Revista Tlamati Sabiduría

Volumen 5, Número 2. Abril-Junio 2014

Título del artículo.

La genética reversa y el desarrollo de vacunas contra la garrapata del ganado vacuno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Título del artículo en idioma Inglés.

Reverse genetics and development of vaccines against cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Autores.

Delia Inés Domínguez García
Martín Ortiz Estrada
Félix Torres Guzmán
Rodrigo Rosario Cruz

Referencia bibliográfica:

MLA

Domínguez-García, Delia Inés , Martín Ortiz Estrada, Félix Torres Guzmán, Rodrigo Rosario Cruz. " La genética reversa y el desarrollo de vacunas contra la garrapata del ganado vacuno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*." *Tlamati*. 5.2 (2014): 60-65. Print.

APA

Domínguez-García, D. I, Ortiz-Estrada M., Torres-Guzmán, F. y Rosario-Cruz, R. (2014). La genética reversa y el desarrollo de vacunas contra la garrapata del ganado vacuno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Tlamati, 5(2), 60*-65.

ISSN: 2007-2066.
Publicado el 29 de Junio del 2014.
© 2014 Universidad Autónoma de Guerrero
Dirección General de Posgrado e Investigación
Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAG. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.

Revista Tlamati Sabiduría

La genética reversa y el desarrollo de vacunas contra la garrapata del ganado vacuno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Delia Inés Domínguez García[1]
Martín Ortiz Estrada[3]
Félix Torres Guzmán[1]
Rodrigo Rosario Cruz[2,1*]

[1]*Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Ambientales y Agropecuarias. Periférico Poniente S/N Colonia Villa de Guadalupe Iguala de la Independencia, Gro. C.P. 40033 /Unidad Académica de Ciencias Naturales. Chilpancingo., Gro. México. Tel. (+52) 733 33 3-47-76*
[2]*Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla 8534.Col Progreso., Jiutepec, Morelos, México. CP 62550.*
[3]*Laboratorios LaPisa, salud animal, Carretera La Piedad-Guadalajara Km. 5.5 Col. Camelinas, C.P. 59375. La Piedad Michoacán, Mexico.*
Autor de correspondencia
rockdrig@yahoo.com.mx

Resumen

El inicio de la era genómica ha conducido a la investigación por el camino del desarrollo de vacunas contra garrapatas y como resultado, se han conducido una gran variedad de estudios enfocados a la identificación de nuevos antígenos blanco para el desarrollo de vacunas. El análisis computacional ha facilitado esta labor, ya que las herramientas bioinformáticas y la disponibilidad de las bases de datos públicas, como la del *National Center for Biotechnology Information* [Centro Nacional de Información en Biotecnología] (NCBI), ha concentrado la información dispersa en una red sistematizada, con lo que es posible invertir el proceso de identificación de las proteínas antigénicas a una estrategia directa de vacunología reversa.

Los retos actuales también incluyen el desarrollo de nuevas vacunas a partir de péptidos recombinantes y sintéticos, derivados del análisis *in silico* de las secuencias de genes, en lo que un enfoque genómico, nos proporcionará una nueva perspectiva y una mejor maquinaria de análisis para el mejoramiento de antígenos existentes y el descubrimiento de nuevas moléculas blanco para el desarrollo de vacunas contra las infestaciones por garrapatas, que nos ayuden a proteger al ganado vacuno de las infestaciones, a mitigar el fenómeno de la resistencia a los acaricidas, a reducir el uso de ixodicidas, a disminuir los decesos producidos por las enfermedades que transmiten y la contaminación ambiental y además, contribuir a la producción de alimentos inocuos.

Palabras clave: Resistencia a acaricidas; *Boophilus microplus*; vacunas contra garrapatas

Abstract

Emergence of Genomic age has led research into the path for tick vaccine development. As a result, a large variety of studies have been carried out in order to identify new target antigens for vaccine development. Computational analysis have made this work easier, since bioinformatics tools and availability of public databases, such as *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), have help to spread out data into a systemic network, where it is possible to reverse the process of antigenic protein identification, as an straightforward strategy of reverse vaccinology. Current

Como citar el artículo:
Domínguez-García, D. I, Ortiz-Estrada M., Torres-Guzmán, F. y Rosario-Cruz, R. (2014). La genética reversa y el desarrollo de vacunas contra la garrapata del ganado vacuno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Tlamati, 5(2),60*-65.

challenges also includes new vaccine developments based on synthetic or recombinant peptides, derived from the *in silico* analysis of gene sequences, Therefore, genomic approaches will provide a new perspective and a better screening engine for improving existing antigens and discovering new targets for vaccine development. Vaccination of cattle in order to prevent cattle tick infestations is a feasible and promising approach to protect animals against ticks and tick borne diseases, as well as reduction of environmental pollution and production of safe food for human consumption.

Key words: Acaricide resistance; *Boophilus microplus*; Tick vaccines

Introducción

Las enfermedades parasitarias representan un problema de importancia global en el contexto de un mercado globalizado, debido a que la apertura comercial y los tratados de libre comercio han traído como consecuencia la libre exportación e importación de animales y productos derivados de ellos y de manera concomitante, la libre circulación de patógenos, mismos que afectan la salud animal y humana, afectando la inocuidad alimentaria (Food and Agriculture Organization [FAO], 2003).

Los parásitos pueden ser internos (endoparásitos) ó externos (ectoparásitos), por ahora, solo haremos referencia a los ectoparásitos, específicamente a la garrapata *Rhipicephalus microplus,* debido a los recientes problemas de resistencia múltiple a los ixodicidas. Ante esta situación, los diferentes grupos de investigación en México y en el mundo, se han interesado en la búsqueda de alternativas tales como: los extractos de plantas con actividad ixodicida (Martinez, Rosario-Cruz, Castillo Herrera, Flores Fernandez, Alvarez y Lugo Cervantez, 2011), proteínas recombinantes potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas que ofrezcan una alternativa para el control de las infestaciones causadas por *R. microplus* (Prudencio, Marra, Cardoso y Goulart, 2010).

La búsqueda y el descubrimiento de nuevas proteínas potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas recombinantes han sido el resultado del descubrimiento de nuevas tecnologías, así como el nacimiento de nuevas áreas del conocimiento que se han desarrollado de manera paralela como la Bioinformática y la genómica funcional (Jensen, de Miranda Santos y Glass, 2007). En el caso específico de *R. microplus*, la integración de estas áreas del conocimiento han permitido innovar y redescubrir nuevas líneas de investigación, así como realizar grandes avances en los enfoques de genética y vacunología reversa, lo cual ha facilitado el uso de los genomas de diversos organismos con la finalidad de encontrar nuevas alternativas útiles para el desarrollo de vacunas (Kongsuwan, Josh, Zhu, Pearson, Gough y Colgrave, 2010).

Importancia de las garrapatas R. microplus

Las garrapatas son el grupo de vectores de patógenos más importante que causan enfermedades a animales salvajes y domésticos (de la Fuente, Estrada-Pena, Venzal, Kocan y Sonenshine, 2008). Específicamente, la garrapata del ganado vacuno *R. microplus* es endémica y daña a la producción ganadera en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Estrada-Peña, García y Sánchez, 2006). Es la especie de mayor importancia económica y sanitaria debido a su amplia distribución, capacidad vectorial, sus hábitos hematófagos y la cantidad de bovinos que afectan (Guerrero, Bendele, Chen, Li, Miller, Pleasance, Varhol, Rousseau y Nene, 2007).

El control de las poblaciones de garrapatas y las enfermedades que transmiten en los países con economías emergentes de America Latina, es una necesidad imperante debido a las millonarias pérdidas económicas que ocasionan (de la Fuente et al., 2008). El uso de compuestos químicos con efecto garrapaticida es la principal herramienta disponible para el combate de las garrapatas (George, Pound y Davey, 2004). Los garrapaticidas han sido utilizados de manera intensiva, esto combinado con la plasticidad de los genomas de los ácaros, ha conducido de manera inevitable al desarrollo de la resistencia a las diferentes familias de acaricidas (Rosario-Cruz, Almazan, Miller, Domínguez-Garcia, Hernandez-Ortiz y de la Fuente, 2009), y en muchos de los casos a la aparición de la resistencia múltiple, aunado al impacto ambiental producido por la contaminación del suelo, subsuelo y del manto freático, así como el efecto sobre otras especies de artrópodos benéficos y la contaminación de los productos como leche y carne para consumo humano (Jongejan y Uilenberg, 2004).

El desarrollo de la selección de líneas de garrapatas resistentes ha puesto de relieve la mayor inconveniencia del uso indiscriminado y el uso de mezclas de acaricidas (Rosario-Cruz et al. 2009). Como consecuencia, la vida útil de los productos en algunas regiones del norte de México se ha reducido a tal grado que ya no representan una alternativa de control, por lo que nuevos enfoques han sido utilizados para la búsqueda de inmunógenos potencialmente útiles para el control de las poblaciones de *R. microplus* (Almazán, Lagunes, Villar, Canales, Rosario-Cruz, Jongejan y de la Fuente, 2010).

Vacunas contra R. microplus

El desarrollo de vacunas durante la era pre-genómica estuvo basada en el uso de organismos muertos, vivos ó atenuados y/ó el uso de proteínas sub-unitarias purificadas a partir de extractos obtenidos de los organismos de interés (Kay y Kemp, 1994).

Para desarrollar este tipo de vacunas es necesario un paso crítico, la identificación y la purificación de las proteínas de interés. En este caso en particular se reconoce a un antígeno como protector, siempre que al ser suministrado al huésped, sea capaz de inducir protección contra el desafío subsecuente en contra del microorganismo, parásito ó plaga en cuestión (Willadsen, 2008).

El enfoque empírico para el desarrollo de vacunas subunitarias incluye varios pasos: a) el cultivo del parásito, microorganismo ó plaga que se quiere controlar, b) El análisis y purificación de sus componentes, c) la identificación de los antígenos que posean las características inmunogénicas requeridas para el desarrollo del producto y d) El

desafío subsecuente con el agente infeccioso ó plaga contra la cual se quiere elaborar la vacuna, en un modelo animal apropiado, para evaluar las características inmunogénicas de esta tecnología (Mulenga, 2000; Willadsen, 2004).

Esta metodología tiene dificultades inherentes al proceso de purificación e identificación de las fracciones que poseen las características antigénicas óptimas para el desarrollo de la vacuna, y la disponibilidad del macro ó microorganismo que se quiere controlar mediante esta herramienta biotecnológica, ya que la producción de la vacuna se ve seriamente limitada cuando el organismo blanco no se puede cultivar fácilmente (Willadsen, 2008). Existen otros inconvenientes que tienen que ver también con la Biología del organismo blanco, por ejemplo, en algunos casos las proteínas más abundantes no necesariamente son inmunoprotectoras, ó es posible que los antígenos expresados durante la infección *in vivo* ó la infestación según sea el caso, no sean las mismas que las que se expresan durante el cultivo *in vitro*. El cultivo puede no ser el caso de la garrapata *R. microplus* ya que en este caso, la garrapata no se puede cultivar *in vitro* pero se puede reproducir con relativa facilidad (Nuttall, Trimnell, Kazimirova y Labuda, 2006).

La genética reversa y el desarrollo de vacunas recombinantes

La era post-genómica ha traído nuevos enfoques en la investigación y estudio de los genomas de organismos de interés en diversas áreas de la salud humana y veterinaria, uno de estos nuevos enfoques es la vacunología reversa, la cual está basada en la búsqueda de genes depositados en las bases de datos generadas por los grupos de investigación dedicados al desciframiento de los genomas de organismos diversos (Jensen et al., 2007; de la Fuente et al., 2008).

La búsqueda de nuevos antrigenos vacunales en la era post-genómica, comienza con la investigación *in silico* de la información del genoma del organismo de interés ó de genes específicos, a los cuales mediante el uso de programas bioinformáticos especializados se les puede asignar desde la función putativa de la proteína hasta la predicción de las características de las secuencias antigénicas potencialmente útiles para el desarrollo de vacunas (Prudencio, Marra, Cardoso y Goulart, 2009). Estas secuencias de genes pueden ser analizadas para posteriormente ser amplificadas mediante técnicas de síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, comúnmente conocidas como Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* [PCR]). Los productos de amplificación por PCR a partir de plantillas de ácidos nucleicos (DNA genómico ó cDNA) provenientes del organismo de interés, pueden ser clonados y expresados en vectores cuyas características pueden variar dependiendo del interés del estudio ó investigación (Nijhof, Balk, Postigo y Jongejan, 2009). Este enfoque denota las bondades del sistema en su conjunto, ya que no se requiere hasta este punto, el mantenimiento del organismo vivo, lo cual es ya un ahorro en términos del tiempo y del trabajo invertido, aunque el éxito del proceso, todavía depende de la exactitud con la que se pueden predecir las características del antígeno, lo cual depende del algoritmo utilizado por el programa (Andreotti, Pedroso, Caetano y Martins, 2008). Esto es un problema, ya que algunas proteínas aun cuando comparten las características estructurales y biológicas, carecen de una semejanza obvia en la secuencia y por esta razón el descubrimiento de antígenos verdaderamente nuevos puede frustrarse ya que la antigenicidad de una secuencia se puede codificar de una manera tan sutil que puede no ser identificada por la sola alineación de la secuencia, debido a esa carencia de semejanza con los antígenos de procedencia conocida (Freemen, Davey, Kappmeyer, Kammlah y Olafson, 2010). Este problema están siendo subsanado por el desarrollo de la bioinformática y se han inventado nuevos algoritmos capaces de identificar y predecir cuales son las regiones más antigénicas codificadas en la secuencia de un gen, con esta información se puede amplificar, clonar y expresar solo la región de interés del gen, reduciendo significativamente el tiempo que se dedicaría a la investigación, para identificar un antígeno nuevo.

Perspectivas del desarrollo de vacunas contra R. microplus

El desarrollo de vacunas contra las garrapatas que afectan al ganado vacuno en las unidades de producción orientadas a la producción de carne, leche y de doble propósito, se vislumbra como un método de control que promete, ser una alternativa viable para mejorar la salud animal, abatir la contaminación ambiental y contribuir con la inocuidad de los alimentos derivados de este tipo de unidades de producción (Prudencio et al., 2010).

Históricamente el estudio de las proteínas de garrapatas para desarrollar inmunógenos, han sido los antígenos que participan en la interfase hospedador-parásito y que actualmente están siendo redescubiertos a partir del análisis de los mapas proteómicos de la saliva (Zivkovic, Esteves, Almazán, Daffre, Nijhof y Kocan, 2010). Sin embargo la experiencia observada en la interacción entre la garrapata y su hospedador, no parece arrojar evidencias de protección ya que las infestaciones naturales en condiciones de campo, no inducen una respuesta inmune sólida, aun cuando se infestan reiteradamente, hasta tres veces por año durante toda la vida del animal.

El desarrollo de vacunas que ha tenido más éxito son las vacunas que han sido derivadas de los intestinos de la garrapata (de la Fuente et al., 2007), a partir de los cuales se han analizado las proteínas ancladas a la membrana de las células intestinales, los ejemplos clásicos son las vacunas *Tickgard* producida en Australia (Odongo, Kamau, Skilton, Mwaura, Nitsch, Musoke, Taracha, Daubenberger y Bishop, 2009) y la vacuna Gavac producida en Cuba (Vargas, Montero, Sánchez, Pérez, Valdés, Alfonso, Joglar, Machado…, 2010) las cuales son elaboradas a partir de los genes homólogos de una cepa de *R. microplus* australiana y cubana respectivamente denominados como Bm86, en Australia y Cuba y como Bm95 en Argentina (de la Fuente et al., 2000; Canales, de la Lastra, Naranjo, Nijhof, Hope, Jongejan y de la Fuente, 2008). A partir de estas observaciones se publicaron diferentes grados de susceptibilidad a la vacunación asociados con las variaciones en la secuencia del gen Bm86 (Kopp, Diaz, Amacker, Odongo, Beier, Nitsch, Bishop y Daubenberger, 2009; Canales, Almazán, Naranjo, Jongejan y de la Fuente, 2009).

Conclusiones

Los resultados de los experimentos utilizando el gen Bm95, sugirieron que era un antígeno universal que resolvió el problema de las poblaciones susceptibles y resistentes a la vacunación con el antígeno original, sin embargo lo que es claro es que la diferencia realmente fue el uso de un gen nativo local, ya que el alineamiento de la secuencia del gen Bm95 con las secuencias de Bm86, demuestran que se trata de una variante del mismo gen. De esto se desprende la importancia de utilizar antígenos nativos para mejorar la eficiencia de las vacunas contra infestaciones por garrapatas, especialmente cuando se trata de vacunas basadas en la secuencia de un solo gen.

La vacunología reversa es el área del conocimiento que más ha contribuido al descubrimiento y la innovación de nuevos enfoques en la investigación de nuevos antígenos vacunales para el control de las garrapatas que afectan a la ganadería bovina. Sin embargo, el conocimiento de los genomas de garrapatas aun es limitado ya que en el caso particular del genoma de *R. microplus* aun no se ha completado y el acceso a los bancos de información se limita a lo que se ha descifrado de manera parcial. Por esta razón es necesario impulsar proyectos para descifrar el genoma de las garrapatas ya que este tipo de avances en la investigación, impactará de manera directa el descubrimiento de nuevos genes útiles para el desarrollo de vacunas recombinantes.

La integración de la Bioinformática, la Genética Molecular y la Genómica Funcional han innovado y redescubierto nuevas líneas de investigación que han permitido realizar grandes avances con base en la minería de datos mediante los enfoques de genética y vacunología reversa, lo cual ha permitido hacer uso de los genomas de diversos organismos con la finalidad de desarrollar nuevos productos útiles para el desarrollo de vacunas y de sistemas diagnóstico.

El uso de la bioinformática y la genómica nos permitirá utilizar la secuencia de los genes que ya se encuentran en las bases de datos para el desarrollo biotecnológico de nuevas vacunas recombinantes, rediseñadas por ingeniería genética, para el mejoramiento de las vacunas ya existentes. La elaboración de vacunas utilizando cepas nacionales y/ó locales, establecerá la diferencia de un excelente sistema de control integrado en un futuro cercano.

El futuro en el campo del desarrollo de las vacunas cada vez es más corto, y los alcances de la tecnología moderna en el campo de la genómica cada vez mayores, el aterrizaje del conocimiento con respecto al desarrollo de esta herramienta para el control de garrapatas está muy cerca de rendir frutos por la lista creciente de nuevos antígenos descubiertos, aunque el campo aun representa un reto para la comunidad científica de México y del mundo.

El uso de vacunas contra las garrapatas se vislumbra como un método de control que promete ser una alternativa factible para mejorar la salud animal, abatir la contaminación ambiental, y promover la producción de alimentos inocuos con lo cual se contribuye al desarrollo de una ganadería sustentable, amigable con el ambiente y con la salud humana.

Referencias

Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F. y de la Fuente, J. (2010). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations [*Identificación y caracterización de Rhipicephalus (Boophilus) microplus como candidato para antígeno protector en el control de infestaciones de garrapata en ganado vacuno*]. *Parasitology Research*. 106, 471-479.

Andreotti, R., Pedroso, M.S., Caetano, A.R., Martins, N. (2008). Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95 [*Comparación del aglutinante previsto de variantes de proteína del intestino de Rhipicephalus (Boophilus) microplus cepa Bm86-Campo-Grande, Bm86 y BM95*]. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 17, 93-8.

Canales, M., de la Lastra, J.M., Naranjo, V., Nijhof, A.M., Hope, M., Jongejan, F., de la Fuente, J. (2008). Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris* [*Expresión de recombinante ortólogo BM86 de Rhipicephalus (Boophilus) microplus, R. annulatus y R. decoloratus como proteinas secretadas en Pichia pastoris*]. *BMC Biotechnology*. 14, 8:14.

Canales, M., Almazán, C., Naranjo, V., Jongejan, F., de la Fuente, J. (2009).Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations [*Vacunación con proteína ortóloga recombinante BM86, Ba86 de Boophilus annulatus para protección contra infestacion del ganado vacuno por B. annulatus y B. microplus*]. *BMC Biotechnology*. 31, 9:29.

Estrada-Peña, A, García, Z, Sánchez, H.F. (2006). The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico [*Distribución y preferencia ecológica de Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) en Mexico*]. *Experimental and Applied Acarology*. 38 (4), 307-16.

de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M. y Sonenshine, D.E. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals [*Recapitulación: Las garrapatas como vectores de patógenos que causan enfermedades en seres humanos y animales*]. *Frontiers in Bioscience*. 13, 6938-6946.

de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F. (2007). Tick vaccines and the transmission of tick-borne pathogens [*Vacunas contra garrapatas y la transmisión de patógenos ocasionados por garrapatas*]. *Veterinary Research Communications*. 31(Suppl. 1), 85-90.

de La Fuente, J., Rodríguez, M., García-García, J.C. (2000). Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens [*Control inmunológico de garrapatas a través de la vacunación con antígenos de vísceras de Boophilus microplus*]. *Annals of New York Academy of Sciences*. 916, 617-621.

Food and Agriculture Organization, (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en America Latina. *Serie Producción Animal y Sanidad Animal*. No 157. FAO. Roma. 51.

Freeman, J.M., Davey, R.B., Kappmeyer, L.S., Kammlah, D.M. y Olafson, P.U. (2010). Bm86 midgut protein se-

quence variation in South Texas cattle fever ticks [*Variación de secuencia de proteina de visceras Bm86 en fiebre del ganado vacuno producida por garrapatas en el Sur de Texas*]. *Parasites and Vectors*. 3, 101-108.

George, J.E., Pound, J.M. y Davey, R.B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides [*Control químico de garrapatas en el ganado vacuno y la resistencia de estos parásitos a los acaricidas*]. *Parasitology*. 129, S353-366.

Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Chen, A.C., Li, A.Y., Miller, R.J., Pleasance, E., Varhol, R., Rousseau, M.E. y Nene, V.M. (2007). Serial analysis of gene expression in the southern cattle tick following acaricide treatment of larvae from organophosphate resistant and susceptible strains [*Análisis serial de una expresión genética de la garrapata de ganado vacuno del Sur después de un tratamiento acaricida mediante larvas resistentes a los órganofosfatos y cepas susceptibles*]. *Insect Molecular Biology*. 16, 49-60.

Jensen, K., de Miranda Santos, I.K. y Glass, E.J. (2007). Using genomic approaches to unravel livestock (host)-tick-pathogen interactions [*Usando acercamientos genómicos a las interacciones (hospedero)-garrapata-patógeno en ganado vacuno en libertad*) . *Trends in Parasitology*. 23, 439-44.

Jongejan, F. y Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks [*La importancia global de las garrapatas*]. *Parasitology*.; 129, S3-14.

Kay, B.H., Kemp, D.H. (1994).Vaccines against arthropods [*Vacunas contra artrópodos*]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 50, 87-96.

Kongsuwan, K., Josh, P., Zhu, Y., Pearson, R., Gough, J. y Colgrave, M.L. (2010). Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus*) *microplus*) [*Explorando el proteoma del intestino medio de la garrapata femenina de ganado vacuno (Rhipicephalus (Boophilus) microplus) parcialmente alimentada*]. *Journal of Insect Physiology*. 56, 212-226.

Kopp, N., Diaz, D., Amacker, M., Odongo, D.O., Beier, K., Nitsch, C., Bishop, R.P. y Daubenberger, C.A. (2009). Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* BM86 homologues [*Identificación de un péptido sintético induciendo anticuerpos reactivos-cruzados enlazados a homólogos BM86 de Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Hyalomma anatolicum anatolicum y Rhipicephalus appendiculatus*]. *Vaccine*. 28, 261-269.

Martinez, V.M., Rosario-Cruz, R., Castillo Herrera, G., Flores Fernandez, J.M., Alvarez, A.H. y Lugo Cervantez, E. (2011). Acaricidal effect of essential oils from *Lipia graveolens* (Lamiales: Vervenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) [*Efecto acaricida de aceites esenciales provenientes de Lipia graveolens (Lamiales: Vervenaceae), Rosmarinus officinalis (Lamiales: Lamiaceae) y Allium sativum (Liliales: Liliaceae) contra Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae)*]. *Journal of Medical Entomology*. 48, 822-827.

Mulenga, A., Sugimoto, C. y Onuma, M. (2000). Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens [Tópicos sobre el desarrollo de vacunas contra garrapatas: Identificación y caracterización como candidatos potenciales de vacunas antígenas]. *Microbes and Infection*. 2, 1353-61.

Nijhof, A.M., Balk, J.A., Postigo, M. y Jongejan, F. (2009). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86 [*Selección de genes de referencia para estudios cuantitativos RT-PCR en garrapatas Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus appendiculatus y determinación de la expresion del perfil Bm86*]. *BMC Molecular Biology*. 29, 10:112.

Nuttall, P.A., Trimnell, A.R., Kazimirova, M. y Labuda, M. (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases [*Antígenos expuestos y ocultos como proyecto de vacunas para el control de garrapatas y enfermedades transmitidas por garrapatas*]. *Parasites and immunology*. 28, 155-63.

Odongo, D., Kamau, L., Skilton, R., Mwaura, S., Nitsch, C, Musoke, A., Taracha, E., Daubenberger, C. y Bishop, R. (2007). Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus* [*La vacunación de ganado vacuno con TickGARD induce anticuerpos de reactividad-cruzada enlazado a los péptidos lineales conservados de homólogos Bm86 en Boophilus decoloratus*]. *Vaccine*. 25, 1287-96.

Prudencio, C.R., Nascimento, R., Filho, M.M., Marra A.O., de Souza, G.R, Almeida JF, Cardoso R, Szabó MP, Goulart LR. (2009). *In silico* analysis for identification of tick phagotopes selected by phage-displayed libraries [*Análisis In Silico para la identificación de fagotopos de garrapatas seleccionadas por bibliotecas de Phage-Display*]. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 18, 39-41.

Prudencio, C.R., Marra, A.O., Cardoso, R. y Goulart, L.R. (2010). Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick [*Péptidos recombinantes como nuevos inmunógenos para el control de la garrapata de ganado vacuno*]. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* . Veterinary Parasitology. 172, 122-131.

Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R.J., Domínguez-Garcia, D.I., Hernandez-Ortiz, R. y de la Fuente, J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance [*Fundamento genético y el impacto de la resistencia de las garrapatas a los acaricidas*]. *Frontiers in Bioscience*. 14, 2657-2665.

Vargas, M., Montero, C., Sánchez, D., Pérez, D., Valdés, M., Alfonso, A., Joglar, M., Machado, H., Rodríguez, E., Méndez, L., Lleonart, R., Suárez, M., Fernández, E., Estrada, M.P., Rodríguez-Mallón, A. y Farnós, O. (2010). Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions [*Dos vacunas iniciales con la vacuna Gavacplus a base de Bm86 contra Rhipicephalus (Boophilus) microplus induce similar*

supresión reproductiva a tres vacunas iniciales bajo condiciones de producción]. *BMC Veterinary Research*. 6, 43-50.

Willadsen, P. (2004). Anti-tick vaccines [*Vacunas anti-garrapatas*]. *Parasitology*.129, S367-87.

Willandsen, P. (2008). Antigen cocktails: Valid hypothesis or unsubstantiated hope? [*Cocteles antigenos: ¿Hipótesis validas o esperanzas sin fundamento?*]. *Trends in Parasitology*. 24, 164-167.

Zivkovic, Z., Esteves, E., Almazán, C., Daffre, S., Nijhof, A.M. y Kocan, K.M. (2010). Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale* [*Expresión diferencial de genes en glándulas salivales de Rhipicephalus (boophilus) microplus macho en respuesta a infección con Anaplasma marginale*]. *BMC Genomics*. 1149, 27-35.