

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**“Caracterización parcial de secuencias ESTs codificantes de proteínas de superficie celular, con potencial inmunogénico, en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”.**

Trabajo de titulación en la modalidad de tesis que para obtener el título de  
Licenciado en Biología

PRESENTA

CÉSAR ALEJANDRO GUTIÉRREZ TORRES

Las Agujas, Zapopan, Jal. Octubre de 2013

El presente trabajo fue realizado en la unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, bajo la dirección del Dr. Moisés Martínez Velázquez y la asesoría de la Dra. Luz Patricia Castro Félix. Es parte de los productos de un proyecto de investigación para la educación SEP-CONACYT (Registro CB-2008/104006). César Alejandro Gutiérrez Torres contó con una beca de CONACYT de dicho proyecto para el desarrollo de la presente tesis.



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

*Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología*

**C. CÉSAR ALEJANDRO GUTIERREZ TORRES**  
**PRESENTE**

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: "Caracterización parcial de secuencias ESTs codificantes de proteínas de superficie celular, con potencial inmunogénico, en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo: **Dr. Moisés Martínez Velázquez** y como asesor a la **Dra. Luz Patricia Castro Félix**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 19 de agosto de 2013

  
DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



  
M.C. VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

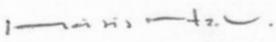
Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha  
Presidente del Comité de Titulación  
Licenciatura en Biología  
CUCBA  
Presente

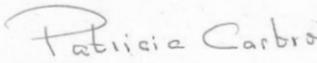
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis e informes**, opción **Tesis** con el título: "**Caracterización parcial de secuencias ESTs codificantes de proteínas de superficie celular, con potencial inmunogénico, en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***" que realizó el pasante **César Alejandro Gutiérrez Torres** con número de código **300239569** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

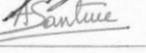
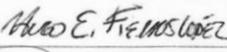
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo:

Atentamente

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal, 3 de septiembre de 2013.

  
Firma  
Dr. Moisés Martínez Velázquez  
Director del trabajo.

  
Firma  
Dra. Luz Patricia Castro Félix  
Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alfredo Ignacio Feria Velasco		4/09/2013
Dra. Anne Marguerite Hélène Santerre		3/09/2013
Dr. Hugo Eduardo Fierros López		05/SEP/2013
Supl. Dra. Luz Patricia Castro Félix		3/09/2013





OFICIO NO. DICB/C110/1301/2010

DIRECCIÓN ADJUNTA DE DESARROLLO CIENTÍFICO  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA BÁSICA



"2010, Año de la Patria.  
Bicentenario del Inicio de la Independencia  
y Centenario del Inicio de la Revolución"

México, D.F., a 13 de septiembre de 2010.

**DR. MOISÉS MARTÍNEZ VELÁZQUEZ**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO**  
**DEL ESTADO DE JALISCO**  
**P R E S E N T E**

REF\_PROY: CB-2008/104006

En respuesta a su solicitud, por este medio informo a usted que ha sido dado de alta el registro de becario con cargo a su proyecto de investigación, de acuerdo a las siguientes especificaciones:

NO. BECARIO	NOMBRE	NIVEL DE APOYO	DURACION (MESES)	MONTO MENSUAL	PERIODO DE PARTICIPACIÓN	MONTO TOTAL
15461	Gutiérrez Torres César Alejandro	1	12	3,000.00	Agosto 2010 – Julio 2011	36,000.00

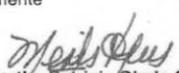
Lo anterior, en el entendido de que para dicha postulación, usted ha integrado el expediente correspondiente verificando el cumplimiento de los requisitos que se solicitan para este nivel en el "Manual para la Administración de Proyectos de Investigación" publicado en la página Web del CONACYT:  
[www.conacyt.mx/Fondos/Fondos\\_ManualAdministracionProyectos.pdf](http://www.conacyt.mx/Fondos/Fondos_ManualAdministracionProyectos.pdf).

Es importante recordarle que el cumplimiento de lo establecido en dicho Manual, es auditado por la Secretaría de la Función Pública, por lo que es indispensable que el expediente que usted mantendrá bajo resguardo, sea actualizado hasta la conclusión del apoyo otorgado.

Como responsable técnico del proyecto usted deberá registrar en los informes parcial y final, tanto técnicos como financieros, los resultados obtenidos y los montos erogados, respectivamente; enviando al final del apoyo, únicamente el oficio de notificación para la liberación del compromiso contraído por el becario, firmado por usted (Por favor **NO** envíe documentos probatorios al CONACYT). Solicitamos se sirva proporcionar una copia del presente al becario.

Sin más por el momento, queda de usted.

Atentamente

  
**Biól. Martha Patricia Ojeda Carrasco**  
Subdirectora de Control y Seguimiento de  
Proyectos de Investigación, CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
Av. Insurgentes Sur 1582, Crédito Constructor, Benito Juárez, México, D.F., 03940  
(55) 5322-7700 [www.conacyt.gob.mx](http://www.conacyt.gob.mx)

## AGRADECIMIENTOS

De manera primordial quiero agradecer a mi Papá sin él no hubiera sido posible llegar hasta este momento, gracias por enseñarme a volar y dejarme volar por mí mismo, por enseñarme a soñar y dejarme soñar a mí solo, por enseñarme a vivir y dejarme vivir, pero sobre todo muchas gracias por haber sacrificado todo y darme una profesión, te quiero mucho “Pá”.

A mi mamá, por ser siempre mi guía y mi apoyo, por inculcarme la felicidad incluso ahora que es mi ángel. Gracias mamá por estar pendiente desde el cielo de esta etapa tan importante que todavía te tocó vivirla conmigo.

A mis hermanos Karla y René que con su amor me han enseñado a salir adelante, gracias por su paciencia, gracias por preocuparse por su hermano menor, gracias por compartir sus vidas, pero sobre todo por estar en otro momento tan importante en mi vida.

A mi director de tesis, él Dr. Moisés Martínez Velázquez por haberme brindado la oportunidad de incursionar en el campo de la ciencia, gracias por su amistad y aún todavía más por haberme compartido sus conocimientos.

A mi asesora, La Dra. Patricia Castro, por la cual siempre he sentido un profundo respeto y admiración, gracias por su paciencia y gracias por haber depositado en mí esa seguridad y confianza y animarme a culminar este proyecto.

A mis sinodales, él Dr. Alfredo Feria Velasco, La Dra. Anne Marguerite Santerre, y el Mtro. Hugo Fierros López, por darme la oportunidad y por el tiempo que me han dedicado para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros y amigos de CIATEJ, Arcelia Lara, María Elena Ramírez, Lupita González Gisela Pacheco y José Miguel Flores, a todos ellos gracias por su valiosa amistad y apoyo para que este esfuerzo se volviera realidad.

A la Mtra. Magdalena Romo, quien además de ser mi tutora durante la carrera me brindó todo su apoyo y amistad, motivándome constantemente a salir a adelante.

Al Lic. Ricardo Águila Preciado, por haberme ayudado de manera desinteresada para iniciar este proyecto proporcionándome el servicio médico de seguridad social

A mis amigos “los mijis”: Olivia, Susana, Gloria y Lalo, por pasar a mi lado los momentos de la vida universitaria y estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mis compañeras y amigas de la unidad de Anatomía Patológica del H.G.Z IMSS # 46, Histotecnóloga Ana Laura Sevilla y Citotecnóloga Nayeli Hernández Mijes, por ayudarme a salir adelante en los momentos más difíciles durante esta etapa.

Por último y no al menos importante debo agradecer a Ricardo Águila Gómez al que durante los últimos años de mi vida me ha ofrecido toda su amistad, confianza, compañerismo y lealtad quien siempre está al pendiente de mí, te agradezco por toda tu ayuda, apoyo y comprensión.

Dedico este trabajo:

A la Vida por permitirme llegar a este tiempo y espacio, puesto que las condiciones no han sido nada fáciles sin embargo sí muy felices y gratificantes.

A toda aquellas personas que padecen Esclerosis Múltiple y Lupus Eritomatoso Sistémico, a los cuales quiero mencionar que este trabajo lo hice pensando en la lucha que día a día enfrentamos por salir adelante, hemos demostrado que cada momento implica un reto y que de ello depende no dejarse vencer jamás.

A la memoria de mi MADRE quién siempre de manera incondicional me demostró la FUERZA y TENACIDAD que debo tener ante los retos constantes, su amor me trajo hasta este momento.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO	4
2.1 Género <i>Rhipicephalus</i>	4
2.1.1 Clasificación taxonómica	4
2.1.2 Morfología	4
2.1.3 Distribución	5
2.1.4 Ciclo biológico	6
2.1.5 Clasificación del ciclo biológico	6
2.1.6 Fase de vida libre	6
2.1.7 Fase de vida parasitaria	7
2.1.8 Hábitos alimentarios	8
2.1.9 Vía de infestación	8
2.1.10 Longevidad	8
2.1.11 Adaptabilidad ecológica	9
2.1.12 Localización sobre el hospedero	9
2.1.13 El papel de la saliva de garrapata como vehículo de patógenos	9
2.1.14 Epidemiología	10
2.1.15 Distribución de enfermedades parasitarias	10
2.1.16 Diagnóstico	11
2.1.17 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	11
3. Métodos de control	13
3.1 Control químico	13
3.1.2 Resistencia fisiológica hacia los ixodícidias	14
3.2 Control cultural	14
3.3 Control inmunológico	16
3.3.1 Razas de bovinos resistentes	19
4. Análisis <i>in silico</i> , un proceso comúnmente referido como minería de datos a partir de recursos genómicos.	19
4.1 Recursos bioinformáticos	20
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
6. JUSTIFICACIÓN	24
7. HIPÓTESIS	25
8. OBJETIVO GENERAL	26
8.1. Objetivos particulares	26
9. MATERIALES Y MÉTODOS	27
9.1 Material biológico para el estudio	27
9.1.2 Disección de tejidos	27
9.2 Obtención de ácidos nucleicos	29
9.3 Selección de secuencias ESTs	29
9.4 Diseño de oligonucleótidos	29
9.5 Extracción de RNA total	29
9.6 Amplificación del cDNA por RT-PCR	28
9.7 Electroforesis de los productos amplificados	30

9.8 Traducción de RNAm a proteína	31
9.9 Localización de regiones transmembranales	31
9.10 Obtención de una respuesta de anticuerpos	31
9.11 Alineamiento de secuencias	31
10. RESULTADOS	32
10.1 EST-TC3327	33
10.2 EST-BEACJ17TR	36
10.3 EST-TC4791	40
10.4 EST-TC2637	43
10.5 EST-TC4495	46
11. DISCUSIÓN	53
12. CONCLUSIONES	56
13. PERSPECTIVAS	57
14. BIBLIOGRAFÍA	58

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	12
Cuadro 2. Composición de las reacciones de PCR	30
Cuadro 3. Secuencias ESTs	32
Cuadro 4. Predicción de péptidos antigénicos de la EST TC3327	34
Cuadro 5. Predicción de péptidos antigénicos de la EST BEACJ17TR	37
Cuadro 6. Predicción de péptidos antigénicos de la EST TC4791	41
Cuadro 7. Predicción de péptidos antigénicos de la EST TC2637	44
Cuadro 8. Predicción de péptidos antigénicos de la EST TC4495	48

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
Figura 2	Mecanismo de acción del antígeno Bm86	18
Figura 3	Diagrama de flujo de la metodología utilizada	28
Figura 4	Amplificación de la EST TC3327	33
Figura 5	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST TC3327	34
Figura 6	Amplificación de la EST BEACJ17TR	36
Figura 7	Secuencia tentativa de aminoácidos derivada de la EST BEACJ17TR	36
Figura 8	Predicción de la estructura de las $\alpha$ -hélices transmembranales de la secuencia EST BEACJ17TR.	37
Figura 9	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST BEACJ17TR	39
Figura 10	Amplificación de la EST TC4791	40
Figura 11	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST TC4791	42
Figura 12	Amplificación de la EST TC2637	43
Figura 13	Secuencia tentativa de aminoácidos derivada de la EST TC2637	43
Figura 14	Predicción de la estructura de las $\alpha$ -hélices transmembranales de la EST TC2637	44
Figura 15	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST TC2637	45
Figura 16	Amplificación de la EST TC4495	46
Figura 17	Secuencia tentativa de aminoácidos derivada de la EST TC4495	46
Figura 18	Predicción de la estructura del receptor putativo acoplado a proteínas G	47
Figura 19	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST TC4495	51
Figura 20	Amplificación de un fragmento del gen de actina en <i>R. microplus</i>	52

## ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µl	Microlitros
A	Alfa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	ADN complementario
CENID-PAVET	Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en parasitología Veterinaria.
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
dNTP's	Desoxinucleósidos Trifosfato
<i>et al</i>	Del latín: et alii (y otros)
EE.UU	Estados Unidos de América
EST	Expressed Sequence Tags
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GABA	Ácido Gamma Aminobutirico
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones forestales, Agrícolas y Pecuarias
Mg	Microgramo
ml	Mililitro
Min	Minuto
PAVET	Portal Virtual de Actualización Veterinaria
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	PCR con Transcripción Reversa.
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	ARN mensajero
<i>R. microplus</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
Ssp	Especie
<i>Taq pol</i>	Polimerasa <i>Thermofilus acuaticus</i>
TAE	Tris Acetato EDTA
Kb	Kilo base
V	Voltio

## RESUMEN

La garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* causa una de las parasitosis de mayor importancia para la ganadería bovina en regiones tropicales y subtropicales.

Los esfuerzos por controlar las infestaciones por garrapatas se han basado fundamentalmente en el control químico. Sin embargo, el uso continuo de acaricidas ha ocasionado la generación de cepas de garrapatas resistentes y daños al medio ambiente. El control inmunológico es una alternativa viable para disminuir las poblaciones de garrapatas, no obstante, la búsqueda y caracterización de antígenos para desarrollar nuevas vacunas o mejorar las ya existentes es un reto vigente. El análisis *in silico* es una expresión que significa “hecho por computadora o vía simulación computacional”, lo cual nos permite realizar predicciones para la identificación racional de las proteínas que pudieran estar localizadas en la superficie celular de los diferentes tejidos expuestos al sistema inmune y así minimizar los ensayos de prueba y error en el diseño de una vacuna subunitaria. En el presente trabajo, mediante el análisis *in silico* se caracterizaron parcialmente cinco secuencias ESTs de *R. microplus*: TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495, que codifican tentativamente para proteínas de superficie celular, como son los receptores para GABA-A, GABA-B, un canal de cloro modulado por glutamato y un receptor de octopamina. Por medio de RT-PCR se estudió su expresión en fase de huevo de 8 y 24 días así como en los tejidos adultos, intestino y ovarios de *R. microplus*. Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó el programa Primer 3, la traducción de la secuencia de RNA mensajero a proteína se realizó con la herramienta Translate, la localización de las regiones transmembranales se llevó a cabo con el programa TMHMM, la predicción de segmentos con potencial antigénico dentro de la secuencia de una proteína se realizó con el programa “Predicted Antigenic Peptides” y también se estableció el grado de similitud con otras secuencias génicas de diferentes especies.

Con este estudio se ha demostrado que el enfoque de generación y caracterización de ESTs, ante la falta de proyectos de secuenciación de genomas de especies de interés como *R. microplus*, es una poderosa herramienta que genera información genómica de una especie en un tiempo razonable.

## 1. INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina es de gran importancia como productora de alimentos de alta calidad nutritiva. Convierte en leche y carne las plantas y subproductos agrícolas e industriales que no son usados directamente por el hombre (Román, 2005). Sin embargo, la producción bovina es afectada por problemas causados por plagas y enfermedades. La garrapata constituye el complejo de especies de ectoparásitos más importantes de la ganadería mundial (Davey *et al.*, 1997).

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta y se han especializado en alimentarse de sangre de mamíferos, aves y reptiles (Castro y Wright, 2007). Se distribuyen de manera importante en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Keirans *et al.*, 1996). La adaptación evolutiva de las garrapatas a la hematofagia es la principal razón por la que producen grandes pérdidas económicas; sin embargo, el mayor impacto de las infestaciones por garrapatas sobre los animales y el hombre es a través de los patógenos que ellas transmiten. Las garrapatas se consideran responsables de más de 100,000 casos de enfermedades en humanos y animales silvestres y domésticos, y son los vectores más importantes de patógenos causantes de enfermedades. A nivel mundial, son los segundos vectores de enfermedades en humanos, después de los mosquitos (De la Fuente *et al.*, 2008).

Las garrapatas que integran las familias Argasidae e Ixodidae son de gran importancia en el ámbito de la salud humana y animal, porque actúan como reservorios de organismos patógenos que incluyen importantes géneros de protozoarios (*Babesia spp* y *Theileria spp*), bacterias (*Rickettsia spp*, *Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp*), virus (*Nairovirus*, *Flavivirus* y *Asfavirus*) y nemátodos (*Acanthocheilonema*) (De la Fuente *et al.*, 2008).

La especie *Rhipicephalus microplus* (anteriormente conocida como *Boophilus microplus*), denominada la “garrapata común del ganado” es la que más impacta sobre el ganado vacuno (Angus, 1996). Asimismo, la garrapata provoca diversos daños a los animales que ataca, pues causa escoriaciones en la piel, abortos, anemia (Yeruham *et al.*, 1998) y una reducción considerable en la producción.

Los últimos treinta años se han caracterizado por el desarrollo y aplicación en distintas áreas ecológicas del mundo, de numerosas estrategias de control para *R. microplus*, que han incluido la quema controlada de potreros, el control biológico utilizando parasitoides, hongos o nemátodos, y el control químico con acaricidas,

aplicados ya sea en forma tópica o sistémica (Nolan y Schnitzerling,1986). La mayoría de ellas mostraron ser altamente eficaces, prácticas y económicas para el control de parásitos, pero incapaces de prevenir y/o controlar el constante desarrollo de resistencia a los parasiticidas (Schillhorn van Veen, 1997).

En México, existen antecedentes que se remontan a la segunda década del siglo pasado, donde se señala la preocupación del sector pecuario por los daños ocasionados por la garrapata, la cual se tradujo en acciones aisladas de lucha, desarrolladas por algunos estados de la República, tales como Sonora y Tabasco. En el estado de Sonora se inició un programa de manejo de ganado en 2.5 millones de hectáreas y gracias a él, se establecieron las técnicas características esenciales para el control de la garrapata, conservadas hasta la fecha.

La investigación acerca de la generación de vacunas en contra de garrapatas en México apenas comienza y no ha habido continuidad en su estudio para lograr una vacuna de origen nacional (Cruz, 1995), y el impacto de las de origen extranjero no se ha reflejado a un nivel comercial, además de existir el inconveniente de que no son polivalentes (Cruz, 1995). En su momento, cuando la inmunización contra garrapatas haya adquirido el nivel de avance y de accesibilidad necesarios para el productor, será un elemento más de mucho valor en el control integral de la infestación por este organismo. Además, la posible combinación de varios inmunógenos provenientes de garrapatas de varios géneros, es un elemento que esperan ser experimentado, analizado y probado a nivel de campo (Redondo *et al.*, 1999).

La complejidad del genoma de la garrapata hace aconsejable, como primera aproximación, no abordar el estudio del genoma completo. Es preferible estudiar sólo una fracción del mismo, es decir aquellos genes que se están expresando en un momento determinado de la biología del organismo. Para ello se obtienen poblaciones de cDNAs que se secuencian de forma masiva para generar miles de secuencias parciales o ESTs (Expressed Sequence Tags). Estas secuencias cortas suelen ser suficientes para la identificación de los genes mediante comparación con las secuencias existentes en las bases de datos públicas (ej. Genbank, EMBL) y para ello se utilizan poderosos programas de análisis informático. Si la información que contiene la secuencia parcial no es suficiente, habría que determinar la estructura de los cDNAs completos para estudiar su función por otros métodos. La obtención de bancos de ESTs de diferentes tejidos, en diferentes situaciones fisiológicas conduciría al descubrimiento sucesivo de nuevos genes, hasta elaborar un catálogo de la mayoría de los que se expresan en un ser vivo. Esta gran cantidad de información, que con la ayuda de la informática (análisis *in silico*) ha contribuido a la búsqueda de genes de interés, es

un proceso comúnmente referido como minería de datos a partir de recursos genómicos. El uso reciente de estas nuevas herramientas genómicas y los enfoques de genética reversa, son una extraordinaria herramienta que podría ayudar en la caracterización de nuevos genes de interés diagnóstico o inmunoproláctico, lo cual contribuye a conocer más a fondo la biología de la garrapata y al mejoramiento de las estrategias de su control (Rosario-Cruz *et al.*, 2010).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Género *Rhipicephalus*

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica

Las garrapatas son un grupo de artrópodos que incluye cerca de 825 especies divididas en tres familias: la Ixodidae, la Argasidae (garrapatas blandas) y la Nuttalliellidae (klompen *et al.*, 2000). La familia Ixodidae contiene alrededor de 650 especies, con cuatro subfamilias y trece géneros; la familia Argasidae comprende cinco géneros y alrededor de 170 especies; por su parte, la familia Nuttalliellidae, que vive en África, comprende una sola especie relativamente incipiente, la *Nuttalliella namaque* (Hoogstraal, 1978). El género *Rhipicephalus* pertenece a la familia Ixodidae.

La inclusión de *Boophilus spp* como un subgénero de *Rhipicephalus* ha generado desacuerdo entre los científicos, y hay quienes consideran que *Boophilus spp* debe mantenerse como un género separado; se postula que debe aplicarse un enfoque polifásico como argumento principal para modificar la ubicación taxonómica de este género de garrapatas (Uilenberg y Goff, 2006), ya que este tipo de enfoque taxonómico justifica ampliamente mantener a *Boophilus* como un género separado, pero a la vez, sostiene tener una estrecha cercanía filogenética con *Rhipicephalus*.

Quienes defienden la inclusión argumentan que el nombre de *Boophilus* puede ser utilizado y reconocido para las cinco especies incluidas en este género. Por lo tanto, la sinonimia de *Boophilus* con *Rhipicephalus* no da lugar a la pérdida de *Boophilus* (Barker y Murrell, 2004). Sin embargo, esta propuesta se basa en pequeñas partes del genoma, por lo que es necesario considerar un enfoque polifásico para obtener árboles filogenéticos que representen de una mejor manera las diferencias y similitudes de ambos géneros, ya que las diferencias tanto morfológicas como biológicas (ciclo de vida), son evidentes. Además, existen evidencias de que las cepas australianas poseen características biológicas que las hacen diferentes de las cepas americanas y africanas (Labruna *et al.*, 2009).

#### 2.1.2 Morfología

Las garrapatas tienen morfología diferenciada entre familias, géneros y especies, pero también entre las fases de su ciclo de vida, es decir, durante la fase larvaria presentan tres pares de patas, como los insectos; en cambio, en las fases de ninfa y adulta poseen cuatro pares de patas que las distinguen de los insectos (Cupp, 1991). El género *Rhipicephalus* forma parte de la familia Ixodidae, compuesta por

garrapatas duras, que se caracterizan por tener un escudo dorsal y no pueden sobrevivir por largo tiempo sin un ambiente adecuado. Además, las garrapatas Ixodidae son de forma oval, aplanadas dorsoventralmente en estado de ayuno y globosas cuando están repletas, con dimensiones que van desde 1mm hasta 12 mm de longitud y con una variación en su color, de amarillento a café oscuro. Las garrapatas duras repletas presentan un límite en el tamaño, para el caso de los machos, pero no para el caso de las hembras.

Estos ácaros presentan dos partes diferenciales visibles: el tronco globoso y las extremidades articuladas. La parte anterior, no es cabeza propiamente dicha, ya que el cuerpo de la garrapata es una sola masa; tienen un conjunto de pies móviles que forman el gnathosoma y una base que mide 4 mm de largo por 0.9 mm de ancho; por encima de éste, se observan dos depresiones llamadas áreas porosas, de las cuales sobresalen dos ganchos denominados quelíceros que ayudan a romper la piel del hospedero (Beati y Keirans, 2001).

Por debajo de los quelíceros, que aparecen en número par, en forma de hoz y los ocelos a los lados, se observa una prolongación de la base del gnathosoma llamado hipostoma; presenta una fórmula dentaria de 3/3, 4/4 que facilita la acción de perforar la piel del hospedero y, además, participa como órgano de fijación. El hipostoma consta de un par de pedipalpos, cada uno conformado por cuatro artejos y desempeña dos funciones: una, ayuda a proteger las partes suaves de la boca y, la otra, funciona como órgano sensorial (Voltzit, 1996).

Enseguida aparecen las extremidades con seis artejos: coxa, trocánter, fémur, tibia, pretarso y tarso. Es necesario señalar que los adultos y las ninfas poseen estigmas y se sitúan en el último par de coxas, mientras que las larvas carecen de ellas; además presentan dimorfismo sexual, el macho es de menor tamaño que la hembra. Cada extremidad mide en promedio, de 10 a 12 mm en las hembras y de 3 a 4 mm en los machos. La parte posterior del ácaro se denomina propodosoma (Cupp, 1991).

El sistema de protección o cutícula posee tres capas: epicutícula, mesocutícula y endocutícula; en ella se aprecian poros, canales o espiráculos. La primera capa contiene lípidos, sustentos cementantes, cuticulina y polifenol que cumplen la importante función de protección contra la desecación. Este sistema de protección tiene la particularidad de sufrir elongaciones de hasta 20 veces su tamaño original cuando el animal está repleto de sangre (Spickett, 1994).

### **2.1.3 Distribución**

Las garrapatas se encuentran distribuidas en todo el mundo, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales (Davey *et al.*, 1997). En Oceanía que es el

continente menor, se encuentra Australia, país que tiene muchos años en el control de la garrapata en sus diversas modalidades y alternativas (Klompen *et al.*, 2000).

El género *Rhipicephalus* se encuentra en México, Australia, Centro y Oeste de África, Sudán, el Mediterráneo y Sudamérica. Se reporta a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus appendiculatus* y *Amblyomma hebraeum* como especies importantes en América, Asia y África (Crampton *et al.*, 1998).

#### **2.1.4 Ciclo biológico**

El ciclo biológico del género *Rhipicephalus* ocurre entre el hospedero, la vegetación y el suelo de un sitio específico; comprende cuatro estadios biológicos: huevo, larva, ninfa y adulta (Figura 1). Este grupo de garrapatas oviposita de 2,000 a 3,000 huevos, aunque otros géneros pueden depositar hasta 20,000 (Krober y Guerin, 2000). La incubación de los huevos ocurre en un periodo de 17 a 21 días, si las condiciones ambientales son favorables (Cupp, 1991; Kaufman y Lomas, 1996). Si las condiciones le favorecen, la garrapata puede completar su ciclo de vida en 37 días, pero en la adversidad puede hacerlo hasta en 281 días (Garris, 1991).

#### **2.1.5 Clasificación del ciclo biológico**

El ciclo del género *Rhipicephalus* es directo está dividido en dos fases: de vida libre y de vida parasitaria.

#### **2.1.6 Fase de vida libre**

También conocida como fase no parasitaria, se inicia con el desprendimiento de la hembra repleta después de alimentarse en el hospedero. La garrapata repleta busca lugares húmedos y cálidos para depositar sus huevos. Se observa un periodo entre el desprendimiento y el inicio de la ovoposición llamado tiempo de pre-ovoposición, fase que dura de 2 a 4 días en condiciones favorables (humedad relativa al 80% y temperatura de 28-30°C, en laboratorio) prolongándose hasta 97 días en los meses de clima frío. Se continúa la ovoposición o puesta de huevos, que varía de 4 a 60 días dependiendo de la influencia de los factores ambientales; en laboratorio se observa un promedio de 20 días, con una media de tres mil huevos por garrapata y un rango de 1,400 a 5,000. El inicio de la eclosión de las larvas o tiempo mínimo de incubación tarda de 14 a 68 días, las larvas poco tiempo después trepan al pasto y llegan al extremo superior del mismo. Este geotropismo negativo es indicativo para considerar a la larva como infestante. En este momento la larva espera la llegada del hospedero, quien es detectado mediante quimiorreceptores, los que entre varias funciones pueden percibir el

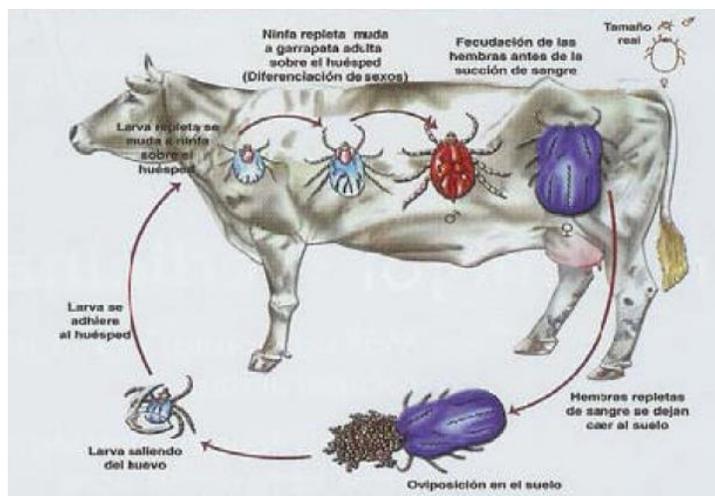
bióxido de carbono expelido por el vertebrado. En el pasto la larva se mantiene en el lado sombreado de la hoja y se va moviendo conforme el día avanza con el fin de mantenerse protegida de los rayos directos del sol.

El amplio rango de la fase de vida libre se debe sobre todo a la temperatura y humedad; así, puede acortarse a 20 días en condiciones muy favorables o prolongarse hasta 299 días en condiciones de frío extremo. Se ha informado de larvas que sobreviven hasta 286 días como larvas de vida libre sin alimentarse.

### **2.1.7 Fase de vida parasitaria**

Se inicia cuando la larva se sube y fija a la piel del hospedero, se alimenta de líquidos tisulares, se repleta y presenta una disminución gradual de los movimientos de las extremidades hasta la total inmovilidad, en este momento se inicia la etapa quiescente o primera muda, la cual se denomina metalarva, estado con doble cutícula del que una vez producida la ecdisis se obtiene una ninfa, que fija su hipostoma a la piel del mismo animal, se alimenta de sangre hasta repletarse y paulatinamente reduce sus movimientos generando una segunda muda y metaninfa, para después de la ecdisis dar origen a hembras jóvenes, que se alimentan. Generalmente la hembra emite una o varias feromonas que atraen al macho para aumentar el apareamiento, esencial para que las hembras se repletan de sangre, lo que generalmente ocurre en las últimas 24 horas de infestación y se desprenden del hospedero para iniciar en el suelo un nuevo ciclo. El macho no se repleta de sangre, sino que come y se aparea para después de comer, buscar una nueva hembra para la reproducción, en forma sucesiva hasta su muerte.

La fase parasitaria es poco variable, observándose hembras repletas generalmente a los 21 días, aunque éstas se pueden observar desde el día 19 después de la infestación, mientras, entre los 22 a 26 días, es el periodo en que se desprende el mayor número de hembras repletas. En resumen, el ciclo biológico completo, que comprende la fase de vida libre y la fase parasitaria puede completarse entre los 40 y 300 días.



**Figura 1.** Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Imagen tomada de [http://www.ampave.org/archivos%20apoyo/Manual\\_tecnico.pdf](http://www.ampave.org/archivos%20apoyo/Manual_tecnico.pdf) Último acceso 28/02/2013

### 2.1.8 Hábitos alimentarios

Las garrapatas son parásitos obligados, ya que la sangre es indispensable para su desarrollo. Durante la alimentación inyectan secreciones salivales en la herida y particularmente en este momento secretan productos que pueden contener organismos patógenos que pueden penetrar dentro del animal por el agujero producido por la mordida (Balashov, 1972). La saliva posee agentes bloqueadores de la histamina, anticoagulantes y citolisinas, que producen y aumentan el tamaño de la lesión, lo cual permite la salida permanente de la sangre, así como mediadores vasoactivos tales como las prostaglandinas que favorecen la permeabilidad capilar y toxinas que causan parálisis del animal infestado (Sutherst, 1989).

### 2.1.9 Vía de infestación

Siempre es directa, las garrapatas necesitan entrar en contacto con el hospedero para poder alcanzarlo (Drugueri, 2004).

### 2.1.10 Longevidad

Muchas especies de garrapatas son capaces de vivir largos periodos de tiempo sin alimentación y sin agua. Las ninfas por lo general viven más que las larvas (Sutherst, 1989). La humedad es un factor determinante en la longevidad de las garrapatas Ixodidae. Su ausencia total es altamente destructiva, mientras que demasiada humedad, particularmente después de un largo periodo de ayuno, permite el crecimiento de hongos, lo que resulta fatal (Sutherst, 1989).

### **2.1.11 Adaptabilidad ecológica**

Las condiciones óptimas para fomentar el desarrollo de varias generaciones de garrapatas por años son las zonas ecológicas donde llueve regularmente, imperando una alta humedad y clima cálido. En regiones subtropicales, marcadas por temporadas de más o menos lluvias o sequías, la intensidad de la plaga es fluctuante (Roush y Mckenzie, 1987).

La subsistencia de las garrapatas en sus diversos estadios de evolución (huevo, larva, ninfa, adulto), está determinada por factores climatológicos como lluvias, sequías, altitud, heladas, temperaturas medias nocturnas y diurnas, tipo de vegetación, así como por la cantidad de animales a disposición; la temperatura más adecuada es de 26-27°C, la humedad relativa >80% y el tipo de vegetación espesa (Quiroz, 1999; Martínez, 2002).

En la fase parasitaria las condiciones ambientales las crea la humedad y el calor corporal del bovino (Martínez, 2002).

### **2.1.12 Localización sobre el hospedero**

La localización de la garrapata sobre el hospedero depende especialmente del género; en el ganado bovino, *Rhipicephalus* es el género más frecuente, se distribuye por todo el animal haciéndose más notoria la infestación en las orejas, tabla del cuello, región pectoral, axilas, base de la cola y región del perineo en todos sus estadios parasitarios (Grupo latino, 2004) y parte interna del muslo, (Roush y Mckenzie, 1987).

### **2.1.13 El papel de la saliva de garrapata como vehículo de patógenos**

Las secreciones de las glándulas salivales facilitan la alimentación de las garrapatas y representan un importante vehículo para la transmisión de patógenos (Ribeiro, 1987). Dichas glándulas están compuestas de células epiteliales que juegan un papel importante en el balance de agua y la eliminación del exceso de ella durante la alimentación; asimismo para tomar vapor de agua atmosférico en periodos de letargo (Munderloh *et al.*, 1996; Parmar *et al.*, 1996).

Durante la alimentación a base de sangre y fluidos de los tejidos, las garrapatas penetran la piel y se anclan firmemente con sus quelíceros en la epidermis del hospedero; esta fijación causa daños en células dérmicas, además de que se secretan enzimas inhibitoras de la coagulación, para succionar enseguida la sangre. Los componentes bioactivos de la saliva actúan como inmunosupresores, analgésicos y anticoagulantes que facilitan el proceso de alimentación (Ribeiro, 1987).

La función de las proteasas en la relación hospedero/parásito, es objeto de estudios frecuentes en los últimos años. En general, participan en la catálisis de importantes reacciones biológicas, tales como el metabolismo proteico, la remodelación tisular, el procesamiento de prohormonas, la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y las reacciones inmunes (Pinto *et al.*, 1997); asimismo en el establecimiento de la infección parasitaria, ya que facilitan la invasión de tejidos del hospedero y permiten la digestión de sus proteínas, con lo que ayudan a los parásitos a evadir la respuesta inmune y previenen la coagulación sanguínea. En síntesis, las enzimas proteolíticas de la garrapata pueden ser el blanco de acción de los acaricidas sistémicos o de anticuerpos (Vaz *et al.*, 1996).

#### **2.1.14 Epidemiología**

Las parasitosis ocasionadas por la garrapata sobre los hospederos que ataca, provoca entre otras cosas disminución en la albúmina, bajo índice de hematocrito, aumento de linfocitos y eosinófilos, disminución de neutrófilos e inhibición de la síntesis proteica (Munderloh *et al.*, 1996); todo ello repercute en un bajo desarrollo muscular, afectación del sistema enzimático y alteración en la producción de progesterona (Munderloh y Timothy, 1995; Hoogstraal, 1977). También se ha identificado retardo en la llegada a la madurez sexual, mayores intervalos entre partos y disminución en la eficiencia de la producción (Marín, 2004).

Independientemente de que los animales atacados por la garrapata sean o no infectados con los patógenos que transmite la misma, éstos pueden morir de una severa anemia, ya que cada una de las garrapatas que se adhieren a la piel del hospedero succiona de 0.5 a 2.0 ml de sangre (Horak *et al.*, 1995).

Entre los patógenos que transmite la garrapata, se encuentran los protozoarios *Theileria parva* y *Theileria annulata* que causan la fiebre de la costa del este (ECE) (Xianxu y Wenshun, 1997). Por otra parte, anaplasmosis y babesiosis (piroplasmosis) son las enfermedades hemoparasitarias más frecuentes en las regiones enzoóticas de los cinco continentes (Samish *et al.*, 1993; Ohta *et al.*, 1995), y donde *R. microplus* es el ectoparásito más activo en el mundo (Bruning, 1996). *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale* son rickettsias transmitidas por garrapatas que invaden y se multiplican en los eritrocitos y producen la anaplasmosis. *Babesia bovis*, *B. ovis* y *B. bigemina* son los agentes causales de la piroplasmosis o babesiosis de diferentes especies animales (Bruning, 1996).

#### **2.1.15 Distribución de enfermedades parasitarias**

En Estados Unidos de América el 25% del ganado lechero contrajo Leucosis Bovina Enzoótica (BLV), enfermedad altamente contagiosa y cuyo agente causal es un retrovirus y se ha demostrado que los vectores más comunes de esta

enfermedad son *R. microplus*, *R. appendiculatus* y *Amblyomma hebraeum*. También se indica que BLV es común en algunos hatos lecheros en el sur de África (Bram, 1994), y además, que el ganado silvestre es un reservorio natural del virus que sirve como fuente inmediata para el ganado susceptible (Kollars, 1996).

La enfermedad de Lyme o borreliosis, causada por la bacteria *Borrelia burgdorferi*, se presenta especialmente en Europa y América del Norte, así como en las regiones templadas, húmedas y bosques del Hemisferio Norte (Guarente, 1997; Brown y Lane, 1992). Originalmente en EE.UU fueron descubiertos tres focos principales de ataque y más tarde un foco secundario; se observó que la progresión de la epizootia fue rápida, pues 11 estados fueron sero positivos en 1980, 21 en 1984 y 49 en 1994 (Oliver, 1996).

En América la garrapata constituye un fuerte problema desde el Norte hasta el Sur; la borreliosis parece ser una enfermedad principalmente de los países industrializados, y la babesiosis parece ser de los países pobres (Oliver, 1996). En suma, las garrapatas, además de la anaplasmosis y la babesiosis (Yeruhan *et al.*, 1998), también transmiten otras enfermedades, tales como theileriosis, cowdrosis (Yunker, 1996), eperythrozooniasis, encefalitis (Stephenson, 1995; Aeschlimann *et al.*, 1989), toxoplasmosis, schistosomiasis, dermatophilosis (Uilenberg, 1996), erlichiosis y trichonosomiasis (Johnson *et al.*, 1997), entre otras.

En México se tienen dos géneros de garrapatas asociados con ganado bovino, entre los que destacan *Rhipicephalus* y *Amblyomma*. Se encuentran diseminadas en la mayor parte del territorio nacional (Hoffman y López-Campos, 2000); estas especies afectan animales en las regiones tropicales y subtropicales del país y del mundo (FAO, 1996) y constituyen los parásitos más importantes en la ganadería mexicana (Hoffman y López-Campos, 2000).

#### **2.1.16 Diagnóstico**

Tradicionalmente se ha realizado mediante la observación directa de los parásitos sobre los animales en lugares preferidos de fijación, como orejas, cara, cuello, dorso, pliegues de la región perineal y patas (Cordero y Lombardero, 1999).

#### **2.1.17 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

En la ganadería bovina, una de las especies que causa mayores pérdidas económicas es la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887). En el cuadro 1 se muestra su clasificación taxonómica.

**Cuadro 1.** Taxonomía de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Drugueri, 2004)

Phylum	Artropoda
Clase	Arachnida
Orden	Acarina
Superfamilia	Ixodoidea
Familia	Ixodidae
Género	<i>Rhipicephalus</i>
Subgénero	<i>Boophilus</i>
Especie	<i>microplus</i>

*R. microplus* presenta espina caudal por el dorso, que puede observarse desde el vientre. La coxa 1, presenta dos espolones en forma de triángulo: el interno es más ancho y largo que el externo. Las coxas II y III presentan dos espolones de borde redondeado y una escotadura profunda. Las placas adanales presentan en su borde posterior una escotadura, de donde se origina una espina hacia el extremo interno. Las placas accesorias son agudas en su borde posterior y dejan visible la espina caudal. Se puede señalar que entre la hembra y el macho existe diferencia en la coxa I, ya que en la hembra es casi tan larga como ancha y los espolones son redondos. Por otra parte la coxa IV puede poseer un pequeño espolón o carecer de él (Cupp, 1991).

En el ciclo biológico de *R. microplus* la etapa de huevo comprende un periodo de incubación de 17 a 21 días (Kaufman y Lomas, 1996). De una fase a otra se lleva a cabo el proceso de ecdisis o desprendimiento del exoesqueleto. La fase parasitaria se inicia en el suelo (larva), luego trepa a las plantas más cercanas y más tarde al hospedero animal, en donde se convierte en ninfa. Tanto en los animales como en el suelo, la garrapata está sujeta a cambios ambientales. El macho adulto se deja caer del hospedero una vez que realiza la cópula, mientras que la hembra se desprende sólo hasta repletar.

*R. microplus* se encuentra en forma endémica en nuestro país y causa daños directos debido a la acción de las picaduras (Buckzen y Bartozick, 2006), además de daños indirectos ocasionados por la transmisión de tres agentes etiológicos: *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* (Jonsson *et al.*, 2008). La garrapata provoca escoriaciones en la piel, abortos, anemia (Yeruhan *et al.*, 1998) y una reducción considerable en la producción de carne y leche (Dreyer *et al.*, 1997). Se calcula que aproximadamente un billón de bovinos en el mundo se encuentran en riesgo de ser afectados por ésta y otras especies de garrapatas, y de las enfermedades que transmiten, lo cual causa pérdidas significativas en la producción (Estrada-Peña *et al.*, 2006).

Los porcentajes de supervivencia de los estadios parasitarios en *R. microplus*, de larva a adulto representa solo el 1-2% en bovinos cebú, del 2-6% en crucea cebú X europeo y de 10-20% en bovinos europeos. En condiciones de menor resistencia, estrés nutricional y etapa de lactancia, estos porcentajes se ven incrementados a más del doble.

### **3. Métodos de control**

Se han desarrollado diversas estrategias para el control de las garrapatas, entre las cuales se pueden citar el uso de productos químicos (Davey y George, 1999; Gosh y Nanda, 1997), agentes biológicos vivos (Kalsbeek, *et al.*, 1995; Kaaya y Hassan, 2000), materiales genéticos (Meltzer, 1996), depredadores naturales (Dreyer *et al.*, 1997), agentes biológicos atenuados (vacunas) (Morrison, 1996) y la rotación de potreros manejados en forma integral (Lawrence *et al.*, 1996). Aunque se afirma que no existe una sola alternativa viable por sí sola, todas ellas tienen algo que aportar.

El conocimiento de las fases de desarrollo de las garrapatas, tanto aquellas que evolucionan sobre el animal, como las que sobreviven en el ambiente fuera del hospedero, y la relación de éstas con las condiciones ambientales, es primordial para tomar medidas y decisiones para su control (Hernández, 2000).

#### **3.1 Control químico**

El control químico de la garrapata *R. microplus* se ha efectuado con productos de la familia de los carbamatos, organoclorados, organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS), amidinas, inhibidores de la regulación del crecimiento (IGR), ivermectinas y recientemente las fenilpirazolonas. La secuencia en su utilización ha sido histórica, dependiendo entre otras cosas, del desarrollo de resistencia a las diferentes familias; por otro lado la eficacia y persistencia han sido variables, aumentando esta última debido al mejoramiento tecnológico en los acaricidas.

Entre los problemas más importantes a los que se ha enfrentado el combate químico de la garrapata *R. microplus*, se encuentra el desarrollo de resistencia a los ixodicidas, como ha ocurrido en casi todos los países en donde se han usado por largos periodos (Georghius, 1983). Generalmente los ixodicidas causan alteraciones en las garrapatas que conducen, a través del proceso de selección, a una adaptación que les permite sobrevivir a las nuevas condiciones artificiales impuestas. Este fenómeno ha sido denominado en términos mundialmente aceptados como “resistencia” y se define como la capacidad adquirida por la fracción poblacional de una especie parásita que le permite sobrevivir a concentraciones de algunos productos que son capaces de eliminar al resto de la

población normal; esta capacidad es transmitida a la siguiente generación (Woodham *et al.*, 1983).

### **3.1.2 Resistencia fisiológica hacia los ixodicidas**

La resistencia de las garrapatas hacia los ixodicidas ocurre en todas o casi todas las áreas en donde el ganado ha sido tratado con estos productos para el control de los ectoparásitos. En México, la resistencia de la garrapata *R. microplus* hacia los ixodicidas organofosforados se detectó entre 1981 y 1985 en las Huastecas Veracruzana, Hidalguense y Potosina (Aguirre *et al.*, 2000), por lo cual las autoridades de salud animal en el país permitieron a partir de 1985 el registro y el uso de piretroides y amitraz, nuevas familias químicas de ixodicidas. Para 1993, después de 8 años de uso continuo y sistemático con piretroides, se detectaron los primeros casos de resistencia a organofosforados y piretroides en los estados de Tabasco, San Luis Potosí, Veracruz y Chiapas, confirmando que el problema se encontraba difundido en áreas de alto riesgo (Ortiz *et al.*, 1995).

Las garrapatas modifican sus procesos bioquímicos a fin de dejar a un lado los efectos tóxicos del insecticida y de sus metabolitos. Algunas poseen una deshidroclorinasa que degrada el ixodicida haciéndolo inocuo. En otros casos hay una absorción más rápida y un metabolismo más acelerado del insecticida que en las garrapatas susceptibles. La resistencia a los productos organofosforados la adquieren al detoxificarse utilizando fosfatasas y carboxiesterasas (Balladares, 1983).

El problema de resistencia de las garrapatas a los ixodicidas ha motivado el interés por el desarrollo de vacunas contra las mismas, como una alternativa para evitar la infestación y a la vez bloquear la transmisión de patógenos causantes de enfermedades.

### **3.2 Control cultural**

Este tipo de control se ubica fuera del hospedero y está estrechamente relacionado con las prácticas culturales de los cultivos, que en el caso de la ganadería son las prácticas relacionadas con el mantenimiento de potreros e involucra actividades tales como: quema controlada, inundación, remoción de maleza y subsuelo, descanso y rotación de potreros y modificación o manipulación del hábitat. Estas actividades afectan adversamente el desarrollo de las garrapatas por el efecto que producen sobre el micro y el mesoclima, lo que ocasiona desbalances en el micro hábitat de *R. microplus* y por ende un efecto negativo en su dinámica poblacional (Pareja, 1992). Su mayor efecto es sobre la fase de vida libre y su valor radica en que es un método de lucha limpio y

completamente ecológico (Barre, 1988), por lo tanto, brinda apoyo a la sustentabilidad de la ganadería del país.

El control cultural es una alternativa que ha sido un componente esencial en el manejo integral de plagas en las áreas agrícola y pecuaria en otros países (Pareja, 1992). La utilización de este tipo de control para la regulación de las poblaciones de garrapata ha sido ampliamente discutida y comprobada; en la actualidad su uso es ya común en algunas partes del mundo. En lugares donde se ha tratado de controlar a la garrapata *A. americanum*, que por ser una garrapata de tres hospederos es más difícil de controlar, se ha utilizado la remoción de la maleza, el corte de la capa superior de la vegetación como el follaje de las copas de los árboles y de la vegetación alta y se ha demostrado que el segado de la vegetación de esta forma reduce la densidad de las garrapatas de esta especie de un 50 a un 80% por hectárea (Brown *et al.*, 2006). Esta práctica podría ser utilizada para el control de *A. cajennense*, una garrapata muy abundante en medios silvestres de regiones tropicales y subtropicales de nuestro país (Solís, 1991). Se ha observado que la aplicación de herbicidas en la vegetación folia baja es menos efectiva que la limpieza mecánica para el control de la garrapata, y es más efectiva solo para la etapa de larva (Wilkinson, 1977).

En la rotación y descanso de potreros, el fundamento es presionar a las garrapatas en su etapa de vida libre, al impedir o retardar que como larvas activas encuentren a su hospedero, para que mueran por hambre y deshidratación (Wilkinson y Wilson, 1958). El sistema de rotación de potreros requiere del descanso obligado de las pasturas por espacios de tiempo que varían de acuerdo al lugar, índice de agostadero y cantidad de garrapatas pero, por lo general, no va más allá de tres meses (Wilkinson, 1957). Sin embargo, en la práctica se presenta cierta resistencia a utilizar este método por considerar que hay una pérdida de pastura. Si bien esto puede ser cierto, conviene evaluar entonces los costos entre mantener unos potreros altamente infestados de garrapatas y otros mantenidos en un nivel tolerable y conveniente. Al programar estratégicamente las actividades de pastoreo del hato de manera precisa y adecuada en un determinado lugar, tal pérdida se podría reducir a un mínimo. Es importante señalar que el empleo de rotación y descanso de potreros es efectivo principalmente contra garrapatas de un solo hospedero, en este caso *R. microplus*, que por ser de ciclo directo no busca otros hospederos alternos al hospedero natural, a menos que se encuentre muy presionada. Sin embargo, puede afectar a otras especies que estén presentes en su etapa de larvas activas en busca de hospedero y no tan selectivas en cuanto a ello como *Amblyomma spp*, así como a otros parásitos que se encuentran en el pastizal y que requieran a un hospedero bovino para completar su ciclo biológico (Waller, 1999). Además, es un método que reduce el

riesgo de desarrollo de resistencia a los ixodíctidos, debido a que usando potreros limpios se espacia más el uso de esta clase de plaguicidas.

### 3.3 Control inmunológico

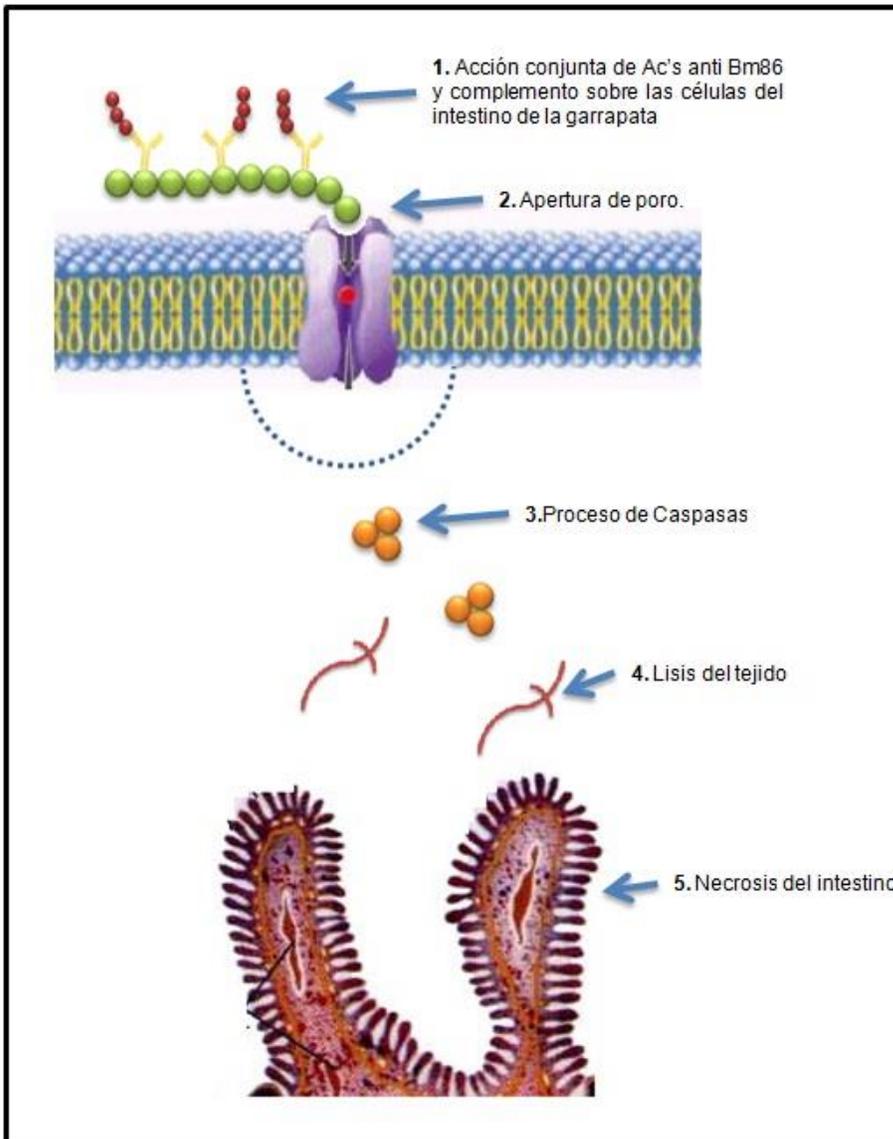
La inmunidad artificialmente adquirida, como una alternativa en el control de la infestación por garrapatas en los animales domésticos, especialmente en el ganado bovino, ha recibido particular atención en los últimos tiempos debido a las ventajas que su uso puede ofrecer (Cruz, 1995). Las ventajas de las vacunas son que tienen efectos de larga duración, no presentan problemas de residualidad en animales ni de contaminación ambiental, tienen menor probabilidad de generar resistencia y tienen la capacidad de actuar sobre blancos muy específicos (Pruett, 1999).

Las garrapatas, a diferencia de otros ectoparásitos, se alimentan de sangre lentamente, y se mantienen adheridas al hospedero por varios días; esto las pone en contacto con moléculas de la respuesta inmune, ya que se produce una asociación entre el epitelio intestinal de la garrapata y los anticuerpos del hospedero (Willadsen, 2001). La larva de la garrapata se fija en la piel a través de su aparato bucal; en estos sitios, las glándulas salivales secretan sustancias activas como enzimas digestivas e inhibidores de la coagulación, que aseguran una relación inmunológica favorable al parásito. También se incluyen sustancias tales como inactivadores del complejo inmunológico del complemento, bradiquinina, anafilotoxina, histamina, sustancias que impiden la agregación de neutrófilos y la activación de linfocitos T y en algunos casos agentes antiinflamatorios (Cruz, 1995). En la saliva de la garrapata se encuentran antígenos que se han identificado intradérmicamente alrededor de los sitios de fijación del ácaro (Willadsen y McKenna, 1983).

Existen antígenos salivales capaces de inducir la producción de anticuerpos circulantes, detectados por medio de diferentes pruebas inmunológicas; esto ha sido comprobado en cuyos infestados con las garrapatas *A. americanum* e *I. ricinus* (Ackerman *et al*, 1981) y en bovinos con *R. microplus* y *R. appendiculatus* (Rechav, 1987, Willadsen y Kemp, 1998). Es debido a la presencia de estos indicadores de la respuesta inmune, en la relación garrapata-hospedero, que se han desarrollado vacunas experimentales, ya sea por medio de inoculación de extractos de glándulas salivales, antígenos salivales o antígenos de tipo oculto, que son antígenos de órganos internos de la garrapata, como el antígeno Bm86. A partir de este último se han originado proteínas recombinantes que se han evaluado como vacunas experimentales (Kemp *et al*, 1999). El efecto de estas vacunas es el daño ocasionado a nivel de intestino del parásito, que le produce problemas de sobrevivencia e incluso la muerte. Sin embargo, el efecto de estas

vacunas no es inmediato y se ve reflejado hasta después de tres meses de la vacunación, no mata ni derriba inmediatamente a las garrapatas adheridas al bovino, su acción se ejerce sobre las siguientes generaciones y paulatinamente va disminuyendo la carga parasitaria en los potreros, por una reducción en el potencial reproductivo de la garrapata, y no elimina por completo el uso de ixodicidas, sólo lo reduce por el espaciamiento que hay en los intervalos de tiempo para aplicarlos (Anónimo, 1997).

El antígeno Bm86 es el primer ejemplo de antígenos utilizados en vacunas para el control de garrapatas. Los anticuerpos producidos por el hospedero como respuesta a la vacunación con estos antígenos provocan lisis de las células intestinales de la garrapata (Figura 2), y como consecuencia una reducción en la sobrevivencia del artrópodo, disminución del peso y de la fertilidad (Willadsen y Kemp, 1998). Las vacunas no solo reducirán las poblaciones de garrapatas, sino en la misma proporción reducirán de manera concomitante la transmisión de babesiosis y anaplasmosis, dos de las enfermedades que más limitan la producción ganadera de nuestro país.



**Figura 2.** Mecanismo de acción del antígeno Bm86. Una vez que la garrapata se alimenta de un bovino inmunizado con Bm86, se presenta la siguiente serie de eventos. **1)** Los anticuerpos anti-Bm86 presentes en la sangre, reconocen su blanco en el intestino de la garrapata. Este reconocimiento permite la fijación del sistema del complemento a la membrana celular del intestino. **2)** La acción del complemento induce la formación de poros en la membrana celular. **3)** Se presenta la activación de proteasas, las cuales cortan sustratos intracelulares. **4)** Se comienza a lisar el intestino. **5)** Se completa la lisis del intestino, lo que altera la alimentación y las funciones de crecimiento y reproducción de la garrapata. Los efectos son directamente proporcionales a la cantidad de sangre ingerida (Modificado de Rodríguez, 2000).

### 3.3.1 Razas de bovinos resistentes

Desde hace poco más de medio siglo se sabe que el ganado *Bos indicus* es más resistente a las garrapatas que el ganado *Bos taurus*, esto debido tanto a sus características fenotípicas como a su capacidad para desarrollar una respuesta inmune más eficiente después de una primera infestación (Utech, *et al.*, 1978). El aumento de sangre *Bos indicus* en cruza de ganado, con el fin de aumentar su resistencia a las garrapatas, también ha sido ampliamente recomendado (Frish, 1999), pero esto implica algunas limitantes productivas como son la disminución en producción láctea y de carne debido a esta cruza (Jonsson *et al.*, 1998). Sin embargo, esta es una alternativa altamente efectiva, aunque de largo plazo y elevado costo, e implica la participación de instancias oficiales, técnicas y financieras que colaboren para lograr una organización sectorial planeada a nivel regional o aun nacional, de un nivel muy por encima del que existe en nuestro país actualmente (George, 1990). Esta alternativa también puede ser adoptada por algunos productores en forma individual o a través de uniones de productores que tengan los medios para lograrla.

### 4. Análisis *in silico*, un proceso comúnmente referido como minería de datos a partir de recursos genómicos.

*In silico* es una expresión que significa “hecho por computadora” o “vía simulación computacional” y se refiere a experimentos hechos fuera de los organismos. Las técnicas informáticas *in silico* son particularmente atractivas porque son extremadamente rápidas y rentables y se pueden aplicar incluso sin que el compuesto esté físicamente disponible. En la investigación farmacéutica se utiliza principalmente para la detección y evaluación de nuevos compuestos moleculares (Miramontes, 1992).

Los resultados de los ensayos *in silico* son los suficientemente aceptables como para jugar un papel importante en la evaluación preclínica de los efectos biológicos. La precisión de las predicciones *in silico* puede ser en muchos casos comparable con alternativas *in vivo* e *in vitro* y es probable que las nuevas mejoras sean alcanzables con la integración de la información biológica.

La disponibilidad de secuencias de genomas organismo-específicos ha revolucionado los enfoques para el estudio de los sistemas biológicos, conduciendo a nuevos conocimientos y oportunidades para resolver problemas biológicos que afectan la salud humana, la salud animal, la agricultura y el ambiente (Guerrero *et al.*, 2005). No obstante, debido al alto costo que representan los proyectos de secuenciación de genomas completos, los proyectos de generación de bibliotecas de ESTs (Expressed Sequence Tags), secuenciación

a partir de extremos de cDNA de un solo paso, permanecen como una de las principales fuentes de datos de secuencias de DNA organismo-específicas, para muchas especies eucariotas. Estos proyectos de descubrimiento de genes, aportan grandes beneficios al campo de investigación de las garrapatas y las enfermedades que transmiten, ya que forman las bases para potenciar nuestra comprensión de la biología de las garrapatas y de los mecanismos moleculares que contribuyen al parasitismo, la resistencia a acaricidas y la transmisión de patógenos trans-estadio y trans-ovárica. Estos conocimientos pudieran traducirse en nuevas opciones de control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten; la identificación de blancos biológicos permitiría desarrollar nuevos agentes acaricidas y vacunas para el control efectivo de estos ectoparásitos (Hill y Gutiérrez, 2000).

#### **4.1 Recursos bioinformáticos**

La Bioinformática puede considerarse como un pilar imprescindible en los proyectos de genómica y proteómica en los que es necesario organizar resultados, analizarlos, generar hipótesis y proponer nuevos experimentos. Esta actividad ha hecho que la Bioinformática se convierta en un componente básico de la biología molecular, la biotecnología y la biomedicina.

Las secuencias de genes y proteínas, junto con la información experimental, están contenidas en centenares de programas y bases de datos, que contienen información altamente especializada de composición muy heterogénea.

Para la caracterización parcial de las secuencias ESTs del presente trabajo sólo se tomaron en cuenta aquellos programas que ayudaron a predecir la estructura y localización de las proteínas de superficie celular, con potencial inmunogénico en la garrapata del ganado *R. microplus*. Los principales esfuerzos en esta investigación incluyeron localizar las secuencias de interés en un banco de datos, diseñar oligonucleótidos, traducir las secuencias de RNAm a proteínas, localizar regiones transmembranales, predecir los segmentos con potencial antigénico y por último alinear las secuencias con otras especies. Esta información de predicción se basó en la siguiente base de datos y programas Bioinformáticos:

BmiGI localizada en: *The Computational Biology and Functional Genomics Laboratory*. Cada una de las ESTs de interés se obtuvo de este banco de datos de libre acceso en la siguiente dirección: <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>, las cuales codifican tentativamente para proteínas de membrana.

Primer 3 (V 4.0) es una aplicación que se encuentra libre para su uso en la siguiente dirección: <http://frodo.wi.mit.edu/>. Para el diseño de oligonucleótidos se tomó en cuenta el tamaño de cada una de las ESTs, es decir, que los oligonucleótidos sentido y anti-sentido estuvieran cada uno en los extremos de la secuencia, y de esta manera amplificar la mayor longitud posible de pares de bases; también se consideró que el tamaño de los oligonucleótidos fuera de 18-20 pb, con un contenido de GC de 40-60% y una Tm de 50-55°C. Además, y por defecto, este programa muestra cinco pares de oligonucleótidos opcionales (Rozen y Skaletsky, 2000).

Translate del portal ExpASy del Instituto Suizo de Bioinformática con acceso: <http://web.expasy.org/translate/>. Esta aplicación permite buscar los marcos de lectura abiertos (Open Reading Frames, ORFs) en las secuencias de RNA que se le suministren. En la pantalla se visualizan los ORFs en las tres pautas posibles de lectura de los codones en una secuencia, en la orientación 5'→3', y las tres pautas posibles en la orientación 3'→5'. Una vez determinado el marco de lectura abierta y establecida la metionina de inicio de la traducción, el programa automáticamente proporciona información de la secuencia, el tamaño y las propiedades isoeléctricas teóricas de las proteínas potencialmente codificadas por el RNA que se ha analizado (Gasteiger *et al*, 2003).

TMHMM (Transmembrane Hidden Markov Model) tiene acceso en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. Con base en las secuencias de interés es posible utilizar esta aplicación para visualizar las regiones intra y extra celulares, así como los dominios transmembranales de las proteínas de interés. También es posible visualizar los cambios que pueden producir las mutaciones genéticas en las estructuras de las proteínas, y de esta manera, con estudios posteriores dar la pauta para conocer la función de las proteínas, por ejemplo, canales transportadores de iones o moléculas. Su uso es gratuito (Krogh *et al*, 2001).

Predicted Antigenic Peptides este programa fue diseñado por el grupo de Inmunomedicina de la Universidad Complutense de Madrid, con acceso en el sitio: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>. La predicción se basa en una tabla que refleja la aparición de residuos de aminoácidos en epítomos conocidos experimentalmente. La precisión de este método es del 75%. Su uso es gratuito (Kolaskar y Tongaonkar, 1990).

ClustalW desarrollado por el Centro de Bioinformática de la Universidad de Kyoto, con acceso en: <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>. El alineamiento de múltiples secuencias permitirá determinar regiones conservadas en la evolución, lo cual puede sugerir una función biológica importante. De esta forma, en estudios

posteriores será posible predecir funciones potencialmente reguladoras a partir de la expresión de genes (Larkin *et al.*, 2007).

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las garrapatas y enfermedades que transmiten son uno de los grandes problemas de salud pública y veterinaria en el mundo; la severidad depende de la región, especies involucradas, agente transmisor, población de hospederos, situaciones socio-económicas y avance tecnológico en las medidas de control. La garrapata *R. microplus* se distribuye geográficamente entre los paralelos 32 de los hemisferios norte y sur y se considera uno de los principales ectoparásitos de los bovinos en algunos países tropicales y subtropicales. En México, *R. microplus* se encuentra presente de forma endémica en las zonas ganaderas más importantes del país y causa pérdidas directas por las infestaciones, el daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de la sangre y disminución en la producción de carne y leche, toxicosis y parálisis. El efecto indirecto está dado por la transmisión de enfermedades; los agentes etiológicos que mayor impacto económico tienen en la ganadería bovina son: *A. marginale*, *B. bovis* y *B. bigemina*.

Se estima que el 83% del ganado en el mundo está expuesto a las garrapatas y las enfermedades que éstas transmiten, lo cual implica una pérdida anual de 13.9 a 18.9 billones de dólares.

El principal método de control de la garrapata del ganado bovino es el uso intensivo de acaricidas, lo cual ha disparado la resistencia en estos artrópodos. Como consecuencia, las estrategias basadas en el control químico pueden volverse incosteables, ya que cada vez es necesario aplicar cantidades crecientes de pesticidas, lo cual, además del alto costo, posee efectos ambientales adversos. Por lo tanto, es imperativo el desarrollo de métodos de control amigables con el ambiente que dependan en menor escala del uso de acaricidas.

## 6. JUSTIFICACIÓN

Las garrapatas, a diferencia de otros ectoparásitos, se alimentan de sangre lentamente, manteniéndose adheridas al huésped por varios días, esto permite que los anticuerpos producidos por el hospedero interactúen con el epitelio intestinal de la garrapata. El desarrollo de vacunas contra garrapatas se ha visto limitado por la identificación de antígenos apropiados. Algunos antígenos han sido identificados mediante la inmunización de bovinos con proteínas derivadas de extractos crudos, así como por mapeo inmunológico de antígenos de animales infestados. Actualmente, las vacunas antigarrapata son consideradas una estrategia de control promisorio, por lo que es necesario caracterizar nuevos antígenos que se utilicen en el desarrollo de dichas vacunas, el análisis *in silico* es una alternativa para la identificación de proteínas con potencial inmunogénico.

## **7. HIPÓTESIS**

La utilización de herramientas bioinformáticas permitirá inferir si las secuencias ESTs de interés codifican para proteínas de membrana y si éstas tienen un potencial inmunogénico.

## 8. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar parcialmente cinco secuencias ESTs codificantes de proteínas de superficie celular, con potencial inmunogénico, en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

### 8.1 Objetivos particulares

1. Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar las ESTs TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495, y determinar su expresión en diversos tejidos de la garrapata *R. microplus*.
2. Analizar *in silico* las secuencias ESTs TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495, utilizando la herramienta "Translate", para determinar el marco de lectura abierto más plausible en cada secuencia.
3. Analizar *in silico* las secuencias de aminoácidos inferidas de las ESTs TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495, utilizando la herramienta "TMHMM", para determinar la presencia de alfa-hélices transmembranales, así como las regiones intra y extracelulares de las proteínas tentativas.
4. Analizar *in silico* las secuencias de aminoácidos inferidas de las ESTs TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495, utilizando la herramienta "Predicted Antigenic Peptides", para determinar la presencia de péptidos antigénicos de las proteínas tentativas.
5. Realizar una comparación de las secuencias de nucleótidos de las ESTs TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495, con secuencias relacionadas de otras especies, utilizando la herramienta "Clustal W", para determinar el grado de similitud de las secuencias de interés.

## **9. MATERIALES Y MÉTODOS**

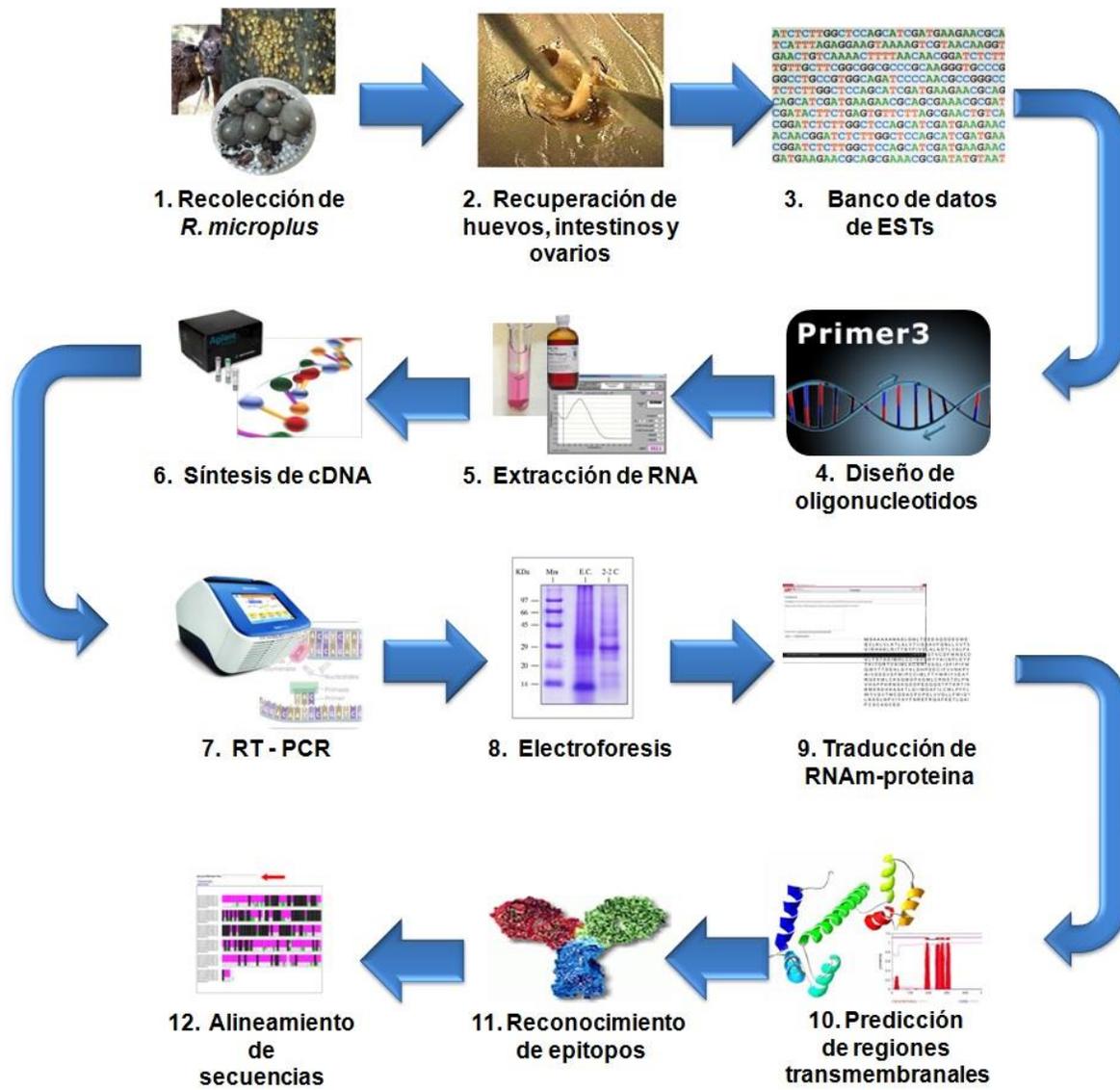
### **9.1 Material biológico para el estudio**

Las garrapatas fueron obtenidas de la Unidad de Artrópodos del CENID-PAVET-INIFAP, ubicado en Jiutepec, Morelos, México. Se disecaron alrededor de 200 garrapatas hembras, adultas y repletas.

#### **9.1.2 Disección de tejidos**

Se obtuvieron sus tejidos (intestinos y ovarios) para posteriormente realizar la extracción de RNA. También se colectaron huevos de 8 y 24 días, a los cuales también se les extrajo RNA.

La Figura 3 muestra el diagrama de flujo de las actividades experimentales realizadas en la presente investigación.



**Figura 3.** Diagrama de flujo de la metodología utilizada. 1) Obtención de garrapatas *R. microplus* en estado adulto. 2) Recuperación de huevos de 8 y 24 días. Disección de tejidos adultos (intestinos y ovarios). 3) Selección de secuencias ESTs en banco de datos. 4) Diseño de oligonucleótidos. 5) Extracción de RNA total de cada tejido. 6) Síntesis de cDNA a partir de 5 µg de RNA total de cada tejido. 7) RT-PCR. 8) Electroforesis de los productos amplificados. 9) Traducción de la secuencia del RNA mensajero a proteína con la herramienta Translate. 10) Predicción de las regiones transmembrales con el programa TMHMM. 11) Predicción de epítopos con el programa Predicted Antigenic Peptides. 12) Alineamiento de secuencias con el programa ClustalW.

## **9.2 Obtención de ácidos nucleicos**

Se pesaron aproximadamente 100 mg de huevos de 8 días, huevos de 24 días y de tejido adulto (intestino y ovario) de garrapatas *R. microplus* hembras, repletas.

## **9.3 Selección de secuencias ESTs**

Las secuencias fueron seleccionadas en el banco de datos *The Boophilus microplus Gene Index* (BmiGI). Las ESTs obtenidas fueron: TC3327 con longitud de 905 pb, BEACJ17TR longitud de 847 pb, TC4791 longitud de 1219 pb, TC2637 longitud de 950 pb y TC4495 con longitud de 1410 pb reportadas por Guerrero *et al.* (2005).

## **9.4 Diseño de oligonucleótidos**

Con el programa Primer 3 (V 4.0) se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de estas secuencias.

## **9.5 Extracción de RNA total**

Se realizó la extracción del RNA total con la utilización del reactivo TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, Inc).

## **9.6 Amplificación del cDNA por RT-PCR**

Se sintetizó el cDNA a partir de 5 µg de RNA total de cada tejido utilizando el kit "SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix" (Invitrogen Life Technologies, Inc.).

Como control interno de amplificación se utilizó la secuencia del gen actina de *R. microplus* reportada por da Silva *et al.* (2005) con una longitud de 1858 pb.

Se prepararon mezclas de reacción de 25 µl cuya composición se muestra en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Composición de las reacciones de PCR.

Reactivo	Cantidad ( $\mu$ l)	Concentración inicial	Concentración Final
cDNA	1	--	--
Oligonucleótidos	1	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Amortiguador	5	10x	1x
dNTP's	1	10 mM	200 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O milliQ	16.2	--	--
MgCl <sub>2</sub>	0.75	50 mM	1.5 $\mu$ M
Taq <i>Pol</i>	0.1	5U	1U

Condiciones de amplificación de las secuencias ESTs:

Desnaturalización inicial 94°C, 5 min; seguido de 40 ciclos de desnaturalización 94°C, 1 min; alineamiento 60°C, 1 min; extensión 72°C, 3 min, y finalmente un paso de extensión de 72°C, 5 min.

Condiciones de amplificación de la secuencia del gen actina:

Desnaturalización inicial 94°C, 5 min; seguido de 40 ciclos de desnaturalización 94°C, 1 min; alineamiento 55°C, 1 min; extensión 72°C, 1 min y finalmente un paso de extensión de 72°C, 5 min.

### 9.7 Electroforesis de los productos amplificados

Los productos amplificados (TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637, TC4495 y actina) se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (50 ml de buffer TAE y 0.5 gr de agarosa) adicionado con 5  $\mu$ l de *Sybrsafe* (tinción del DNA). Se cargaron 10  $\mu$ l de cada uno de los amplificados más 1.5  $\mu$ l del amortiguador de carga BlueJuice. Se utilizó el marcador de peso molecular de 1Kb (1.5  $\mu$ l; New England Biolabs) como referencia de tamaño de los fragmentos. Las muestras se corrieron a 80 V por 60 min. Los amplificados se observaron en un analizador de imágenes (Biorad) y se determinó el tamaño de los mismos.

### **9.8 Traducción de RNAm a proteína**

Con el programa Translate del portal ExPASy se llevó a cabo la traducción de la secuencia de RNA mensajero a proteína.

### **9.9 Localización de regiones transmembranales**

El programa TMHMM Server v. 2.0 permitió determinar la localización de las regiones transmembranales. El programa brinda servicios de predicción en línea en CBS (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark).

### **9.10 Predicción de una respuesta de anticuerpos**

*Predicted Antigenic Peptides* : permitió la predicción de segmentos con potencial antigénico dentro de la secuencia de una proteína.

### **9.11 Alineamiento de secuencias**

ClustalW. Permitió el alineamiento de secuencias, con la utilización de la red japonesa de bases de datos y servicios computacionales GenomeNet.

## 10. RESULTADOS

Para iniciar la caracterización de secuencias que tentativamente codifican para proteínas de superficie celular, se partió de la base de datos de secuencias expresadas (ESTs). A continuación se presenta cada una de las secuencias de interés, con su respectivo análisis *in silico*, así como la demostración de su expresión en diversos tejidos de garrapata.

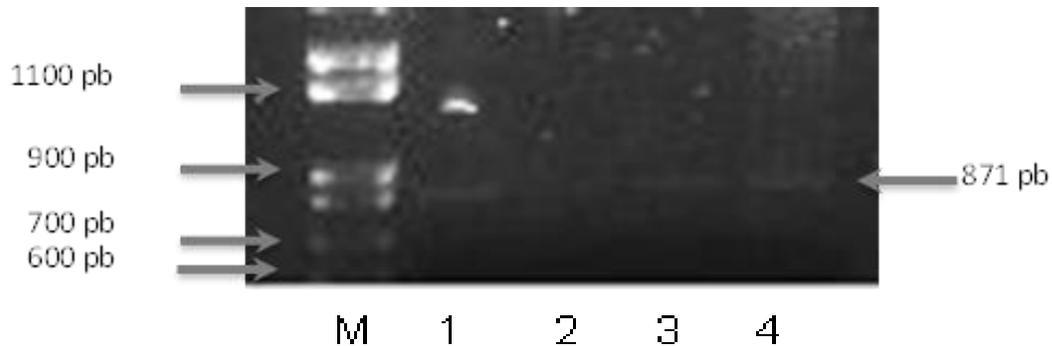
El cuadro 3 muestra las ESTs de interés, los oligonucleótidos utilizados para su amplificación y los fragmentos amplificados durante las reacciones de PCR.

**Cuadro 3.** Secuencias ESTs analizadas en este trabajo. Los nombres de las ESTs son los utilizados en la base de datos BmiGI. La longitud de cada EST es la reportada por Guerrero *et al* (2005). Se presentan los oligonucleótidos específicos de cada secuencia y el tamaño esperado de cada fragmento amplificado. Como control de amplificación se utilizó el gen de la actina de *R. microplus*. \*El tamaño corresponde al RNAm completo de actina.

Secuencia	Longitud de la EST (pb)	Oligonucleótidos	Fragmento amplificado (pb)
TC3327	905	F 5'-CTC CCT CGT CGT GTT TCG-3' R 5'-CAA TTC AAA AGA AAG AGG AAA TGA-3'	871
BEACJ17TR	847	F 5'-CTT GCT GCG ACC ACG ACT-3' R 5'-AGA ACA GGT CGG GCT TCC-3'	786
TC4791	1219	F 5'-CCA ATG CAG TGG TCT CGA T-3' R 5'-TCA CTG ATC CAA AGA TTG TTC A-3'	1188
TC2637	950	F 5'-CCC TAT GCC CAA ACC ATA GA-3' R 5'-GCG ATG GGC ATA TAG CAT TC-3'	916
TC4495	1410	F 5'-CAC CAT GAG CGC AGC GGC-3' R 5'-ATC TTC ACA GCC AGC ACA TG-3'	1105
ACTINA	1858*	F 5'-ACA GGT CCT TAC GGA TGT CG-3' R 5'-GAC GCA GAT CAT GTT CGA GA-3'	524

## 10.1 EST-TC3327

Por medio de la PCR se logró amplificar un fragmento de 871 pb (Fig. 4). Como se puede observar, la intensidad del producto de PCR es muy similar en los tejidos adultos de la garrapata (intestino y ovario), al igual que en la muestra de huevo de 8 días. No obstante, en huevo de 24 días se observó una menor amplificación.



**Figura 4.** Amplificación de la EST TC3327 que codifica tentativamente para un receptor tipo GABA-A en *R. microplus*. M=Marcador de tamaño (1 Kb), 1=huevo de 8 días, 2=huevo de 24 días, 3=intestino y 4=ovario de hembra adulta repleta. La flecha del lado derecho indica el fragmento amplificado de interés, con un tamaño de 871 pb.

En cuanto al análisis de la secuencia de la EST, no fue posible obtener el marco de lectura completo para inferir la secuencia de aminoácidos con la utilización de la herramienta Translate ya que se observaron fragmentos muy cortos e interrumpidos (resultado no mostrado). Sin embargo, con el uso del programa Predicted Antigenic Peptides se obtuvo la predicción de tres péptidos antigénicos, los cuales se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Predicción de péptidos antigénicos en la secuencia traducida de la EST TC3327.

N	Posición de inicio	Secuencia	Posición de término
1	27	YPDRVPVIVEK	37
2	48	KKKYLVPSDLTVGQFYFLIRKRIHLRPEDALFFIVNNVIPP	88
3	103	EDFFLYIA	110

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST TC3327 muestra una elevada similitud con secuencias codificantes de receptores GABA de otras especies, se observó un 53.57% de identidad (Figura 5).

```

Rhipicephalus      ---CATGAAGTTTCTCTACAAGGAGGAGCACCCGTTTCGAGAAGCGGAGGAGCGAGG
Ixodes             -----AATGAAGTTTTCAGTACAAGGAGGAGCACCCGTTTCGAGAAGAGGAGGGGTGAAG
Graphocephala     -----ATGAAGTTTCAATACAAAGAAGAGCACCCATTTGAGAAGAGGAAAGCTGAAG
Epinephelus      CACTGAAAATGAAGTTTCTGTACAAAGAAGAACATCCCTTTGAGAAGAGACGGTCAGAGG
Branchiostoma    CTGTCAAAATGAAGTGGGAATACAAGGACGAGCATCCTTTTCGAGAAGCGGAGAGCCGAGG
Homo              CCGGGAGGATGAAGTTCGTGTACAAAGAAGAGCATCCGTTTCGAGAAGCGCCGCTCTGAGG
                  ***** : *****.* ** .** ** * * * *****.* .. **.*

Rhipicephalus    GTGACAAGATTTCGCAGGAAGTACCCGTGACCGAGTCCCGTGATAGTGGAGAAGGCCCCCA
Ixodes           GCGACAAGATTTCGCAGGAAGTACCCAGACAGAGTCCCGTGATAGTGGAGAAGGCCCCCA
Graphocephala    GTGAAAAAATCAGGAAGAAGTACCCGGATAGAGTGCCAGTGATTGTGGAGAAAGCACCAA
Epinephelus     GAGAAAAAATAAGAAAGAAGTACCCAGACAGGGTGCCAGTGATTGTGGAAAAAGCTCCTA
Branchiostoma    GAGAGAAGATCAGGAACAAATACCCCGACAGAGTTCGGGTGATTGTAGAAAAAGCCCCCA
Homo             GCGAGAAGATCCGAAAGAATAACCCGGACCGGGTGCCGGTGATAGTAGAAAAAGCTCCCA
                  * * * * .** . * * . ** .***** ** .*.** * * *****:*.**.***.* * * *

Rhipicephalus    AGGCCCGCATTGGCGACCTGGACAAGAAGAAGTACCTGGTTC CCTCGGACCTGACCGTAG
Ixodes           AGGCCCGCATTGAGGACCTGGACAAGAAGAAGTACCTGGTGCCTCTGACTTGACGGTGG
Graphocephala    AAGCGAGAAATCGGTGACTTGGACAAGAAGAAGTACTTGGTGCCTCGGATTTGACTGTGC
Epinephelus     AAGCCAGAAATAGGAGATCTGGACAAGAAAAAGTACCTGGTCCCCTGACCTTACAGTGG
Branchiostoma    AGGCTCGGATTGGAGACCTGGATAAGAAGAAGTACCTGGTTCCTTCAGATCTCACAGTTG
Homo             AAGCTCGGATAGGAGACCTGGACAAGAAGAATAACCTGGTGCCTTCTGATCTCACAGTTG
                  *.** .* * * * . ** ***** **.*.*** ***** * * * * * * * * *

Rhipicephalus    GCCAGTTCTACTTCTGATCCGCAAGCGGATCCACCTGCGGCCGGAGGATGCGCTCTTCT
Ixodes           GCCAGTTCTACTTCTTCCATCCGCAAGAGGATCCACCTGCGGCCGAGGATGCCCTGTTCT
Graphocephala    GCCAGTTTACTTCTTGATCCGCAAACGCGTCCATCTCCGTCCCAGGATGCGCTTTTCT
Epinephelus     GCCAGTTCTACTTCTTCCATCCGGAACGAATTCACCTGCGTGCTGAGGATGCTCTTCT
Branchiostoma    GTCAGTTCTACTTCTTGATTCGGAAGCGGATTCACCTGCGCCCAGAAGACGACTCTTCT
Homo             GTCAGTTCTACTTCTTGATCCGGAAGCGAATTCATCTCCGAGCTGAGGATGCCTTGTTTT
                  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

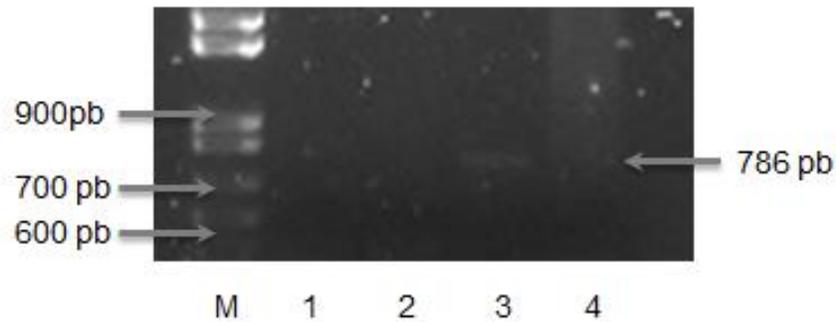
Rhipicephalus    TCATTGTCAACAATGTCATTCCTTACTAGTGCCACCATGGGCTCCCTTTACCAGGAGC
Ixodes           TCATTGTCAACAACGTCATTCCTTCCGACAAGCGCCACCATGGGATCCCTTACCAGGAAC
Graphocephala    TCTTTGTGAACAATGTCATTCCTTCCCAACAGTGCTACAATGGGTTCCTGTACCAGGAAC
Epinephelus     TCTTTGTCAACAATGTCATTCCTTCCCAACATCAGCCACCATGGGCTACTTACCAGGAAC
Branchiostoma    TCTTTCGTGAACAATGTCATTCCTTCCCAACAGTGCGACCATGGGCTCCTGTACCAGGAGC
Homo             TCTTTGTCAACAATGTCATTCCTTCCCAACAGTGCCACAATGGGTGAGTGTACCAGGAAC
                  **.* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```



## 10.2 EST-BEACJ17TR

Por medio de PCR, se amplificó un fragmento de 786 pb, el cual únicamente se observó en la muestra de intestino de garrapata adulta (Figura 6).



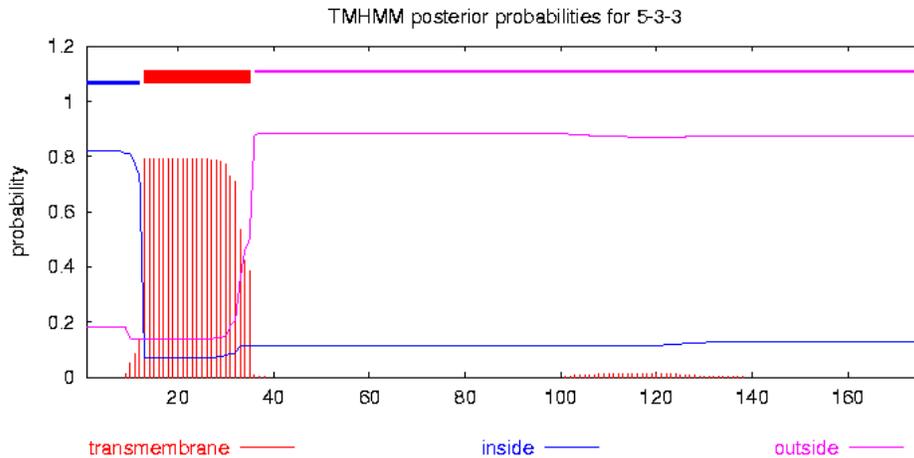
**Figura 6.** Amplificación de la EST BEACJ17TR que codifica tentativamente para un receptor tipo GABA-A en *R. microplus*. M=Marcador de tamaño (1 Kb), 1=huevo de 8 días, 2=huevo de 24 días, 3=intestino y 4=ovario de hembra adulta repleta. La flecha indica el fragmento amplificado de interés, con un tamaño de 786 pb.

A partir de la secuencia parcial del RNA mensajero, se dedujo la secuencia tentativa parcial de la proteína (Figura 7).

```
SGKTGRKDS TVRWLLLCASCLAVQLACSVLPTARALDAG
SSTGGTGSSEVYLSSVERESDSPATSDVPATSAETPGG
SDPSVPAPRLAFLDK MLEQYDKRAWPTYG MGHPTYVKV
NIYVNSIGPVNANNMEYG MDIYLRQSWQDLRLNVSKYGV
TTPVTINGEDIMGKIWKPDF
```

**Figura 7.** Secuencia tentativa de aminoácidos derivada de la EST BEACJ17TR. Las metioninas se indican en negritas.

Esta secuencia se analizó con el programa TMHMM, para encontrar posibles  $\alpha$ -hélices transmembranales. Como se observa en la Figura 8, el programa predice la existencia de al menos una  $\alpha$ -hélice, que corresponde aparentemente al extremo carboxilo terminal de la proteína.



**Figura 8.** Predicción de la estructura de las  $\alpha$ -hélices transmembranales y de las regiones intra y extracelulares, a partir de la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia EST BEACJ17TR.

Con la utilización del programa Predicted Antigenic Peptides, se predijeron 6 probables péptidos antigénicos en la secuencia parcial de la proteína, los cuales se muestran en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Predicción de péptidos antigénicos en la proteína derivada de la EST BEACJ17TR.

N	Posición de inicio	Secuencia	Posición de término
1	10	TVRWLLLCASCLAVQLACSVLPTARALD	37
2	47	SSSEVYLSS	55
3	64	ATSDVPA	70
4	79	SDPSVPAPRLAFLD	92
5	110	HPTYVKVNIYVNSIGP	125
6	146	LRLNVSKYGVTTTPVT	160

El análisis de la secuencia de nucleótidos de la EST BEACJ17TR muestra que es similar a secuencias codificantes de receptores GABA en otras especies, con una identidad del 26.33% (Figura 9).



```

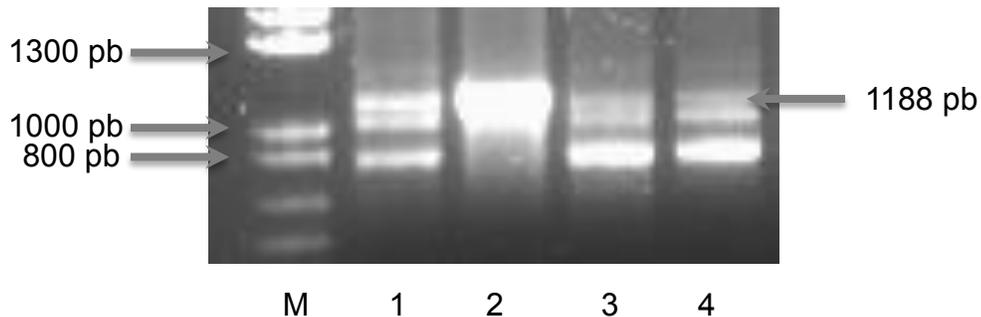
Ailuropoda      TTTTCCGATG-GATGAACATTCCTGCCCCCTGGAGTTCTCCAGCT-----
Homo            CTTTCCAATG-GATGAACACTCCTGCCCCCTGGAGTTCTCCAGTTGGTCTCGTTCTATTG
Sus             TTTTCCAATG-GATGAACACTCCTGCCCCCTGGAATTCTCCAGTT-----
Taeniopygia    CTTCCAATG-GATGTCCACTCCTGCCCACTGGAATTTCAAGCT-----
Rhipicephalus  GTAGCAGTAGTGAGGTGTACCTGAGCAGCGTGGAGCGCGAGAG-----
                *: *...:* ** *: *      :**. . ****. . **

```

**Figura 9.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST BEACJ17TR de *R. microplus*, con receptores GABA conocidos. Los nucleótidos idénticos se indican con asteriscos. *Ailuropoda melanoleuca* (XM\_002912529.1), *Homo sapiens* (NM\_198903.2), *Sus scrofa* (XM\_003134088.1), *Taeniopygia guttata* (XM\_002189310.1), *Rhipicephalus microplus* (BEACJ17TR).

### 10.3 EST-TC4791

Con los oligonucleótidos específicos se amplificó por PCR un fragmento de 1188 pb. Como se puede ver en la Figura 10, la intensidad del producto de PCR es similar en los tejidos adultos de garrapata (intestino y ovario). No obstante, en huevo de 8 días la amplificación es mayor, y en huevo de 24 días es muy superior al resto de las muestras. Cabe mencionar que además del fragmento amplificado de interés, se pudieron observar dos bandas adicionales de menor tamaño (1000 pb y 800 pb, respectivamente).



**Figura 10.** Amplificación de la EST TC4791 que codifica tentativamente para un receptor tipo GABA-B en *R. microplus*. M=marcador de tamaño (1 Kb), 1=huevo de 8 días, 2=huevo de 24 días, 3=intestino y 4=ovario de hembra adulta repleta. La flecha indica el fragmento amplificado de interés, con un tamaño de 1188 pb.

En un intento por obtener más información de esta secuencia, se tradujo la misma, con la utilización de diferentes marcos de lectura de los nucleótidos, en ambas orientaciones, y se analizaron los péptidos resultantes, en busca de  $\alpha$ -hélices transmembranales, con el programa TMHMM. Como resultado se obtuvo que no hay un evidente marco de lectura abierto, y por esta misma razón no se pudieron predecir claramente las regiones transmembranales (resultados no mostrados). No obstante, el análisis de la proteína con el programa Predicted Antigenic Peptides, mostró la presencia de 13 péptidos antigénicos, los cuales se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Predicción de péptidos antigénicos en la proteína derivada de la EST TC4791.

N	Posición de inicio	Secuencia	Posición de término
1	4	AHLLSVLLCLA AFLQYASPL	23
2	29	VETGVQNLKSLYIAAVFP	46
3	55	GGQGCLPAALMALE	68
4	74	SDLLIGYKL	82
5	89	SQVRCPH	95
6	109	LTFRAVLLFQMF	120
7	122	SYRNLICQI	130
8	137	SQHSPRSLQSVFKRGYALVSCCLASVAVLLNQVIVLIPSA	176
9	184	NAQFCCSHLQCNPGLAATVMYDLLYNE	210
10	212	QKLMLLGGCSIVCFVVAE	229
11	233	MWNLVVVSALHIIQCLDS	250
12	267	SLHAHRLSMPHLRAEFIQLKLHIIIAVLTH	296
13	298	HNHFVLFTSFFLVSINC	314

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de esta EST con secuencias relacionadas de otras especies, muestra que hay un grado de identidad entre ellas de 15.93% (Figura 11).

```

Aedes      GTGTTTTCTCTCTTTATTTGCAGTGTGAGCCCGGGCTCGGGGCTAGTGTATGTACAAT
Culex      GTGGTTCCCCATTGGTTGGTCAAATGTGAGCCCGGACTTGGGGCCAGTGTATGTACAAT
Drosophila ATCCTGCACAGCAACGACAGCGAGTGTGAGCCCGGTTTGGGCGCCAGCGTGATGTACAAT
Ixodes     TCGCGCTTCCATCAGACTTCCGGGTTTCCGCGATCACG-CGCGCGCGCCTAATAGCTA
Rhipicephalus -----ACGCTCACGAGCGCGGCTCGGTGATCCACTACT
                . * ** . * * . : . :
    
```

```

Aedes      TTGCTGTACAATGCACCTCAGAAGTTGATGCTCCTAGCGGGCTGCAGTACGGTTTGTACG
Culex      CTGTTGTACAATGCGCCCCAGAAGTTGATGCTGTTGGCGGGCTGCAGTACCGTTTGTACG
Drosophila CTGCTCTATAATAAACCGCAAAAGCTGATGCTGTTGGCAGGATGCAGCACGGTCTGCACC
Ixodes     CGGCTTTCCTT---ATTTAGTTCCTTTGTGTATGGCTCACTACCCACACGCTCTGGGTCCG
Rhipicephalus CAG-----TTGCGACATTGAACAGCACGGAGCGATAG
                * : * . : * . * * * : .
    
```

```

Aedes          ACAGTAGCCGAAGCAGCGAAAAATGTGGAACCTAGTTG----TGCTTTGTTATGGTGCATC
Culex          ACAGTCGCCGAAGCAGCGAAAAATGTGGAACCTAGTTG----TGTTATGTTACGGCGCATC
Drosophila    ACTGTAGCCGAGGCTGCCAAAAATGTGGAATCTAATTG----TGCTCTGTACGGGGCCTC
Ixodes        CATGTTCTCTCGGAGACCTCACAGAAGACTTTCCTTCTTTTCAGATATCCTACGGTTCTAG
Rhipicephalus CCCTGCGCGGCG-----
..            ..

Aedes          TAGTCCTGCCTTATCAGATAGAAGTAGATTTCTTACGTTATTTAGGACGCATCCATCTGC
Culex          TAGCCCTGCCTTATCAGATAGAAGTAGATTTCTTACGTTATTTAGGACGCATCCGTCTGC
Drosophila    GAGTCCGGCTCTTTTCGGATCGCAAACGATTCCCCACTCTATTCGGCACCCATCCATCGGC
Ixodes        TTCTCCCGCACTGTGCAATAGGAAACGCTTTCGACGTTCTTCCGAACGCACCTTCAGC
Rhipicephalus -----ATCGATAGACCGAGAGGGCAACCGTAGGAATGAACGCGATGGATGGT
                **...: . .: .   * . * : : * * * . : *

Aedes          CACTGTACATAATCCTACCAGAATTAAGCTAATGCAAAAGTTTGGGTGGTCGCGAGTAGC
Culex          GACTGTACATAATCCTACTAGAATAAACTAATGCAAAAATTTGGGTGGTCGCGTGTAGC
Drosophila    CACGGTGCACAATCCAACGCGCATCAAGCTGATGAAGAAATTCGGCTGGTCCCGGTGGC
Ixodes        CACGATCCACAACCCGACGCGCATCAAGTTGTTCAGAAGTTTGAGTGGTCACGCATCGC
Rhipicephalus GCCCATTGTGTGTCG-----TGCTGTTGTGTTTGGCCGCTTCTTACAGTACGC
                . * . * . : . * *                : . * . : * . : : . * * * * . : **

Aedes          GATCCTCCAACAAGCCGAAGAAGTGTTCATATCGACTGTCGAGGATTTAGAACTCGATG
Culex          GATCCTCCAGCAAGCCGAAGAAGTGTTCATATCGACGGTCGAGGATTTGGAGACCCGGTG
Drosophila    CATTCTGCAGCAGGCGGAGGAGTCTTTTATATCGACCGTAGAGGATCTCGAGAATCGATG
Ixodes        CATCATCCAGGAGGCGGAAGAGGTGTTCACTTCGACGGGAGAGGACCTTGAATTAAGTG
Rhipicephalus GAGCCCCTTGCAACCGAATGAAAAAGTCGAGACAGGAGTACAAAACCTCAAGAGTCTGTA
                * . . : . * . * * * . : * . : * . * . * * * . * . * . * .

Aedes          TAAGGATGCTGGTATCGAGATAGTGACGAGACAATCATTCCCTTTCGGATCCAACCGATGC
Culex          CAAAGAGGCCGAATCGAGATAGTGACAAGACAATCATTCCCTTTCGGATCCTACCGATGC
Drosophila    CATGGAGGCTGGCGTTGAAATCGTAACTAGACAATCATTCTATCCGATCCAACAGACGC
Ixodes        CAAAGAGGCACACATTGAAATTTGTACAAGGCAGAGCTTTCAGACCGATCCACGGATGC
Boophilus    CATAGCG-----GC
                * : * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Aedes          AGTGCGAAACCTTCGCCGACAGGATGCTCGGATCATCGTTGGACTATTTTACGTAGTCGC
Culex          GGTGCGGAATCTCCGAGACAAAGATGCCCGTATTATTGTGCGACTATTCTACGTAGTCGC
Drosophila    CGTGCGCAATTTGCGACGCCAGGATGCACGCATCATTGTGGGACTCTTCATGTGGTGGC
Ixodes        GGTGAAGAACCTGGTGAGGCAAGATGCGCGGATCATTGTGGGTATGTTCTATGTGGCAGC
Rhipicephalus AGTGTTCCCCATGAAGGGCCATGGTGGCTGGCTCGGCG---GTCAAGGATGCTTCCAGC
                *** . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

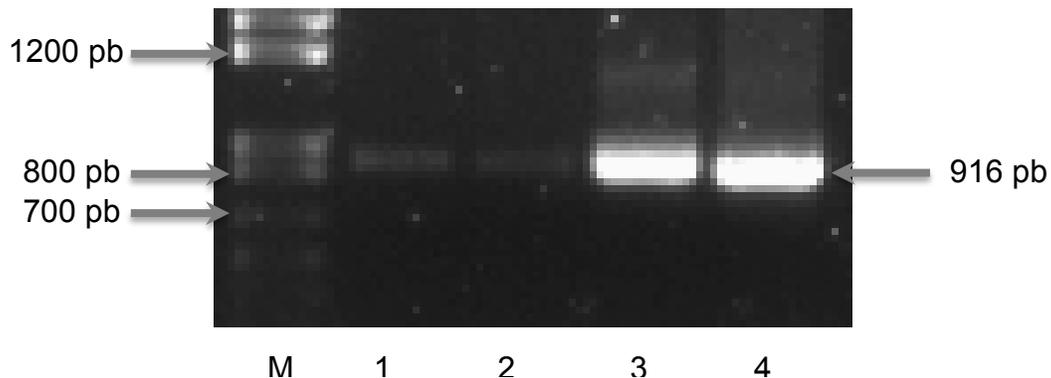
Aedes          AGCCAGGCGGGTCTGTGTGAAATGTACAAACAGCAACTTTATGGCAGGGCGTACGTGTG
Culex          AGCCAGGCGGGTCTGTGCGAAATGTACAAACAGCAGCTTTACGGAAGGGCTTACGTGTG
Drosophila    CGCCAGGAGGGTGTCTGCGAAATGTACAAACAGCAGCTATATGGCCGAGTCATGTGTG
Ixodes        AGCTCGCCGGTTTTTTGTGAGGCATACAAGCAGAACGTGTTTGGCAAGCAGTATGTGTG
Rhipicephalus GGCGCTTATGGCATTAGAAGATGTGAACAAGCG-----GTCTGACCTCTTGATTG
                ** . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 11.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST TC4791 de *R. microplus*, con receptores GABA-B conocidos. Los nucleótidos idénticos se indican con asteriscos. *Aedes aegypti* (XM\_001652657.1), *Culex quinquefasciatus* (XM\_001863624.1), *Drosophila melanogaster* (AF318272.1), *Ixodes scapularis* (XM\_002406043.1), *Rhipicephalus microplus* (TC4791).

## 10.4 EST-TC2637

Por medio de PCR se amplificó un fragmento de 916 pb. Este producto se observó mucho más elevado en los tejidos adultos de garrapata (intestino y ovarios), comparado con el tejido de huevo de 8 y 24 días (Figura 12).



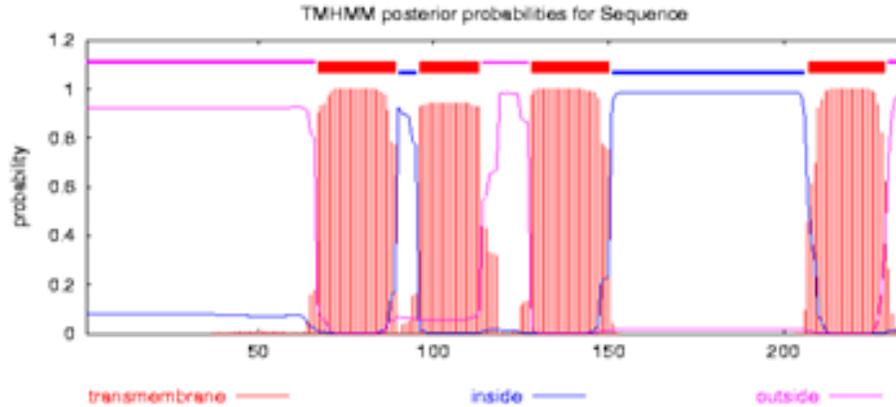
**Figura12.** Amplificación de la EST TC2637 que codifica tentativamente para un canal de cloro modulado por glutamato en *R. microplus*. M=marcador de tamaño (1 Kb), 1=huevo de 8 días, 2=huevo de 24 días, 3=intestino y 4=ovario de hembra adulta repleta. La flecha indica el fragmento amplificado de interés, con un tamaño de 916 pb.

La traducción de la secuencia de nucleótidos de esta EST, generó una secuencia de 234 aminoácidos (Figura 13), que tentativamente constituye de manera parcial, un canal de cloro modulado por glutamato.

```
GPYAQTIEQTAISWQDTPIVLERPIEIPFDLVHNSYGH  
YNRAIDTGVFSFLNATFTLERQNGYHLIQTYLPTFLIVMI  
SWVSFWLNVDATPARVTLGVTTLLTMTTVASGVRTQLPP  
VSYIKAIDVWIGACSVMVFGALLEFTLVNYLSRSKLRPEE  
FRKSINIFHRNRKGGGEKRDGEEGPNKYETRGMELQKN  
LKRSQNVDKVCRIMFPFVFFVFNVVYWFYYLYMSEFT
```

**Figura 13.** Secuencia tentativa de aminoácidos derivada de la EST TC2637. Las metioninas se indican en negritas.

El análisis de esta secuencia con el programa TMHMM predijo que ésta presenta putativamente 4  $\alpha$ -hélices transmembranales, lo cual sugiere que la secuencia de interés codifica en efecto para una proteína de membrana de la naturaleza indicada (Figura 14).



**Figura 14.** Predicción de la estructura de las  $\alpha$ -hélices transmembranales del receptor putativo del canal de cloro modulado por glutamato, derivado de la EST TC2637, en *R. microplus*. Las barras en rojo representan las cuatro  $\alpha$ -hélices transmembranales, las líneas en azul representan regiones intracelulares, mientras que las líneas en rosa representan regiones extracelulares

Con el programa Predicted Antigenic Peptides se lograron predecir 8 probables péptidos antigénicos en la secuencia tentativa parcial de la proteína, los cuales se muestran en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Predicción de péptidos antigénicos en la proteína derivada de la EST TC2637.

N	Posición de inicio	Secuencia	Posición de término
1	17	TDPIVLERPIEIPFDLVHNS	37
2	45	IDTGVFSFLNA	55
3	63	NGYHLIQTYLPTFLIVMISWVSFWLNVDATPARVTLGVTT	102
4	109	VASGVRTQLPPVSYIKAIDVWIGACSVMVFGALLEFTLVNYLSRS	153
5	203	NVDKVCRIIMPFFVFFVFNVVYWFYYLYM	230
6	240	VQTGHSLT	247
7	285	YSWCICCRG	293
8	296	ALTECYMPIAN	306

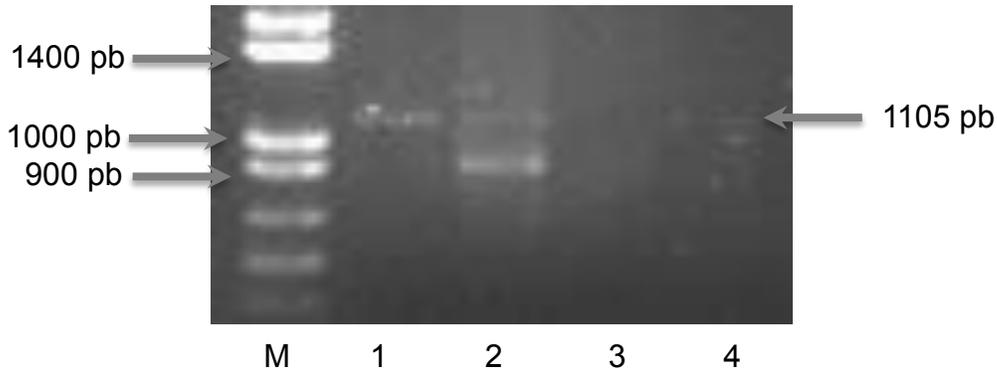
El alineamiento de nucleótidos de esta secuencia con secuencias relacionadas, muestra que hay una identidad del 20.28% (Figura 15).



**Figura 15.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST TC2637 de *R. microplus*, con canales de cloro conocidos. Los nucleótidos idénticos se indican con asteriscos. *Rhipicephalus microplus* (TC2637), *Ixodes scapularis* (XM\_002403206.1), *Rhipicephalus sanguineus* (GQ215234.1), *Aedes aegypti* (XM\_001662847.1).

## 10.5 EST-TC4495

Se diseñaron oligonucleótidos específicos y se amplificó por PCR un fragmento de 1105 pb (Figura 16). Este producto únicamente se observó en la etapa de huevo (8 y 24 días).



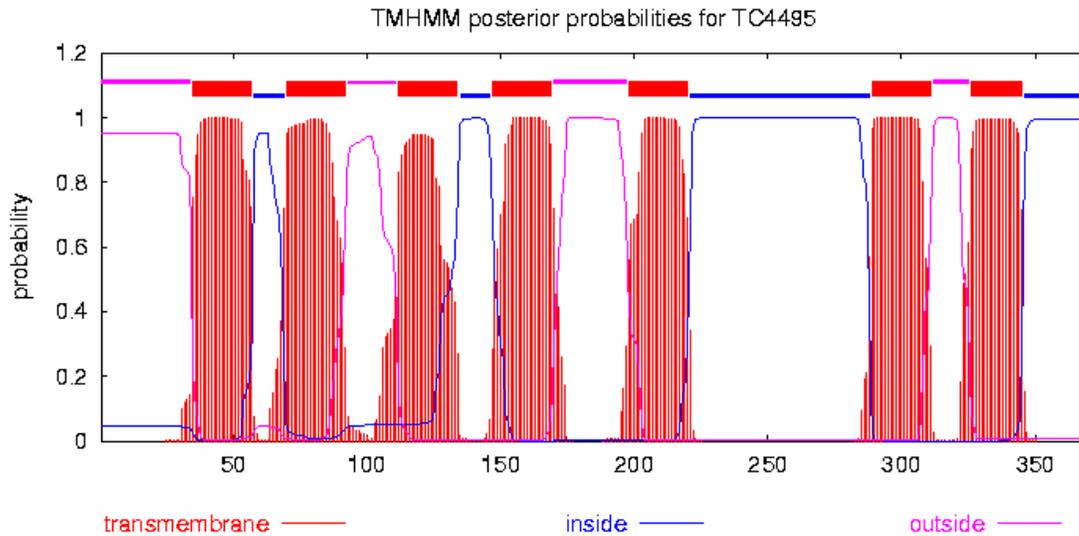
**Figura 16.** Amplificación de la EST TC4495 que codifica tentativamente para un receptor acoplado a proteínas G, del tipo octopamina, en *R. microplus*. M=marcador de tamaño (1 Kb), 1=huevo de 8 días, 2=huevo de 24 días, 3=intestino y 4=ovario de hembra adulta repleta. La flecha indica el fragmento amplificado de interés, con un tamaño de 1105 pb.

La traducción de la secuencia de nucleótidos de la EST TC4495 permitió determinar la secuencia correcta de aminoácidos, la cual pudiera representar a la proteína completa (Figura 17).

```
MS A A A A A N A S L G N L T D E E A G D D E S W E S V L K L V L K T L A L V  
T I I S S A V F G N L L V V T S V I R H H K L R I T T N Y F I V S L A L A D T L V  
A L F A M T F N A S V T I S G R W L F N Q T V C D F W N S C D V L F S T A S I  
M H L C C I S V D R Y Y A I I K P L E Y P T K I T G R T V A I M L A C A W I S S  
G L I S F I P I F M G W Y T T D E H L G Y K L D H P D E C I F V V N K P Y A I V  
S S S V S F W I P C C I M L F T Y W R I Y V E A T R Q E K M L C K S Q M G P A  
G M L C R N S T D L P N V H A P P H R N S H G D D P E S G Q S T P T K R T I  
N K M K R E H K A A K T L G I I M G A F I L C W L P F F L W Y V S V T M C G D  
A C P C P D L V D L L F W I G Y L N S S L N P V I Y A Y F N R E F R Q A F K  
E T L Q A I F C S C A G C E D
```

**Figura 17.** Secuencia tentativa de aminoácidos derivada de la EST TC4495. Las metioninas se indican en negritas.

El análisis de esta secuencia con el programa TMHMM, permitió reconocer siete  $\alpha$ -hélices transmembranales (Figura 18), que corresponden con la estructura básica de los receptores acoplados a proteínas G (7TM) o llamados de siete pasos transmembranales.



**Figura 18.** Predicción de la estructura del receptor putativo acoplado a proteínas G, del tipo octopamina, derivado de la EST TC4495, en *R. microplus*. Las barras en rojo representan las siete  $\alpha$ -hélices transmembranales, las líneas en azul representan regiones intracelulares, mientras que las líneas en rosa representan regiones extracelulares.

Con el uso del programa Predicted Antigenic Peptides se predijeron 13 probables péptidos antigénicos en la secuencia tentativa de la proteína, los cuales se muestran en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Predicción de péptidos antigénicos en la proteína derivada de la EST TC4495.

<b>N</b>	<b>Posición de inicio</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición de término</b>
1	25	WESVLKLVKTLALVTIISAVFGNLLVVTSVIRHHKL	62
2	66	TNYFIVSLALADTLVALFA	84
3	87	FNASVTI	93
4	99	FNQTVCDF	106
5	108	NSCDVLFSTASIMHLCCISVDRYYAIKPLEY	139
6	144	TGRTVAIMLACAWISSGLISFIPIF	168
7	176	EHLGYKL	182
8	184	HPDECIFVVNKPYAIVSSSVSFWIPCCIMLFTYWRIYVE	222
9	227	EKMLCKS	233
10	238	AGMLCRN	244
11	247	DLPNVHAP	254
12	285	AAKTLGIIMGAFILCWLPFFLWYVSVTMCGDACPCPDLVV DLLFWIGYLNSSLNPVIYA	343
13	353	FKETLQAIFCSCA	365

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de esta EST con secuencias relacionadas, muestra que existe una identidad entre ellas del 34.26% (Figura 19).

```

Rhipicephalus      -----AATCGTGGGAGAGCGTGCTCAAACCTGGTGTCTCAAGACGCTCGCG
Ixodes             -----TCC TGGGAGAGTGTCTCTCAAGCTGGTGTCTCAAGACGCTGGCC
Acyrtosiphon      GGGACGGCGGAAGATGTGGCCGCGGCCGTGGGCCCGGTGCTCGTCATCAAGACGGTGGCC
Drosophila        -----ACGAGGATTGGCTGGACAACATCGTTGGGTGTTC AAGGCCTTTGTC
Schistocerca      -----CACTGGTCTCAGTACTCATCTGGCGCTCAAGGGCACCGCC
Apis              -----AGCGAGGAGAAGTTGTTCGGTGCCTGTGACGATCGTGAAAGGTTGCGTG
                    . * . . .: . * **.. *

Rhipicephalus      CTGGTCACCATCATCTCCTCGGCAGTGTTCGGGAACCTGCTGGTGTCTCACGT CAGTCATA
Ixodes            CTGGTCACCATCATCTCGTTCGGCCGTGTTCGGCAATCTCCTGGTGTCTCACGT CCGGTGATC
Acyrtosiphon      ATGTGCTCGATAATATTGTGCGCGGTGCTGGGAAACGCTCTGGTGGTGTACAGCGTGGTG
Drosophila        ATGCTGCTCATCATCATCTGCGGCCATCTGCGGCAATCTGCTTGTATTATTCTGTGATG
Schistocerca      ATGGCGTGCATCATAGTCGCCGCCATCTCCTCGGAAACCTCCTGGTGTCTGAGCGTCATG
Apis              TTGGGCTCCATCATAGTGACCGCGGTGTTCGGCAATCTGTTGGTGTGGTGTTCGGTGTGATG
                    ** **..* . **.* ** ** * ** * . * : ** .

Rhipicephalus      CGGCACCACAAGCTGCGCATCACCACCAACTACTTCATCGTGTTCGCTGGCGCTGGCCGAT
Ixodes            CGGCACCACAAGCTGCGCATCACAACCAACTACTTCATCGTGTTCAC TGGCGCTGGCCGAC
Acyrtosiphon      CGGCACCGGAAGCTCCGCATACTACCAACTACTACGTGTTCGCTGGCGGTTCGCCGAC
Drosophila        CGTGTAGAAAATTAAGAGTTATAACGAATTACTTTGTAGTTTCC TTAGCCATGGCTGAT
Schistocerca      AGGCACCGCAAACCTGCGCATCATCACC AACTACTTCGTGTTCGCTGCGCTGGCCGAC
Apis              CGGCACAGGAAGCTGCGGATCATCACC AATTAATTCGTGGTCTCTTTAGCGTTGGCCGAC
                    .* : .. **.* . * . * . ** ** ** * : . * ** ** * ** * ** **

Rhipicephalus      ACGCTGGTGGCGCTGTTTCGCGATGACCTTCAACGCGTCCGTACCATCTCGGGCCGCTGG
Ixodes            ACTCTGGTGGCGCTCTTCGCGATGACCTTCAACGCGTCCGTGACCATTTTCGGGCCGCTGG
Acyrtosiphon      TTCCTGGTGGCGCTGTGCGCCATGTCGTTCAACGCCAGCGTCGAGATCACC GGAAAGTGG
Drosophila        ATAATGGTCGCTATTATGGCCATGACATTTAACTTTAGTGTGCAAGTAACTGGGCGGTGG
Schistocerca      CTGCTCGTCGCCATGGTTCGTCATGCCGTTCAACATGAGCGTGCAGATCAACGAGCGCTGG
Apis              ATGTTGGTCCCATGTTTCGCCATGACGTTCAACGCGAGCGTGCAATTGACCGGCAAATGG
                    * ** ** . * * ** * ** ** : ** . * : . * . . **

Rhipicephalus      CTCTTCAACCAGACAGTGTGTGACTTTTGGAACTCGTGTGACGTGCTCTTCAGCACGGCC
Ixodes            CTCTTCAACCAGACTGTGTGCGATTTTTGGAAC TCGTGGACGTGTCTTCAGCACGGCG
Acyrtosiphon      ATGTTTCGATACGTATGTGCGACGTTTGG AACAGCCTGGACGTGTACTTCTCCACCGCG
Drosophila        AACTTCAGCCCCTTCTGTGCGATTTGTGGAACAGCCTCGATGTCTACTTCTCAACAGCG
Schistocerca      CTGTTTCGGCTTCTTCATGTGTGACGTGTGGAAC TCGTGGACGTCTACTTCTCCACGGCG
Apis              CTGTTTCGGCTATTTTCATGTGTGCGACGTGTGGAATTCCCTGGACGTGTACTTTCAGCACCGAGC
                    . : **..* . ** ** * ** ** : ** ** : ** : ** . **

Rhipicephalus      TCCATTATGCACCTGTGTGCATCAGCGTAGACCGTACTATGCCATTATCAAGCCGCTC
Ixodes            TCCATCATGCACCTGTGTGCATCAGCGTGGACCGCTACTACGCCATTATTAACCGCTC
Acyrtosiphon      TCCATACTCCACCTATGCTGTATAAGCGTGGACCGTACTACGCCATCGTCAGCCCGCTG
Drosophila        AGTATTTTGCATTTATGCTATGCTGATCTGTGGATAGATACTATGCTATTGTTAAGCCCTC
Schistocerca      TCCATCCTTCACCTGTGTGTATCAGCGTGCATCGCTACTGGGCCATCGTGAAGCCGCTC
Apis              TCCATCCTCCATCTCATGTGCATCTCGGTGGACCGTACTGGGCGATCGTGAAACCGCTC
                    : ** * ** * : ** ** : ** ** . * ** . ** **

Rhipicephalus      GAGTACCCGACCAAATCACC GGCCGACCGTGGCCATTATGTTGGCCTGCGCGTGGATC
Ixodes            GAGTACCCAACCAAGATAACGGGCCGGACAGTGGCCATCATGCTGACTTGGCCCTGGGTG
Acyrtosiphon      CAGTACCCGATCACCATGACGCGCGTACCGTCTCTGTATATGCTGCTCAACGTGTGGACG
Drosophila        AAGTATCCGATTAGCATGACGAAACGCGTGGTTCGGCATTATGCTGTAAACACATGGATA
Schistocerca      AAGTACCCCATCAACATGACGAAGCGCTCGTTCGCTTTTCATGCTGGTGGCCTGGTGG
Apis              AAATATCCATTATCATGACCAGGAGGTTGGCCGCTACATGCTGCTGCCTGTTGGATA
                    *.** ** * * ** ** . . * * : : ** ** * **

```

Rhipicephalus AGTTCGGGCTCATATCGTTCATACCCATCTTCATGGGCTGGTACACGACGGAACAC  
Ixodes AGCTCGGGCTCATCTCCTTCATACCCATCTTCTGGGCTGGTACACGACGGAACGAGCAT  
Acyrtosiphon CTACCGGCGCTCATATCGTTCCTTCCGATATTCTTCGGTTGGTACACGACCGCCGAGCAC  
Drosophila TCGCCGGCACTGCTCCTCTTTCGCCCATCTTCATCGGCTGGTACACGACGCGCAGCAC  
Schistocerca TCCCCGGCTATCATATCCCTTCTTCCCATTTTTATGGGCTGGTACACGACGTTTCGAAAAC  
Apis TTGCCCGCTTCATCTCGTTCGTCGCCATTTTTATGGGATGGTACACCACGCGCAGAAC  
\* \* \* . \* . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . \* . \*

Rhipicephalus CTCGGCTACAAGCTCGACCACCCGGACGAGTGCATATTCTGGTGAACAAGCCGTACGCG  
Ixodes CTGGTGTACAAGTGGAGCACCCGGACGAGTGCATCTTCGTGGTGAACAAGCCGTACGCC  
Acyrtosiphon CAGGCGTTCGCGCCGAAGAACCCATTCGTCGTTTTTCGTCGTAACCGGTACTACGCG  
Drosophila CAGCAGTTCGTCATCCAGAATCCGACGCAATGCTCGTTCGTGGTGAACAAGTACTACGCC  
Schistocerca CAGAGGTTCCGCGAGGAGAACCCGACCTCTGCGAGTTCAAAGTGAACAAGTGGTACGTG  
Apis AGTATCGAAGGCAGAATCATCCGAGATATGCGAGTTTAAGGTGAACAAGATTTACGTG  
. . \* . \* \* \* . \* \* \* \* \* . : \* \* \* \* . \* \* \* \* \*

Rhipicephalus ATAGTGTGAGCAGCGTGTCTTCTGGATCCCATGCTGCATCATGTTGTTACATACTGG  
Ixodes ATCATTTGAGCAGCGTGTCTTCTGGATCCCCTGTTGCATCATGCTGTTACCTACTGG  
Acyrtosiphon ATCATATCGTCGTCTGTCTCGTTTTGGATACCCGGCGTCGTCATGATCGTCATGTACTAC  
Drosophila GTCATCTCGAGCTCCATATCGTTCTGGATACCCCTGCACCATTATGATAATTACCTACTTG  
Schistocerca GTCGTCTCGTCGCTGATCTCTTCTGGATCCCCTGCACCATCATGATCTTCACGTACCTG  
Apis ATATTCTCGTCGAGCGTCTCGTTCTGGATACCCCTGCACCATCATGACGCTCACGTATTTG  
. \* . \* \* \* : . \* \* \* \* \* . \* \* \* \* \* \* . \* . \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Rhipicephalus CGCATCTACGTGGAGGCCACGCGCCAGGAGAAGATGCT----CTGCAAGTCG--CA  
Ixodes CGTATCTACGTGAGGCCACACGCCAGGAGAAGATGCT----CTGCAAGTCG-----CA  
Acyrtosiphon AGGATTTACAAGAAGCCGTTTCGACACGACAAGCCCT----GTCCCGCACGTCCAGTAA  
Drosophila GCCATCTTCGCGGAAGCCAATCGGCAGGAGAAGCAGCTGATGATGCGGCACCGCAATGCC  
Schistocerca GCCATCTTTCGTGAGGCCAACCGCCAGGAGAAGCAGCTGCACTCGGCATCGGCAACCGCG  
Apis CCGGTGTTTAAAGAGGCCAACAGGCAGGAGAAGCAGATG-CACAGCAGGATGCGGAACGT  
. \* \* : \* \* \* . \* \* \* . . \* \* . . . \* . \* . \* : \*

Rhipicephalus GATGGGCCCCCGGCATG-----CTGTGCCGATCGACCGACCTGCCCAA  
Ixodes GATGGG---ACCCGGCATG-----CTGTGTGCAAAAT--TCGACCGATCAGAGCAT  
Acyrtosiphon TATAATTCTGAACAGCATA-----CATCAACACAGGGTTCAACACTACAGTCATA  
Drosophila ATGCTGATGCACCGACCAT-----CCATGCAGCCATCAGCCGAGGGCGCTGAGCGG  
Schistocerca ATGCTCATGAACCATACCGCAACAGCCGAGTACGCCAACAGCAACGGCGACGTCATG  
Apis GATGCTGTTGAGCCACAGCCGAGCAAGGATTTGAACAATTTGAACGGGAGTTGAACAG  
: \* \* \* . \* \* . . . \* \* . . \* \* \* . \* .

Rhipicephalus CGTGACGCG---CCGCCACCGGAECTCGCACGGCGACGACCCGGAGAGCGGC  
Ixodes G-----  
Acyrtosiphon GATTACGGCC-----TCCAGACAGCGAAAACATGTCAAATGGAACGTTACGACGGC  
Drosophila ATCCGGGTCG-----TCGAAAACATTCGACGCTGCACGAGGTCGAGCAGGAGCACACC  
Schistocerca AGCAGCAGCGGGCGCTCCTCCAAGACGCTCACCTTGACGAGGTCACCCACGGGGACGTCG  
Apis CGCGGGCTCG-----TCCAAGACGTTGACGTTGAACGAGATCAGTACCAATCACCTG

Rhipicephalus CAGTCGACGCCCCAACGACCATCAACAAGATGAAGCGAGAGCACAAGGGCGGC  
Ixodes -----CCCAACCGGAGCACAAGGCCGCG  
Acyrtosiphon GAAG-----ACCAGTACGAGTTGGAGGACCGAGCACAAGGTCGCT  
Drosophila CCCACTAAGGACAAG-----CACTTAATCAAAATGAAGCGGGAGCACAAGGCCGCA  
Schistocerca CACTCGACGCCCCAACGAGACCGCAACATCATCAAGATGAAGCGGAGCACAAGGGCGCG  
Apis CACACGCCACCAAGG---ACAAGAATATCATGAAGATGAAGAGAGAGCACAAGGCTGCG  
\* . . \* \* \* \* \* \* . \* \* \*

Rhipicephalus AAGACGCTTGGCATCATATATGGGCGGTTTCATCTCTGCTGGTTGCCCTTCTTCCTGTGG  
Ixodes AAGACGCTGGGCATTATATATGGGCGCTTCATCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCCTGTGG  
Acyrtosiphon CGCACGCTGGGAATCATCATGGGCGTATTCCTATTGTGCTGGTTGCCATTTTTCTTCTGG  
Drosophila CGCACGCTGGGCATCATCATGGGCACTTCATCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCCTGTGG  
Schistocerca CGGACGCTGGGCATCATCATGGGCACGTTTCATCTCTGCTGGCTGCCCTTCTTCCTGTGG  
Apis AGGACGTTGGGCATCATCATGGGCACCTTCATACTATGCTGGTTACCTTCTTCTTGTGG  
. . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* . \* \* \* . \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

```

Rhipicephalus      TACGTGTCGGTGACCATGTGCGGCGACGCCTGCCCTTGCCCCGACCTGGTGGTGGACTTG
Ixodes              TACGTGTCCATCACCATGTGCGGCGATGCCTGCCCCTGCCCGGAGCTGGTGGTGGACCTG
Acyrtosiphon       TATGTGATATCGACTTTATGCGGAGATCCATGTAGCTTCCCGAAACACTTGTGACCGTG
Drosophila          TAC---ACACTCTCCATGACCTGCGAGGTGTGCCAAGTGCCCGACATAGTCGTCTCGATC
Schistocerca        TACGTGTCAACGTGCGTGTGCG---ACACCTGCCCCTGCCCGGAGCTGGTGTGTCGACCTG
Apis                TACGTTATCACAACGTTGTGCGGGGAATCCTGTCCGTGCCCGGACGTTGTGATCGCCCTG
                    **      :      :*  *.: *   *   ** .   ** **      * . *   .   *

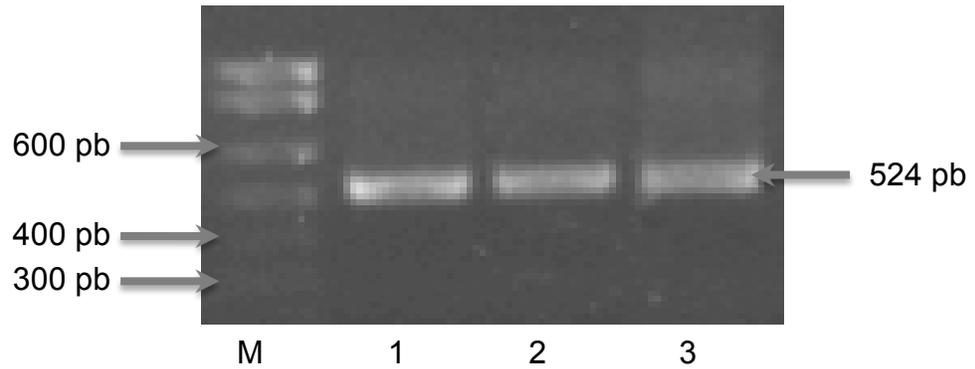
Rhipicephalus      CTCTTTTGGATCGGATACCTCAACTCGTCGCTCAACCCGGTCATTTACGCCTACTTCAAC
Ixodes              CTCTTCTGGATCGGATACCTCAACTCCTCGCTCAACCCGGTCATCTACGCCTACTTCAAC
Acyrtosiphon       TTGTTTTGGATTGGTTATTTCAATTCATCACTGAACCCCTTGATATATGCCTACTTTAAT
Drosophila          CTCTTCTGGATCGGGTACTTCAACTCAACGCTAAACCCGCTGATCTACGCGTACTTTAAC
Schistocerca        GTCTTCTGGATCGGCTACTTCAACTCGACGCTGAACCCCATCATCTACGCGTACTTCAAC
Apis                CTTTTCTGGATCGGGTACACGAATTCGGCGCTGAACCCGTTGATCTACGCGTACTTCAAC
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Rhipicephalus      AGAGAGTTCGCCAGGCCTTCAAGGAGACTCTGCAGGCCATCTTCTG-----
Ixodes              CGAGAGTTCGCCAGGCCTTCAAGGAGACGCTGCAGGCCATCTTCTG-----
Acyrtosiphon       AGAGACTTCAGGGAAGCATTCAAAAATACGCTTCAATGTGTGTTCCCGTGTGTGTCAGTCA
Drosophila          CGCGACTTCGGGAGGCGTTCGCAACACGCTGCTCTGTCTGTTCTG-----
Schistocerca        CGCGACTTCGGGAGGCGTTCAGAACACGCTGCAGTGCGCCTTCTG-----
Apis                CGCGACTTCGAGAAGCTTCAAGAATACTCTGCAGTGCAGTTCGCTCTGCAGA
                    . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 19.** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la EST TC4495 de *R. microplus*, con receptores acoplados a proteínas G, del tipo octopamina conocidos. Los nucleótidos idénticos se indican con asteriscos. *Rhipicephalus microplus* (TC4495), *Ixodes scapularis* (XM\_002411090.1), *Acyrtosiphon pisum* (XM\_001948486.2), *Drosophila melanogaster* (AJ880689.1), *Schistocerca gregaria* (GU237483.1), *Apis mellifera* (XM\_003249170.1).

Para todas las reacciones de amplificación de las ESTs de interés, se utilizó como control de amplificación el gen de actina de *R. microplus*. En la Figura 20 se presenta una fotografía representativa de la amplificación del gen de referencia, en donde se observa un amplicón de 524 pb.



**Figura 20.** Amplificación de un fragmento del gen de actina en *R. microplus*. Este gen se utilizó como control de amplificación. M=marcador de tamaño (1 Kb), 1=huevo de 8 días, 2=huevo de 24 días, 3=intestino de hembra adulta repleta.

## 11. DISCUSIÓN

El estudio y caracterización de genes que codifican para proteínas de superficie celular en la garrapata *R. microplus* es importante, ya que éstas pueden estar implicadas en el desarrollo de resistencia a los acaricidas químicos en garrapatas expuestas, y a su vez pueden servir para el diseño racional de nuevos agentes acaricidas. Asimismo, pueden ser útiles para desarrollar nuevas vacunas anti garrapata. El presente trabajo se enfocó hacia la caracterización parcial de secuencias ESTs que codifican tentativamente para proteínas de membrana en *R. microplus*. A través de la amplificación por PCR y el análisis *in silico*, se lograron identificar cinco secuencias con estas características. Se pudo determinar que existe una expresión diferencial de las ESTs en los estadios de desarrollo de huevo y adulto, así como entre dos tejidos adultos (intestino y ovario), lo que puede reflejar la participación espacio-temporal de estos genes en el desarrollo de la garrapata.

En 1998, por primera vez, Crampton *et al* aislaron e identificaron 234 ESTs de genes expresados en etapa larvaria en *R. microplus*. Estas secuencias fueron depositadas en la base de datos Genbank y así se marcó un inicio en el ámbito de la investigación genómica de *R. microplus* y su control.

El presente trabajo se enfocó a la caracterización parcial de algunas de las secuencias ESTs reportadas por Guerrero *et al.*, 2005. Entre las ESTs parcialmente caracterizadas, es probable que tres codifiquen para receptores GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico). TC3327 y BEACJ17TR codifican tentativamente para receptores tipo GABA-A, y TC4791 codifica para un receptor tipo GABA-B. Se conoce que el GABA funciona como el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de vertebrados e invertebrados. Normalmente, cuando el GABA es liberado de la terminal nerviosa presináptica, se liga a la proteína de un receptor postsináptico que contiene un canal interno de iones cloro (Cl<sup>-</sup>). En este proceso existen dos tipos de receptores el GABA-A y el GABA-B; cuando el GABA es liberado de la neurona presináptica se liga al receptor GABA-A, por consiguiente se abre el canal, y los iones fluyen hacia la neurona postsináptica. Esta permeabilidad del cloro puede causar una hiper-polarización significativa (más negativa), y el potencial de la membrana tiene un efecto depresor sobre los disparos de los impulsos nerviosos. Con respecto al GABA-B, es un receptor que necesita de una proteína G, por lo tanto es un segundo mensajero (receptor metabotrópico), la función de la proteína G es abrir el ligando, la membrana postsináptica se vuelve permeable al ion K<sup>+</sup>, lo que ocasiona que el ion K<sup>+</sup> salga de la membrana y por consiguiente se hiper-polariza e impide la propagación del impulso nervioso (Corley *et al.*, 2012). Ambos receptores pueden representar blancos importantes para los acaricidas.

Por otra parte, la EST TC2637 codifica tentativamente para un canal de cloro modulado por glutamato. La información disponible indica que la ivermectina (antiparasitario) se une selectivamente y con gran afinidad a este canal, que se encuentra en las células nerviosas y musculares de los invertebrados. Ello conduce a un incremento en la permeabilidad de la membrana celular a los iones cloruro e hiperpolarización, que da como resultado la parálisis y muerte del parásito (Ikeda *et al.*, 1989). Esta información nos da la pauta para seguir trabajando con esta secuencia y caracterizar el receptor completo.

La amplificación por PCR de la secuencia TC4791 presentó dos productos, estos productos pudieran representar isoformas del gen de interés, no obstante, tampoco se descarta que sean productos inespecíficos de la reacción.

Finalmente, la secuencia EST TC4495 codifica para un receptor acoplado a proteínas G del tipo octopamina. En la amplificación por PCR adicionalmente, se presentó un fragmento de aproximadamente 800 pb en la muestra de huevo de 24 días, el cual puede ser un producto inespecífico, sin embargo será importante confirmar o descartar esta posibilidad mediante estudios adicionales. En 1999, Baxter y Barker reportaron el aislamiento de un cDNA codificante de un receptor de este tipo, en la garrapata *R. microplus*. La comparación de secuencias indica que no se trata del mismo receptor, si bien, son moléculas muy relacionadas entre sí (datos no mostrados). Por lo tanto, será importante realizar la caracterización completa de este nuevo receptor, e investigar su posible participación en la resistencia a acaricidas en *R. microplus*.

Estos hallazgos aportan nuevos conocimientos a la información genómica de la garrapata *R. microplus*, y en un futuro inmediato permitirán ampliar los estudios sobre los mecanismos de resistencia a diversos acaricidas, así como el diseño racional de nuevos agentes de control. Al mismo tiempo, estos genes pueden representar nuevos blancos moleculares para el desarrollo de vacunas antigarrapata.

El desarrollo de una vacuna inicia con la identificación de aquellas moléculas capaces de generar una respuesta inmune protectora. Usando técnicas tradicionales este proceso lleva comúnmente a ensayos de prueba y error y a la eliminación de algunos candidatos en estudio. El análisis *in silico* del presente trabajo permite la identificación racional de las proteínas que pudieran estar localizadas en la superficie celular de los diferentes tejidos (intestino y ovarios) expuestas al sistema inmune y así minimizar los ensayos de prueba y error en el diseño de una vacuna subunitaria (Zagursky *et al.*, 2003).

Con la ayuda del programa “Predicted Antigenic Peptides”, para cada una de las secuencias ESTs se predijo diferente número de epítomos, lo cual implica que si el bovino fuera inmunizado con estos antígenos, sería capaz de producir anticuerpos dirigidos contra estos péptidos, los cuales pudieran ser inmunoprotectores. El desarrollo de este trabajo permite contar ahora con información valiosa, que será de mucha utilidad para el diseño de vacunas contra la garrapata *R. microplus*.

Algunas vacunas han sido incorporadas a diversos ensayos clínicos, basadas en nuevos antígenos descubiertos mediante minería de genomas; tal es el caso de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (Pizza *et al.*, 2000). La compañía de vacunas Chiron, en colaboración con el Instituto de Investigaciones Genómicas (TIGR) de los Estados Unidos, secuenció el genoma completo del meningococo de la cepa virulenta MC58 del sero grupo B (Tettelin *et al.*, 2000). Durante los meses que duró la secuenciación del genoma, y mientras se descifraban las secuencias nucleotídicas de todos los genes, un grupo de bioinformáticos detectó más de 600 candidatos vacunales mediante análisis *in silico*. De estos candidatos, 350 fueron clonados y expresados en *Escherichia coli* y posteriormente usados para inmunizar ratones (Pizza *et al.*, 2000). El antisuero obtenido fue evaluado mediante ELISA de células completas y por el análisis del tipo de células activadas por fluorescencia (FACS), para verificar que estas proteínas fueran antígenos expuestos en la superficie del meningococo. Adicionalmente, a estos sueros se les determinó la actividad bactericida, parámetro que correlaciona con la protección en humanos. Finalmente, 91 nuevos antígenos de superficie fueron identificados, de los cuales 29 indujeron anticuerpos bactericidas. Después de evaluar la variabilidad de las secuencias de estos candidatos entre numerosos aislamientos clínicos, el número se redujo a siete (Holst *et al.*, 2003).

Este estudio ha demostrado que, el enfoque de generación y caracterización de ESTs, ante la falta de proyectos de secuenciación de genomas de especies de interés como *R. microplus*, es una poderosa herramienta para generar información genómica, en un tiempo razonable. El aislamiento y caracterización de nuevos genes permitirá investigar y responder importantes cuestiones biológicas, y dentro de pocos años se espera una nueva generación de vacunas compuestas por predicción *in silico*.

## 12. CONCLUSIONES

1. Se logró realizar la amplificación de las ESTs TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495, cuyos productos de PCR correspondieron con el tamaño esperado. Asimismo, fue posible apreciar diferencias cualitativas en su expresión, en los diferentes tejidos de la garrapata *R. microplus*.
2. La utilización de la herramienta “Translate” permitió determinar el marco de lectura abierto tentativo de aminoácidos en las secuencias ESTs BEACJ17TR, TC2637 y TC4495.
3. La utilización de la herramienta “TMHMM” permitió determinar los dominios transmembranales, así como las regiones intra y extra celulares de las proteínas tentativas de las secuencias ESTs BEACJ17TR, TC2637 y TC4495.
4. La utilización de la herramienta “Predicted Antigenic Peptides” permitió determinar los péptidos antigénicos de las proteínas tentativas en las secuencias ESTs TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495.
5. Con la utilización de la herramienta “ClustalW” se logró establecer el grado de similitud de las secuencias ESTs TC3327, BEACJ17TR, TC4791, TC2637 y TC4495, con secuencias génicas relacionadas de otros organismos, si bien, faltaría determinar la secuencia completa de las mismas.

### **13. PERSPECTIVAS**

La caracterización de secuencias ESTs conducirá al desarrollo de vacunas antigarrapata, ya que esto permitirá identificar los antígenos con mayor potencial de ser candidatos vacunales de una forma relativamente rápida.

El estudio de secuencias ESTs permitirá conocer la fisiología celular en la garrapata, ya que los receptores de superficie celular son el blanco para el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad insecticida, acaricida o el desarrollo de vacunas.

Se podrá profundizar en el estudio de los mecanismos de resistencia a los acaricidas químicos, ya que con estas aportaciones se podrán valorar las alteraciones en las secuencias de los genes caracterizados.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman, S., Clare, F.B., McGill, T.W. and Sonenshine, D.E. (1981) Passage of host serum components including antibody across the digestive tract of *Dermacentor variabilis*. *International Journal for Parasitology*, 67:737-740.
- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Xiao, H., Merril, C.R, Wu, A., Olde, B. and Moreno, R.F. (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252(5013): 1651-6.
- Aeschlimann, A. M., Brossard, T., Haug. and Rutti., B (1989) Tick vaccine. *Verh. Deutsche Zoology Gesellschaft*. 82: 95-110.
- Angus, B.M. (1996) The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia y achievements in its control. *International Journal for Parasitology*, 26(12): 1341-1355.
- Anónimo (1997) Cómo combatir garrapatas con la vacuna gavac. En: México Ganadero. Órgano oficial de la Confederación Nacional Ganadera. No. 429 pp. 14-15.
- Aguirre, H.D., M.M Cafrune and Guglielmone, A.A. (2000) Experimental infestation of llamas (*Lama glama*) with *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) *Experimental and Applied Acarology*, 24: 661-664.
- Balashov, Y.S. (1972) Bloodsucking ticks (Ixodidae) vector of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, 8: 161-376.
- Balladares, C. (1983) Dinámica de la garrapata en Nicaragua. MIDINRA. Centro Nacional de Diagnóstico e Investigaciones veterinarias. Empresa Nicaragüense de Ediciones Culturales. 1 ed.Tomo I. Managua, Nicaragua, pp 33-58.
- Barre, N. (1988) Mesures agronomiques permettant one diminution des populations de la tick *Amblyomma variegatum* .*Revue d' Élevage et de Médecine . Veterinaire des Pays Tropicaux*, 41 (4): 387-393.
- Barker, S.C. and Murrell, A. (2004) Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129:15-36.
- Baxter, G.D. and Barker, S.C., (1999) Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 461–467.

- Beati, L. and Keirans, J.E. (2001) Analysis of the systematic relationships among tick of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequence and morphological character. *Journal of Parasitology*, 87(1): 32-48.
- Bettler, B., Kaupmann, K. and Mosbacher, J. (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA-B receptors. *Physiological Reviews*, 84: 835-867.
- Boyce, W.N and Brown, R.N.(1991) Antigenic characterization of *Psoroptes spp* (Acari: Psoroptidae) mites from different hosts. *International Journal for Parasitology*, 77: 675-679.
- Bowman, A.S., L.B Coons., G.R. Needham and J.R. Sauer (1997) Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Medical and Veterinary Entomology*, 11: 277-285.
- Bram, R.A (1994) Integrated control of ectoparasites In: ectoparasites of animals and control methods. *Review of Science Technology*. 13: 1357-1365.
- Brown, R.N and Lane R.S. (1992) Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Science*, 256: 1439-1442.
- Brown, W.C., Normine, J., Goff, W.L., Suarez, C.E. and McElwain, T.F. (2006) Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunology*, 28(7): 315-27.
- Bruning, A. (1996) Equine piroplasmiasis an update on diagnosis. *Treat and Prevention (review)*. *British Veterinary Journal*, 152 (2): 139-151.
- Buckzek, A. and Bartozick, K. (2006) Tick host interactions. *Przegląd Epidemiologiczny*, 1:28-33
- Buitrago, M. y Cobas, E. (2001) *Parasitología Animal I. Nicaragua*. Compilación, pp 8-11,13, 62-63. Folleto.
- Castellanos, JL. (1998) Seguimiento a predios con garrapata resistente hacia los ixodidas y alternativas para su control. Curso de diagnóstico y control de las principales enfermedades parasitarias. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. Ciudad Victoria, Tamps. México.
- Castro, JJ. (1997) Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*, 71:77-97.
- Castro, M.B. and Wright. S.A. (2007) Vertebrate hosts of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in California. *Journal of Vector Ecology*, 32: 140-9.

Canestrini, (1887) Acari: Ixodidae in cattle in Minas Gerais State Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 32: 375-380.

Cen A. J., Rodriguez, R.I., Dominguez , A. J. and Wagner, G. (1998) Studies on the effect on infection by *Babesia spp* on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 78: 253-257.

Chema, S. (1990) Summing-up of strategies for the control of ticks in Africa. *Parasitology*, 32: 201-202.

Cordero, M y Lombardero, O. (1999) *Parasitología Veterinaria*. Mc Graw Hill Interamericana. 1ª ed. Madrid España, pp 420-421, 427-428.

Corley, S.W., Piper, E.K., and Jonson, N.N (2012) Generation of full-length cDNAs for eight putative GPCnR from the cattle tick, *R. microplus* using a targeted degenerated PCR and sequencing strategy. *PLOS ONE*, 7(3), e32480.

Crampton, A.L., C. Miller G.D. Baxter and S.C. Barker (1998) Expressed sequence tags and new genes from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, 22:177-186.

Crause, J.C., Verschoor, J.A., Coetzee, J., Hoppe, H.C., Taljard, J.N., Neitz, W.H. and Gothe, R (1993) The localization of a paralysis toxin in granules and nuclei of prefed female *Rhipicephalus evertsi evertsi* tick salivary gland cells. *Experimental and Applied Acarology*, 17(5): 357-363.

Cruz, V.C. (1995) Caracterización inmunoquímica de proteínas de superficie de intestino de garrapatas *Boophilus microplus*. Tesis de doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Cupp, E.W (1991) Biology of ticks. *Veterinary Clinics of North America*, 21(1): 1-26.

Davey, R.B., Ahrens E.H. and George J.E. (1997) Comparative effectiveness of coumaphos treatments applied by different methods for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Agricultural Entomology*, 14(1): 45-54.

Davey, R.B. and George J.E (1999) Efficacy of coumaphos applied as a dip for control of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Journal of Economic Entomology*, 92(6): 1384-1391.

De la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Kocan., K.M. and Sonenshine, D.E. (2008) Overview: Ticks as vector of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*, 13: 6938-6946.

Dreyer, K., Fourie, L.J and Kok, D.J. (1997) Predation of livestock ticks by chickens as a tick-control method in a resource-poor urban environment. *Orderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64: 273-276.

Drugueri, L. (2004) Garrapatas del ganado bovino. Argentina. Disponible en <http://www.zoetecnocampo.com/forog/Forum2/HTML/000226.html> . Último acceso 27/02/2013

Estrada-Peña, A., García, Z., Fragosó S.H. (2006) The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in México. *Experimental and Applied Acarology*, 38: 307-316

FAO (1984) Ticks and tick-borne disease control. A practical field manual. Vol. II, Tickborne Disease Control, FAO, Rome, pp 301-621.

FAO (1987) El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual práctico de campo. Vol I y II Roma.

FAO (1996) Food requirements and population growth. WFS 96/ Tech/10. World Food Summit, pp 60.

Felz, M.V., Durden, L.A and Oliver, J.H (1996) Ticks parasitizing humans in Georgia and South Carolina. *Journal of Parasitology*, 82(3): 505-508.

Flores, J. (2008) Farmacología humana. Quinta edición, Barcelona: Elsevier Masson, pp 503-505.

Frish, E.J (1999) Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *International Journal for Parasitology*, 29: 57-71.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., Bairoch, A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31: 3784-3788.

Garris, G.I. (1991) Control of ticks. *Veterinary clinics of North America*, 21 (1): 173-183.

George, E.J (1990) A summing-up of strategies for the control of ticks in regions of the world other than Africa. *Parasitology*, 32:203-209

Georghiou, G.P. (1983) Pest resistance to pesticides. Plenum Press, New York, pp 809.

Grupo latino. (2004) Volvamos al campo. Manual del ganadero actual. Tomo I. Grupo latino Ltda. 4 ed. Colombia, pp 575-576. 580-582.

- Ghosh, S.K and Nanda, S.K. (1997) Therapeutic efficacy of butox (Deltamethrin) against cattle tick, *Boophilus microplus* in Tripura. Indian Veterinary Journal, 74(3): 250-251.
- Guarente, L. (1997) Aging what makes US ticks. Science. 275: 943-944.
- Guerrero, F.D., R.J Miller., Rousseau, M.-E., Sunkara, S., Quackenbush, J, Lee, Y, and Nene, V. (2005) BmiGI: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30: 585-595.
- Hernandez, F., Teel, P.D., Corson, M.S and Grant, W.E. (2000) Simulation of rotational grazing to evaluate integrated pest management strategies for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Venezuela. Veterinary Parasitology, 139-149.
- Hill, C.A. and Gutierrez, J.A. (2000) Analysis of the expressed genome of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) using an expressed sequence tag approach. Microbial Comparative Genomics, 5: 89-101.
- Hoffman, A. y López-Campos, G. (2000) Biodiversidad de los ácaros en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. CONABIO UNAM. México.
- Holst, J., Feiring, B., Fuglesang, J.E., Hoiby, E.A., Nokleby, H and Aaberge, I.S. (2003) Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. Vaccine, 21(7-8): 734-737.
- Hoogstraal, H. (1977). Pathogens of Acarina (ticks) en: Roberts and Strand (editors), Pathogens of medically important arthropods. Supplement No 1. Bulletin, WHO, 337-342.
- Hoogstraal, H. (1978) Biology of ticks. Tropical Medicine Veterinary, pp 3-14.
- Horak, I.G., Fourie, L.J. and J Vanzyl J.M. (1995) Arthropod parasites of impalas in the Kruger National Park with particular reference to ticks. South African Journal of Wildlife Research, 25(4): 123-126.
- Hugh-Jones.; Barre, N., Nelson G., Wehnes K. Warner J.(1992) Landsat. Identification of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) habitats in Guadeloupe. Remote Sens Environmental, 40: 43-55.
- Ikeda, H H. (1987) Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Journal of Bacteriology, 169(12): 5615–5621.

Jentsch, T. J., Stein V., Weinreich, F. and Zdebik, A. A. (2002) Molecular structure and physiological functions of chloride channels. *Physiological Reviews*, 82: 503-568.

Jongejan, F. and Uilenberg, G. (1994). Ticks and control methods. *Revue Scientifique et Technique Office International*, 13: 1201-1226.

Johnson, E.M., Ewing, S.A., Barker, R.W., Fox, J.C., Crow, D.W and Kokan, K.M (1997) Experimental transmission of *Erlchia cannis* (Rickettsiales: Erlichiae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Nodidae). *Veterinary Parasitology*, 74: 277-288.

Jonsson, N.N., Mayer, G.D., Matschoss, L.A., Green, E. P. and Ansell, J. (1998) Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. *Veterinary Parasitology*, 79(1): 65-77.

Kalsbeek, V., Frandsen, F and Steenberg, T. (1995) Entomopathogenic fungi associated with *Ixodes ricinus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 19: 455-1

Kaufman M W. and Lomas, L.O. (1996) Male factors in ticks- their role in feeding and egg development. *Invertebrate Reproduction and Development*, 30 (1-3): 191-198.

Kaaya, G.P and Hassan, S. (2000) Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*, 24(12): 913-926.

Keirans, J.E., Hutcheson, H.J., Purden, L.A. and Klompen, J.S.H. (1996) *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae)-Redescription of all active stages, distribution, host, geographical variation, medical and veterinary importance (review). *Journal of Medical Entomology*, 33(3):297-318.

Kemp, D.H., Mc Kenna, R.V., Thullner, R. and Willadsen, P. (1999) Strategies for tick in a world acaricide resistance. *Tropical Agriculture*. En: IV Seminario Internacional de Parasitología Animal, Puerto Vallarta, México, 1-10.

Klompen, J.S.H., Black, W.C., Keeirans J.E. and Norris, D.E. (2000) Systematic and biogeography of hard ticks, a total evidence approach. *Cladistics*, 16: 79-102.

Kolaskar, A. and Tongaonkar, A. (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigenic. *Elsevier*, 276 (1-2): 172-174.

Kollars, T.M. (1996) Interspecific differences between small mammals as host of immature *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and model for detection of high risk areas of Rock Mountain Spotted Fever. *Journal of Parasitology*, 82(5): 707-710.

- Krober, T. and Guerin, P.M. (2000) The dynamics of an avoidance behavior by ixodid ticks to liquid water. *Journal of Insect Behavior*, 13(3): 397-420.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305: 567-580.
- Labruna, B.M., Naranjo, V., Mangold, J.A., Thompson, C., Estrada-Peña, A., Guglielmone, A.A., Jongejan, F. and de la Fuente, J. (2009) Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 46-58.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Willm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J and Higgins, D.G. (2007) Clustal W. and Clustal X. *Version 2 Bionformatics*, 23(21): 2947-8
- Lawrence, J.A., Musisi, F.L., Mfitilodze, M.W., Tjornehoj, K, Whiteland, A.P., Kafuwa, P.T and Chamambala, K.E (1996) Integrated tick and tick-borne disease control-trials in cross bred dairy cattle in Malawi. *Tropical Animal Health and Production*, 28 (4): 280-288.
- Lima, W.S., Ribeiro, M.F. and Guimaraes, M.P. (2000) Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil *Tropical Animal Health Production*, 32: 375-380.
- Marín, A. (2004) Medicina alternativa en la prevención y control de enfermedades del ganado bovino. Conferencia en Santiago de Chile.
- Martínez, J. (2002) Garrapato bovino. Disponible en [http://www.carrapatobovino.com/ciclo\\_de\\_vida\\_do\\_carrapato.html](http://www.carrapatobovino.com/ciclo_de_vida_do_carrapato.html)
- Meltzer, M.I (1996) A possible explanation of the apparent breed-related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestation. *Veterinary Parasitology*, 67(3-4): 275-279.
- Morrison. W.I. (1996) Sub unit vaccines for complex tick-borne pathogens- dream or reality. *British Veterinary Journal*, 152(6): 617-619.
- Miramontes P (1992) Un modelo de autómatas celulares para la evolución de los ácidos nucleicos. Tesis de doctorado en matemáticas. UNAM.
- Munderloh, U.G., Blouin, E.F., Kocan K.M., Ge N.L., Edwards W.L. and Kurtti T.J. (1996) Establishment of the tick (Acari: Ixodidae) borne cattle pathogen

*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *Journal of Medical Entomology*, 33(4): 456-464.

Munderloh, U.G. and Timothy, J.K. (1995) Cellular and molecular interrelationship between ticks and prokariotic tick-borne pathogens. *Annual Review of Entomology*, 40: 221-243.

Nolan, J. and Schnitzerling, H.J. (1986) Drug resistance in arthropod parasites, pp.603-620. In W.V. Campbell and R.S. Rew (eds) *Chemotherapy of parasitic diseases*. Plenum, New York.

Nolan J. (1990) New approaches in the development and management of drugs used in ectoparasites control. *Veterinary Parasitology*, 25: 135-145.

Norval, R.A.I., Sutherst, R.W., Gibson, J.D. Kerr, L.M. and Ellenhauge, A. (1997) The effects of the brown ear-tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, on milk production in dairy cattle. *Medical Veterinary Entomology*, 11: 155-158.

Ohta, M., Kawazu, S.I., Tsuji N., Terada, T. Kamio and Fujisaki K. (1995) Rapid and sensitive method for detection of newly isolated babesia parasite (*Babesia* spp) in the anticipated vector-tick using the polymerase chain reaction technique. *Journal of Protozoology Research*, 5(3): 108-117.

O'Kelly, C (1981) Metabolic changes in cattle due to the specific effect of the tick *Boophilus microplus*. *British Journal of Nutrition*, 45(3): 557-566.

Oliver, J.H. (1996) Lyme borreliosis in the Southern United States. A review *Journal of Parasitology*, 82(6): 926-935.

Ortiz, E. M., Santamaría, V.M., Ortiz N.A., Soberanes, C.N., Osorio, M.J., Franco, B.R., Martínez, I.F. y Fragoso, S.H. (1995) Caracterización de la resistencia de *Boophilus microplus* a ixodicidas en México. *Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal, Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria*. Acapulco, Guerrero, México: 58-66.

Pareja, R.M. (1992) El manejo integrado de plagas: componente esencial de los sistemas agrícolas sostenibles. *Manejo integrado de plagas*, 24: 44-50

Parmar, A., Grewal, A.S and Dhillon, P. (1996) Immunological cross-reactivity between salivary gland proteins of *Hyalomma anatolicum* and *Boophilus microplus* ticks. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51(3-4): 345-352.

Pegram, R.G., James, A.D., Killorn, K.J., Lemche, J., Ghirotti, M., Tekle, Z., Chizyuka, H.G., Mwase, E.T. and Cllizyuka, F. (1991) Studies on the economics of ticks in Zambia. *Experimental and Applied Acarology*, 12: 9-26.

- Pinto, A.D.S., Barreto, C.C., Schrank, A., Ulhoa, C.J. and Vainstein, M.H. (1997) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(4): 322-327.
- Pizza, M., Scarlato, V., Masignani, V., Giuliani, M.M., Arico, B. and Comanducci, M. (2000) Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287(5459): 1816-1820.
- Pruett, J.H. (1999) Immunological control of arthropod ectoparasites. A review. *International Journal of Parasitology*, 29: 25-32.
- Quiroz, R.H. (1999) Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa, México, pp767-802.
- Rechav, Y. (1987) Resistance of Brahman and Hereford cattle to African ticks with reference to serum gamma globulin levels and blood composition. *Experimental and Applied Acarology*, 3: 219-232.
- Redondo, M., Fragoso, H., Ortiz M., Montero, C., Lona, J., Medellín, J., Fría R., Hernández, V., Franco, R., Machado, H., Rodríguez, M. and de la Fuente, J. (1999) Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Experimental and Applied Acarology*, 23(10): 841-849.
- Roeder, T. (2005) Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annual Review Entomology*, 50: 447-477.
- Rodríguez, V.M (2000) Respuesta inmunológica contra garrapatas. *Revista de Biotecnología Aplicada*, 17: 215-220.
- Rosario-Cruz, R., Almazan, G.C., Saltijeral, O.J., de La Fuente, J. (2010) *Boophilus microplus* biological and molecular aspects of acaricide resistance and their impact on animal health. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12:181-192.
- Rosario-Cruz R., Guerrero F.D., Miller R.J., Rodríguez-Vivas R.I., Domínguez-García D.I., Cornel A.J., Hernández-Ortiz R. and George J.E. (2005) Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in a population of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 42: 1020-1025.
- Ribeiro, J.M. (1987) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology*, 32 (1): 463.

- Román.P.H. (2005) Potencial de producción de los bovinos en el trópico de México. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH. Centro Experimental Pecuario. Paso del toro Veracruz México, 3: 394.
- Roush, RT. and McKenzie, A.(1987) Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annual Review of Entomology, 32: 361-380.
- Rozen, S. and Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In: Misener, S. and S.A. Krawetz (Eds.). Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc., Totowa (NJ): 365-386.
- Samish, M. Pipano E. and Hadani, A. (1993) Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. American Journal of Veterinary Research, 54(3): 411-414.
- Schillhorn van Veen, T.W. (1997) Traditional methods of animal parasitic disease control. Veterinary Parasitology, 71: 177-194.
- Shipley, M.M., Dillwith J.W., Essemberg, R.C., Howard, R.W and Sauer J.R (1994) Analysis of lipids in the salivary glands of *Amblyomma americanum* (L.): detection of a high level of arachidonic acid. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 23: 37-52.
- Sieghart, W. (1992) GABA-A receptors: ligand gated Cl ion channels modulated by multiple drug-binding sites. Trends in Pharmacological Sciences, 13: 446-450.
- Smith, G.B and Olsen, R.W. (1995) Functional domains of GABA-A receptors. Trends in Pharmacological Sciences, 16: 162-168.
- Solís, S. (1991) Epidemiología de las garrapatas *Boophilus spp.* y *Amblyomma spp.* en México. En: Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal: Garrapatas y enfermedades que transmiten. SARH-CONASA-INIFAP-IICA, Oaxtepec, Mor, México pp. 19-30.
- Spickett, A.M. (1994) Tick ecology. International Journal for Parasitology, 24(6): 845-849.
- Stephenson, J.R. (1995) Rapid vaccination protocols for commercial vaccines against tick-borne encephalitis. Vaccine, 14(2): 181.
- Sutherst, R. W. (1983) Management of arthropod parasitism in livestock. World association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Ed. Dansmore: pp. 41-56.

Sutherst, R. W. A (1989) Resistance of cattle ticks as one element in a tick control programme. The eradication of tick. FAO. Rome. Italy. Pp. 154-164.

Teel, P. D. (1991) Application of modelling to the ecology of *Boophilus annulatus* (Say) (Acari: Ixodidae). Journal of Agriculture Entomology, 8(2): 291-296.

Tettelin, H., Saunders, N.J., Heidelberg, J., Jeffries, A.C., Nelson, K.E. and Eisen, J.A. (2000) Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. Science, 287(5459):1809-1815.

Utech, K B W., Wharton, R H and Kerr, J D. (1978) Resistance to *Boophilus microplus* in different breeds of cattle. Australian Journal of Agricultural and Resource Economics, 29: 885-895.

Uilenberg, G. (1996) Integrated control of tropical animal parasitoses. Tropical Animal Health and Production, 28(4): 257-265.

Uilenberg, G., Goff, W.L. (2006) Polyphasic Taxonomy. Annals of the New York Academy of Sciences, 1081: 492-497.

Vaz, J.I.S., Martínez R.H., Oliveira, A., Heck, A., Logullo, C., Gonzales, J.C. Dewes, H. and Masuda, A. (1996) Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. Veterinary Parasitology, 62(1-2): 155-160.

Voltzit, O.V. (1996) Functional morphology of support-fixation apparatus in the family ixodidae (Acarina). Zhurnal obshchei Biologii, 57(4): 469-489.

Waller, P.J (1999) International approaches to the control of integrated control of nematode parasites of livestock. International Journal for Parasitology, 29: 155-164.

Wang, H. and Nutall P.A. (1999) Immunoglobulin-binding proteins in ticks: New target for vaccine development against a blood-feeding parasite. Cellular and Molecular Life Sciences, 56: 286-295.

Willadsen, P. and Kemp, D.H. (1998) Vaccination with concealed antigens for tick control. Parasitology Today, 4: 196-198.

Willadsen, P. and McKenna, R.V. (1983) Binding of antigens to tissues: The example of *Boophilus microplus* and bovine skin. International Journal for Parasitology, 13: 593-598.

Willadsen, P. (2001) The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. Veterinary Parasitology, 101: 353-363.

Wilkinson, P.R. and Wilson T.J. (1958) Survival of cattle in central Queensland pastures. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9: 130-143.

Wilkinson, P.R. (1957) The spelling of pastures in cattle tick control. *Australian Journal of Agricultural Research*, 8: 414-423.

Wilkinson, P.R. (1977) Effect of herbicidal killing of shrubs on abundance of adult *Dermacentor andersoni* (Acarina: Ixodidae) in British Columbia. *Journal of Medical Entomology*, 13: 713-718.

Woodham, C.B., González, O.A., López, L.A. y Guereña, M.R. (1983) Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus* en Mexico 1960-1980. *Revista Mundial de Zootecnia*, 48: 18-24.

Xianxun, L. and Wenshun, L. (1997) Cattle theileriosis in China. *Tropical Animal Health Production*, 29: 4-7.

Yeruhan, I. A., Hadani Y.F. and Galker (1998) Some epizootiological and clinical aspects of ovine Babesiosis caused by *Babesia ovis*- a review. *Veterinary Parasitology*. 74:153-163.

Yunker, C.E. (1996) Heart water in sheep and goats: a review. *Ondersteport Journal of Veterinary Research*, 63: 159-170.

Zagursky, R.J., Olmsted, S.B., Russell, D.P., Wooters, J.L. (2003) Bioinformatics: how it is being used to identify bacterial vaccine candidates. *Expert Rev Vaccines*, 2(3): 417-436.