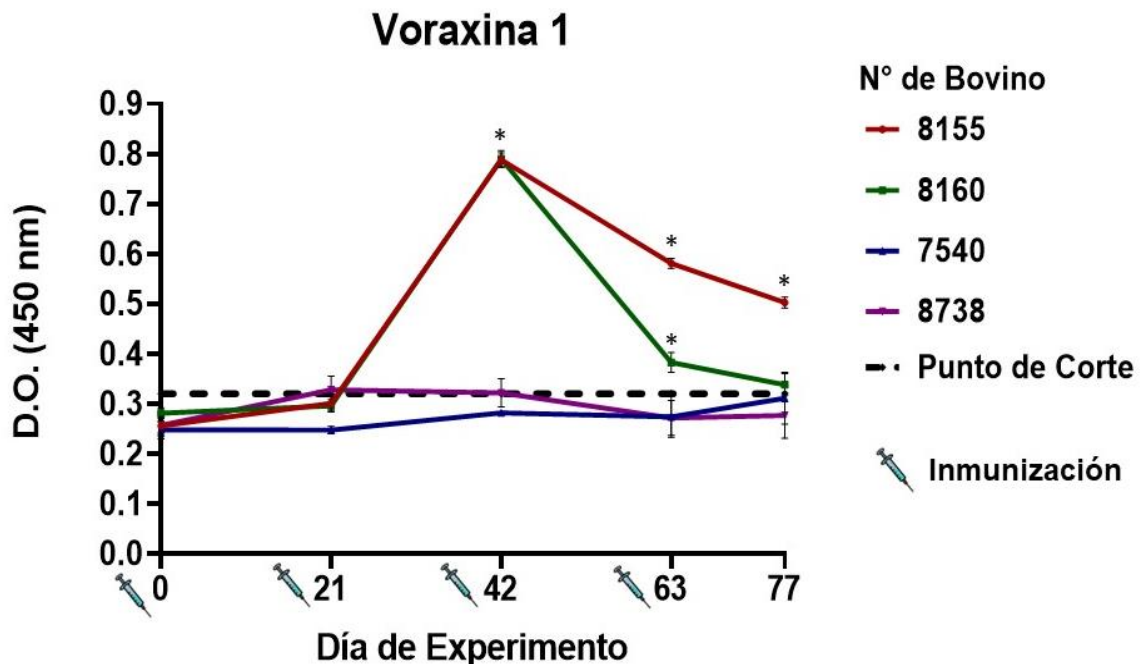


Figura 22. Gráfica de inmunogenicidad del péptido Voraxina 1. Dilución 1:500. Bovinos 8155 y 8160 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).



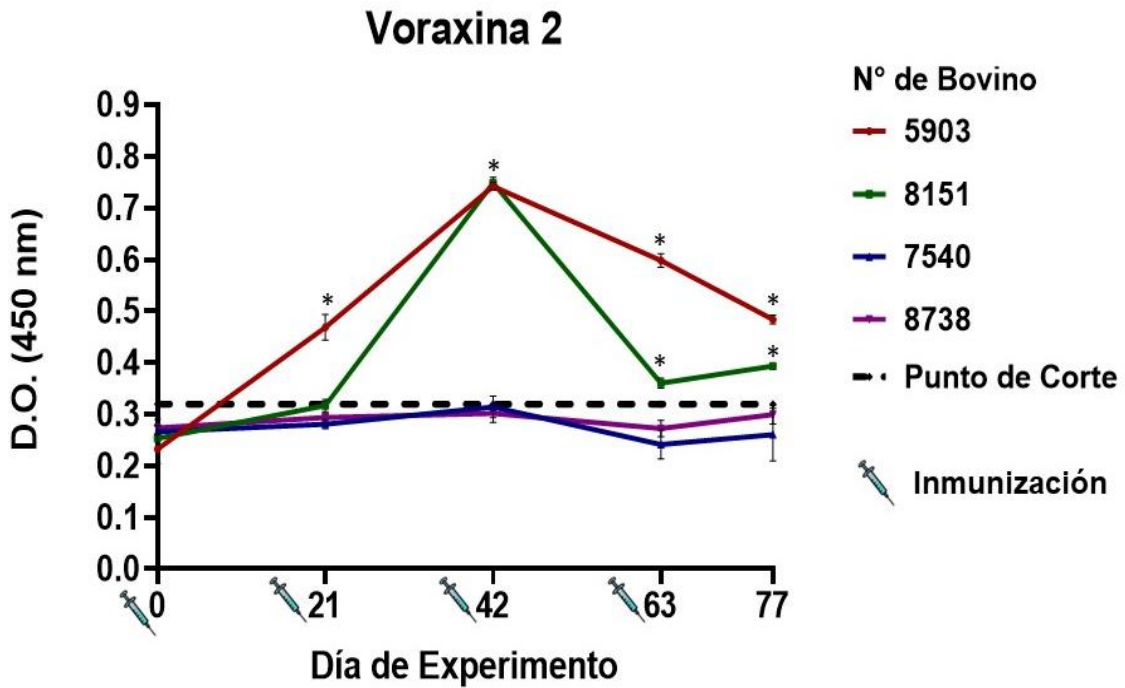


Figura 23. Gráfica de inmunogenicidad del péptido Voraxina 2. Dilución 1:500. Bovinos 5903 y 8151 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

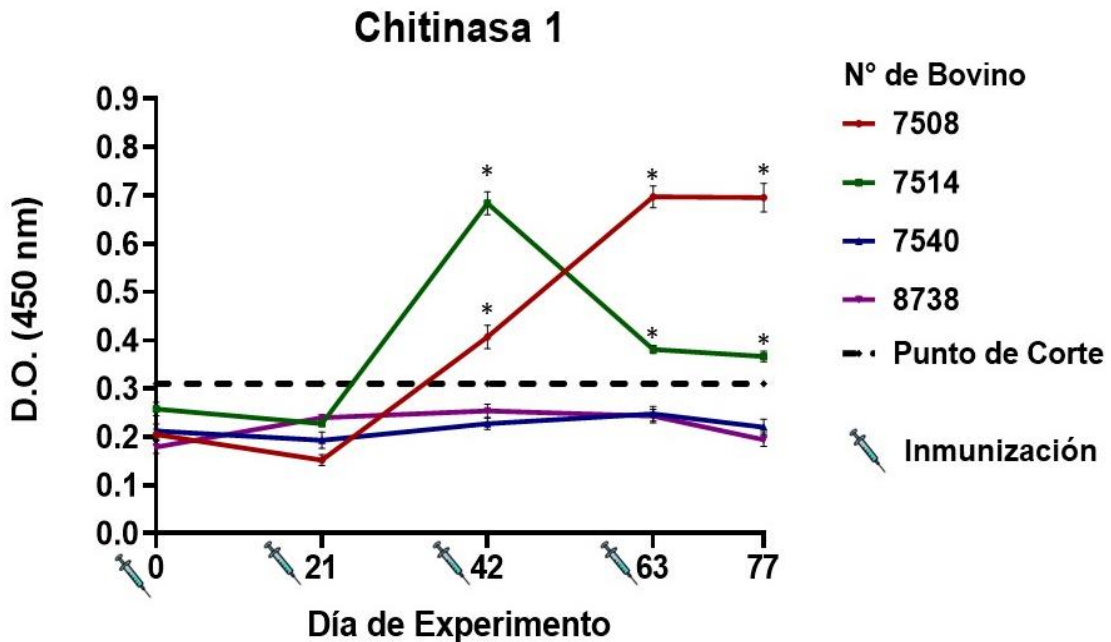


Figura 24. Gráfica de inmunogenicidad del péptido Chitinasa 1. Dilución 1:500. Bovinos 7508 y 7514 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

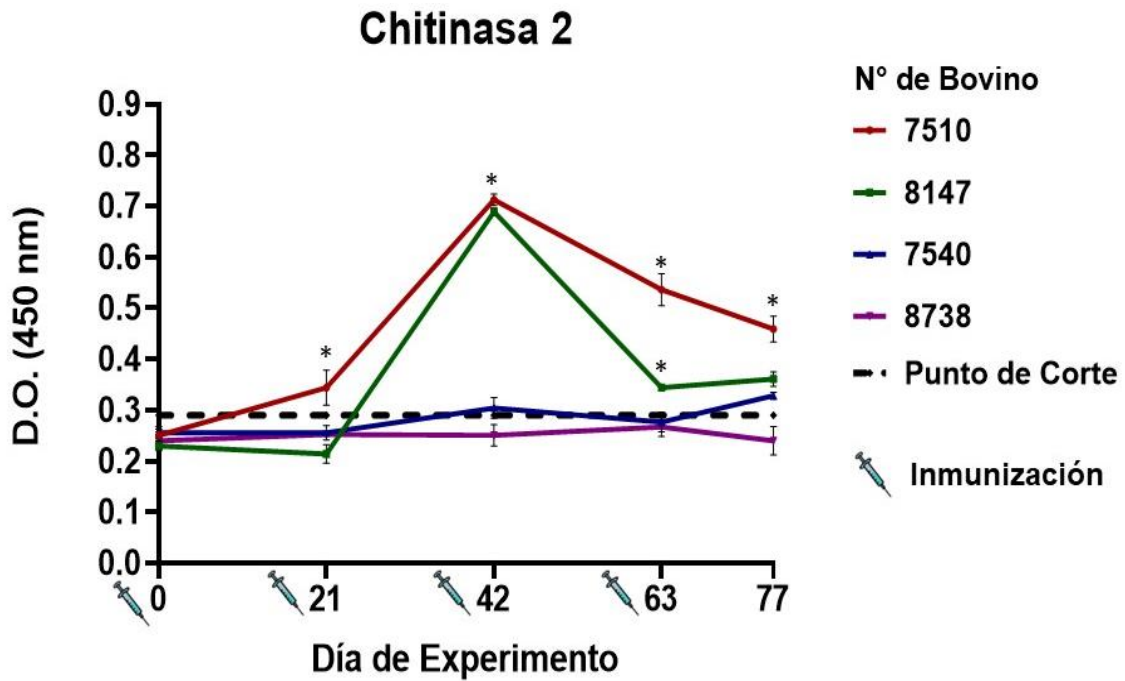


Figura 25. Gráfica de inmunogenicidad del péptido Chitinasa 2. Dilución 1:500. Bovinos 7510 y 8147 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

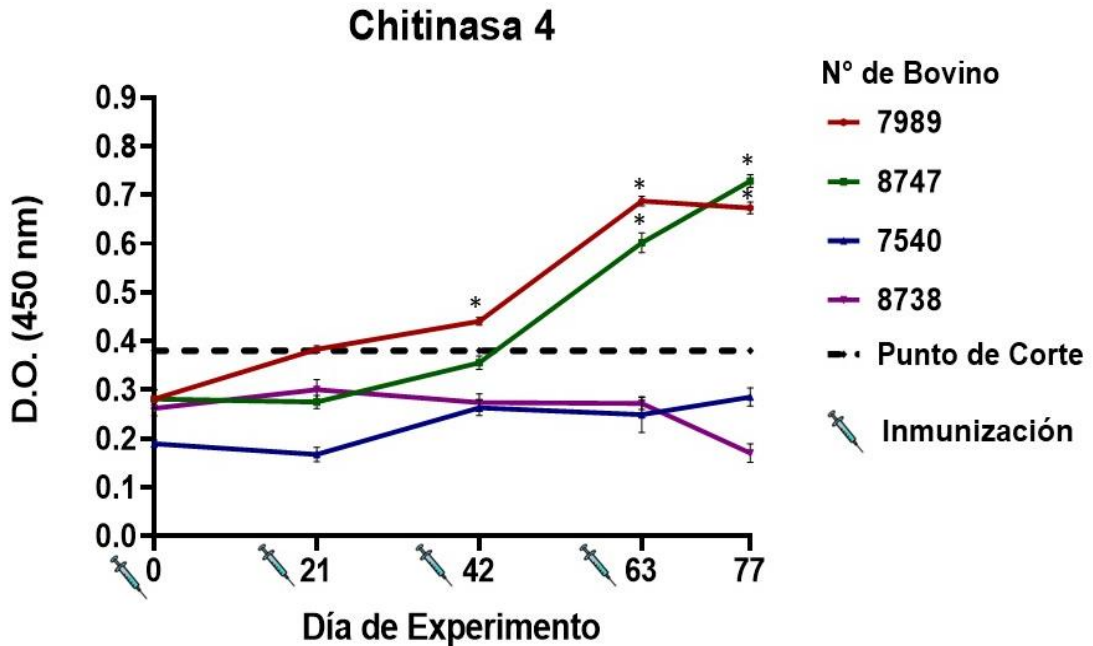


Figura 26. Gráfica de inmunogenicidad del péptido Chitinasa 4. Dilución 1:500. Bovinos 7989 y 8747 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 7540 y 8738 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

Los niveles de D.O. alcanzados en los animales inmunizados son parecidos a lo reportado por Patarroyo *et al.* (2002) y Almazán *et al.* (2005), quienes también inmunizaron con péptidos sintéticos. La diferencia estadística significativa respecto a los controles apareció después de aplicar la segunda dosis, similar a lo obtenido por Patarroyo *et al.* (2002) y Tafúr-Gómez *et al.* (2020).

La respuesta inmunitaria fue monitoreada con las pruebas de ELISA, y para esta se eligió una dilución de 1:500 de los sueros inmunes, ya que fue la concentración óptima para ver los cambios en los niveles de anticuerpos durante el experimento (Scoles *et al.*, 2022). Los péptidos inmunogénicos con los que se decidió proseguir con el experimento de infestación se determinaron por las siguientes características: Ambos bovinos generan anticuerpos a niveles estadísticamente significativos respecto al control con un máximo de dos inmunizaciones y la respuesta inmunitaria no decrece por debajo del punto de corte con las vacunaciones posteriores.

Se obtuvieron títulos de anticuerpos de 1:1000 en los péptidos inmunogénicos VDAC 3, Chitinasa 3, Voraxina 3 y Voraxina 4 al analizar los sueros correspondientes a la segunda inmunización. Estos valores corresponden a lo observado por Almazán *et al.* (2010) y Merino *et al.* (2013), quienes obtuvieron títulos de 1:1000. A pesar de que muchos autores encontraron y evaluaron antígenos vacunales con diluciones de suero que van de 1:25 a 1:250 (Martiz-Oliver *et al.*, 2012; Lambertz *et al.*, 2012; Ortega-Sánchez *et al.*, 2020; Patarroyo *et al.*, 2020; Scoles *et al.*, 2022), se debe recalcar que la cantidad de anticuerpos presentes en el suero se correlacionan con la inmunidad generada y porcentaje de eficacia alcanzada (de la Fuente *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 1998; Merino *et al.*, 2011). Otro dato a considerar es que a mayor concentración y cantidad de anticuerpos generados, mayor probabilidad que estos alcancen su sitio objetivo, ya que solo el 1-5% de los anticuerpos que ingiere la garrapata logran llegar a la hemolinfa y a su órgano blanco, esto debido a que las garrapatas son capaces de eliminar el suero sanguíneo a través de sus glándulas salivales y cuentan con

mecanismos moleculares que atrapan y eliminan la mayor parte de las inmunoglobulinas que consumen (Wang & Nuttall, 1999; Sonenshine & Roe, 2014).

Al ser la primera vez que se evalúan péptidos de estas proteínas, no hay otro estudio que sirva punto de comparación de la inmunogenicidad de estos antígenos. Ahora bien, en el caso de VDAC 3, se resalta que los títulos de anticuerpos obtenidos son superiores a los reportados en la ELISA indirecta contra la proteína recombinante BmVDAC, descrito por Ortega-Sánchez *et al.* (2020), quienes utilizaron diluciones 1:100. En el caso particular de voraxina, únicamente en un estudio previo se habían realizado pruebas de ELISA con la subunidad alfa recombinante de voraxina de *R. appendiculatus*, consiguiéndose títulos de 1:1000 en conejos (Yamada *et al.*, 2009). Además, en un estudio con una quitinasa recombinante de *H. longicornis*, se obtuvieron títulos de anticuerpos de 1:5000 a 1:8000 en ratones, mediante western blot (You & Fujisaki, 2009).

Sin embargo, no todos los animales inmunizados tuvieron la misma respuesta inmunitaria. Esta variación puede deberse a diversos factores, descritos por Roth *et al.* (1999), como: Alteraciones en la vacuna, enfermedades infecciosas concurrentes o estrés e inmunosupresión en el animal. Adicionalmente, se ha descrito que la respuesta inmunitaria en bovinos puede ser variable debido a factores relacionados al complejo principal de histocompatibilidad (MHC), puesto que un animal con características homocigotas en los dos alelos del MHC tendrá una respuesta más limitada que los animales heterocigotos (Tizard *et al.*, 2019). A pesar de esto, de la Fuente *et al.* (1995), encontraron que únicamente el 6% de bovinos inmunizados con Bm86 recombinante en situaciones de campo, no generaron anticuerpos contra el antígeno.

La caída de la respuesta inmunitaria en los bovinos inmunizados con VDAC 1, VDAC 2, VDAC 4, Voraxina 1, Voraxina 2, Chitinasa 1, Chitinasa 2 y Chitinasa 4 se pudo deber a que los programas bioinformáticos utilizados para la predicción de epítomos tienen tasas de error, con eficacias de 58.7% (Saha & Raghava, 2004), 65.93% (Saha & Raghava, 2006) y 70% (Fleri *et al.*, 2017).

### 7.3 Análisis bioinformático

Los análisis bioinformáticos en todos los péptidos permitieron contrastar las secuencias de aminoácidos contra proteínas reportadas del bovino. Así, se encontró que algunos péptidos comparten homologías en cinco o más aminoácidos contiguos, y se cree que puede haber interferencia porque los epítomos predichos no son específicos y puede haber cierta tolerancia a los antígenos, pero esto no ha podido demostrarse (Ortega-Sánchez *et al.*, 2020). Los péptidos VDAC 3, Voraxina 3, Voraxina 4 y Chitinasa 3 comparten secuencias de aminoácidos continuas con algunas proteínas del bovino y aun así resultaron ser inmunogénicos.

En el caso de los péptidos de VDAC, los péptidos 1, 2 y 4 resultaron tener similitudes con VDAC del bovino, con homologías de hasta 73% y coberturas de hasta 100%, mientras que el péptido inmunogénico VDAC 3 tiene identidad con enzimas de localización intracelular. Los análisis BLAST de los péptidos de VDAC se muestran en las Figuras 27-30.

VDAC 1								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">plasmalemmal porin [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	34.1	34.1	94%	0.003	72.22%	282
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 1 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	34.1	34.1	94%	0.003	72.22%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	34.1	34.1	94%	0.003	72.22%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion channel 3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	33.3	33.3	100%	0.005	61.90%	78
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	33.3	33.3	100%	0.005	61.90%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 3 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	33.3	33.3	100%	0.005	61.90%	284
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	33.3	33.3	89%	0.005	68.42%	294
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion channel 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	33.3	33.3	89%	0.005	68.42%	294
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: voltage-dependent anion-selective channel protein 2-like [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	33.3	33.3	89%	0.005	68.42%	294
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion channel 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	33.3	33.3	89%	0.005	68.42%	294

Figura 27. Análisis BLAST del péptido VDAC 1.

VDAC 2								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">plasmalemmal porin [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	36.3	36.3	100%	4e-04	72.22%	282
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 1 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	36.3	36.3	100%	4e-04	72.22%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	36.3	36.3	100%	4e-04	72.22%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion channel 3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	34.1	34.1	100%	0.002	72.22%	78
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	34.1	34.1	100%	0.002	72.22%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 3 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	34.1	34.1	100%	0.002	72.22%	284
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: hypothetical protein BOS_25100 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	30.8	30.8	77%	0.037	78.57%	200
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">insulin-like growth factor-binding protein 4 precursor [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	28.6	28.6	44%	0.21	100.00%	258
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">CXHXORF15 protein [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	27.4	27.4	77%	0.60	71.43%	394
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">gamma-taxilin [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	27.4	27.4	77%	0.60	71.43%	512

Figura 28. Análisis BLAST del péptido VDAC 2.

VDAC 3								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">myristoyl CoA protein N-myristoyltransferase [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.1	26.1	55%	2.2	81.82%	416
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: glycy peptide N-tetradecanoyltransferase 1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.1	26.1	55%	2.2	81.82%	496
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">glycy peptide N-tetradecanoyltransferase 1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.1	26.1	55%	2.2	81.82%	496
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">RecName: Full=Glycy peptide N-tetradecanoyltransferase 1; AltName: Full=Myristoyl-CoA:protein N-myri...</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.1	26.1	55%	2.2	81.82%	497
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.0	24.0	60%	12	66.67%	434
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">type II N-myristoyltransferase [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.0	24.0	55%	12	72.73%	445
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 isoform X5 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.0	24.0	60%	12	66.67%	469
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 isoform X4 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.0	24.0	60%	13	66.67%	486
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 isoform X3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.0	24.0	60%	13	66.67%	495
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">glycy peptide N-tetradecanoyltransferase 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.0	24.0	55%	13	72.73%	498

Figura 29. Análisis BLAST del péptido VDAC 3.

VDAC 4								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 1 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	46.4	46.4	95%	1e-07	73.68%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	46.4	46.4	95%	1e-07	73.68%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">plasmalemmal porin [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	46.4	46.4	95%	1e-07	73.68%	282
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	43.1	43.1	95%	2e-06	68.42%	283
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 3 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	43.1	43.1	95%	2e-06	68.42%	284
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion-selective channel protein 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	43.1	56.4	90%	2e-06	72.22%	294
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion channel 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	43.1	56.4	90%	2e-06	72.22%	294
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: voltage-dependent anion-selective channel protein 2-like [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	43.1	56.4	90%	2e-06	72.22%	294
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">voltage-dependent anion channel 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	43.1	56.4	90%	2e-06	72.22%	294
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">G patch domain-containing protein 3 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.1	39.0	65%	25	52.63%	454

**Figura 30. Análisis BLAST del péptido VDAC 4.**

La similitud más importante del péptido Voraxina 1 es con cadenas pesadas de anticuerpos del bovino, específicamente con IgM e IgG, compartiendo identidad de 87% y cobertura de 50%.

En el caso de Voraxina 2, esta tiene similitudes con una proteína de control del ciclo celular, con una endonucleasa y una proteína vacuolar, con similitudes de 64 -100% y cobertura de 80%.

Voraxina 3 y Voraxina 4 tienen como máximo cuatro aminoácidos consecutivos, de una isoforma del nidógeno, con cobertura de 77%, y con isoformas de una enzima metil-transferasa, con cobertura de 75%. Los análisis BLAST de los péptidos de voraxina se muestran en las Figuras 31-34.

Voraxina 1								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">immunoglobulin mu heavy chain [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.8	21.8	50%	40	87.50%	157
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.8	21.8	37%	41	100.00%	528
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.8	21.8	37%	41	100.00%	528
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">YARS protein [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.8	21.8	37%	41	100.00%	528
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">thioredoxin reductase 1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.4	21.4	50%	56	75.00%	102
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">immunoglobulin gamma heavy chain [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.4	21.4	50%	57	87.50%	152
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">kelch domain-containing protein 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.4	21.4	43%	57	85.71%	406
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">thioredoxin reductase 1, cytoplasmic [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.4	21.4	50%	58	75.00%	499
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">class 1-like follicle-stimulating hormone beta polypeptide precursor [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.0	21.0	37%	80	83.33%	129
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">follitropin subunit beta precursor [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	21.0	21.0	37%	80	83.33%	129

Figura 31. Análisis BLAST del péptido Voraxina 1.

Voraxina 2								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">cell cycle control protein 50B [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.7	25.7	76%	2.0	64.29%	353
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">cell cycle control protein 50A [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.7	25.7	76%	2.0	64.29%	361
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">tRNA-splicing endonuclease subunit Sen15 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	23.5	41%	12	100.00%	168
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	23.5	70%	12	69.23%	839
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	23.5	70%	12	69.23%	839
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: mutS homolog 3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	52.8	88%	12	45.83%	925
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">DNA mismatch repair protein Msh3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	52.8	88%	12	45.83%	929
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">DNA mismatch repair protein Msh3 isoform X4 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	41.1	88%	12	45.83%	943
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">DNA mismatch repair protein Msh3 isoform X3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	41.1	88%	12	45.83%	1015
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">DNA mismatch repair protein Msh3 isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	41.1	88%	12	45.83%	1118

Figura 32. Análisis BLAST del péptido Voraxina 2.



Voraxina 3								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: nidogen 1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	54.1	77%	2.1	69.23%	1053
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">nidogen-1 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	54.1	77%	2.1	69.23%	1240
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">nidogen-1 precursor [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	54.1	77%	2.1	69.23%	1241
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">rab11 family-interacting protein 5 isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.7	41.6	59%	4.1	88.89%	1221
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">rab11 family-interacting protein 5 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.7	41.6	59%	4.1	88.89%	1317
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TOG array regulator of axonemal microtubules protein 1 isoform X6 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.2	41.6	63%	5.8	66.67%	1653
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TOG array regulator of axonemal microtubules protein 1 isoform X5 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.2	41.6	63%	5.8	66.67%	1767
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TOG array regulator of axonemal microtubules protein 1 isoform X4 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.2	41.6	63%	5.8	66.67%	1773
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TOG array regulator of axonemal microtubules protein 1 isoform X3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.2	41.6	63%	5.8	66.67%	1779
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TOG array regulator of axonemal microtubules protein 1 isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.2	41.6	63%	5.8	66.67%	1818

Figura 33. Análisis BLAST del péptido Voraxina 3.

Voraxina 4								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">histone-lysine N-methyltransferase EHMT2 isoform X3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.4	39.9	75%	5.0	66.67%	1177
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">histone-lysine N-methyltransferase EHMT2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.4	39.9	75%	5.0	66.67%	1211
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">histone-lysine N-methyltransferase EHMT2 isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.4	39.9	75%	5.0	66.67%	1234
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">histone-lysine N-methyltransferase EHMT2 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.4	39.9	75%	5.0	66.67%	1268
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.4	39.9	75%	5.0	66.67%	1686
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Cctq [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	23.5	68%	9.9	72.73%	184
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Ca model of bovine TRiC/CCT derived from a 4.0 Angstrom cryo-EM map [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	23.5	68%	10	72.73%	512
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: T-complex protein 1 subunit theta-like [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	23.5	68%	10	72.73%	545
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">T-complex protein 1 subunit theta [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	23.5	68%	10	72.73%	548
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">T-complex protein 1 subunit theta isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	23.5	23.5	68%	10	72.73%	553

Figura 34. Análisis BLAST del péptido Voraxina 4.

Los péptidos Chitinasa 1 y 2 tiene similitud en dos y tres aminoácidos consecutivos con isoformas de proteínas del bovino, pero no resultaron ser inmunogénicos. Chitinasa 1 tiene similitud de hasta 66% con isoformas de una glicoproteína de oviducto.

Chitinasa 2 tiene identidad con una proteína transcripcional, denominada tipo *mastermind*. El péptido Chitinasa 3, inmunogénico, no tuvo más de tres aminoácidos consecutivos con similitud en isoformas de una glicoproteína de oviducto, y una identidad máxima de 57%. Chitinasa 4 tiene similitudes en más de cuatro aminoácidos con proteínas de distinto origen del bovino. Los análisis BLAST de los péptidos de chitinasa se muestran en las Figuras 35-38.

Chitinasa 1								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X7 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	507
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X6 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	512
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X5 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	520
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X4 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	526
✓	<a href="#">RecName: Full=Oviduct-specific glycoprotein; AltName: Full=Estrogen-dependent oviduct protein; AltNa...</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	537
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	538
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	539
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	540
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	551
✓	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.5	26.5	66%	1.8	64.29%	552

Figura 35. Análisis BLAST del péptido Chitinasa 1.

Chitinasa 2								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">mastermind-like protein 2 isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	29.9	29.9	95%	0.13	44.83%	979
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">mastermind-like protein 2 isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	29.9	29.9	95%	0.13	44.83%	1060
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: mastermind-like protein 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	29.9	29.9	95%	0.13	44.83%	1128
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">mastermind-like protein 2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	29.9	29.9	95%	0.13	44.83%	1128
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">testis-expressed protein 50 precursor [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	54%	1.4	64.71%	179
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">cystatin-13 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.7	45.0	36%	3.9	77.78%	141
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: cystatin-8-like [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.7	45.0	36%	4.0	77.78%	209
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.7	44.1	45%	4.1	60.00%	1070
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Bcl2 protein [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.2	25.2	50%	5.6	54.55%	185
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">apoptosis regulator Bcl-2 isoform X4 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	25.2	25.2	50%	5.6	54.55%	186

Figura 36. Análisis BLAST del péptido Chitinasa 2.

Chitinasa 3								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X12 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	437
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X11 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	446
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X10 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	459
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X9 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	465
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	480
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X8 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	491
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X7 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	507
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X6 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	512
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X5 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	520
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">oviduct-specific glycoprotein-like isoform X4 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	89%	0.98	57.89%	526

Figura 37. Análisis BLAST del péptido Chitinasa 3.

Chitinasa 4								
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">metalloreductase STEAP2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	28.6	28.6	80%	0.32	47.06%	490
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12 precursor [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	27.4	27.4	76%	0.92	58.82%	1607
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: chromosome 10 open reading frame 11-like [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	38%	1.3	87.50%	171
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">leucine-rich melanocyte differentiation-associated protein isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	38%	1.3	87.50%	226
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">leucine-rich melanocyte differentiation-associated protein isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.9	26.9	38%	1.3	87.50%	251
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">semaphorin-4C isoform X3 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.1	26.1	47%	2.6	72.73%	692
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">semaphorin-4C precursor [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.1	39.9	52%	2.6	72.73%	833
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">semaphorin-4C isoform X2 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	26.1	39.9	52%	2.6	72.73%	890
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TPA: d(2) dopamine receptor [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.8	39.9	95%	7.1	52.38%	443
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">D(2) dopamine receptor isoform X1 [Bos taurus]</a>	<a href="#">Bos taurus</a>	24.8	39.9	95%	7.1	52.38%	443

**Figura 38. Análisis BLAST del péptido Chitinasa 4.**

Aunque la mayoría de los receptores de células T y B que reconocen secuencias de aminoácidos propias son eliminadas durante el desarrollo, el repertorio que tienen estos receptores es muy extenso y puede que se mantengan algunos receptores de baja afinidad contra proteínas propias, sobre todo en aquellas que se mantienen intracelularmente, se expresan en bajas concentraciones o que en condiciones normales no se exponen a las células inmunitarias (Janeway *et al.*, 2001).

#### 7.4 Desafío biológico e infestación experimental

Antes de infestar a los animales con las larvas de *R. microplus*, se verificó la respuesta inmunitaria de los bovinos inmunizados. Para esto, nueve días después de la segunda inmunización se colectaron muestras de suero y se realizaron las pruebas de ELISA indirecta anteriormente descritas para cada individuo y por péptido analizado. Adicionalmente, una última muestra de suero se obtuvo doce días después de la segunda inmunización, y se decidió aplicar una tercera dosis catorce días después de aplicar la segunda vacuna. Las Figuras 39 a 42 muestran la respuesta inmunitaria de los animales antes de la infestación con larvas.

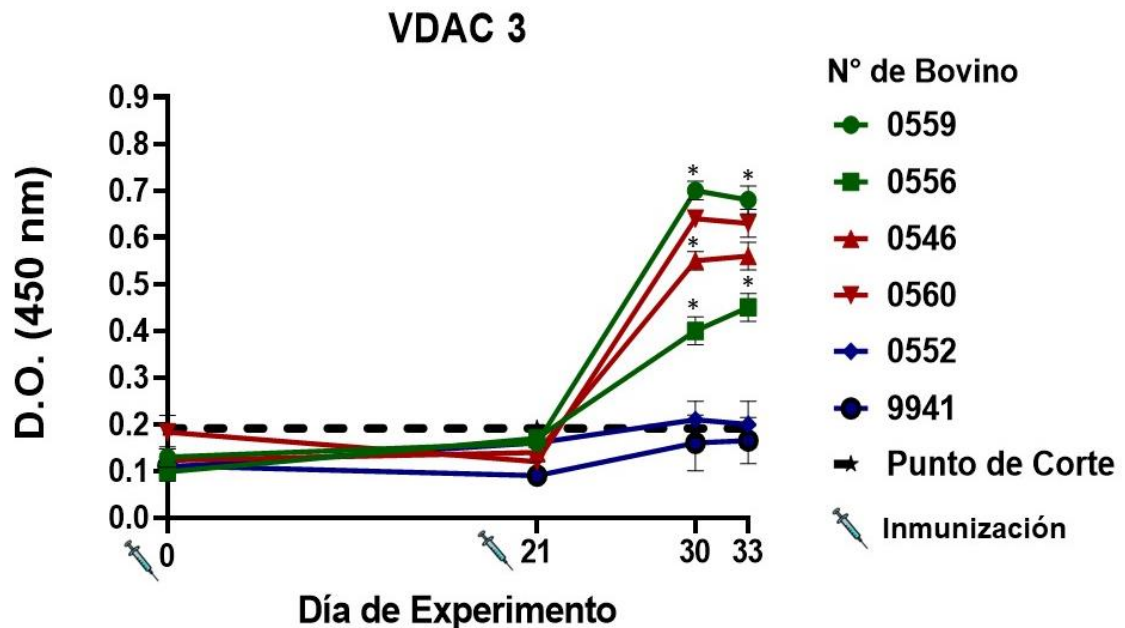


Figura 39. Gráfica de la inmunogenicidad del péptido VDAC 3 antes de la infestación. Dilución 1:500. Bovinos 0559 y 0556 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 0546 y 0560 inmunizados con 100 µg de cada péptido; bovinos 0552 y 9941 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

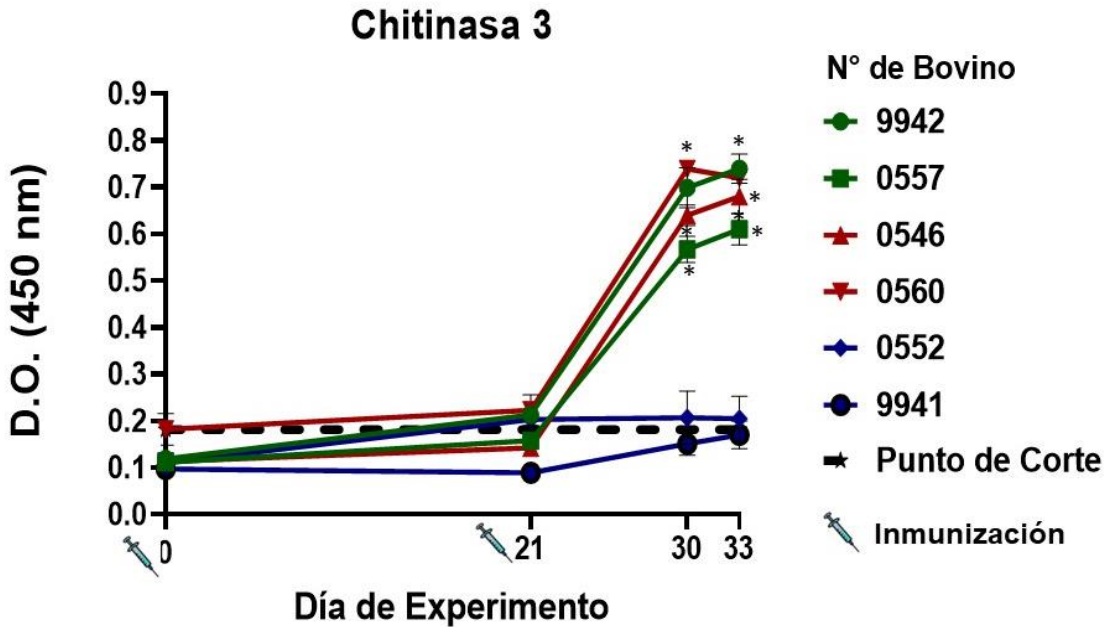


Figura 40. Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Chitinasa 3 antes de la infestación. Dilución 1:500. Bovinos 9942 y 0557 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 0546 y 0560 inmunizados con 100 µg de cada péptido; bovinos 0552 y 9941 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

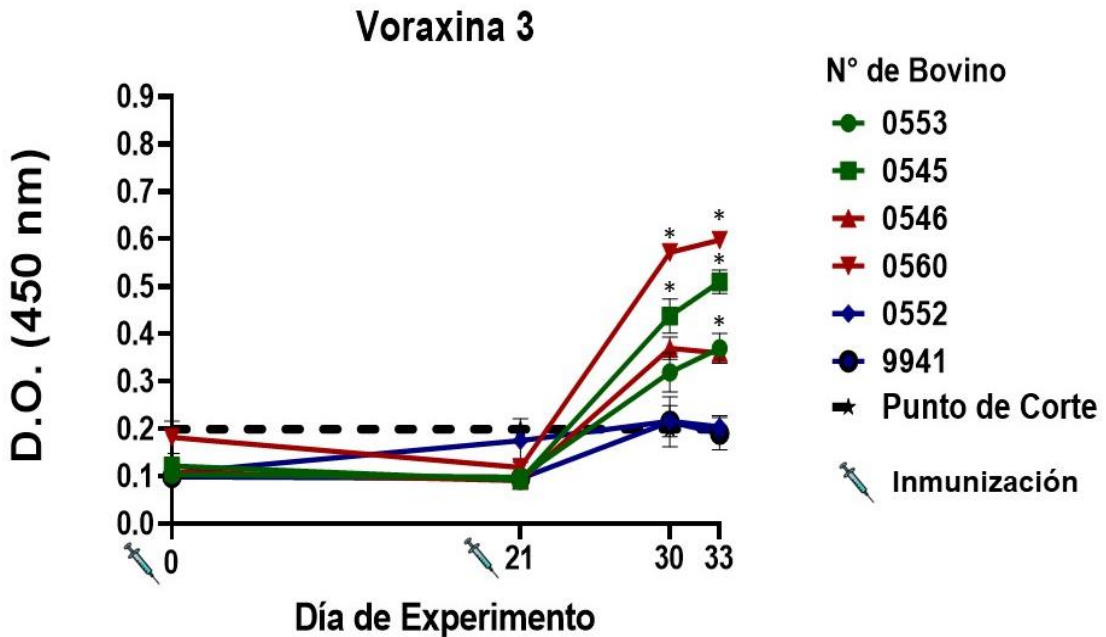


Figura 41. Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Voraxina 3 antes de la infestación. Dilución 1:500. Bovinos 0553 y 0545 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 0546 y 0560 inmunizados con 100 µg de cada péptido; bovinos 0552 y 9941 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

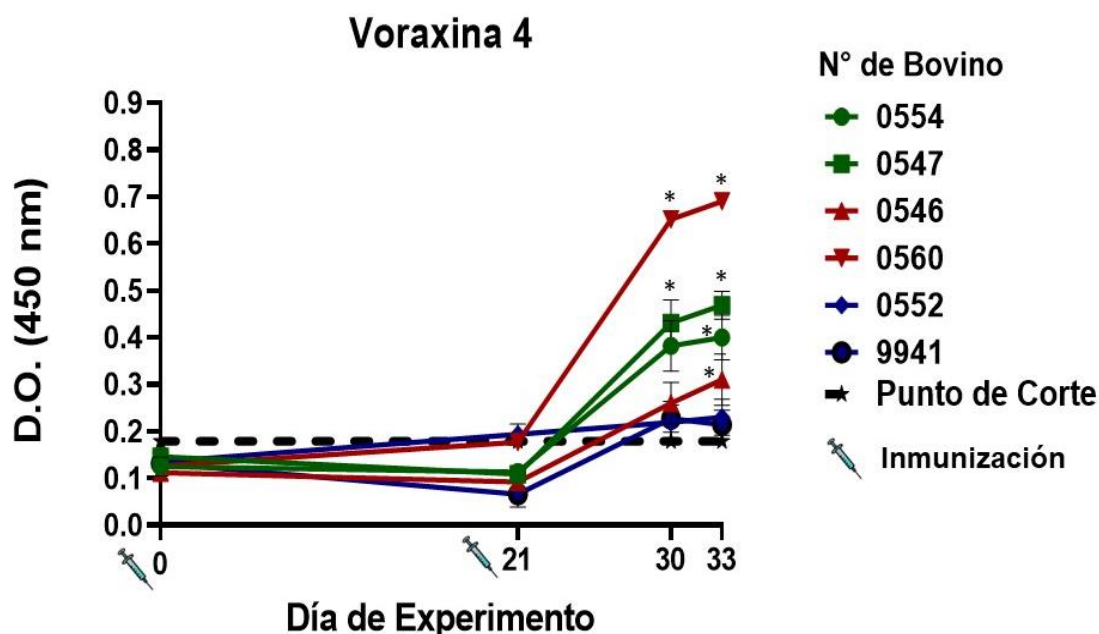


Figura 42. Gráfica de la inmunogenicidad del péptido Voraxina 4 antes de la infestación. Dilución 1:500. Bovinos 0554 y 0547 inmunizados con 100 µg del péptido; bovinos 0546 y 0560 inmunizados con 100 µg de cada péptido; bovinos 0552 y 9941 inmunizados con adyuvante. En \* se señalan los sueros con diferencia estadística significativa mediante prueba de ANOVA y post hoc Tukey ( $p < 0.05$ ).

Durante la infestación experimental, un bovino inmunizado con la mezcla de los cuatro péptidos (número 0560) fue retirado del experimento debido a problemas clínicos. Por lo tanto, la obtención de datos en ese bovino fue considerado incompleto y se decidió eliminar de la comparativa ese par de bovinos experimentales inmunizados con el coctel de péptidos. Para fines prácticos, se decidió comparar el bovino inmunizado con los cuatro péptidos y que completó el experimento (0546) con el bovino de control (0552) más semejante en cuanto a raza y peso, y se muestra en el apéndice (Cuadro 8). Los bovinos fueron infestados con 0.5 g de larvas de *R. microplus* (0.25 g/lado del bovino). Las garrapatas fueron recolectadas durante los días 19 a 26 de la infestación, hasta que finalizó la repleción de garrapatas. El primer parámetro biológico evaluado fue la supervivencia de las garrapatas, y los resultados se presentan en la Figura 43.

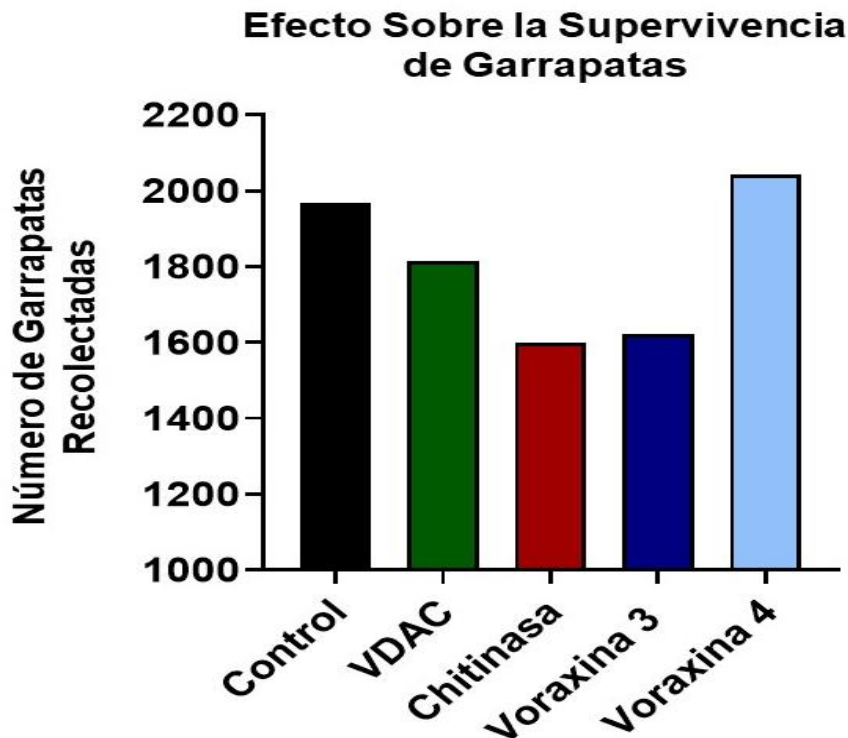


Figura 43. Número total de garrapatas recolectadas al final de la infestación.

De los dos bovinos de control se recolectaron un total de 1967 garrapatas repletas, mientras que en los animales inmunizados con péptidos hubo una disminución en la supervivencia, con excepción de los bovinos inmunizados con Voraxina 4. En total, con respecto a los controles, hubo una disminución de 7.72% con VDAC 3 (n=1815); de 17.5% con Voraxina 3 (n=1622); y 18.75% con Chitinasa 3 (n=1598), mientras que el aumento con Voraxina 4 fue del 3.81% (n=2042).

La disminución del número garrapatas al inmunizar con VDAC 3 se ha demostrado por Ortega-Sánchez *et al.* (2020), quien reportó un 30% de disminución al vacunar con rBmVDAC. A pesar de que los ensayos de ELISA indican que se obtuvo una mayor concentración de anticuerpos al inmunizar con un solo péptido de VDAC que con la proteína recombinante completa, la diferencia de mortalidad entre ambos experimentos puede deberse a que la proteína completa desencadena



una producción de anticuerpos dirigidos contra distintas regiones de la proteína, afectándola más eficientemente al bloquear distintos sitios. La mortalidad puede deberse a que VDAC es una proteína que regula el flujo de metabolitos entre la célula y el ambiente extracelular, y la unión de anticuerpos puede interrumpir con los procesos de apertura/cierre del canal y afectar el equilibrio celular al impedir la entrada o salida de moléculas indispensables para la supervivencia del organismo (Shoshan *et al.*, 2010; Varughese *et al.*, 2021).

Quitinasa es una enzima con bastantes funciones en los procesos de muda y crecimiento, convirtiéndola en una proteína fundamental para el desarrollo de las distintas fases de las garrapatas. Se ha reportado mortalidad en garrapatas *H. longicornis* al vacunar con esta enzima recombinante, disminuyendo en 20% la cantidad de garrapatas que alcanzan la fase adulta, principalmente debido a muerte interestadial de las ninfas (You & Fujisaki, 2009). En este estudio, se identificó una mortalidad de 18.75% de las garrapatas desafiadas con Chitinasa 3, no obstante, debido a las características biológicas de *R. microplus* como garrapata de un solo hospedero, no fue posible identificar el estadio predominantemente afectado. La reducción de la supervivencia de las garrapatas se puede deber a lo anterior, pues la afectación de esta enzima impide el desarrollo interestadial y una menor cantidad de garrapatas pueden llegar al estadio adulto y ser recolectadas (Zhang *et al.*, 2021). Sin embargo, al haber muchas enzimas involucradas en los procesos de ecdisis y apótesis, afectar solo una de estas proteínas no repercutiría en un porcentaje mayor de mortalidad (Arakane & Muthukrishnan, 2010; Zhang *et al.*, 2021).

De voraxina se sabe muy poco en cuanto a su mecanismo de acción, siendo una proteína secretada, presente en el espermátforo durante la cópula y con un sitio de actividad desconocido dentro de la hembra (Sonenshine & Roe, 2014). Por ende, la forma en que causa mortalidad es algo difícil de establecer en este estudio. Yamada *et al.*, 2009 no reportaron efecto de mortalidad sobre garrapatas *R. appendiculatus* en un estudio con voraxina recombinante. El principal efecto

obtenido con un antígeno derivado de voraxina debería reflejarse sobre el peso y oviposición de la garrapata (Weiss & Kaufman, 2004).

Otra característica que pudo determinarse durante la recolección fue el efecto de la respuesta inmunitaria a estos antígenos sobre la duración del ciclo biológico. La gráfica correspondiente a este efecto se muestra en la Figura 44.

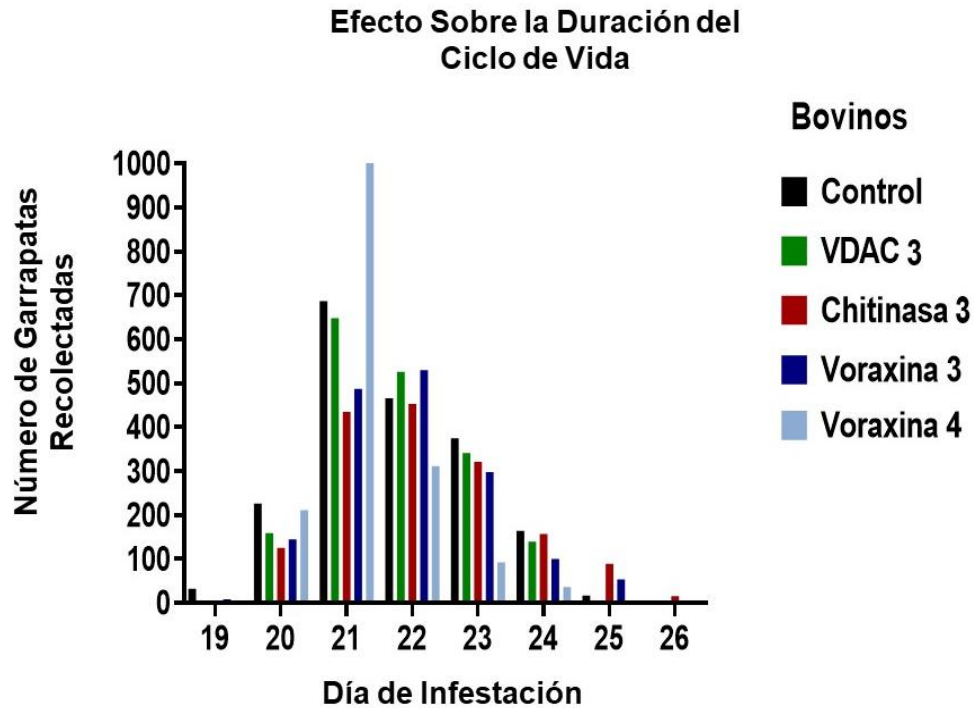


Figura 44. Número de garrapatas recolectadas por día durante la infestación.

La duración del ciclo biológico de *R. microplus* sobre el bovino es de aproximadamente 19-23 días, con un promedio de 21 días (Benavides *et al.*, 2016). En este experimento, el tiempo de recolección se alargó hasta el día 25 en las garrapatas desafiadas con Voraxina 3, y hasta los 26 días en las garrapatas desafiadas con Chitinasa 3. El alargamiento del ciclo parasítico en las garrapatas afectadas por anticuerpos contra quitinasa, se puede deber al papel que tiene esta enzima sobre la ecdisis y la apólisis, y por ende en el desarrollo de estos organismos. Este efecto de alargamiento de los ciclos estadiales y de muda se describió que ocurrió en larvas de *H. longicornis*, por You & Fujisaki (2009), quienes

determinaron un retraso de 1.4 días respecto al control, pero no hubo retraso en los ciclos de ninfa y adulto. Debido a que *R. microplus* es una garrapata de un único hospedero, no fue posible determinar el estadio en que ocurrió el retardo. La razón del retraso en la caída de las garrapatas desafiadas con Voraxina 3 no está claro, ni reportado en estudios previos, y sobretodo porque no hay afectación sobre el peso de la garrapata.

El efecto de la respuesta inmunitaria a los antígenos sobre el peso de las garrapatas se muestra en la Figura 45.

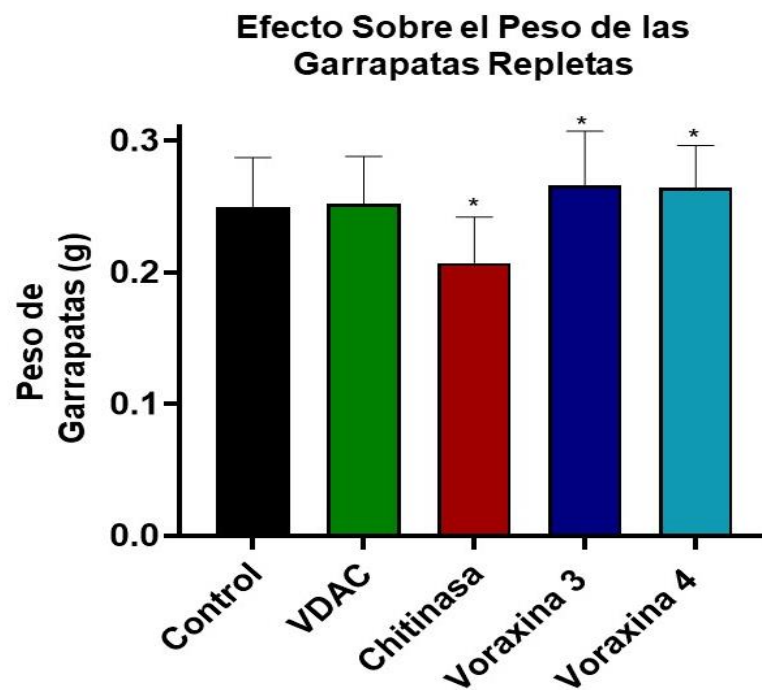


Figura 45. Peso promedio de las garrapatas recolectadas en muestras de 650 individuos. En \* se señalan los promedios con diferencia estadística significativa mediante prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0.01$ ).

La afectación de las inmunizaciones sobre el peso obtenido de las garrapatas fue significativamente menor solo con Chitinasa 3, al obtenerse pesos de 0.207 g ( $\pm 0.035$  g), comparadas con el 0.249 g ( $\pm 0.038$  g) de las garrapatas de control, representando una disminución del 16.8%. Esto puede deberse a daño sobre el desarrollo completo y funcional de la cutícula y de la membrana peritrófica,

esta última parte esencial del funcionamiento intestinal (Arakane & Muthukrishnan, 2010). No obstante, este parámetro no ha sido descrito en artículos previos con antígenos de quitinasa. Con VDAC 3 ( $0.252 \text{ g} \pm 0.036 \text{ g}$ ), se obtuvo un aumento del 1.2%, siendo este porcentaje no significativamente diferente respecto al control. Ortega-Sánchez *et al.* (2020) reportaron una disminución del 5% del peso en las garrapatas desafiadas con rBmVDAC.

Al ser parte de una proteína cuya función está directamente relacionada con la repleción, se esperaba que los péptidos de Voraxina afectaran el peso de las garrapatas recolectadas, pese a esto, el efecto fue lo contrario, obteniéndose aumentos significativos del 6.8% con Voraxina 3 ( $0.266 \text{ g} \pm 0.041 \text{ g}$ ) y del 6.02% con Voraxina 4 ( $0.264 \text{ g} \pm 0.032 \text{ g}$ ). Lo anterior se aleja de los resultados previos publicados por Weiss & Kaufman (2004) y Yamada *et al.* (2009), en *A. hebraeum* y *R. appendiculatus*, quienes describen una reducción de peso del 72% y 42%, respectivamente. La ausencia de un efecto sobre el peso de las hembras recolectadas se asemeja con lo reportado por Donohue *et al.*, 2009 y Smith *et al.*, 2009, quienes trabajando con ARN de interferencia bloquearon voraxina de las especies *D. variabilis* y *A. hebraeum* y no hallaron efecto sobre el peso. Esto puede deberse a que en *R. microplus* esta proteína no está completamente caracterizada y puede que sea necesario identificar y afectar ambas subunidades de la proteína (Donohue *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2009). Otra posible explicación es que es muy corto el tiempo que está expuesta la proteína en la hemolinfa, y alcanza su órgano blanco antes de poder ser afectada por anticuerpos. Yamada *et al.*, 2009, obtuvieron títulos de anticuerpos de 1:100, por lo que los niveles reportados de inmunoglobulinas específicas en las ELISAS de este estudio parecerían no ser causa del nulo efecto sobre el peso. Lo que sí podría influir es la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados por péptidos frente a aquellos producidos por la subunidad proteica recombinante. Adicionalmente, se ha hipotetizado que voraxina puede no ser secretada libremente, sino unida a membranas o incluso en una forma intracelular (Donohue *et al.*, 2009). Por lo

anterior, se debe estudiar por completo los mecanismos de la ingurgitación en *R. microplus*, y caracterizar voraxina y otras proteínas implicadas en la repleción de las hembras adultas y fecundadas.

Con respecto a la oviposición, se cuantificó el peso de huevos ovipositados por garrapata y la masa total de oviposición obtenida del total de garrapatas por péptido analizado. Los resultados se muestran en las Figuras 46 y 47.

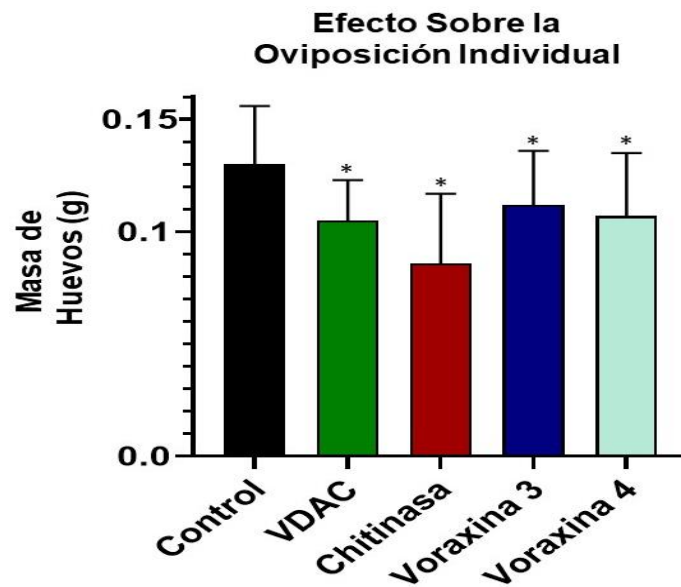


Figura 46. Oviposición individual por garrapata. En \* se señalan los promedios con diferencia estadística significativa mediante prueba de T ( $p < 0.05$ ).

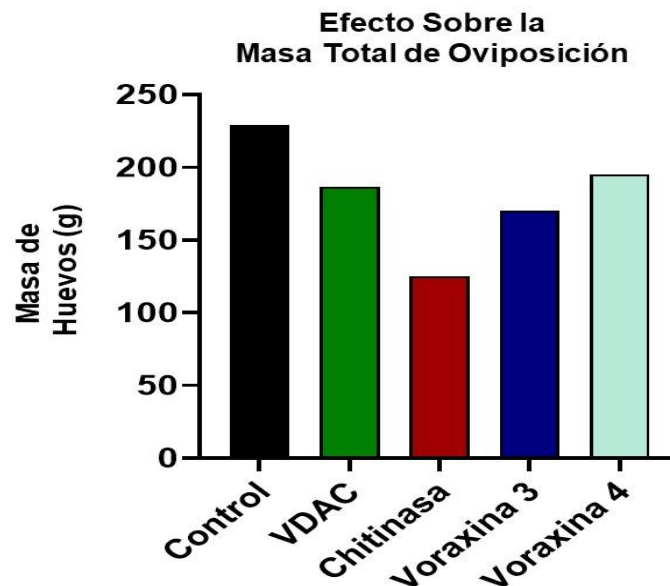


Figura 47. Masa de oviposición obtenida con el total de garrapatas.

Ortega-Sánchez *et al.* (2020), encontró que las garrapatas desafiadas con rBmVDAC tuvieron una oviposición significativamente menor, con un porcentaje de reducción de 54% por en la cantidad de huevos que produjo una garrapata. En el presente estudio la disminución fue de 19.23% (0.105 g  $\pm$  0.018 por garrapata), significativamente distinto al control (0.13 g  $\pm$  0.03 g), pero bastante menor al resultado obtenido con la proteína completa recombinante. El silenciamiento de VDAC mitocondrial en diferentes modelos animales ha sugerido la importancia de esta proteína para el desarrollo celular y su metabolismo energético, regulando la entrada y salida de moléculas como ATP, ADP y NADH, además de iones importantes, considerando que la oviposición es uno de los procesos más desgastantes para las garrapatas (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010; Sonenshine & Roe, 2014).

Las garrapatas correspondientes al péptido Chitinasa 3 (0.086 g  $\pm$  0.03 g) fueron afectadas en un 33.9% respecto a la oviposición del control. Este efecto había sido reportado previamente por You & Fujisaki (2009), quienes reportaron una disminución de 12% en la oviposición de *H. longicornis*. La reducción en la oviposición de estas garrapatas puede estar directamente relacionada con su peso promedio. En *R. microplus*, se ha descrito que la producción de huevos en las hembras es proporcional al peso de la garrapata (Bennett, 1974).

Por otro, lado la reducción en la oviposición por efecto de los péptidos de voraxina 13.84% y 17.7% con Voraxina 3 (0.112 g  $\pm$  0.024 g) y Voraxina 4 (0.107 g  $\pm$  0.028 g), respectivamente. En los primeros estudios de Weiss & Kaufman (2004), se reportó la disminución del 36.5% en la oviposición de las hembras que se lograron repletar, y posteriormente Yamada *et al.* (2009) consiguieron un 56% de disminución en la oviposición de *R. appendiculatus*. A pesar de que no se pudo observar la afectación en la repleción de las garrapatas, sí hubo una disminución de la oviposición, y esto podría ser posible por afectación al desarrollo de los ovocitos o a la síntesis y acumulación de vitelogenina.

La última característica recopilada fue la fertilidad, contabilizando larvas vivas, larvas muertas y huevos sin eclosionar. Los resultados se muestran en la Figura 48.

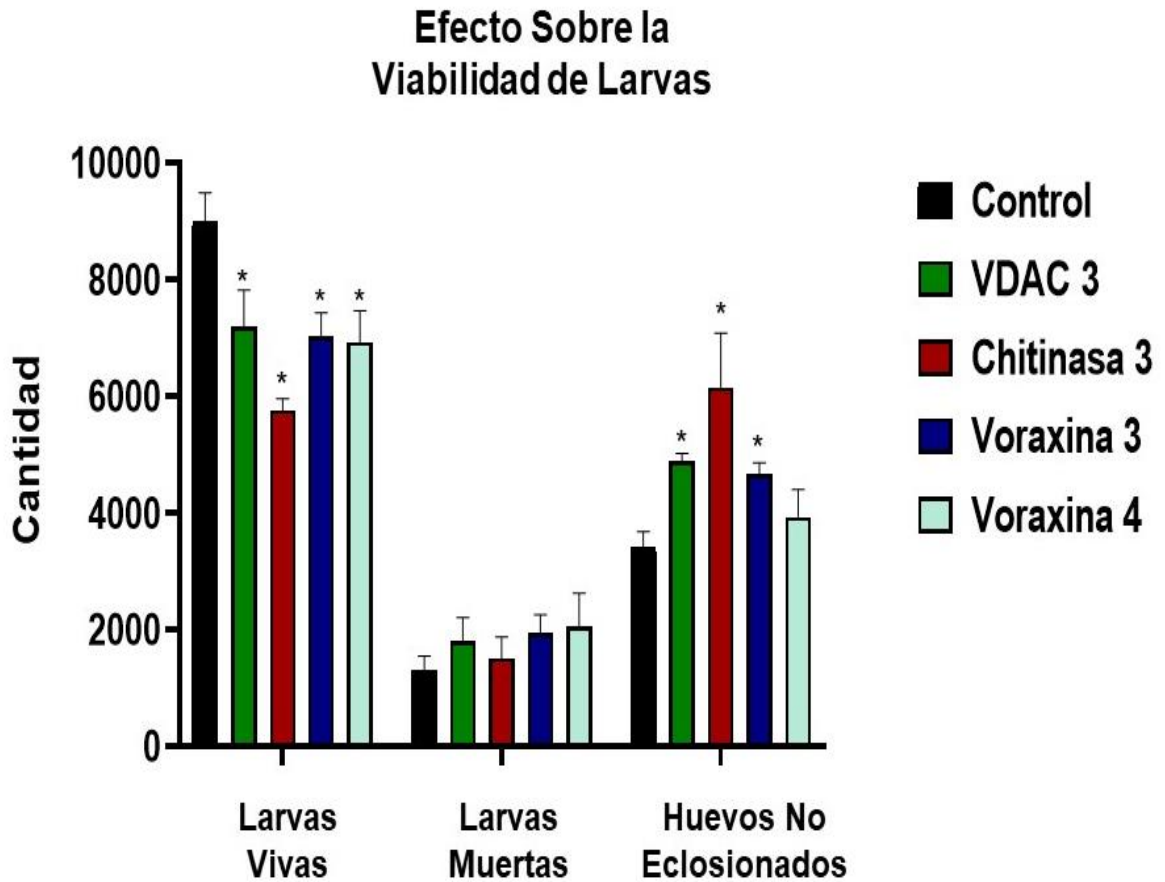


Figura 48. Índices de viabilidad y fertilidad de los huevos. Contabilizados en 1 g de huevos y por triplicado. En \* se señalan los promedios con diferencia estadística significativa respecto al control mediante prueba de T ( $p < 0.05$ ).

En las garrapatas de control, se contabilizaron medias de  $8997.25 \pm 500.53$  larvas vivas,  $1299.01 \pm 250.40$  larvas muertas y  $3411.02 \pm 273.12$  huevos sin eclosionar.

Nuevamente, el efecto sobre la viabilidad de las larvas es superior en el experimento de Chitinasa 3, al haber una mayor cantidad de larvas muertas ( $1509.67 \pm 367.11$ ) y huevos no eclosionados ( $6159.67 \pm 932.69$ ) respecto a los controles, y una disminución de 36% en larvas vivas contabilizadas ( $5761.33 \pm 201.79$ ). Aun cuando la literatura no reporta que las quitinasas tengan una participación en la eclosión y supervivencia de las larvas de garrapatas, se ha descrito que en mosquitos y nemátodos, los huevos tienen quitina en su estructura, y que previo a la eclosión y en las larvas recién eclosionadas, hay una intensa actividad quitinolítica (Arnold *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 2007; Farnesi *et al.*, 2015).

El desafío con VDAC 3 resultó en una disminución del 20.1% de las larvas viables ( $7189.10 \pm 637.15$ ) y un aumento del 43% de huevos sin eclosionar ( $4901.05 \pm 123.18$ ). Estos resultados pueden ser comparados con lo obtenido por Ortega-Sánchez *et al.* (2020), quienes reportaron afectación a la fertilidad con una reducción del 72% de larvas vivas y un 43% de incremento de huevos sin eclosionar y larvas muertas. En otros experimentos de silenciamiento de VDAC en ratones se describió infertilidad en los individuos, por lo que antecedentes de este efecto (Sampson *et al.*, 2001).

Con los péptidos Voraxina 3 y Voraxina 4, el 48.5% y 46.3% de las observaciones correspondieron a larvas muertas y huevos no eclosionados, números superiores al 35.5% correspondiente al control. Aún con lo anterior, efectos sobre la fertilidad o un rol fisiológico no han sido reportados para esta proteína (Donohue *et al.*, 2009).

En el cálculo de la eficacia vacunal se decidió incluir a la fórmula los parámetros de supervivencia, capacidad de oviposición y fertilidad, anteriormente usados para evaluar vacunas en esta especie de garrapata y otras de un solo hospedero. Asimismo, se presenta el efecto sobre el peso de las garrapatas, aunque no forma parte de la fórmula de eficacia (Fragoso *et al.*, 1998; Patarroyo *et al.*, 2002; Ortega-Sánchez *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 6.



**Cuadro 6. Eficacia de los péptidos evaluados.**

<b>Péptido evaluado</b>	<b>DT(%)</b>	<b>DW(%)</b>	<b>DO(%)</b>	<b>DF(%)</b>	<b>E(%)</b>
VDAC 3	7.73	-1.21	19.23	21.19	40.69
Chitinasa 3	18.76	16.87	33.92	35.06	71.18
Voraxina 3	17.54	-6.83	13.85	21.49	51.92
Voraxina 4	-3.81	-6.02	17.74	18.14	27.63
<p><b>DT:</b> Efecto sobre el total de hembras repletas  <b>DW:</b> Efecto sobre el peso de hembras repletas  <b>DO:</b> Efecto sobre la oviposición  <b>DF:</b> Efecto sobre la fertilidad  <b>E:</b> Eficacia vacunal</p>					

La mayor eficacia se calculó con el péptido Chitinasa 3, el cual tuvo un porcentaje de 71.18%. Este valor es considerablemente alto al compararlo con los reportes de eficacia logrados con la vacuna de Bm86 (Almazán *et al.*, 2018), que ronda del 50 al 90%, y por tratarse de un único péptido de 19 aminoácidos, pero por sí solo no alcanza el 80% requerido.

Los siguientes péptidos con eficacia mayor a menor, fueron Voraxina 3, con 51.92%, VDAC3 con 40.69%, y Voraxina 4, con 27.63%.

En el cuadro 7 se muestran algunos resultados de otros péptidos antígenos vacunales para comparar la eficacia presentada en este trabajo.

**Cuadro 7. Eficacia de otros péptidos candidatos vacunales.**

Proteína	Péptido	Tamaño (aminoácidos)	DT (%)	DW (%)	DO (%)	DF (%)	E (%)	Referencia
<b>Bm86</b>	SBm4912	40	28.11	10.74	33.58	24.48	64.42	Patarroyo <i>et al.</i> , 2002
	SBm7462	40	48.56	7.98	31.04	30.80	75.58	
	SBm19733	46	12.78	0	19.31	9.13	22.57	
<b>Bm95</b>	Bm95 + MSP-1	--	54	25	-22	22	22	Almazán <i>et al.</i> , 2012
<b>Ubiquitina</b>	UBQ + MSP-1	87	3	8	0	0	---	
<b>Factor de Elongación</b>	EF1 + MSP-1	462	38	7	-15	22	38	
<b>Subolesina</b>	SUB + MSP-1	146	34	37	11	67	81	
<b>P0</b>	pP0	20	39	49	75	41	96	Rodríguez <i>et al.</i> , 2015
<b>ATAQ</b>	pATAQ	17	37.5	-5.2	-6.7	1.8	35	Rangel-Aguirre <i>et al.</i> , 2016
<b>Subolesina</b>	rSub	102	53	8	16	67	67	Mendoza-Martínez <i>et al.</i> , 2021
<b>Bm86</b>	Recombinante Completa	650	41	6	15	56	56	
<b>Sub + Bm86</b>	rSub + rBm86	752	28	10	19	49	49	
<b>Acuaporina</b>	RmAq2	17	24.5	-10.7	-17.6	-0.25	-	Scoles <i>et al.</i> , 2022
<p><b>DT:</b> Efecto sobre el total de hembras repletas  <b>DW:</b> Efecto sobre el peso de hembras repletas  <b>DO:</b> Efecto sobre la oviposición  <b>DF:</b> Efecto sobre la fertilidad  <b>E:</b> Eficacia vacunal</p>								

La eficacia del péptido VDAC 3 (40.69%) es menor al 82% que fue conseguido con inmunizaciones con la proteína recombinante (Ortega-Sánchez *et al.*, 2020). A pesar de que no se igualó la misma eficacia, con este péptido se repitió la afectación en la supervivencia, oviposición y fertilidad, lo que afirma esta proteína como un viable candidato vacunal. Se podría sugerir mayor investigación para intentar identificar los determinantes inmunogénicos de BmVDAC que consigan igualar o acercarse al 80% de eficacia.

La eficacia de Chitinasa 3 (71.18%) es bastante más alta al comparar con los otros tres péptidos de estudio, y su eficacia es similar o ligeramente inferior a lo logrado con otros posibles antígenos vacunales. Además, como candidato vacunal contra garrapata, es el primer reporte de eficacia con esta proteína. En total, se obtuvo la reducción en la supervivencia de las garrapatas y un significativo decremento de la repleción, oviposición y viabilidad de las larvas. Adicionalmente, se notaron alteraciones físicas en una porción de las garrapatas recolectadas, observándose cambios en la cutícula de estas garrapatas afectadas, mostrando características de mayor translucidez y friabilidad o menor resistencia, lo último manifestándose con exceso de mortalidad durante la oviposición. Lo anterior puede deberse a que hay algunas quitinasas que no solo hidrolizan quitina y cuyo principal efecto sería la imposibilidad o dificultad de eliminar el exoesqueleto anterior, sino otro atributo que tienen es la participación en la regulación de las enzimas que sintetizan la quitina (Arakane & Muthukrishnan, 2010). Algunas de estas garrapatas se muestran en la Figura 49.



**Figura 49. Apariencia externa de garrapatas recolectadas de los bovinos inmunizados con Chitinasa 3. En la imagen de la extrema derecha se muestra una hembra de control repleta.**

Los péptidos de Voraxina 3 (51.92%) y Voraxina 4 (27.63%) tuvieron diferentes grados de eficacia, principalmente con la diferencia que Voraxina 3 afectó más el índice de supervivencia, mientras que Voraxina 4 no lo afectó. En el resto de parámetros los resultados fueron muy similares.

Estos resultados indican que estos péptidos sí alteran los parámetros biológicos de *R. microplus*, cada uno con su impacto particular y grado de afectación. Sin embargo, la eficacia de estos péptidos no alcanza el 80% de eficacia (control) que se pide en un biológico ixodicida para las normativas mexicanas (NOM-006-ZOO-1993). Se puede formular una vacuna quimérica con estos péptidos y evaluar su eficacia, esperando que haya un efecto sinérgico entre los antígenos y afectar en distintos grados a las garrapatas (Willadsen, 2008).

Si la formulación de una vacuna multiantigénica resulta con eficacia de 80% o superior, se puede solicitar un estudio de mayor alcance en condiciones controladas y en situaciones de campo, así como evaluar con distintas cepas de garrapatas como lo indica la norma mexicana.

## 8. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró la presencia cuatro péptidos con epítomos B inmunogénicos, correspondientes a tres proteínas de *R. microplus*, señaladas como posibles candidatos vacunales.

Los péptidos inmunogénicos analizados tienen diferentes efectos sobre parámetros biológicos de las garrapatas, principalmente sobre la oviposición y fertilidad, siendo el péptido Chitinasa 3 el de mayor eficacia, con 71.18%. Los péptidos Voraxina 3, VDAC 3 y Voraxina 4 tuvieron porcentajes de eficacia menores, con 51.92%, 40.69% y 27.63% respectivamente. No obstante, ningún péptido alcanzó el 80% de eficacia planteado en la hipótesis y que señalan las normas nacionales.

Este estudio es el primero que señala el potencial vacunal de voraxina y quitinasa de *R. microplus*, y el primero que utiliza un péptido corto de BmVDAC.

Esta investigación es un primer e importante paso para la elaboración de una vacuna multiantigénica multiepitópica contra *R. microplus*, que integre estos péptidos y afecte a la garrapata en distintas fases de su ciclo biológico.

## 9. LITERATURA CITADA

- Abbas, R.Z., Zaman, M.A., Colwell, D.D., Gilleard, J. & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Vet. Parasitol.* 203(1-2): 6–20. 10.1016/j.vetpar.2014.03.006
- Aguirre, J.E. & Santamaría, V.M. (1986). Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. En VII Reunión Anual Asoc. Mex. De Parasitología
- Allen, J.R. & Humphreys, S.J. (1979). Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature* 280, 491–493. 10.1038/280491a0.
- Almazán, C., Blas-Machado, U., Kocan, K.M., Yoshioka, J.H., Blouin, E.F., Mangold, A.J. & de la Fuente, J. (2005). Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine*, 23(35), 4403–4416. 10.1016/j.vaccine.2005.04.01
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F. & de la Fuente, J. (2010). Identification and characterization of *Rhipicephalus microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol. Res.* 106(2): 471–479. 10.1007/s00436-009-1689-1
- Almazán, C., Moreno-Cantú, O., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Canales, M., Villar, M. & de la Fuente, J. (2012). Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*. 30(2), 265–272. 10.1016/j.vaccine.2011.10.102
- Almazan, C., Tipacamu, G.A., Rodriguez, S., Mosqueda, J. & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Front. Biosci.* 23:1535–1551. 10.2741/4659.
- Alonso-Díaz, M.A. & Fernández-Salas, A. (2021). Entomopathogenic Fungi for Tick Control in Cattle Livestock From Mexico. *Fungal. Biol.* 21:657-694. 10.3389/ffunb.2021.657694
- Anderson, J.F. & Magnarelli, L.A. (2008). Biology of ticks. En: Infectious disease clinics of North America: tick borne diseases, Lyme Disease. p. 195-215. Edlow, J.A. W.B. Saunders, Philadelphia, PA, USA.
- Angus, B.M. (1996). The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *Int. J. Parasitol.* 26(12):1341-1355. 10.1016/s0020-7519(96)00112-9.
- Arakane, T. & Muthukrishnan, S. (2010). Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell Mol Life Sci.* 67(2):201-216.10.1007/s00018-009-0161-9

- Arakane, Y., Zhu, Q., Matsumiya, M., Muthukrishnan, S. & Kramer, K.J. (2003). Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect Biochem Mol Biol.* 33:631–648
- Araujo-Meléndez, J., Sifuentes-Osornio, J., Bobadilla-del-Valle, J.M, Aguilar-Cruz, A., Torres-Ángeles, O., Ramírez-González, J.L., Ponce-de-León, A., Ruiz-Palacios, G.M. & Guerrero-Almeida, M.L. (2012). ¿Qué sabemos acerca de la fiebre Q en México? *Rev. Invest. Clin.* 64(6):541-545.
- Armstrong, R.A., Eperjesi, F. & Gilmartin, B. (2002). The application of analysis of variance (ANOVA) to different experimental designs in optometry. *Ophthalmic Physiol. Opt.* 22(3):248-56. 10.1046/j.1475-1313.2002.00020.x.
- Arnold, K., Brydon, L.J., Chappell, L.H. & Gooday, G.W. (1993). Chitinolytic activities in *Heligmosomoides polygyrus* and their role in egg hatching. *Mol. Biol. Parasitol.* 58(2):317–323. 10.1016/0166-6851(93)90054-2
- Aubry, P. & Geale, D.W. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.* 58(1):1-30. 10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x.
- Barker, S.C. & Walker, A.R. (2014). Ticks of Australia. The species that infest domestic animals and humans. *Zootaxa.* 3816(1):1-144. 10.11646/zootaxa.3816.1.1.
- Barré, N. & Uilenberg, G. (2010). Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle ticks. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 29(1):135-147.
- Benavides-Ortiz, E., Romero-Prada, J. & Villamil-Jiménez, L.C. (2016). Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático: Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático. IICA. San José, Costa Rica.
- Bennett, G.F. (1974). Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia*, 16(1):52–61.
- Berry, C.M. (2017). Resolution of the taxonomic status of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. PhD thesis. University of Glasgow, Scotland.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A. & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 129 Suppl:S247-S269. 10.1017/s003118200400519.
- Bozkir, A. & Hayta, G. (2004). Preparation and evaluation of multiple emulsions water-in-oil-in-water (W/O/W) as delivery system for influenza virus antigens. *J. Drug. Target.* 12:157–164
- Bowman, D. (2014). *Georgis' Parasitology for veterinarians*. 10<sup>th</sup> edition, Elsevier. USA.

- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M. & de la Fuente, J. (1997). Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine*, 15(4), 414–422. 10.1016/s0264-410x(96)00192-2
- Chevillon, C., De Garine-Wichatitsky, M., Barré, N. & De Meeus, T. (2012). Understanding the genetic, demographical and/or ecological processes at play in invasions: lessons from the southern cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari:Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 59:203-218. 10.1007/s10493-012-9602
- Colombini, M. (2004). VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol. Cell. Biochem.* 256-257(1-2):107-115. 10.1023/b:mcbi.0000009862.17396.8d
- Colombini, M., Blachly-Dyson, E. & Forte, M. (1996). VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion channels.* 4:169–202. 10.1007/978-1-4899-1775-1\_5
- Cupp, E.W. (1991). Biology of ticks. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.* 21(1):1-26. 10.1016/S0195-5616(91)50001-2
- Dantas-Torres, F., Fernandes-Martins, T., Muñoz-Leal, S., Castilho-Onofrio, V. & Barros-Battesti, D.M. (2019). Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks. Tick. Borne. Dis.* 10(6):1-45. 10.1016/j.ttbdis.2019.06.012
- Dar, P., Kalaivanan, R., Sied, N., Mamo, B., Kishore, S., Suryanarayana, V. V. & Kondabattula, G. (2013). Montanide ISA™ 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle. *Vaccine.* 31(33), 3327–3332. 10.1016/j.vaccine.2013.05.078
- de la Fuente, J. & Contreras, M. (2015). Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev. Vaccines* 14(10):1367-1376. 10.1586/14760584.2015.1076339.
- de la Fuente, J. & Kocan, K.M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 28(7):275-283. 10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x
- de la Fuente, J., Rodríguez, M., Fragoso, H., Ortiz, M., Massard, C.L., García, O. & Leonar, R. (1995). Efficacy of vaccination with Gavac™ in the control of *Boophilus microplus* infestations. In: *Recombinant Vaccines for the Control of Cattle Tick*. Elfos Scientae, La Habana, pp. 177-185.
- de la Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J. C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H., & Leonart, R. (1999). Vaccination against ticks



- (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet. Anal.* 15(3-5):143-148. 10.1016/s1050-3862(99)00018-2.
- de Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P. & Jongejan, F. (2001). Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 25(3):245-261. 10.1023/a:1010609007009
- Domínguez-García, D.I., Torres-Agatón, F. & Rosario-Cruz, R. (2016). Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México / Economic evaluation of tick (*Rhipicephalus microplus*) control in Mexico. *CIBA Rev. Ibero. Cienc. Biol. Agro.* 5(9), 43 - 52.
- Donohue, K.V., Khalil, S.M., Ross, E., Mitchell, R.D., Roe, R.M. & Sonenshine, D. E. (2009). Male engorgement factor: Role in stimulating engorgement to repletion in the ixodid tick, *Dermacentor variabilis*. *J. Insect. Physiol.* 55(10): 909–918. 10.1016/j.jinsphys.2009.05.019
- dos Santos-Vaz, D. (2010). Breves considerações sobre alterações climáticas, riscos ambientais e problemas de saúde. *Hygeia* 6:60–66
- Estrada-Peña, A., García, Z. & Fragoso-Sánchez, H. (2006). The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) in Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 38:307-316. 10.1007/s10493-006-7251-2.
- Farnesi, L.C., Menna-Barreto, R.F., Martins, A.J., Valle, D. & Rezende, G. L. (2015). Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J. Insect. Physiol.* 83:43-52. 10.1016/j.jinsphys.2015.10.006
- Fernandes, E., Bittencourt, V. & Roberts, D.W. (2012). Perspectives of the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp. Parasitol.* 130(3):300-305. 10.1016/j.exppara.2011.11.004.
- 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 the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 183(3-4):338-342. 10.1016/j.vetpar.2011.07.028.
- Fleri, W., Paul, S., Dhanda, S.K., Mahajan, S., Xu, X., Peters, B. & Sette, A. (2017). The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front. Immunol.* 8:278. 10.3389/fimmu.2017.00278
- Fragoso, H., Rad, P.H., Ortiz, M., Rodríguez, M., Redondo, M., Herrera, L. & de la Fuente, J. (1998). Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. off. *Vaccine*, 16(20):1990–1992. 10.1016/s0264-410x(98)00116-9

- García-García, J.C., Gonzalez, I.L., González, D.M., Valdés, M., Méndez, L., Lamberti, J., D'Agostino, B., Citroni, D., Fragoso, H., Ortiz, M., Rodríguez, M., & de la Fuente, J. (1999). Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol.* 23(11):883-895. 10.1023/a:1006270615158
- George, J.E., Pound, J.M. & Davey, R.B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129:S353–S366. 10.1017/s0031182003004682
- Ghosh, S., Tiwari, S.S., Kumar, B., Srivastava, S., Sharma, A.K., Kumar, S., Bandyopadhyay, A., Julliet, S., Kumar, R. & Rawat, A.K. (2015). Identification of potential plant extracts for anti-tick activity against acaricide resistant cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 66(1):159-171.10.1007/s10493-015-9890-7
- Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L. & Arantes, G.J. (2004). Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129 Suppl, S427–S442. 10.1017/s0031182004006079
- Graham, O.H. & Hourrigan, J.L. (1977). Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. *J. Med. Entomol.* 13(6):629-658. 10.1093/jmedent/13.6.629
- Graham, O.H., Price, M.A. & Trevino, J.L. (1972). Cross-mating experiments with *Boophilus annulatus* and *B. microplus* (Acarina: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 9(6):531-537. 10.1093/jmedent/9.6.531. PMID: 4654687.
- Guglielmone, A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Shao, R. & Barker, S.C. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa.* 2528:1-28. 10.5281/zenodo.196488.
- Guirakhoo, F., Pugachev, K., Zhang, Z., Myers, G., Levenbook, I., Draper, K., Lang, J., Ocran, S., Mitchell, F., Parsons, M., Brown, N., Brandler, S., Fournier, C., Barrere, B., Rizvi, F., Travassos, A., Nichols, R., Trent, D. & Monath, T. (2004). Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J. Virol.*, 78(9): 4761–4775. 10.1128/jvi.78.9.4761-4775.2004
- Henrissat, B. (1999). Classification of chitinase modules. In: Chitin and chitinases. Birkhauser Verlag. Switzerland, pp 138–156
- Horak. I.G., Camicas, J.L. & Keirans, J.E. (2002). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol.* 28(1-4):27-54. 10.1023/a:1025381712339

- Horn, M., Nussbaumerová, M., Sanda, M., Kovárová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C.R., Kopáček, P., & Mares, M. (2009). Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem. Biol.* 16(10):1053-1063. 10.1016/j.chembiol.2009.09.009
- Ibrahim, Eel-S., Gamal, W.M., Hassan, A.I., Mahdy, Sel-D., Hegazy, A.Z. & Abdel-Atty, M.M. (2015). Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. *Vet World.* 8(10):1189-1198. 10.14202/vetworld.2015.1189-1198
- Janeway, C.A., Travers, P. & Walport, M. (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science
- Johnston, L.A., Kemp, D.H. & Pearson, R.D. (1986). Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effects of induced immunity on tick populations. *Int. J. Parasitol.* 16(1):27-34. 10.1016/0020-7519(86)90061-5
- Jongejan, F. & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology.* 129, Suppl:S3-S14.10.1017/s0031182004005967.
- Kemp, D.H., Agbede, R.I, Johnston, L.A.& Gough, J.M. (1986). Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. *Int. J. Parasitol.* 16(2):115-120.10.1016/0020-7519(86)90096-2
- Kim, H.Y. (2015). Statisticals notes for clinical researchers: post hoc multiple comparisons. *Restor. Dent. Endo.* 40(2):172-176. 10.5395/rde.2015.40.2.172
- Kimura, S. (1973). The control of chitinase activity by ecdysterone in larvae of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 19:115-123.
- Kiss, T., Cadar, D. & Spinu, M. (2012). Tick prevention at a crossroad: New and renewed solutions. *Vet. Parasitol.* 187(3-4):357-366. 10.1016/j.vetpar.2012.02.010.
- Klimka, A., Michels, L., Glowalla, E., Tosetti, B., Krönke, M. & Krut O. (2015). Montanide ISA 71 VG is Advantageous to Freund's Adjuvant in Immunization Against *S. aureus* Infection of Mice. *Scand. J. Immunol.* 81(5):291-297. 10.1111/sji.12279
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., & Meléndez, R.D. (2003). Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol, Rev.* 16(4): 698–712. 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003
- Kopp, N., Diaz, D., Amacker, M., Odongo, D.O., Beier, K., Nitsch, C., Bishop, R.P. & Daubenberger, C.A. (2009). Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*,

- Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Hyalomma anatolicum anatolicum and Rhipicephalus appendiculatus BM86 homologues. *Vaccine*. 28(1): 261–269. 10.1016/j.vaccine.2009.09.085
- Kumar, B. & Ghosh, S. (2016). Cloning and molecular analysis of voraxin- $\alpha$  gene of Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *J. Parasit. Dis.* 40(1), 184–188. 10.1007/s12639-014-0475-x
- Lambertz, C., Chongkasikit, N., Jittapalapong, S. & Gauly, M. (2012). Immune Response of Bos indicus Cattle against the Anti-Tick Antigen Bm91 Derived from Local Rhipicephalus (Boophilus) microplus Ticks and Its Effect on Tick Reproduction under Natural Infestation. *J. Parasitol. Res.* 2012:907607. 10.1155/2012/907607
- Leal, B., Zamora, E., Fuentes, A., Thomas, D.B. & Dearth, R.K. Questing by tick larvae (Acari:Ixodidae): A review of the influences that affect the off-host survival. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 113(6):425-438. 10.1093/aesa/saaa013.
- Lindblad, E.B. (2004). Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine*. 22(27-28):3658-68. 10.1016/j.vaccine.2004.03.032
- Lohmeyer, K.H., Pound, J.M., May, M.A., Kammlah, D.M. & Davey, R.B. (2011). Distribution of Rhipicephalus (Boophilus) microplus and Rhipicephalus (Boophilus) annulatus (Acari:Ixodidae) Infestations Detected in the United States Along the Texas/Mexico Border. *J. Med. Entomol.* 48(4):770-774. 10.1603/me10209
- Lomas, L.O. & Kaufman, W.R. (1992). An indirect mechanism by which a protein from the male gonad hastens salivary gland degeneration in the female ixodid tick, Amblyomma hebraeum. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 21(3):169–178. 10.1002/arch.940210302
- Ma, M., Chen, Z., Liu, A., Ren, Q., Liu, J., Liu, Z., Li, Y., Yin, H., Guan, G. & Luo, J. (2016). Biological parameters of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari:Ixodidae) fed on rabbits, sheep and cattle. *Korean J. Parasitol* 54(3): 301-305. 10.3347/kjp.2016.54.3.301.
- Madder, M., Thys, E., Achi, L., Touré, A. & De Deken, R. (2011). Rhipicephalus (Boophilus) microplus: a most successful invasive tick species in West-Africa. *Exp. Appl. Acarol.* 53(2):139-145. 10.1007/s10493-010-9390-8.
- Maritz-Olivier, C., van Zyl, W., Stutzer, C. (2012). A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, Rhipicephalus microplus. *Ticks Tick Borne Dis.* 3(3):179-187. 10.1016/j.ttbdis.2012.01.003
- McMichael, A.J., Campbell-Lendrum, D.H., Corvalán, C.F., Ebi, K.L., Githeko, A.K., Scheraga, J.D. & Woodward, A. (2003) Climate change and human health: risks and responses. World Health Organization, Geneva.

- Mendoza-Martínez, N., Alonso-Díaz, M.A., Merino, O., Fernández-Salas, A. & Lagunes-Quintanilla, R. (2021). Protective efficacy of the peptide Subolesin antigen against the cattle tick *Rhipicephalus microplus* under natural infestation. *Vet Parasitol.* 299:109577. 10.1016/j.vetpar.2021.109577
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Rosario-Cruz, R., Rodríguez, S., Domingos, A. & de la Fuente, J. (2013). Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*, 31(49):5889–5896. 10.1016/j.vaccine.2013.09.037
- Meza, B., Ascencio, F., Sierra-Beltrán, A.P., Torres, J. & Angulo, C. (2017). A novel design of a multi-antigenic, multistage and multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori*: An in silico approach. *Infection, genetics and evolution.* *Infect. Genet. Evol.* 49:309-317. 10.1016/j.meegid.2017.02.007
- Miller, R.J., Almazán, C., Ortíz-Estrada, M., Davey, R.B., George, J.E. & De León, A.P. (2013). First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. *Vet. Parasitol.* 191(1-2): 97–101. 10.1016/j.vetpar.2012.08.011
- Miraballes, C. & Riet-Correa, F. (2018). A review of the history of research and control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay. *Exp. Appl. Acarol.*, 75(4):383–398. 10.1007/s10493-018-0278-3.
- Mohammed, E.S. & Elshahawy, I. (2018). The current prevalence of bovine babesiosis and theileriosis infection in Egypt. *J. Bacteriol. Mycol.* 6(6):306-311. 10.15406/jbmoa.2018.06.00224
- Moreira, M.F., Dos Santos, A.S., Marotta, H.R., Mansur, J.F., Ramos, I.B., Machado, E.A., Souza, G.H., Eberlin, M.N., Kaiser, C.R., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S. & Vasconcelos, A. M. (2007). A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37(12):1249–1261. 10.1016/j.ibmb.2007.07.017
- Moussian, B. (2013). The arthropod cuticle. In: *Arthropod Biology and Evolution: Molecules, Development and Morphology*. Springer, pp: 171-196.
- Murrell, A. & Barker, S.C. (2003). Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst. Parasitol.* 56:169-172. 10.1023/b:sypa.0000003802.36517.a0
- Murrell, A., Campbell, N.J. & Barker S.C. (2000). Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16(1):1-7. 10.1006/mpev.2000.0762
- Nava, S., Venzal, J.M., González-Acuña, D., Martins, T.F. & Guglielmone, A.A. (2017). *Ticks of the southern cone of America*. Elsevier, 1st edition. 348 pp.

- Nicholson, W.L., Sonenshine, D.E., Noden, B.H. & Brown, R.N. (2019). Ticks (Ixodida). In: Medical and Veterinary Entomology. 3rd Edition. pp. 603-672.
- Ortega-Sánchez, R., Camacho-Nuez, M., Castañeda-Ortiz, E.J., Martínez-Benítez, M.B., Hernández-Silva, D.J., Aguilar-Tipacamú, G. & Mosqueda, J. (2020). Vaccine efficacy of recombinant BmVDAC on *Rhipicephalus microplus* fed on *Babesia bigemina*-infected and uninfected cattle. *Vaccine*, 38(19), 3618–3625. 10.1016/j.vaccine.2019.12.040
- Pappas, P.J. & Oliver, J.H. (1972). Reproduction in Ticks (Acari: Ixodoidea) 2. Analysis of the stimulus for rapid and complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Med. Entomol.* 9(1):47-50. 10.1093/jmedent/9.1.47
- Patarroyo, S.J.H., de Sousa-Neves, E., Fidelis, C.F., Tafur-Gómez, G.A., de Araujo, L., Vargas, M.I., Sossai, S. & Prates-Patarroyo, P.A. (2020). Bovine immunisation with a recombinant peptide derived from synthetic SBm7462® (Bm86 epitope construct) immunogen for *Rhipicephalus microplus* control. *Ticks Tick Borne Dis.*, 11(5):101461. 10.1016/j.ttbdis.2020.101461
- Patarroyo, J.H., Portela, R.W., De Castro, R.O., Pimentel, J.C., Guzman, F., Patarroyo, M.E., Vargas, M.I., Prates, A.A. & Mendes, M.A. (2002). Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88(3-4):163-172. 10.1016/s0165-2427(02)00154-x
- Pérez-Cogollo, L.C., Rodríguez-Vivas, R.I., Ramírez-Cruz, G.T. & Miller, R.J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet. Parasitol.* 168(1-2):165-169. 10.1016/j.vetpar.2009.10.021.
- Perez, C., González-Fernández, N., Moreira-Rubio, A., Zamora-Sánchez, J., Pérez-González, E., Bricaud, M., Gaucheron, J., Alfaro-Martínez, A., Salinas-Rodríguez, D., Sardiñas-Padrón, M., Domingo-Puentes, M. & Segura-Silva, R. (2017). Using Montanide™ ISA 50 V2 as adjuvant for the formulation of the anti-tick Gavac® vaccine. 34(4): 4201-4205.
- Pérez-Soria, M.M. (2020). Desarrollo y evaluación de una vacuna multiantigénica y multiepitópica contra garrapatas *Rhipicephalus microplus*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Pérez, T.M., Guzmán-Cornejo, C., Montiel-Parra, G., Paredes-León, R. & Rivas, G. (2014). Biodiversidad de ácaros en México. *Rev. Mex. Biodivers.* 85(S1):399-407. 10.7550/rmb.36160
- Petermann, J., Bonnefond, R., Mermoud, I., Rantoen, D., Meynard, L., Munro, C., Lua, L. & Hüe, T. (2017). Evaluation of three adjuvants with respect to both

- adverse effects and the efficacy of antibody production to the Bm86 protein. *Exp. Appl. Acarol.* 72(3):303-315. 10.1007/s10493-017-0156-4
- Porfirio, N.I. & Schwentesius, R.R. (2016). Control biológico de garrapata *Boophilus microplus* con microorganismos. Obtenido de: [https://www.researchgate.net/profile/Rita\\_Rindermann/publication/289768055\\_Control\\_biologico\\_de\\_Garrapata\\_con\\_Microorganismos/links/569282aa08aed0aed8167e2b.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rita_Rindermann/publication/289768055_Control_biologico_de_Garrapata_con_Microorganismos/links/569282aa08aed0aed8167e2b.pdf). Consultado el [20/11/2021].
- Rajaula, J., Rahman, A. & Krutmuang, P. (2020). Entomopathogenic fungi in Southeast Asia and Africa and their possible adoption in biological control. *Biol. Control.* 151:104399. 10.1016/j.biocontrol.2020.104399.
- Rangel-Aguirre, A., Lobo, F.P., Cunha, R C., Garcia, M.V. & Andreotti, R. (2016). Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Vet. Parasitol.* 221:30–38. 10.1016/j.vetpar.2016.02.032
- Reck, J., Klafke, G. M., Webster, A., Dall'Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U. A., Corassini, V. B., Vargas, R., dos Santos, J. S. & Martins, J. R. (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 201(1-2), 128–136. 10.1016/j.vetpar.2014.01.012.
- Roberts, J.A. (1968). Acquisition by the host of the resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *J. Parasitol.* 54(4):657-662. 10.2307/3277013
- Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., Alvarez-Sánchez, M.E., Neri, A.F., Mendoza-Hernández, G. & Camacho-Nuez, M. (2012). The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of *Babesia bigemina* sexual stages with *Rhipicephalus microplus* midgut cells. *Vet. Parasitol.* 187(3-4):538-541. 10.1016/j.vetpar.2012.01.028.
- Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., León-Ávila, G., Castañeda-Ortiz, E.J., Álvarez-Sánchez, M.E., Camacho, A.D., Ramos, A. & Camacho-Nuez, M. (2015). BmVDAC upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 212(3-4):368–374. 10.1016/j.vetpar.2015.06.016.
- Rodríguez-Mallon, A., Encinosa, P.E., Méndez-Pérez, L., Bello, Y., Rodríguez-Fernández, R., Garay, H., Cabrales, A., Méndez, L., Borroto, C. & Estrada, M.P. (2015). High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 6(4):530–537. 10.1016/j.ttbdis.2015.04.007
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., Pérez-de León, A.A., Silva-Villela, H., Torres-Acosta, J.F., Fragoso-Sánchez, H., Romero-Salas, D., Rosario-Cruz, R.,

- Saldierna, F. & García-Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8(1): 61-74. 10.22319/rmcp.v8i1.4305.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F. & Fragoso Sánchez, H. (2005). Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de Importancia Económica en Producción Animal. McGraw-Hill. México. 571-592.
- Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R.J., Dominguez-Garcia, D.I., Hernandez-Ortiz, R. & de la Fuente, J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Front. Biosci.* 4:2657-2665. 10.2741/3403
- Roth, J.A. (1999). Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures. *Adv. Vet. Med.* 41:681-700. 10.1016/s0065-3519(99)80053-6
- SADER. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). La producción de carne de res mantiene un crecimiento anual sostenible de 2.5%. Ciudad de México, México. Obtenido de: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/la-produccion-de-carne-de-res-en-mexico-mantiene-un-crecimiento-anual-sostenible-del-2-5-agricultura>. Consultado el [21/09/2020].
- Saha, S. & Raghava, G.P.S. (2004). BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. In Nicosia, G., Cutello, V., Bentley, P.J. & Timis, J. ICARIS, LNCS, 3239:197-204, Springer.
- Saha, S. & Raghava, G.P. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins.* 65(1):40-48. 10.1002/prot.21078
- Samish, M., Ginsberg, H. & Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology.* 129 Suppl:S389-S403. 10.1017/s0031182004005219
- Sampson, M.J., Decker, W.K., Beaudet, A.L., Ruitenbeek, W., Armstrong, D., Hicks, M.J. & Craigen, W.J. (2001). Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3. *J. Biol. Chem.* 276 (42):39206–39212. 10.1074/jbc.M104724200
- Salvador, A., Igartua, M., Hernández, R. M. & Pedraz, J. L. (2011). An overview on the field of micro- and nanotechnologies for synthetic Peptide-based vaccines. *J. Drug. Deliv.* 181646. 10.1155/2011/181646
- Scoles, G.A., Hussein, H.E., Olds, C.L., Mason, K.L. & Davis, S.K. (2022). Vaccination of cattle with synthetic peptides corresponding to predicted extracellular domains of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* aquaporin 2 reduced the number of ticks feeding to repletion. *Parasit. Vectors*, 15:49. 10.1186/s13071-022-05166-1



- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria. (2020). Garrapata *Boophilus* spp. Obtenido de: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-para-el-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>. Consultado el [22/09/2020].
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria. (2021). Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp. Obtenido de: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>. Consultado el [24/10/2021].
- Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 399(6735):483-487. 10.1038/20959
- SIAP. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2021). Resumen nacional. Avance acumulado de la producción pecuaria, por producto: Leche de bovino y carne de bovino en canal. Año 2020. México. Obtenido de: [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecAvanceProd.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp). Consultado el [24/11/2021].
- Smith, A., Guo, X., de la Fuente, J., Naranjo, V., Kocan, K.M. & Kaufman, W.R. (2009). The impact of RNA interference of the subolesin and voraxin genes in male *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) on female engorgement and oviposition. *Exp. Appl. Acarol.* 47(1):71–86. 10.1007/s10493-008-9195-1
- Snowball, G.J. (1957). Ecological observations on the cattle tick *Boophilus microplus*. (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* 8:394-413. 10.1071/AR9570394
- Sonenshine, D.E. (1991). *Biology of ticks*, Vol. 1. New York. Oxford University Press.
- Sonenshine, D.E. & Roe, M.R. (2014). *Biology of ticks*. Vol. 1. New York. Oxford University Press.
- Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N. & Arbel, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects. Med.* 31(3):227-85. 10.1016/j.mam.2010.03.002. Epub.
- Srinivasan, R., Sevgan, S., Ekesi, S. & Tamò M. (2019). Biopesticide based sustainable pest management for safer production of vegetable legumes and brassicas in Asia and Africa. *Pest. Manag. Sci.* 75(9):2446-2454. 10.1002/ps.5480
- Tabor, A.E., Ali, A., Rehman, G., Rocha-García, G., Fonseca-Zangirolamo, A., Malardo, T. & Jonsson, N. (2017). Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-Host interface: A review of resistant and susceptible host responses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:506. 10.3389/fcimb.2017.00506.

- Tafúr-Gómez, G.A., Patarroyo-Salcedo, J.H., Vargas, M.I., Araújo, L., Fidelis, C.F., Prates-Patarroyo, P.A., Cortés-Vecino, J.A. & Portela, R.W. (2020). Intestinal changes and performance parameters in ticks feeding on calves immunized with subunits of immunogens against *Rhipicephalus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 80:91-107. 10.1007/s10493-019-00451-8.
- Takeo, S., Hisamori, D., Matsuda, S., Vinetz, J., Sattabongkot, J. & Tsuboi, T. (2009). Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission blocking target. *Parasitol. Int.* 58(3):243-248. 10.1016/j.parint.2009.05.002
- Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing, 3<sup>rd</sup> edition. Oxford, UK. 2080 pp.
- Titus, R.G., Bishop, J.V., Mejia & J.S. (2006). The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.* 28(4):131-141. 10.1111/j.1365-3024.2006.00807.x
- Thinnes, F.P. (1992). Evidence for extra-mitochondrial localization of the VDAC/porin channel in eucaryotic cells. *J Bioenerg Biomembr.* 24(1):71-75. 10.1007/BF00769533
- Tizard, I. (2018). *Inmunología Veterinaria*. Elsevier, pp 552.
- Varughese, J.T., Buchanan, S.K. & Pitt, A.S. (2021). The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease. *Cells*, 10(7):1737. 10.3390/cells10071737
- Vialle, R., Dupuis, L., Deville, S., Bertrand, F., Gaucheron, J. & Aucouturier, J. (2010). Microgel particulate adjuvant: Characterisation and mechanism of action. *Procedia. Vaccinol.* 2:12-16.
- Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G. & Preston, P.M. (2003). Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. *Biosciences reports*, Edinburgh.
- Wang, H. & Nuttall, P.A. (1999). Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell. Mol. Life Sci.* 56(3-4):286-295. 10.1007/s000180050430
- Weiss, B.L. & Kaufman, W.R. (2004). Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(16):5874-5879. 10.1073/pnas.0307529101
- Wharton, R.H. (1975). Resistant cattle for biological control of cattle tick. *Animal Quarantine.* 4:13-17.
- Willadsen, P. (2004). Antitick vaccines. *Parasitology.* 29, Suppl:S367-387. 10.1017/s0031182003004657.

- Willadsen, P. (2008). Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends Parasitol.* 24(4):164-167. 10.1016/j.pt.2008.01.005
- Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G.S. & Hungerford, J. (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology.* 110 Suppl:S43-S50. 10.1017/s0031182000001487
- Willadsen, P. & Kemp, D.H. (1988). Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitol Today.* 4(7):196-198.10.1016/0169-4758(88)90084-1
- Willadsen, P. & Kemp, D.H. (1989). Novel vaccination for control of the *Babesia* vector, *Boophilus microplus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83Suppl:107. 10.1016/0035-9203(89)90617-2
- Wu, X.B., Na, R.H., Wei, S.S., Zhu, J.S. & Peng, H.J. (2013). Distribution of tick-borne diseases in China. *Parasit Vectors.* 6:119. 10.1186/1756-3305-6-119
- Yamada, S., Konnai, S., Imamura, S., Ito, T., Onuma, M. & Ohashi, K. (2009). Cloning and characterization of *Rhipicephalus appendiculatus* voraxinalpha and its effect as anti-tick vaccine. *Vaccine*, 27(43): 5989–5997. 10.1016/j.vaccine.2009.07.072
- You, M. & Fujisaki, K. (2009). Vaccination effects of recombinant chitinase protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *J. Vet. Med. Sci.* 71(6):709-712. 10.1292/jvms.71.709
- You, M., Xuan, X., Tsuji, N., Kamio, T., Taylor, D., Suzuki, N. & Fujisaki, K. (2003). Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Biol. Chem.* 278(10), 8556–8563. 10.1074/jbc.M206831200

## 10. APÉNDICE

**Cuadro 8. Comparativa de la eficacia vacunal del experimento coctel respecto a un control (n=1)**

<b>Péptido evaluado</b>	<b>DT(%)</b>	<b>DW(%)</b>	<b>DO(%)</b>	<b>DF(%)</b>	<b>E(%)</b>
Coctel	19.26	-4.81	31.50	29.66	63.40
*Comparación entre el bovino 0546 respecto al control 0552					
<b>DT:</b> Efecto sobre el total de hembras repletas <b>DW:</b> Efecto sobre el peso de hembras repletas <b>DO:</b> Efecto sobre la oviposición <b>DF:</b> Efecto sobre la fertilidad <b>E:</b> Eficacia vacunal					

Figura 50. Carta de aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



Campus Juriquilla, Qro, noviembre 11, 2020.

DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO  
PROFESOR INVESTIGADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Colaborador: Aldo Pavón Rocha

Tesista: Daniel Gustavo López Díaz

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Titulo	Resolución
"Evaluación de la eficacia vacunal de VDAC, voraxina y chitinasa contra <i>Rhipicephalus microplus</i> " (80FCN2020).	APROBADO

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente,

*Oscar R. García*

Dr. Oscar Ricardo García Rubio  
Comité de Bioética  
Facultad de Ciencias Naturales