

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO



EVALUACION DE ANTÍGENOS CON POTENCIAL PARA SU USO EN VACUNAS
PARA EL CONTROL DE GARRAPATAS E INFECCIÓN POR *Anaplasma* spp. EN
UN MODELO MURINO

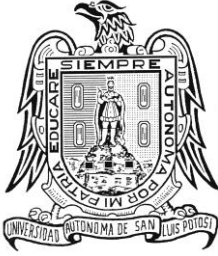
Por:

Verónica Carvajal de la Fuente

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Diciembre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO



EVALUACION DE ANTÍGENOS CON POTENCIAL PARA SU USO EN VACUNAS
PARA EL CONTROL DE GARRAPATAS E INFECCIÓN POR *Anaplasma* spp. EN
UN MODELO MURINO

Por:

Verónica Carvajal de la Fuente

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias

Dr. Fernando A. Muñoz Tenería
Director de Tesis

Dr. José de la Fuente García
Co-Director

Dr. Octavio Merino Charrez
Co-Director

Dra. Milagros González Hernández
Asesor

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Diciembre 2018

PÁGINA DE APROBACIÓN DE TESIS

El trabajo titulado “Evaluación de antígenos con potencial para su uso en vacunas para el control de garrapatas e infección por Anaplasma spp. en un modelo murino” fue realizado por: “Verónica Carvajal de la Fuente” como requisito para obtener el grado de “Doctora en Ciencias Agropecuarias” y fue revisado y aprobado por el suscrito Subcomité Tutorial y se autoriza la entrega de la presente versión del trabajo de tesis al Comité de Examen de Grado para su evaluación.

Dr. Fernando A. Muñoz Tenería

Director de Tesis



Firma

Dr. José de la Fuente García

Co-Director



Firma

Dr. Octavio Merino Charrez

Co-Director



Firma

Dra. Milagros González Hernández

Asesor



Firma

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 5 días del mes de Diciembre de 2018.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi querido esposo Jorge Loredo Osti, que me ha apoyado en todo momento, con este y todos los proyectos de mi vida, gracias por tu paciencia, por tus consejos y sobre todo por tu amor.

A mis hijas Emily e Isabela, mis más grandes tesoros, quienes son el motor que me motivan cada día a salir adelante, las amo.

A mi madre Guadalupe de la Fuente Guajardo, por ser un ejemplo a seguir, a mi padre Pedro Carvajal Rivera que desde el cielo me acompaña día a día.

A mis suegros, el Sr. Gregorio Loredo Cadena (+) y la Sra. Catarina Osti Espinoza quiero dedicarles también este trabajo y agradecerles por todo ese gran apoyo y el amor que siempre nos han brindado como familia. ¡Muchísimas gracias!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a DIOS por haber hecho posible que pudiera cumplir con este proyecto de mi vida y haberme dado la oportunidad de terminarlo.

De manera muy especial quiero agradecer a mis directores de Tesis: Dr. Fernando Muñoz Tenería y Dr. José de la Fuente, quienes me brindaron sus conocimientos y su amistad. A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Octavio Merino Charrez y Dra. Milagros González Hernández, por sus valiosos comentarios, sugerencias y experiencia que permitieron el enriquecimiento de este trabajo.

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UASLP, por permitirme realizar mis estudios doctorales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca otorgada durante un período de mi formación.

Quiero agradecer con muchísimo cariño a la Dra. Catarina Loredó Osti, Coordinadora del programa de Doctorado de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, por brindarme su apoyo incondicional en todo momento. ¡Muchísimas gracias Cati!

Expreso mi agradecimiento al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaBA) en especial al Dr. Roberto F. González Amaro por permitirme trabajar en sus instalaciones y en los equipos de citometría. A la Dra. Berenice Hernández Castro por su paciencia, experiencia y valiosos aportes realizados durante el procesamiento y análisis de las muestras de citometría de flujo.

Mi más sincera gratitud a los integrantes del Laboratorio de Epigenética y Biología de Plantas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en especial a la Dra. Catalina Arenas Huertero y a Jaime Aportela.

Agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, por permitirme realizar algunos de mis experimentos de laboratorio durante mi formación doctoral. Al Dr. José Alberto Ramírez de León, quien a través del programa de Apoyo Académico, tramitó una beca complementaria, la cual facilitó mi estancia durante mis estudios de doctorado.

Quiero agradecer también a las estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria de la UASLP, Gabriela Hernández Olvera y Diana Patricia Tovar Sánchez por su valiosa ayuda al momento de procesar todas las muestras de este proyecto. Mil gracias a las dos, sin ustedes hubiera sido casi imposible concluir con los muestreos.

Esta tesis fue parcialmente financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Secretaría de Educación Pública a través del proyecto CB-2015-01- 255205-019 “Caracterización proteómica de *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus* y *Amblyomma cajennense* para el control de infestaciones en bovinos” aprobado en la convocatoria SEP-CONACYT 2015.

Proyecto apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA DE APROBACIÓN DE TESIS	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	v
RESUMEN.....	viii
SUMMARY	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
Importancia económica y sanitaria de las garrapatas	1
Distribución de garrapatas en México.....	2
Las garrapatas como transmisores y reservorios de patógenos.	3
Anaplasmosis bovina.....	4
Métodos de control de garrapatas	4
Vacunas para el control de garrapatas.....	5
Respuesta inmunológica contra garrapatas.....	6
Memoria inmunológica e inmunidad	8
Linfocitos B.....	8
Molécula CD45R/B220.....	10
Células Plasmáticas.....	10
Molécula CD 138 (Sindecano1).....	11
CAPÍTULO 1. TENDENCIAS ACTUALES EN EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA GARRAPATAS EN BOVINOS	13
Introducción	14
Antígeno Bm86	15
Proteínas salivales como antígenos vacunales	15
Antígeno salp15	15
Factor liberador de histamina de garrapata.....	
Antígeno Silk	16
Antígeno TSLPI (Inhibidor de la vía de las lectinas de la glándula salival)	17
Antígeno p64TPR.....	17
Subolesina.....	18
Ferritinas	19
Serpinas	19
Proteínas de Choque Térmico.....	20
Proteína mayor de superficie de Anaplasma (MSP).....	20
Conclusiones.....	21
Referencias.....	22
CAPITULO 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE SUBOLESINA EN <i>Rhipicephalus microplus</i> INFECTADAS CON <i>Anaplasma marginale</i> ”	25

Abstract.....	25
Resumen	25
Introducción	26
Material y Métodos	27
Cepa de garrapata	27
Diseño experimental.....	27
Monitoreo de la parasitemia seguido a la inoculación de <i>A. marginale</i>	27
Infestación y alimentación de garrapatas.....	27
Confirmación de la infección del becerro con <i>A. marginale</i>	28
Confirmación de la infección de <i>A. marginale</i> en garrapatas	29
Extracción de glándulas salivales.....	29
Extracción de DNA, RNA y proteínas de tejidos de garrapatas	29
Clonación expresión y purificación de la proteína subolesina.....	29
Expresión y prutrificaión de la proteína recombinante sublesina	30
Análisis mediante Western blot	30
Evaluación de los niveles de expresión de subolesina	31
Resultados.....	
Discusión	36
Conclusiones	38
Referencias.....	39
CAPITULO 3. EVALUATION ON MICE OF THE IMMUNOGENICITY OF TWO TICK CHIMERIC ANTIGENS AS A VACCINE CANDIDATES TO CONTROL TICKS AND ANAPLASMA SP. INFECTION	44
Abstract.....	44
Introduction.....	44
Materials and Methods	46
Vaccine preparation and vaccination.....	46
Immunization trial.	47
Blood and tissue collection	47
Cell isolation for flow cytometer	47
Determination of serum antibody levels by ELISA	48
Statistical Analysis.....	49
Results and Discussion	49
Conclusion	49
References.....	56
DISCUSIÓN GENERAL.....	65
CONCLUSIONES.....	68
LITERATURA CITADA.....	69

RESUMEN

Las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* son artrópodos hematófagos distribuidos en zonas subtropicales y tropicales. A nivel mundial, se les considera después de los mosquitos, los principales transmisores de enfermedades como anaplasmosis y babesiosis. En la ganadería de México ocasionan excesivas pérdidas económicas. El método de control que más se ha utilizado es la aplicación de acaricidas, sin embargo, el uso continuo de esta técnica ha propiciado serias consecuencias ambientales, amenazas para la salud pública y la generación de garrapatas resistentes. El control inmunológico surgió como una alternativa de control. Las vacunas existentes en el mercado se basan en el antígeno Bm86, sin embargo, no son eficaces en todas las regiones del mundo. Gracias al surgimiento de nuevas tecnologías se ha logrado obtener proteínas de interés que pueden servir como candidatos vacunales no sólo para controlar un mayor rango de especies de garrapatas, sino también, antígenos que jueguen un papel vital en la interacción garrapata-patógeno. La subolesina es una proteína que ha demostrado ser protectora contra las infestaciones de garrapatas, capaz de disminuir su capacidad de transmitir varios patógenos. Estudios recientes han demostrado que la infección con *A. marginale* en garrapatas y células del hospedador vertebrado, es capaz de cambiar la expresión del gen de subolesina. El primer objetivo de este estudio fue analizar la expresión diferencial de subolesina en glándulas salivales de *R. microplus* infectadas con *A. marginale* utilizando RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real). Los resultados mostraron una sobreexpresión diferencial de subolesina en garrapatas infectadas comparadas con las no infectadas ($P < 0.05$), respaldando su uso para desarrollar vacunas con doble efecto. A la hora de diseñar una vacuna, es necesario considerar que tenga la capacidad de inducir inmunidad específica, así como poder estimular a las células del sistema inmunológico que inducen una respuesta duradera. Por lo tanto, el segundo objetivo fue evaluar en un modelo murino, la respuesta de las células B de memoria y células plasmáticas de larga vida, contra distintos candidatos vacunales. Las poblaciones de células B (marcadas B220) y células plasmáticas (CD138) se midieron en bazo, linfonodos y médula ósea a través de citometría de flujo. Las concentraciones séricas de IgG fueron también determinadas. Los resultados mostraron que el porcentaje de células B220 fue significativamente mayor en bazo a las 3, 6 y 9 semanas post-vacunación para HSP70-MSP4 y grupo control comparada con BM95-Sub-MSP1a. En contraste, los niveles de expresión de CD138 en el bazo y médula ósea de los grupos que recibieron la proteína BM95-Sub-MSP1a fue significativamente mayor comparado con el resto de los grupos ($p < 0.05$). La respuesta de IgG, se encontró que los grupos inmunizados con ambas proteínas expresaron una tendencia de aumento en la cantidad de anticuerpos durante las 9 semanas, sin embargo, sólo el grupo con BM95-Sub-MSP1a alcanzó niveles significativos comparados con el control ($p < 0.05$).

Palabras clave: *R. microplus*, *A. marginale*, subolesina, expresión génica, glándulas salivales, células de memoria, células plasmáticas, modelo murino.

SUMMARY

Ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) are hematophagous arthropods distributed in subtropical and tropical zones. Worldwide, they are considered after mosquitoes, the main transmitters of diseases such as anaplasmosis and babesiosis. In livestock in Mexico, they cause excessive economic losses. The method of control that has been most used is the application of acaricides, however, the continuous use of this technique has led to serious environmental consequences, threats to public health and the generation of resistant ticks. Immune control emerged as an alternative control. As a practical alternative, vaccines have been suggested as an environmentally friendly method. In the early 1990s, vaccines with the recombinant *R. microplus* Bm86 gut antigens became commercially available. Nowadays, the development of new technologies, have permitted to identify new potential antigen candidates. Among the most important of identified antigen, is subolesin that was discovered in *Ixodes scapularis*. Vaccination trials with recombinant subolesin demonstrated effective control of arthropod vector infestations and tick-borne pathogens. Recent studies have demonstrated that infection of both tick and vertebrate host cells with this microorganism changed gene expression. Therefore, one of the objectives of this study was to investigate subolesin expression in uninfected and *A. marginale*-infected *R. microplus* salivary glands by real-time reverse transcriptase (RT)-PCR. Results from this study revealed that, the expression of subolesin was significantly higher in salivary glands of infected *R. microplus* in comparison to uninfected ones ($P < 0.05$). The above, strongly supports its use to develop vaccines with double effect. An important consideration when designing a vaccine is that it has the ability to induce specific immunity, as well as being able to stimulate memory B cells and long-lived plasma cells, which are the main cells of the immune system. Therefore, the aim of this study was to compare the immune response in a murine model two potential candidates for anti-tick vaccines (BM95-Sub-MSP1a and HSP70-MSP4) in lymphoid organs. B-cell and plasma cell populations were determined in spleen, lymph nodes and bone marrow by flow cytometer using the B-cell marker CD45R/B220 and the plasma cell marker CD138. Finally, serum IgG concentrations were measured at specific time points pre- and post-vaccination. Results from this second experiment showed that, the percentage of B220-expressing cells were significantly higher in the spleen at 3, 6 and 9 weeks after immunization in HSP70-MSP4 and control group as compared with those in BM95-Sub-MSP1a mice. In contrast, the levels of CD138-expressing cells in BM95-Sub-MSP1a were significantly higher for both spleen and bone marrow, compared to the others two groups ($P < 0.05$). As for the IgG response, it was found that in the protein treated groups showed an upward trend until week 9; nonetheless, IgG serum levels revealed that the group immunized with BM95-Sub-MSP1a reached values significantly higher compared with the control ($p < 0.05$).

Keywords: *R. microplus*, *A. marginale*, Subolesin, salivary gland, gene expression, memory B cells, long-lived plasma, murine model.

INTRODUCCIÓN

Importancia económica y sanitaria de las garrapatas

La ganadería bovina representa una de las industrias más importantes generadoras de divisas en los países tropicales y subtropicales. En estas zonas es precisamente donde las garrapatas cuentan con un medio propicio para su desarrollo causando pérdidas cuantiosas a la ganadería. Algunos estudios indican que las pérdidas económicas por parasitismo de garrapatas en bovinos ascienden a 18,900 millones de dólares anuales (Peter *et al.*, 2005).

Las garrapatas presentan un amplio rango de hospedadores que a la vez parasitan a los animales domésticos, silvestres y al hombre. Después de los mosquitos, las garrapatas son consideradas en humanos como el segundo grupo de vectores transmisores de enfermedades y como la principal causa de transmisión de microorganismos patógenos (bacterias, rickettsias, protozoarios, virus y hongos) en animales (Parola y Raoult, 2001).

Las garrapatas y las enfermedades transmitidas por estas, constituyen uno de los principales obstáculos en el desarrollo de la industria ganadera a nivel mundial. Este impacto económico negativo se debe, fundamentalmente, a las pérdidas directas sobre la producción; a la presencia de anemias debido a que estos parásitos hematófagos al alimentarse extraen grandes cantidades de sangre de sus huéspedes; a daños en las pieles de los animales debido a heridas locales que pueden complicarse con infecciones bacterianas secundarias o por larvas de moscas; a efectos tóxicos y disminución en la producción de leche y carne; y a la presencia de bajas tasas de fertilidad, mayor tiempo de la engorda y dificultad en la importación de razas mejoradas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas por garrapatas (De Meneghi *et al.*, 2016). El efecto indirecto está dado principalmente al ser transmisores de importantes enfermedades como Babesiosis y Anaplasmosis consideradas de mayor importancia económica para el ganado vacuno en México, Centro y Sudamérica y Australia (Quiroz, 2005). Además, en México, estas dos enfermedades limitan los programas de mejoramiento genético cuando se requiere introducir ganado genéticamente superior a zonas endémicas de garrapatas (Almazán, 2006; Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

En Estados Unidos a partir de 1943 se logró la erradicación de la Babesiosis la cual ocasionó importantes pérdidas económicas estimadas en aquel tiempo, en \$130.5 millones de dólares; no obstante, debido a que *R. microplus* y *R. annulatus* aún se encuentran

presentes en México, existe una zona de cuarentena permanente a lo largo de la frontera con México (George, 2008).

Distribución de garrapatas en México

El 40% del territorio en México es de aproximadamente 197, 225,000 hectáreas que están cubiertas por pastos y se utilizan principalmente para la producción de ganado bovino productor de carne. En este territorio se explota el 70% de los 30 millones de cabezas de ganado. Estos animales se ven afectados en forma directa por las garrapatas que figuran como principales transmisores de agentes infecciosos (SAGARPA, 2006).

En México, se han identificado 77 especies de garrapatas que afectan a los animales domésticos y al hombre. Las especies que se encuentran en nuestro país en orden de importancia son: *R. microplus*, *R. annulatus*, *Amblyomma cajennense*, *A. imitador*, *A. maculatum*, *A. triste*, *A. americanum* y *Anocentor nitens*. *R. microplus* tiene una distribución geográfica en nuestro país en zonas tropicales, templadas y áridas que abarca el 53.0% del territorio nacional, mientras que *R. annulatus* sólo el 27.0% teniendo un esquema de distribución diferente y presentando mayor afinidad en zonas áridas y templadas (Rodríguez- Vivas *et al.*, 2006).

Las garrapatas como transmisores y reservorios de patógenos.

Además de los efectos directos (anemias, respuestas tóxicas y alérgicas, desarrollo de miasis) que provocan en el hospedador, uno de los principales problemas con las garrapatas, es que éstas actúan como vectores de diversos agentes patógenos (virus, bacterias, protozoos, céstodos y nematodos). Los virus y bacterias se transmiten directamente al hospedador, de modo que los ectoparásitos actúan como vectores mecánicos. Por otro lado, los protozoos, céstodos y nematodos requieren desarrollarse en el vector. En estos casos, el artrópodo actúa como un hospedador intermediario que ejerce función de verdadero vector biológico. Una vez que el agente patógeno se desarrolla en el vector, adquiere capacidad infectiva, de forma que puede ser transmitido a un nuevo hospedador cuando el vector se alimenta sobre él. A diferencia de la transmisión mecánica, la transmisión biológica requiere del transcurso de un período de tiempo desde que se produce la adquisición del agente patógeno hasta que éste madura y se transforma

en infectante. El vector puede continuar infectando hospedadores durante el resto de su vida (Francischetti *et al.*, 2009).

La capacidad vectorial de las garrapatas se ve favorecida por distintos aspectos: 1) entre los factores biológicos que favorecen al alto potencial vectorial de las garrapatas se encuentra en su modo de alimentarse por períodos prolongados durante los cuales permanecen fuertemente adheridas al huésped permitiendo la transmisión bidireccional de los agentes patógenos; 2) la picadura, por lo general pasa desapercibida hasta que la garrapata se ingurgita completamente de sangre; 3) el ambiente en el intestino de las garrapatas es menos hostil que el de insectos hematófagos, pues estos últimos poseen proteasas intracelulares; por lo tanto, los patógenos ingeridos por garrapatas no están expuestos directamente a la acción proteolítica de estas enzimas, 4) la transmisión transtadial (larva → ninfa → adulto) y vertical (transmisión transovárica de la hembra a la siguiente generación a través del ovario) de distintos agentes (por ejemplo, distintas *Rickettsia*); 5) su capacidad para alimentarse sobre distintos hospedadores, que permite la transmisión de los agentes patógenos de unos hospedadores a otros; 6) el potencial reproductor de las hembras, capaces de depositar cientos o miles de huevos y que posibilita un crecimiento rápido de las poblaciones de estos parásitos; 7) su capacidad para mantenerse vivas tras largos períodos de inanición. Y por último, 8) para poder ingerir la sangre necesaria, las garrapatas neutralizan las repuestas defensivas del hospedador, a través de una gran cantidad de moléculas farmacológicamente activas, que son inoculadas durante la alimentación. Todas estas características les proporcionan ventajas sobre otros transmisores de agentes patógenos ubicando a las garrapatas como los ectoparásitos que mayor cantidad de microorganismos transmiten (Anderson y Magnarelli 2008).

Anaplasmosis bovina

La anaplasmosis es una enfermedad producida por la rickettsia *Anaplasma* spp. (Rickettsiales: Anaplasmatacea) que se encuentra distribuida en zonas tropicales y subtropicales (Kocan *et al.*, 2004). Esta enfermedad es endémica en México, Centro, Sudamérica y las islas del Caribe, se puede encontrar a lo largo de todo el continente Americano con excepción de las zonas desérticas o montañosas (Kocan *et al.*, 2008).

Dentro del género *Anaplasma*, *Anaplasma marginale*, es precisamente la más patógena de todas y geográficamente se distribuye en las áreas tropicales, abarcando más de la mitad del territorio nacional (Blood, 1992).

Anaplasma marginale es una rickettsia intracelular obligada, esférica o cocoide, de 0.3 µm de diámetro que se ubica en la periferia, dentro de una vesícula derivada de la membrana del eritrocito del bovino y que se observa como un cuerpo de inclusión, compuesto de 8 a 12 cuerpos iniciales. Los organismos de la familia Anaplasmataceae son patógenos intracelulares obligados que se encuentran exclusivamente dentro de vacuolas unidas a la membrana de la célula hospedadora. El género *Anaplasma* incluye a los patógenos de rumiantes, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum* que también es un patógeno de equinos, perros y humanos; y *A. platys*, este último patógeno del perro (Blood, 1992).

La anaplasmosis causa primeramente una anemia, cuyo grado varía en función del número de eritrocitos parasitados. La primera aparición coincide con la disminución en el hematocrito, con aparición de eritrocitos inmaduros en frotis de sangre, y fiebre. El grado de anemia varía ampliamente en bovinos jóvenes de más de 3 años, pero siempre es grave en animales adultos y esplenectomizados (Blood, 1992).

La rickettsia es ingerida por garrapatas al momento de alimentarse en un animal enfermo o portador sano, al llegar al intestino de la garrapata tiene un primer ciclo de multiplicación en las células intestinales. Posteriormente, migra a las glándulas salivales, donde tiene un segundo ciclo de multiplicación, de aquí es liberada con la saliva al torrente sanguíneo cuando la garrapata se alimenta de un segundo animal sano, iniciando un nuevo ciclo en el bovino. *A. marginale* también infecta a las células endoteliales del bovino y posiblemente éste sea el sitio donde permanezca en los animales portadores (Carreño *et al.*, 2007). La transmisión mecánica de *Anaplasma*, ocurre a través de moscas hematófagas del género *Stomoxys* y de *Haematobia irritans*, además de algunos mosquitos como *Anopheles*, *Psorophora* y tábanos (*Tabanidae*), así como un mal manejo con jeringas contaminadas. El estado de portador puede durar toda la vida, incluso el parásito puede no ser siempre detectado en la sangre. La transmisión horizontal ocurre principalmente por garrapatas como *R. microplus* y *R. annulatus* (Blood, 1992).

Métodos de control de garrapatas

La estrategia más utilizada para controlar las garrapatas consiste en la aplicación de ixodicidas, directamente a los animales infestados (baños de inmersión y de aspersion) a diferentes intervalos que van a depender de la región geográfica, especie de garrapatas y eficacia residual del garrapaticida. En la actualidad existen 6 grupos de productos químicos que se utilizan para el control de garrapatas en México: Organofosforados,

Piretroides, Amidinas, Endectocidas, Fenilpirazolonas e Inhibidores del desarrollo (Rodríguez- Vivas *et al.*, 2011). Aunque el uso de estos químicos ha sido utilizado con éxito en el control de las garrapatas; su uso descontrolado ha provocado la generación de garrapatas resistentes a la acción de estos productos, la aparición de residuos químicos en la carne y leche, así como la contaminación del medio ambiente ocasionando graves amenazas para la salud pública (Miller *et al.*, 2008; Fragoso *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que el control biológico podría ser una alternativa para el control de garrapatas. Se han utilizado garzas y pájaros, otros estudios demuestran que las hormigas como la *Pheidole megacephala* y el ácaro *Anystis baccarum* tiene algún efecto depredador. Los hongos entomopatógenos como *Metarrizium anisopliae* han demostrado poseer buena eficacia para el control de las garrapatas (Rodríguez-Vivas y Rosado-Aguilar, 2006). Otros agentes biológicos que potencialmente pueden ser usados para el control de garrapatas son: bacterias (*Cedecea lapagei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter agglomerans*), nematodos entomopatógenos (Heterorhabditidae y Steinernematidae). Todos estos agentes afectan principalmente los estadios de vida libre de las garrapatas. En los últimos años se han desarrollado unos 171 micopesticidas, alrededor del mundo, de los cuales únicamente tres productos contienen *M. anisopliae* para el control de garrapatas (Fernandes *et al.* 2012). En México las cepas Ma34 y Mal4 han demostrado ser eficientes para el control del *R. microplus* a nivel de campo (larvas en pasto y garrapatas adultas en bovinos) (Alonso-Díaz *et al.*, 2007, Ojeda-Chi *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha empleado la nanotecnología para desarrollar formulaciones fúngicas, por ejemplo, la microencapsulación de las conidias para protegerlas de las condiciones climáticas adversas (radiación solar, temperatura, humedad, etc.) e incrementar su eficacia (Fernandes *et al.*, 2012).

Vacunas para el control de garrapatas

La posibilidad de controlar las infestaciones por garrapatas a través de la inmunización del huésped con antígenos seleccionados fue demostrado por primera vez por Allen and Humphreys (1979). La base principal de este método de vacunación es la de inducir en el hospedador anticuerpos específicos contra antígenos que resulten perjudiciales para el artrópodo al momento de su alimentación. A principios de 1990 se identificó el antígeno Bm86 en células intestinales de la garrapata *R. microplus*; su función no se ha elucidado completamente; sin embargo, se ha demostrado que ésta proteína

contiene varios receptores tipo factor de crecimiento epidérmico (EFG-like domains) que pueden estar involucradas en la coagulación de la sangre y el crecimiento celular (Rand *et al.*, 1989).

La respuesta a la vacunación con este antígeno produce anticuerpos que al estar en contacto con la garrapata provocan destrucción de sus células intestinales, trayendo como consecuencia una disminución en su capacidad reproductiva (50-90%), del número de garrapatas repletas (20-30%), del peso de las garrapatas (30 %) y del peso de los huevos (60-80%) (Jonsson *et al.*, 2000; de la Fuente *et al.*, 2007). También se ha demostrado que es eficaz contra otros géneros y especies de garrapatas tales como *B. annulatus*, *B. decoloratus*, *H. anatolicum* y *H. dromedarii* (de la Fuente *et al.*, 2007; Willadsen y Kemp, 1998; de la Fuente, 2000; García-García *et al.*, 2000).

Homólogos y ortólogos de BM86 de diferente especies de garrapatas, como *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus decoloratus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus*, se han identificado y considerado como potenciales candidatos vacunales para el control de infestaciones de garrapatas (Jeyabal *et al.*, 2010).

Los mecanismos exactos por los cuales el antígeno BM86 provoca lisis de las células intestinales no son bien comprendidos, sólo se sabe que la respuesta inmune humoral juega un rol muy importante. En estudios llevados a cabo en bovinos se ha observado que BM86 induce anticuerpos de tipo IgG con el serotipo predominante de tipo IgG1 el cual se asocia con la respuesta tipo Th1 donde el complemento produce la destrucción de las células intestinales (McGuire *et al.*, 1979; Tellam *et al.*, 1992). No obstante, en estudios realizados en ratones se demostró un aumento en el tipo de IgG2a comparado con IgG1 (Kemp *et al.*, 1989). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en bovinos y ratones que fueron vacunados con Bm86 con derivados de levaduras de *Pichia pastoris* como adyuvante, se encontró mayor cantidad de IgG1 que IgG2 así como una fuerte correlación entre los niveles de IgG1 entre los sueros de bovino y ratón (Rodríguez-Valle *et al.*, 2001). Posteriormente, también en otra investigación donde se evaluaron ratones inmunizados con Bm86, se observó, un aumento en los títulos de anticuerpos de tipo IgG, específicamente IgG2a e IgG2b, pero además, una mayor cantidad sérica de IL4, IL5, IL12 e Interferón gamma, comparada con los ratones controles, sugiriendo que la inmunización con esta vacuna recombinante induce además una respuesta de tipo celular (Ruiz *et al.*, 2006). Estos investigadores proponen utilizar a ratones como modelos predictivos de la respuesta inmune del ganado, hacia antígenos recombinantes de Bm86 (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2001).

Mundialmente se conocen dos vacunas recombinantes comerciales que contienen este antígeno, la vacuna cubana (GavacTM) y la australiana (Tick-GardTM). En 1998, la primera fue evaluada en México donde se utilizaron diversas pruebas de campo para el control de infestaciones de *R. microplus* y *R. annulatus* con resultados variables que dependieron de la cepa y la región geográfica (Fragoso *et al.*, 1998). No obstante, esta vacuna tuvo usos limitados en México y otros países de Latinoamérica debido a la falta de eficacia contra otras especies de garrapatas y a la persistente infección del ganado por distintos patógenos transmitidos por estos ectoparásitos (de la Fuente, 2007). Estudios posteriores demostraron que entre una cepa y otra de *R. microplus*, existen diferencias significativas en la susceptibilidad a la vacunación con Bm86 (Almazán *et al.*, 2010). Dicha variación se debe en gran parte, al polimorfismo de los genes utilizados para el desarrollo de las vacunas, lo cual implica que existen variaciones considerable en la secuencia de aminoácidos que componen el inmunógeno (Sossai *et al.*, 2005). Esto ha generado fracasos a nivel mundial al intentar implementar la vacuna en base a Bm86 en otros países que no son los países en donde se desarrolló la vacuna (Kaewmongkol *et al.*, 2015).

Una de dos conclusiones hechas por de la Fuente (2007), menciona que las vacunas basadas en el antígeno Bm86 recombinante han demostrado ser económicamente viables y efectivas para el control de las garrapatas del bovino, con una reducción del uso de acaricidas y en la incidencia de los- patógenos transmitidos por garrapatas en algunas regiones.

Se ha sugerido que el efecto de la vacuna (Bm86) se podría incrementar con la inclusión de nuevos antígenos efectivos o con el uso de nuevos adyuvantes que contribuyan a lograr una respuesta inmune más efectiva.

Respuesta inmunológica contra garrapatas

Durante la infestación con garrapatas se establece una relación muy estrecha con el hospedero dando como resultado la estimulación del sistema inmune del animal. En general, al iniciarse la alimentación de la garrapata sobre un individuo que nunca antes estuvo expuesto a infestaciones, se caracteriza por el reconocimiento de un gran número de inmunógenos salivales como: moléculas antihemostáticas, que permiten a la garrapata mantener la hemorragia, moléculas antiinflamatorias, que entre otras acciones, evitan el prurito y el dolor de la picadura, y moléculas inmunomoduladoras, que permiten a las garrapatas alimentarse sobre hospedadores sensibilizados en contactos previos y que además, facilitan la transmisión de patógenos (Stibraniova *et al.*, 2013). Todas estas

moléculas son capaces de inducir en el hospedero respuestas inmunitarias, algunas de las cuales no generan protección frente a la garrapata, al tiempo que otras proporcionan cierto grado de resistencia frente al parásito (Wikel, 2013). Por lo tanto, es importante distinguir los mecanismos inmunológicos que no generan protección de aquellos que sí lo hacen, sobre todo si se desea desarrollar vacunas más eficientes para el control de garrapata. Esta distinción no es fácil debido a que no existe un modelo universal de una respuesta inmunitaria anti-garrapata, sino que ésta depende de diversos factores tales como la especie de garrapata y hospedador implicado (raza, edad del animal, así como historia de exposición previa) (Ribeiro *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, se describirá de manera genérica la respuesta inmunitaria contra las garrapatas:

En un primer contacto, las moléculas inmunogénicas de la saliva son capturadas por las células presentadoras de antígenos (células dendríticas de la piel), que los procesan y presentan en su superficie asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II (MHC-II por sus siglas en inglés). Estas células migran hacia los linfonodos cercanos donde ocurrió la picadura y allí presentan los antígenos a los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados (Th0). Los linfocitos reconocen específicamente al complejo MHC-II/antígeno a través de su receptor de antígenos (el complejo TCR-CD4) y, tras recibir las señales adecuadas, se activan y expanden clonalmente diferenciándose ya sea en linfocitos Th1 o bien en linfocitos Th2. Esta diferenciación depende en gran medida, de las señales co-estimuladoras proporcionadas por las citocinas presentes en el medio en el momento de la presentación antigénica. Por ejemplo, la IL-4 e IL-10 inducen respuestas Th2 (inmunidad humoral o mediada por anticuerpos), mientras que el IFN γ y la IL-12 producen respuestas Th1 (inmunidad celular). Una vez activos, los linfocitos Th1 y Th2 secretan nuevas citocinas, diferentes en cada caso, y éstas ponen en marcha distintos mecanismos inmunitarios. En las respuestas Th2 los linfocitos secretan citocinas como IL-4, IL-5, e IL-13, que estimulan la producción de anticuerpos específicos (IgG e IgE) por los linfocitos B, así como la movilización de mastocitos y eosinófilos, propiciando el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad inmediata, que potencialmente pueden proteger frente a hematófagos de alimentación rápida. Por el contrario, en las respuestas Th1, las citocinas secretadas por los linfocitos, principalmente IFN γ e TNF- α , estimulan respuestas mediadas esencialmente por macrófagos y basófilos, que conducen al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad retardada, que es generada por las garrapatas duras que se caracterizan por una alimentación lenta (Fontaine *et al.*, 2011).

La introducción de saliva de las garrapatas en la piel de un hospedero insensibilizado, causa la degranulación de mastocitos y basófilos, posiblemente mediante hidrólisis enzimática de la membrana plasmática producida por las enzimas salivales. Por

lo tanto, se liberan factores quimiotácticos y vasoactivos que pudieran contribuir a la infiltración de leucocitos observados en los sitios de unión de las garrapatas durante las primeras exposiciones del animal (Tabor *et al.*, 2017).

La generación de C5a por la activación de la vía alternativa del complemento, también pudiera contribuir a influjos celulares hacia el sitio donde pica la garrapata. Como se mencionó anteriormente, muchas garrapatas tienen la capacidad de modular las respuestas innata y adquirida del hospedero, debido a que la saliva contiene inhibidores de la ruta alternativa de activación del complemento, de anafilotoxinas y de células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), los cuales son elementos de la inmunidad innata. Además, varios antígenos de la saliva tienen la capacidad de eludir o suprimir los mecanismos inmunológicos reduciendo la producción de citocinas por parte de los macrófagos, los cuales son de gran importancia para iniciar los primeros pasos de la respuesta inmune adquirida contra la garrapata (Xu *et al.*, 2005). Las principales alteraciones que ocurren en este caso, se debe a que se afectan las señales requeridas para la estimulación de los linfocitos T y B. Por ejemplo, la capacidad de proliferación de los linfocitos T disminuye, al igual que la producción de IL-2 e IFN- γ por los linfocitos Th1. Sin embargo, la producción de IL-4 por los linfocitos Th2 se mantiene normal (Kazimirova y Stibraniova, 2013).

Memoria inmunológica e inmunidad

Cuando por primera vez un organismo se encuentra con un antígeno se produce una respuesta inmune que se denomina "respuesta primaria". Por el contrario, cuando el organismo vuelve a ser desafiado, por el mismo antígeno, se produce una respuesta mucho más rápida y eficaz denominada "respuesta secundaria". Las diferencias esenciales son: a) En la respuesta primaria los niveles de inmunoglobulinas se alcanzan tras un largo período después del estímulo antigénico, mientras que en la respuesta secundaria se alcanzan más rápidamente; b) La respuesta primaria es de menor intensidad que la secundaria; c) En la respuesta primaria predomina la inmunoglobulina IgM, mientras que en la secundaria predomina la IgG; d) La respuesta secundaria, al predominar en ella la IgG, de vida media más larga que la IgM, es más permanente en su acción que la primaria y además, los anticuerpos de la respuesta secundaria poseen mayor afinidad que en la primaria (Sun *et al.*, 2014)

La inducción de la memoria inmunológica es una característica del sistema inmune adaptativo y es la parte medular para todos los regímenes de vacunación. Esta se define como una respuesta que permanece en ausencia de antígenos, es decir, que la respuesta

puede ser mantenida por un largo tiempo después de la aplicación de una vacuna. La memoria inmunológica involucra tanto a células B y T de memoria, en ambos casos, son clones de células que están listas para responder rápidamente en contra del patógeno (Dogan *et al.*, 2009). Además, otras células que son fundamentales en el mantenimiento de la memoria inmunológica, son las células plasmáticas de larga vida, las cuales son la fuente principal de anticuerpos detectables. Se ha observado que se puede mantener un estado de protección inmunológica años después del estímulo antigénico, de tal manera que la inducción de una respuesta inmune protectora de larga duración es el principal objetivo en el desarrollo de vacunas (Radbruch *et al.*, 2009).

Linfocitos B

En la mayor parte de las vacunas disponibles hoy en día, el mecanismo de acción está mediado por la generación de anticuerpos protectores de tal manera que la generación y mantenimiento de la respuesta inmune humoral son de gran interés para el desarrollo de nuevas vacunas. Las respuestas de anticuerpos de larga duración se encuentran mediadas por dos tipos principales de células: Las células B de memoria y las células plasmáticas de larga vida, ambas son generadas durante la respuesta primaria a un antígeno (Sallusto *et al.*, 2010).

Los linfocitos B se originan en la médula ósea a partir de progenitores hematopoyéticos pluripotenciales, y es en ella donde se lleva a cabo la maduración final de su receptor antigénico denominado BCR (B cell receptor). Los linfocitos B, además de generar células plasmáticas, pueden actuar como células presentadoras de antígenos profesionales. A diferencia de las células dendríticas y de los macrófagos, que reconocen al patógeno fundamentalmente mediante receptores de reconocimiento de patrones (Radbruch *et al.*, 2006), los linfocitos B realizan el reconocimiento de los patógenos a través de su BCR, que está formado por una inmunoglobulina de membrana, asociada a un heterodímero de dos cadenas proteicas, conocidas como Ig- α Ig- β o CD79a y CD79b, que se encarga de la transmisión de la señal al interior de la célula (Hikida *et al.*, 2009).

Las células B, están adaptadas para capturar específicamente moléculas solubles a través de sus receptores de superficie, interiorizando posteriormente todo el conjunto (receptor y antígeno). Después de este proceso tiene lugar el fraccionamiento (procesamiento), tras el cual, los péptidos resultantes vuelven a la superficie de la célula unidos a moléculas de Clase II del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) (Yuseff *et al.*, 2013). Como el mecanismo de captura e ingestión es muy eficaz y los linfocitos B expresan constitutivamente grandes cantidades de moléculas Clase II se

generan grandes concentraciones de complejos presentadores en la superficie. Sin embargo, las células B no tienen actividad co-estimuladora de forma constitutiva pero existe una serie de productos microbianos que la pueden inducir mediante la expresión de CD80 (B7.1) y, sobre todo, CD 86 (B7.2) (Bar-Or *et al.*, 2001). En el caso de CD80 se identificó inicialmente como una molécula expresada por las células B activadas mediante lipopolisacárido bacteriano. Esto explica el por qué es imprescindible inyectar adyuvantes bacterianos para obtener una respuesta inmune a proteínas solubles que requieren a las células B como células presentadoras de antígenos.

Algunas de las células B activadas no dan origen a células plasmáticas sino que adquieren capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo sin proliferar y aparentemente sin estimulación antigénica. Son producidas en los centros germinales y son capaces de organizar una respuesta rápida a una nueva exposición al mismo antígeno. Por lo general este tipo de células han sufrido un cambio de isotipo, el receptor es de alta afinidad y pueden recircular entre los tejidos linfáticos (Allen *et al.*, 2007).

Marcador CD45R (B220)

El marcador CD45, también conocido como antígeno panleucocitario, es una glicoproteína transmembrana con un peso molecular de 180-220 KD con actividad tirosin fosfatasa y se expresa con diferentes isoformas en todas las células nucleadas del sistema hematopoyético (Hermiston *et al.*, 2003). Esta molécula presenta al menos 8 isoformas producidas por el splicing alternativo del ARNm de sus 3 4 exones, los exones 4, 5 y 6 que codifican múltiples sitios de glicosilación en su dominio extracelular (Dawes *et al.*, 2006). Las dos isoformas de CD45 de mayor importancia son CD45R y CD45RA. La isoforma CD45RA es la isoforma de mayor peso molecular, puesto que conserva la expresión de los 3 exones, y se presenta en los linfocitos vírgenes circulantes. La otra isoforma (CD45R) es la forma de menor peso molecular, ya que carece de los 3 exones, y está menos glicosilada. Esta última isoforma se expresa en los linfocitos circulantes tras la activación y se asocia con la adquisición de memoria inmunológica (células de memoria). CD45 es un regulador positivo de la señalización del receptor de antígeno de los linfocitos B y algunas subclases de linfocitos T.

La unión del receptor de las células B (BCR) y el péptido antigénico presentado por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) inicia una cascada de transducción de señales que al final conducen a la activación del linfocito. Este proceso se inicia con la activación de las proteínas tirosina quinasas las cuales fosforilan los inmunoreceptores presentes en el BCR. El resultado en el aumento de la actividad es la fosforilación de

numerosas proteínas y enzimas que facilitan la estimulación de las vías de señalización para la activación de las células B con la transcripción de nuevos genes principalmente para la producción de citocinas y su proliferación. Se estima que esta proteína ocupa un 10% del área de la superficie celular de linfocitos B y T donde juega un rol importante en la regulación de la diferenciación celular (Hermiston *et al.*, 2003).

Células plasmáticas

Los linfocitos B sufren un proceso de diferenciación que en su fase efectora final, dando lugar a una nueva célula llamada célula plasmática (CP), cuya función es producir anticuerpos a gran escala, pero que no puede dividirse (Oracki *et al.*, 2010). Las CPs se desarrollan en los órganos linfoides secundarios y en sitios de respuestas inmunes (por ejemplo placas de Peyer), como resultado final de procesos de activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B específicos, en presencia del antígeno (Ag) de estímulos producidos por linfocitos T y otras células colaboradoras. Las CPs tempranas se forman en la denominada reacción extrafolicular, en la que algunos linfocitos B pueden diferenciarse en CPs de vida corta, cuyos segmentos génicos V mantienen su configuración germinal al no haber sufrido todavía mutaciones somáticas (Ahuja *et al.* 2008). En el caso de existir linfocitos B de memoria para el Ag inductor, éstos son también reclutados en estos focos, donde se diferencian a CP tempranas. Posteriormente, y si existe suficiente Ag, se produce la activación del centro germinal. En los centros germinales los linfocitos B proliferan, maduran la afinidad de sus Igs mediante el proceso de hipermutación somática (SHM) y selección antigénica, donde experimentan cambio de clase o isotipo (Yuseff *et al.*, 2013). Tras estos procesos, algunas CP migran a la médula ósea, donde pueden sobrevivir durante largo tiempo una vez inducida la respuesta inmune, e incluso una vez eliminado el Ag; sólo una pequeña proporción persiste en otros órganos secundarios como el bazo (Slifka y Ahmed, 1998).

La vida media de las células plasmáticas (CP) puede variar entre unos cuantos días hasta varios meses y en base a esto, se pueden clasificar en 2 tipos de CPs: las de vida corta y las de vida larga (Liu *et al.*, 2012). Se ha establecido que ambos procesos de maduración se llevan a cabo en los centros germinales y que la generación de células B de memoria es necesaria para producir CP de larga vida. Estas 2 poblaciones celulares expresan el marcador CD138 (Syndecan-1) y ya no expresan los marcadores típicos de linfocitos B (CD19, B220) (Kunkel & Butcher 2003). Además, expresan ciertas moléculas de adhesión como el ligando de la selectina E y P, CD11a, CD18 y CD44. También expresan CXCR4 el ligando que se encuentra en los cordones medulares de los

ganglios, en la pulpa roja del bazo y en médula ósea. Por otra parte, dejan de expresar CXCR5 y CCR7. El 0,1 al 1% de la médula ósea puede estar ocupada por células plasmáticas de larga vida (Hargreaves, *et al.*, 2001).

Molécula CD/138 (Sindecano-1)

La determinación del inmunofenotipo es útil para caracterizar y distinguir a las células plasmáticas ya sean sanas reactivas o patológicas. Las células plasmáticas se caracterizan esencialmente por la co-expresión de las moléculas de membrana CD138 o syndecano1 y CD38, lo que permite su identificación mediante citometría de flujo de muestras provenientes de médula ósea, sangre periférica o suspensiones celulares de tejidos (Hallile *et al.*, 2015).

Los sindecanos son proteínas de transmembrana pertenecientes a la familia de proteoglicanos, tienen gran importancia en la adhesión y señalización celular. Su principal característica son sus cadenas de sulfato de heparano, las cuales les confieren la propiedad de unir proteínas extracelulares, ya sean plasmáticas, como la antitrombina 1, o de matriz extracelular, como la fibronectina. También son capaces de formar complejos de señalización, con los factores de crecimiento y morfogénicos (O'Connor *et al.*, 2002). Existen 4 tipos de sindecanos descritos, expresados en diferentes tipos celulares los cuales varían su expresión en ciertas condiciones fisiológicas y patológicas. La mayoría de las células expresa combinaciones distintas de los cuatro sindecanos en la medida que se diferencian, resultando en patrones selectivos de expresión que probablemente reflejan distintas funciones. El sindecano 1 o CD138 es una glucoproteína transmembranaria de 30.5 kDa que se expresa en distintas etapas de la diferenciación en células linfoides normales, tales como los pre-linfocitos B, los linfocitos B inmaduros y las células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas, así como en el epitelio estratificado y simple. Sin embargo, mediante citometría de flujo se comprobó que se expresa con mucha mayor intensidad en las células plasmáticas, en comparación con cualquier otra célula del sistema sanguíneo. Por lo tanto, su fuerte expresión (CD138+++) se considera un marcador específico de células plasmáticas (Medina *et al.*, 2002).

CAPÍTULO 1. TENDENCIAS ACTUALES EN EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA GARRAPATAS EN BOVINOS

Capítulo del libro “Tópicos selectos de medicina veterinaria II”. Primera edición. Editor: Dr. Jaime Salinas Chavira. Editorial Plaza Valdéz

Estatus. En revisión por la editorial.

Verónica Carvajal de la Fuente^{1*}
José Octavio Merino Charrez²
Fernando Alberto Muñoz Tenería³
Jorge Loredó Osti⁴

Introducción

El desarrollo de una vacuna comienza con la identificación, de aquellos componentes o estructuras únicas que sean capaces de generar una respuesta inmune protectora. El uso de la inmunización para el control de garrapatas fue demostrado por primera vez 1979 por Allen y Humphreys, sin embargo, no fue hasta la década de los 90, que varios antígenos seleccionados fueron aislados como candidatos vacunales; entre ellos destacaron los extraídos a partir de las células intestinales de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como el Bm95, Bm91, y el más conocido, Bm86 (Rand *et al.*, 1989). El principal mecanismo de acción de estos inmunógenos es que al ser inoculados en el animal, se producen anticuerpos que al unirse a su antígeno correspondiente, inducen la destrucción de las células intestinales provocando que el contenido intestinal se introduzca

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tamaulipas, km 5, Carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, CP 87000, México.

² *Ibíd.*

³ Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Km. 14.5 Carretera San Luis Potosí-Matehuala, Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, S.L.P. CP. 78321, México.

⁴ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tamaulipas, km 5, Carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, CP 87000, México.

*Autor para correspondencia E-mail: vcarvajal@docentes.uat.edu.mx

a la hemolinfa y como consecuencia se produzca la muerte de la garrapata (Rodríguez *et al.*, 1995). Bm86 fue la primera glicoproteína que fue clonada y utilizada en vacunas comerciales denominadas TickGARDPLUS-™ en Australia y Gavac™ en América Latina.

Uno de los principales objetivos al momento de diseñar una vacuna anti-garrapata es utilizar antígenos que logren una mejor protección ante la mayor cantidad de especies de garrapatas; además, se busca reducir la capacidad que poseen estos parásitos para transmitir distintos patógenos (de la Fuente *et al.*, 2017). No obstante, identificar cuáles son las moléculas que sean esenciales para la sobrevivencia, infección y transmisión de patógenos, son uno de los factores limitantes para crear vacunas con este nuevo enfoque. Afortunadamente, gracias a los últimos avances en bioinformática, genómica funcional y proteómica, es posible seleccionar, clonar y expresar aquellos genes de interés de distintas especies de garrapatas que se encuentran en la base de datos de acceso público (Vector Base, The Gene Index Project, Cattle Tick Base), para posteriormente purificar las proteínas recombinantes y finalmente, identificar *in vitro* e *in vivo* los posibles candidatos vacunales (Capecchi *et al.*, 2004; de la Fuente *et al.*, 2008). La identificación de estas moléculas necesarias tanto para la sobrevivencia de las garrapatas y la transmisión e infección de patógenos, facilitará la selección de blancos que contribuirán al descubrimiento de nuevas estrategias de vacunas para el control simultáneo de infestaciones de garrapatas y patógenos transmitidos.

Antígeno Bm86

Bm86 es una glicoproteína de membrana expresada principalmente en las células del tracto digestivo de las hembras *R. microplus*. Su función no se ha elucidado completamente; sin embargo, se ha demostrado que esta proteína contiene varios receptores tipo factor de crecimiento epidérmico (EFG-like domains) que pueden estar involucradas en la coagulación de la sangre y el crecimiento celular (Rand *et al.*, 1989). Homólogos y ortólogos de BM86 de diferente especies de garrapatas, como *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus decoloratus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* y *Rhipicephalus appendiculatus*, se han identificado y considerado como potenciales candidatos vacunales para el control de infestaciones de garrapatas (Jeyabal *et al.*, 2010).

Los mecanismos exactos por los cuales el antígeno BM86 provoca la muerte de la garrapata no son bien comprendidos, sólo se sabe que la respuesta inmune humoral juega un rol muy importante. No obstante, en un estudio realizado con ratones inmunizados con una vacuna recombinante de Bm86 se observó, un aumento en los títulos de anticuerpos de tipo IgG, específicamente IgG2a e IgG2b así como una mayor cantidad sérica de interleucinas como IL4, IL5, IL12 e interferón gamma comparada con los ratones controles, sugiriendo que la inmunización con esta vacuna recombinante induce una fuerte respuesta de tipo humoral y celular (Ruiz *et al.*, 2007).

Proteínas salivales como antígenos vacunales

El comienzo de la alimentación de la garrapata sobre un animal que nunca antes estuvo expuesto a infestaciones por este parásito, se caracteriza por el reconocimiento de inmunógenos salivales (los cuales pueden variar durante el ciclo biológico del parásito) por parte de las células de la epidermis y la dermis que se concentran en el sitio de la mordida. Estos, al entrar en contacto con el sistema inmune del hospedador son capaces de inducir una respuesta innata y posteriormente una específica de tipo humoral (producción de anticuerpos), celular (células citotóxicas) o ambas. Sin embargo, en algunos trabajos se ha reportado que el tipo de respuesta inmunológica (innata o específica) producida durante la alimentación dependerá tanto de la especie de garrapata como el tipo de huésped. Estos inmunógenos salivales son principalmente moléculas antihemostáticas, que permiten a la garrapata mantener la hemorragia, moléculas antiinflamatorias, que entre otras acciones, evitan el prurito y el dolor de la picadura, y moléculas inmunomoduladoras, que permiten a las garrapatas alimentarse sobre hospedadores sensibilizados en contactos previos y que además, facilitan la transmisión

de patógenos (Stibraniova *et al.*, 2013). Debido a sus variadas actividades biológicas, estas moléculas salivales han despertado un gran interés como blancos antigénicos para el desarrollo de vacunas anti-garrapata que no sólo bloqueen sus infestaciones sino también la transmisión de patógenos (Betancur *et al.*, 2015; de la Fuente *et al.*, 2017).

Antígeno Salp15

Salp 15 es una proteína secretada en la saliva de *I. scapularis* e *I ricinus* que tiene propiedades inmunosupresoras en el huésped donde inhibe la activación de las células T CD4, el complemento y la función de las células dendríticas. Osp C es una proteína de superficie exterior de *B. burgdorferi* (agente causal de la enfermedad de Lyme) que se expresa de forma diferencial para ayudar a la espiroqueta a que se adapte, sobreviva y persista en el artrópodo. Cuando la garrapata empieza a alimentarse con sangre del huésped, la espiroqueta inicia la síntesis de Osp C en el intestino de la garrapata infectada. La proteína Salp 15 físicamente se une a Osp C de la superficie de *B. Burgdorferi*, durante la salida de la glándula salival facilitando la sobrevivencia de la bacteria, su transmisión e infección del huésped. La interacción Salp15-Osp C oculta la proteína Osp C de la respuesta inmune del huésped, protegiendo a la espiroqueta (Ramamoorthi *et al.*, 2005).

Factor liberador de histamina de garrapata

El factor liberador de histamina de *I scapularis* fue caracterizado por Dai *et al.* (2010). Es una proteína secretada en la saliva y es sobre-expresada en garrapatas infectadas con *B. burgdorferi*. El silenciamiento de esta proteína usando ARN de interferencia significativamente afectó la alimentación de la garrapata y disminuyó considerablemente los niveles de infección de *B. burgdorferi* en ratones. El bloqueo de esta proteína podría ser una opción viable para desarrollar vacunas que dificulten la alimentación y por lo tanto la transmisión de patógenos.

Antígeno silk

La proteína flageliforme Silk fue previamente descubierta en las glándulas salivales de garrapatas. Se ha sugerido que juegan un importante papel en la infección y/o multiplicación de *Anaplasma marginale*. Además, se ha demostrado que los niveles de mRNA incrementaron en respuesta a la infección de *A. marginale* en las glándulas salivales de *R. microplus*. Algunos experimentos con ARN de interferencia mostraron un

74% de mortalidad de garrapatas y una reducción del 63% de los niveles de DNA después del bloqueo del gen. Adicionalmente, se demostró que esta proteína puede participar en la adhesión de las garrapatas a su huésped. (Zivkovic *et al.*, 2010).

TSLPI (Inhibidor de la vía de las lectinas de la glándula salival).

TSLPI es una proteína identificada por Schuijt *et al.* (2011) que protege a la bacteria *Borrelia burgdorferi* de ser destruida por el sistema del complemento (vía de las lectinas) del huésped. En este estudio se silenció el gen que codifica para esta proteína mediante RNA de interferencia donde se demostró que se redujo significativamente el porcentaje de infección en ninfas y además se impidió su transmisión en ratones.

Antígeno p64TPR

El antígeno p64TPR, es una proteína recombinante de 15 kDa que fue identificada en la garrapata de tres hospedadores *Rhipicephalus appendiculatus*. Esta es una proteína de tejido que es producida por ciertas especies de ectoparásitos que se alimentan de sangre con el fin de poder adherirse y alimentarse con mayor facilidad. El efecto de la inmunización con esta proteína en cobayos infestados con ninfas y adultos fue la disminución de la infestación de 48 y 70% respectivamente (de la Fuente y Kocan, 2008).

Subolesina

Recientemente, el silenciamiento de genes como una herramienta de la genómica funcional, permite hacer inferencias sobre la importancia de la función de ciertas proteínas en la fisiología de las garrapatas, tal es el caso del gen de la “subolesina” la cual fue descubierta en *Ixodes scapularis* como un antígeno protector y que es estructural y funcionalmente ortóloga a la akirina en insectos y vertebrados (Canales *et al.*, 2009). La subolesina es una proteína evolutivamente conservadas que regula la expresión génica y por lo tanto, interviene en múltiples procesos fisiológicos celulares, como la digestión, la respuesta inmunitaria, la reproducción y el desarrollo (Almazán, *et al.*, 2005; de la Fuente, *et al.*, 2006; Kocan, *et al.*, 2009). Además, ha demostrado participar en la regulación de la transcripción y el control de la respuesta inmune frente a la infección de varios patógenos (de la Fuente *et al.*, 2006; Merino *et al.*, 2013; Zivkovic *et al.*, 2010; Naranjo *et al.*, 2013). Se ha sugerido que la función de la subolesina puede ser similar a la de insectos y vertebrados en el control de NF-kB dependiente e independiente de la expresión génica en las garrapatas (Galindo *et al.*, 2009). Por lo tanto, la subolesina también está implicada en la regulación de su propia expresión a través de la interacción con el factor de transcripción NF-kB (Naranjo *et al.*, 2013). En un estudio llevado a cabo por Kocan (2009) demostró que la regulación de subolesina en las glándulas salivales de las garrapatas infectadas con *A. marginale* se ve afectada por la infección, demostrando así su participación en la inmunidad innata de la garrapata sugiriendo que la subolesina puede funcionar en las glándulas salivales para limitar la infección patógena a niveles que no sean perjudiciales para las garrapatas.

Experimentos de vacunación han demostrado que la inmunización con subolesina/akirina, reduce significativamente las infestaciones de distintas garrapatas, mosquitos y otros artrópodos (de la Fuente y Merino, 2013). Gracias a estos resultados se propuso el desarrollo de vacunas diseñadas para el control de múltiples vectores artrópodos utilizando las proteínas ortólogas de subolesina para producir una vacuna mucho más efectiva (Willandsen, 2006; Canales *et al.*, 2009). Además se valoró la eficacia de subolesina como vacuna para el control no sólo de infestaciones con *R. microplus*, sino también para controlar infecciones contra *A. marginale* y *Babesia bigemina* obteniendo buenos resultados (Merino *et al.*, 2011; Merino *et al.*, 2013).

Hasta el día de hoy, solo 2 ejemplos de vacunas combinadas han mostrado ser promisorias, el antígeno BM86 y subolesin además de péptidos derivados del análisis de

los genomas (vacunología reversa). Aunque no se ha comprendido completamente, las funciones de BM86 y subolesina, es más probable que sean diferentes basándose en fenotipos observados después de la inmunización con antígenos individuales y la localización subcelular de estos. Tomando en cuenta estas consideraciones una nueva fórmula de vacuna que contiene la combinación de BM86 y subolesina fue recientemente patentada argumentando que existe una sinergia entre estos antígenos que resultan en una vacuna con mayor eficacia para controlar las infestaciones de garrapatas en el ganado (de la Fuente *et al.*, 2015). El mecanismo fundamental por el cual se produce protección utilizando la combinación de Bm86 y subolesina así como los péptidos derivados de la vacunología reversa aún necesita ser elucidado.

Ferritinas

Las ferritinas son proteínas almacenadoras de hierro que juegan un papel primordial en la homeostasis del hierro durante la alimentación de la garrapata. Un tipo común de ferritina 2 compuesta por una cadena pesada, ha sido recientemente caracterizada como una proteína secretada específica del intestino hacia la hemolinfa de la garrapata donde actúa como transportador de hierro. Para evaluar la eficacia de Ferritina 2, Hajdusek *et al.*, (2010) inmunizaron conejos y bovinos con proteínas obtenidas de *Ixodes ricinus* (IrfER2) y *R. microplus* (RmFER2) respectivamente. En este estudio se logró demostrar que la IrfER2 redujo significativamente el número de garrapatas, el peso y porcentaje de fertilidad de *I. ricinus* en conejos con una eficacia general de 98%. La eficacia general para RmFER2 para el control de infestaciones de *R. microplus* en bovinos fue del 64%.

Serpinas (Inhibidores de la serina proteasa).

Las serpinas son un grupo de proteínas con estructuras similares capaces de inhibir otras enzimas del grupo de las proteasas encontradas en una gran variedad de organismos incluyendo los artrópodos hematófagos. Estas proteínas regulan importantes funciones como la coagulación de la sangre, digestión del alimento y respuestas inflamatorias e inmunes por los que son consideradas como posibles blancos de antígenos para el uso de vacunas (Mulenga *et al.*, 2001).

Proteínas de Choque Térmico (HSP)

Las proteínas del shock térmico pertenecen a una familia que se encuentra, en su mayor parte, en forma constitutiva en todas las células pro y eucariotas. Frente a determinadas agresiones ambientales, toxicidad o presencia de infecciones, los organismos reaccionan con un mecanismo de defensa celular que involucra la sobreexpresión de estas proteínas. Su función es minimizar los daños producidos por el estrés mejorando la supervivencia de las células. La superfamilia de estas proteínas se compone de varias familias cuyos miembros se agrupan en base a sus pesos moleculares.

Las Hsp70 es la más conservada en la evolución, siendo constitutiva y participando en los procesos de maduración de otras proteínas celulares, transporte de las mismas, eliminación de proteínas desnaturalizadas y actividad de ATPasa. Frente a la infección por *A. phagocytophilum*, se ha demostrado que las proteínas de estrés térmico Hsp70 y Hsp20 juegan un papel en el proceso infeccioso a través de su inducción e inhibición, respectivamente. Además, a partir de ensayos funcionales se comprobó que el silenciamiento génico de Hsp70 y Hsp20 afecta negativamente en la alimentación de la garrapata, así como en su capacidad de búsqueda de los hospedadores vertebrados a través del ascenso por la vegetación. Es curioso observar cómo la propia alimentación de la garrapata dispara la expresión de genes que el patógeno puede utilizar en su propio beneficio, y cómo de la misma manera, el aumento de la temperatura ambiental induce igualmente la expresión de genes de respuesta a estrés que le permiten a la garrapata aumentar la velocidad de ascenso por la vegetación con el fin de encontrarse lo antes posible con el hospedador, minimizando el tiempo de exposición a la desecación. Estos resultados sugieren la existencia de una relación establecida entre las HSPs y los procesos fisiológicos de vital importancia para la garrapata Ayllon *et al.*, (2015).

Proteína mayor de superficie de Anaplasma (MSP)

La anaplasmosis bovina es una enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en el ganado bovino de regiones tropicales y subtropicales (Kocan *et al.*, 2004). Diferentes especies de *Anaplasma* (*A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* y *A. bovis*) de distintas regiones del mundo han sido identificadas en las cuales se puede observar que difieren en su biología, características genéticas y transmisibilidad por garrapatas. Esta diversidad genética ha sido caracterizada utilizando seis genes que codifican ciertas proteínas que se encuentran localizadas en la membrana celular de la rickettsia conocidas como proteínas principales de superficie o MSP (por sus siglas en

inglés) y que constituyen blancos de la respuesta inmune de los hospederos vertebrados e invertebrados contra el patógeno. Estos genes se han denominado MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 (Kocan *et al.*, 2004; de la Fuente *et al.*, 2005). El gen que codifica MSP1a se conserva durante la multiplicación de la rickettsia en bovinos y garrapatas y se ha demostrado ser una adhesina de eritrocitos bovinos y en células de garrapatas (García-García *et al.*, 2009)(de la Fuente *et al.*, 2003). La proteína MSP4 forma parte de la membrana externa con ortólogos en todos los *Anaplasma spp.* examinados hasta el momento (Molad *et al.*, 2004), es una proteína altamente conservada entre especies y aunque la función de esta proteína es desconocida para cualquier *Anaplasma spp.*, es útil para la identificación de la Anaplasmosis (de la Fuente *et al.*, 2003; de la Fuente *et al.*, 2005).

Recientemente, Villar *et al.* (2015) demostraron que *A. phagocytophilum* activa un nuevo mecanismo asociado con estrés celular bacteriano y proteínas de membrana para contrarrestar la respuesta celular de la garrapata hacia las infecciones y favorecer así la multiplicación del patógeno. Estos resultados muestran que la proteína mayor de superficie 4 (MSP4) y la proteína de choque térmico HSP70, se encuentran localizadas en la membrana bacteriana donde interactúan posiblemente durante la infección del patógeno en la garrapata. Además, se ha demostrado que los anticuerpos producidos en contra de MSP4 y HSP70 inhiben la infección del patógeno en las células de la garrapata. Estos resultados respaldan la idea de que estas proteínas tienen efecto controlando la infección y la transmisión por patógenos (Villar *et al.*, 2015). Se ha sugerido que el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-MSP4 y anti-HSP70 podrían ser el resultado del bloque de estos anticuerpos en la interacción entre los ligandos bacterianos (ejemplo MSP4) y los receptores de la garrapata o bien, que tiene un efecto en la funcionalidad en las proteínas necesarias para establecer la infección o multiplicación de la bacteria en las células de las garrapatas sugiriendo que las proteínas MSP4 y HSP70 de *A. phagocytophilum* pueden ser potenciales candidatos de antígenos protectores que interfieren con la infección del patógeno en garrapatas de *Ixodes scapularis*.

Conclusiones

El desarrollo de una vacuna para el control de garrapatas y patógenos transmitidos en bovinos, constituye hoy en día, una de las opciones más viables para sustituir el uso de acaricidas. La aplicación del conocimiento básico del genoma y el proteoma de la garrapata y de la regulación temporal de los genes involucrados en la transmisión de enfermedades, constituyen un generador importantísimo de información para alcanzar

dichos objetivos. Asimismo, la lista creciente de nuevos antígenos descubiertos a partir de cepas locales de garrapatas, constituye una herramienta esencial para obtener los candidatos idóneos para un mejor control integrado regionalmente. No obstante, a nivel de campo esto aún representa un verdadero reto para la comunidad científica de México y el mundo.

References

- Allen, J.R., and Humphreys, S.J. (1979). Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. *Nature*. 280, 491-493.
- Almazán, C., Kocan, K.M., Blouin, E.F., de la Fuente, J. (2005). Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*. 23, 5294–5298. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.004>
- Ayllón, N., Villar, M., Galindo, R.C., Kocan, K.M., Šíma, R., López J.A., *et al.* (2015). Systems biology of tissue-specific response to *Anaplasma phagocytophilum* reveals differentiated apoptosis in the tick vector *Ixodes scapularis*. *PLoS Genet*. 11:e1005120. 10.1371/journal.pgen.1005120
- Betancur, H.O., Betancourt E.A., Giraldo, R.C. (2015). Importance of ticks in the transmission of zoonotic agents. *Rev. MVZ Córdoba*. 20, 5053-5067.
- Canales, M., Naranjo, V., Almazán, C., Molina, R., Tsuruta, S. A., Szabó M.P.J., *et al.* (2009). Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick protective antigen, subolesin. *Parasitol. Res*. 105, 97–111. 10.1007/s00436-009-1368-2.
- Capecchi, B., Serruto, D., Adu-Bobie, J., Rappuoli, R., Pizza, M. (2004). The Genome revolution in vaccine research. *Curr Issues Mol Biol*. 6, 17-28.
- Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., and Fikrig, E. (2010). Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent. *PLoS Pathog*. 6:e1001205.
- de la Fuente, J., Blouin, E.F., Kocan, K.M. (2003). Infection exclusion of the rickettsial pathogen *Anaplasma marginale* in the tick vector *Dermacentor variabilis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 10, 182–184. 10.1128/cdli.10.1.182-184.2003

- de la Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E.F., Naranjo, V., Kocan, K.M. (2005). RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol Res.* 96, 137–141.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 28, 275–83.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci.* 13, 6938-46.
- de la Fuente, J., Merino, O. (2013). Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine.* 31, 5923–5929. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.049>
- de la Fuente, J., Contreras, M. (2015). Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev. Vaccines* 14, 1367–1376. [10.1586/14760584.2015.1076339](https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1076339)
- de la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A.G., Estrada-Peña, A., Jonsson, N., Kocan, K.M., Mansfield, K.L., Nijhof, A.M., Papa, A., Rudenko N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Caracappa, S., Fooks, A.R, Gortazar, C., Ryan, O., Rego, M. (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 7,14.
- Galindo, R.C., Doncel-Pérez, E., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Gortazar, C., Mangold, A. J., De la Fuente, J. (2009). Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Developmental y Comparative Immunology.* 33(4), 612-617.
- Garcia-Garcia, J.C., Barat, N.C., Trembley, S.J., Dumler, J.S. (2009). Epigenetic silencing of host cell defense genes enhances intracellular survival of the rickettsial pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *PLoS Pathog.* 5:e1000488. [10.1371/journal.ppat.1000488](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000488)
- Hajdusek, O., Almazán, O., Loosova, G., Villar, M., Canales, M., Grubhoffer, L., Kopecek, P., de la Fuente, J. (2010). Characterization of ferritin 2 for the control of

tick infestations. *Vaccine*. 28, 2993-2998.

- Jeyabal, L., Azhahianambi, P., Susitha, K., Ray, D.D., Chaudhuri, P., Ghosh, S. (2010). Efficacy of rHaa86, an orthologue of Bm86, against challenge infestations of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Transbound Emerg Dis*. 57, 96-102.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. 129:285–300. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004700>
- Kocan, K. M., Zivkovic, Z., Blouin, E. F., Naranjo, V., Almazán, C., Mitra, R., y de la Fuente, J. (2009). Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC developmental biology*. 9(1), 1.
- Molad, T., Brayton, K.A., Palmer, G.H., Michaeli, S., Shkap, V. (2004). Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. centrale* vaccine strain. *Vet. Microbiol*. 100(1- 2), 55-64.
- Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., De la Fuente, J. (2011). Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine*. 29, 8575–8579. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.023>
- Merino, O., Alberdi, P., Pérez de la Lastra, JM., de la Fuente, J. (2013). Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Front in Cell and Inf Micro*, 3, 30.
- Mulenga, A., Sugino, M., Nakajima, M., Sugimoto, C., and Onuma, M. (2001). Tick-encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. *J. Vet. Med.Sci*. 63, 1063–1069.
- Naranjo, V., Ayllón, N., Pérez de la Lastra, J.M., Galindo, R.C., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Mitra, R., Alberdi, P., Villar, M., de la Fuente, J. (2013). Reciprocal Regulation of NF-kB (Relish) and Subolesin in the Tick Vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065915>
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X.F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M.V., Kantor, F.S., Anderson, J.F., Koski, R.A., Fikrig, E. (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*. 436 (7050), 573-7.

- Rand, K., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G.S. (1989). Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86, 9657-9661.
- Rodríguez, M., Massard, C.R., Fonseca, D.A., Ramos, N.F., Machado, H., Labarta, V. & de la Fuente, J. (1995). Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine*. 13, 1804-1808.
- Ruiz, L.M.1., Orduz, S., López, E.D., Guzmán, F., Patarroyo, M.E., Armengol, G. (2007). Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm86 gene. *Vet Parasitol*. 144(1-2),138-45.
- Schuijt, T.J., Coumou, J., Narasimhan, S., Dai, J., Deponte, K., Wouters, D., Brouwer, M., Oei, A., Roelofs, J.J., Van Dam, A.P., Van der Poll, T., Van't Veer, C., Hovius, J.W., Fikrig, E. (2011). A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease agent. *Cell Host Microbes*. 10,136-146.
- Stibraniova, I., Lahova, M., & Bartikova, P. (2013). Immunomodulators in tick saliva and their benefits. *Acta Virol*. 57 (2), 200-216.
- Villar, M., Ayllón, N., Kocan, K. M., Bonzón-Kulichenko, E., Alberdi, P., Blouin, E. F., et al. (2015). Identification and characterization of *Anaplasma phagocytophilum* proteins involved in infection of the tick vector, *Ixodes scapularis*. *Plos One*. 10, (9). :e0137237. doi: 10.1371/journal.pone.0137237
- Willadsen P. (2006). Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet Parasitol*. 138, 161–168.
- Zivkovic, Z., Esteves, E., Almazán, C., Daffre, S., Nijhof, A.M., Kocan, K.M., Jongejan, F., de la Fuente, J. (2010). Differential expression of genes in salivary glands of male *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to infection with *Anaplasma marginale*. *BMC Genomics*. 11,186.

CAPITULO 2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE SUBOLESINA EN *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* INFECTADAS CON *ANAPLASMA MARGINALE*.

**Artículo publicado en el Journal: Experimental and Applied Acarology (2018)
76:229–241 <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0302-7>**

DIFFERENTIAL EXPRESSION ANALYSIS FOR SUBOLESIN IN *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* INFECTED WITH *ANAPLASMA MARGINALE*.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus (formerly *Boophilus microplus*) ticks are potential vectors of several pathogens of livestock especially in tropical and subtropical regions where may have substantial effects on economic development. Among tick-borne pathogens, *Anaplasma marginale* is considered one of the most important in domestic and wild ruminants worldwide. Different molecular mechanisms have been employed by both ticks and these intracellular pathogens, in order to be able to adapt and survive. Subolesin, originally called 4D8, is an evolutionary well-preserved protein among Ixodid tick species. This new antigen was found to be protective against tick infestations when used as a vaccine, since it has an essential role in tick blood digestion, development and infection of host cells by *Anaplasma marginale*. Recent studies have demonstrated that infection of both tick and vertebrate host cells with this microorganism changed gene expression. Therefore, the main objective of this study was to investigate subolesin expression in uninfected and *A. marginale*-infected *R. microplus* salivary glands by real-time reverse transcriptase (RT)-PCR. To analyze the differential expression of the recombinant protein Subolesin, the gene was previously expressed from ticks infected with *A. marginale*. Results from this study revealed that, the expression of subolesin was significantly higher in salivary glands of infected *R. microplus* in comparison to uninfected ones.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, Subolesin, salivary gland, gene expression, *Anaplasma marginale*.

Resumen

Las garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* son vectores potenciales de patógenos en todo el mundo que causan enfermedades en los seres humanos y en los bovinos. La bacteria *Anaplasma marginale* es un patógeno de gran importancia que afectan a la ganadería y a la fauna silvestre, aunado a ello *R. microplus* y *A. marginale* han desarrollado mecanismos moleculares que contribuyen a su supervivencia. La subolesina, inicialmente llamada 4D8, es una proteína conservada que fue descubierta en la garrapata *Ixodes scapularis* como un antígeno y demostró que era protectora contra las infestaciones de garrapatas cuando se utiliza como vacuna, además de ser altamente conservada entre las garrapatas de la familia Ixodidae. El objetivo de este estudio fue analizar la expresión diferencial de subolesina en garrapatas de la especie *R. microplus* infectadas con *A. marginale* y sin infectar, utilizando RT-PCR y PCR en tiempo real. Para analizar la expresión diferencial de la subolesina, se expresó el gen previamente a partir de garrapatas infectadas con el patógeno *A. marginale*. Los resultados mostraron la sobreexpresión diferencial de subolesina en tejidos de glándulas salivales de *R. microplus* infectadas con *A. marginale* en comparación a la nula expresión de dicha proteína en las *R. microplus* sin infectar.

Palabras clave: *Rhipicephalus microplus*, subolesina, expresión génica, glándulas salivales, *Anaplasma marginale*.

Introducción

La industria del ganado de carne es una de las principales fuentes económicas en México y el mundo. Sin embargo, en las explotaciones ganaderas extensiva, las enfermedades parasitarias se consideran una restricción importante para su desarrollo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). Las garrapatas que afectan al ganado bovino (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) son una de las parasitosis de mayor importancia para la ganadería de México ya que ocasionan excesivas pérdidas económicas, consecuencia del alto costo que representa su control y erradicación. El género *Boophilus*, además de provocar deterioro directo en el animal, aumenta el factor de riesgo al ser vector importante de enfermedades como anaplasmosis (*Anaplasma spp*) y babesiosis (*Babesia spp*) (de la Fuente *et al.* 2008a). Durante las últimas décadas, el método de control que más se ha utilizado ha sido mediante la aplicación de acaricidas, sin embargo, ésta técnica ha sido parcialmente exitosa ya que el uso continuo y la alta exposición que los parásitos

han tenido a estos químicos han propiciado serias consecuencias ambientales ocasionando graves amenazas para la salud pública, así como, la generación de cepas de garrapatas resistentes a estos productos (Kröber and Guerin, 2007; Ghosh *et al.*, 2007). El control inmunológico surgió en la década de los 90's como alternativa de control en donde se identificó el antígeno Bm86, una glicoproteína obtenida de células intestinales de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Almazán *et al.*, 2005)(de la Fuente y Merino, 2013). No obstante, ésta vacuna desde su introducción, tuvo usos limitados en México y Latino américa debido a problemas asociados a su comercialización, a la falta de eficacia contra especies distintas a *R. microplus* y a la persistente presencia de patógenos transmitidos (de la Fuente, 2007). Hoy en día con el desarrollos de nuevas tecnologías como la genómica y proteómica han permitido la identificación de nuevos antígenos candidatos potenciales para controlar un mayor rango de especies de garrapatas así como los patógenos que transmiten (Villar *et al.*, 2017). Entre los antígenos identificados más prometedores se encuentra la subolesina, una proteína que en un principio se le denominó 4D8 y que fue descubierta en la garrapata *Ixodes scapularis* (Almazán *et al.*, 2003). Diferentes pruebas de inmunización donde se usó la proteína recombinante subolesina, han destacado el importante papel que juega en el huésped para protegerlo de infestaciones de garrapatas y cómo ésta además, interfiere con la habilidad de la garrapata para transmitir patógenos, en especial *A. marginale* y *A. phagocytophilum* (de la Fuente *et al.*, 2006). Actualmente, existe evidencia de que la expresión de subolesina varía significativamente en diversos tejidos de garrapatas infectadas con ciertos patógenos sugiriendo que la proteína podría ser funcionalmente importante en la inmunidad innata de la garrapata (de la fuente *et al.*, 2008a)(de la Fuente *et al.*, 2008)(Zivkovic *et al.*, 2010). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la expresión diferencial de subolesina en garrapatas *R. microplus* infectadas con *A. marginale* y sin infectar, utilizando RT-PCR (transcriptasa inversa) y PCR en tiempo real.

Material y Métodos

Cepa de garrapata

Se utilizaron garrapatas *R. microplus* previamente establecidas en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma de Tamaulipas a partir de larvas obtenidas de la cepa denominada susceptible Media Joya (propiedad del germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias).

Cepa de *A. marginale*

El grupo 1 fue inoculado vía intravenosa con 1×10^8 eritrocitos infectados (EI) de *A. marginale* (inoculo de Anaplasma Mex. 30-184-1 clarín 2, Bov. 48 280208 3058EP) propiedad del CENID-PAVET Jiutepec Morelos.

Diseño experimental

Se utilizaron dos becerros esplenectomizados de razas europeas aproximadamente de 8 meses de edad, libres de garrapatas y negativos a hemoparásitos. El primer bovino fue infectado con *Anaplasma marginale* mientras que el segundo fungió como control negativo. Los bovinos fueron mantenidos en corraletas individuales de 55 cm por 150 cm y recibieron dos raciones diarias de alimento y agua *ad libitum*.

Monitoreo de la infección de bovinos con *A. marginale*

El progreso de la infección se analizó diariamente verificando la temperatura corporal, hematocrito y frotis sanguíneo utilizando sangre obtenida a partir de la vena coccígea. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo las normas oficiales de bienestar animal y trato humanitario establecido por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

Infestación y alimentación de *R. microplus*

Los bovinos fueron rasurados en el costado derecho para colocar dos celdas circulares de algodón (25 cm de diámetro) con adhesivo industrial no tóxico (3M Scotch Weld, St. Paul, Minnesota, EE. UU.). Posteriormente se colocaron sobre los becerros 250 mg de larvas de *R. microplus* dentro de las celdas, lo que equivale aproximadamente a 5 mil larvas. En el becerro infectado se tomó el día cero como el nuevo ciclo de la *Anaplasma marginale*, posteriormente se infestó con *R. microplus* el día nueve para colectar el día 21 post infestación esto con el fin de coincidir con el día 30 de la parasitemia deseable de 0.7% a 1% de eritrocitos infectados (EI) (Figura 1).

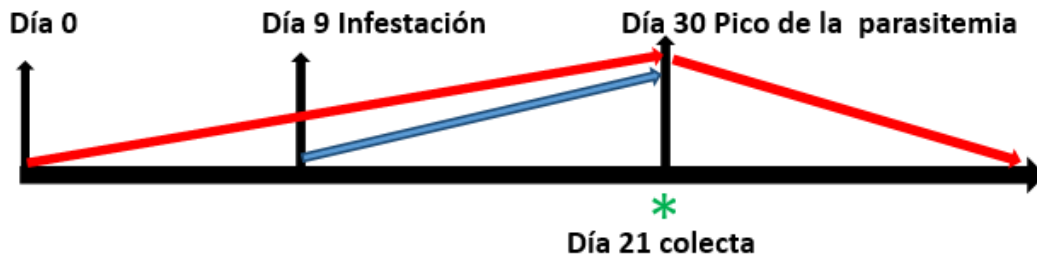


Figura 1. Esquema de infección de *A. marginale* y repleción de *R. microplus* sobre el becerro 1. La flecha color rojo indica la evolución de la anaplasmosis en sus 30 días de ciclo biológico, además, se puede observar el pico más alto de parasitemia el día 30. La flecha color azul muestra el inicio de la infestación con larvas de *R. microplus* en el día 9 (tomando en cuenta el ciclo biológico de la garrapata que es de 21 días). El asterisco nos muestra el día de recolección de hembras de *R. microplus* ingurgitadas de sangre infectada.

Confirmación de la infección del becerro con *A. marginale*.

La confirmación de la infección se realizó a partir de sangre que se extrajo para monitorear el becerro, la cual fue mantenida a -20°C en un lapso no mayor de 24 horas para evitar la degradación del DNA. Se utilizó un kit comercial (Ultra clean DNA BloodSpin Kit, MO BIO Laboratories, USA). El DNA extraído sirvió como molde para la realización del PCR que amplificó el gen MSP4 con los iniciadores: sentido 5'-GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC-3' y antisentido 5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3' (Ocampo *et al.*, 2012), con los siguientes pasos: desnaturalización 94°C por 120", alineación a 60°C por 60" 68°C por 60" y extensión a 72°C por 60" con 35 ciclos y un paso final de extensión a 72°C por 10 min (de la Fuente *et al.* 2008a). Al término de la reacción se tomaron 8 μl del producto de PCR y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % a 120 voltios durante 30 minutos. El gel fue teñido con Bromuro de Etidio y observado en un transiluminador de luz ultra violeta. El Gene-Ruler™ DNA ladder mix (MBI Fermentas, Alemania) fue utilizado como marcador de peso molecular.

Confirmación de la infección con *A. marginale* en *R. microplus*.

Una vez corroborada la infección del becerro, se colectaron 5 garrapatas del becerro 1 para la obtención de tejidos (glándulas salivales e intestino medio) y su posterior extracción de ADN mediante el reactivo TRIzol-Reagent (Life technologies. Cat Numero: 15596.026). Se utilizó PCR en punto final, usando los iniciadores RTMSP4F 5'-GACGTGCTGCACACAGATTT-3' RTMSP4R 5'-CTCATCAAATAGCCCCGTGGT-3' para amplificar el gen MSP4 de *A. marginale* (No. de acceso del Genbank AF428083), con los siguientes pasos: desnaturalización 94 °C por 120", alineación a 60 °C por 60" y extensión a 72 °C por 60" con 35 ciclos y un paso final de extensión a 72 °C por 10 min. Al término de la reacción se tomaron 8 µl del producto de PCR y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a no más de 120 voltios durante 30 minutos. El gel fue teñido con GelRed™ (Biotium, Nucleic Acid Stain) y observado bajo un transiluminador de la luz ultravioleta.

Extracción de glándulas salivales.

Comprobada la infección en *R. microplus* se colectaron 60 garrapatas hembras repletas infectadas y no infectadas en cajas Petri individualmente. Las garrapatas fueron embebidas en parafina la cual fue calentada con la punta de un aplicador de silicón termofusible. Una vez que la parafina se calentó y comenzó a derretirse, se tomaron las garrapatas con una pinza y se hizo presión permitiendo la fijación y solidificación. Posteriormente se prosiguió a cubrir con una gota de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) para evitar la deshidratación de los tejidos. Las glándulas salivales fueron diseccionadas con un bisturí utilizando la técnica de Patton *et al.* (2012). Los tejidos fueron lavados en PBS y posteriormente fueron almacenados a -80°C en RNAlater (Ambion, Austin, TX, EE. UU.) (Antunes *et al.*, 2014).

Extracción de DNA, RNA y proteína de tejidos de garrapatas.

Se realizó la extracción de DNA, RNA y proteína utilizando el kit AllPrep® DNA/RNA/Protein (QIAGEN, Cat. No. 80004, Hilden, Alemania) de los tejidos de *R. microplus* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se prosiguió a cuantificar el DNA y RNA a través de espectrofotometría (Nano Drop, Thermo Scientific). Por otro lado, la concentración de proteína se determinó usando el kit: Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.).

Clonación, expresión y purificación de la proteína Subolesina

La región que codifica para subolesina de *R. microplus* (número de acceso Genbank GQ456170.1) se amplificó mediante RT-PCR usando el ARN de tejido de *R. microplus* y los oligonucleótidos específicos que se utilizaron fueron 5'-CACCATGGCGTGCGCCACCCTGAAAC-3' y 5'-TTAAGACAGATAAGACGGGGTG-3', (Antunes *et al.*, 2014) utilizando el Kit (Promega, Access RT-PCR System No de catálogo A1250, Literature #TB220, EE. UU.) primer ciclo 45°C por 45 min (Transcripción Reversa) posteriormente 1 ciclo a 94°C por 2 min y como segunda fase 40 ciclos con una desnaturalización de 94°C por 30", alineamiento 60°C por 60", extensión 72°C por 60" y finalmente una última extensión de 72°C 7 min (de la Fuente *et al.*, 2008b; Zivkovic *et al.* 2010). Se tomaron 8 µl del producto de PCR y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a no más de 120 voltios durante 30 minutos. El gel fue teñido con Gelred (Biotium, Nucleic Acid Stain No de catálogo 41001) y observado bajo un transiluminador visualizado con luz ultravioleta, observando un fragmento de 400 pb. Posteriormente se realizó la purificación del producto de PCR utilizando el kit de Purificación: GeneClean® III (Kit MP Biomedicals, LLC III Krich, France, No de catálogo 11101-600) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de purificación fue insertado en el en el vector de expresión pET101 / D-TOPO®, utilizando el kit de clonación Champion pET Directional TOPO Expression (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU. No de catálogo K10101), según instrucciones del fabricante. Para la inserción del producto se utilizaron los sitios de restricción *AgeI* y *XbaI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU. No de catálogo K10101). Los plásmidos construidos fueron transformados en *Escherichia coli* cepa BL21 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) en un volumen de 4 µl, dejándose reposar por 20 minutos en hielo. La transformación se realizó incubando 30 segundos a una temperatura de 41.9°C y 4°C durante 2 minutos. Inmediatamente después se le agregó 250µl de medio S.O.C. dejándose incubar en agitación por 60 minutos a una temperatura de 37°C a 200 rpm. Pasado este tiempo las construcciones fueron sembradas en una placa con agar Luria-Bertani (LB) más 50 µg/ml de ampicilina. Después se agregó 0.5 mM de X-Gal e Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), incubándose a 37°C durante 12 horas. Para corroborar la construcción fueron elegidas 4 colonias blancas al azar de las cuales se obtuvo los ADN plasmídicos correspondientes a través del kit GenJet™ Plasmid Miniprep (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU. No de catálogo K0502). Este ADN plasmídico fue sometido a PCR de colonia para detectar el gen de subolesina. Una vez que se comprobó la presencia del gen, las colonias fueron sembradas en 10 ml de caldo LB (LB, AMRESCO; No de catálogo J106) conteniendo 10 µl de ampicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) y 0.4% de glucosa (Laboratorios CONDA S.A., Madrid, España). Estas colonias se incubaron en agitación a 37°C durante 12 horas para lograr la

inducción de la proteína recombinante. Posteriormente se agregó IPTG (SIGMA-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) a una concentración final de 0,5 mM y se incubó en agitación durante 4 h a 37°C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación (1000g por 10 minutos) y se resuspendieron en 500 µL de inhibidor de proteasas (SIGMA, Aldrich Inhibidor de proteasas, Cat: 539137-10VL, Lot: D00175937, EE. UU.). Las bacterias se mantuvieron a -20°C hasta la extracción de la proteína. Para la purificación de subolesina recombinante se descongelaron por 30 minutos a 4°C. Se lisaron las bacterias a través de sonicación (Modelo MS73; Bandelin Sonopuls, Berlín, Alemania). Se llevó a cabo 1 ciclo de 60 mega hertz por 60 minutos a 4°C y las proteínas recombinantes se purificaron a partir del sobrenadante. Estas fueron purificadas hasta 80% a 90% de pureza por cromatografía de afinidad utilizando HisTrap FF crude (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EE. UU.). La concentración de proteínas se midió usando el kit de ensayo de proteína BCA Pierce® (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.). Las proteínas purificadas se analizaron por gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) 12% y Western blot.

Análisis mediante Western blot

Se tomaron 14µl de proteína extraída de cada muestra de las fracciones más representativas de la cromatografía y se resuspendieron en 14µl de amortiguador Laemmli (Bio-rad laboratorios, Cat. No. 161-0737, EE. UU.) y 7µl de marcador de peso molecular Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Lithuania). El volumen de las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% (Expedeon, Run Blue, San Diego, CA, EE. UU.) y se sometieron a electroforesis durante 1 hora a 180 V de corriente constante. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, Dassel, Alemania) utilizando una solución de transferencia (Thermo scientific™, 1-Step transfer Buffer) colocándose en la cámara de inmunotransferencia (Thermo Scientific Pierce Electrophoretic Blotting, Q, Thermo Scientific Power Blotter N° 22834) a 25 V 1.3 A por 12 minutos. La membrana fue bloqueada con albumina sérica bovina al 3% (Sigma Life Science, EE. UU.) durante 2 h a 4°C. Después de la incubación, la membrana fue lavada cuatro veces con Tris amortiguador salino (TBS 1X-0.5% de Tween, Thermo scientific™, TBS Tween Buffer) con una duración de 5 minutos cada lavado. Después se agregaron los anticuerpos primarios elaborados en conejos blancos de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) tal y como lo reporta Antunes *et al.*, 2014. Los anticuerpos fueron diluidos en TBS a una dilución de 1:500. Después de incubar durante 12 horas, se lavó cuatro veces con TBS/Tween y se agregaron los anticuerpos secundarios anti-conejo IgG (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) diluidos en TBS a una concentración de 1:1000 y se

dejaron incubando por 75 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación se realizaron seis lavados. Finalmente se reveló utilizando el reactivo luminiscente Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, (Meridian Rd, Rockford, IL, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Determinación de los niveles de expresión de Subolesina

Se utilizó el RNA extraído de tejidos de glándula salival de *R. microplus* para evaluar la expresión génica de subolesina por tiempo real RT-qPCR (PCR en tiempo real, transcripción inversa) utilizando como oligonucleótidos: 4D8R5: 5'-GCTTGCGCAACATTAAGCGAAC-3' y 4D833: 5'-TTTGGTCGTACGTAAACTTGACAAATGTG-3' (Nº de acceso en Genbank AY652654). El proceso se realizó usando el kit One-Step qRT-PCR (ThermoFisher, Scientific, EE. UU.) y un termociclador Rotor-Gene Q, QIAGEN y el software de la serie Q siguiendo recomendaciones del fabricante (Ayllón *et al.*, 2013). Los niveles de mRNA de subolesina se normalizaron con el gen 16S utilizando la técnica del genNorm de Bio-Rad iQ5 edición estándar, version 2.0 (Livak y Schmittgen 2001).

Análisis Estadístico

Se compararon los niveles de subolesina normalizados entre garrapatas alimentadas con sangre de bovino infectadas y sin infectar, utilizando software Statistica® mediante la prueba t de Student ($P \leq 0.05$).

Resultados

Infección del bovino

La infección del becerro con *Anaplasma marginale* fue corroborada mediante la técnica PCR punto final, para esto se amplificó el gen MSP4 con un tamaño molecular de 345 pb. Como se puede observar en la figura 2, el bovino estuvo constantemente

infectado, alcanzando el pico de infección al día 21. Esto coincidió con la repleción de las garrapatas *R. microplus* utilizadas en el experimento.

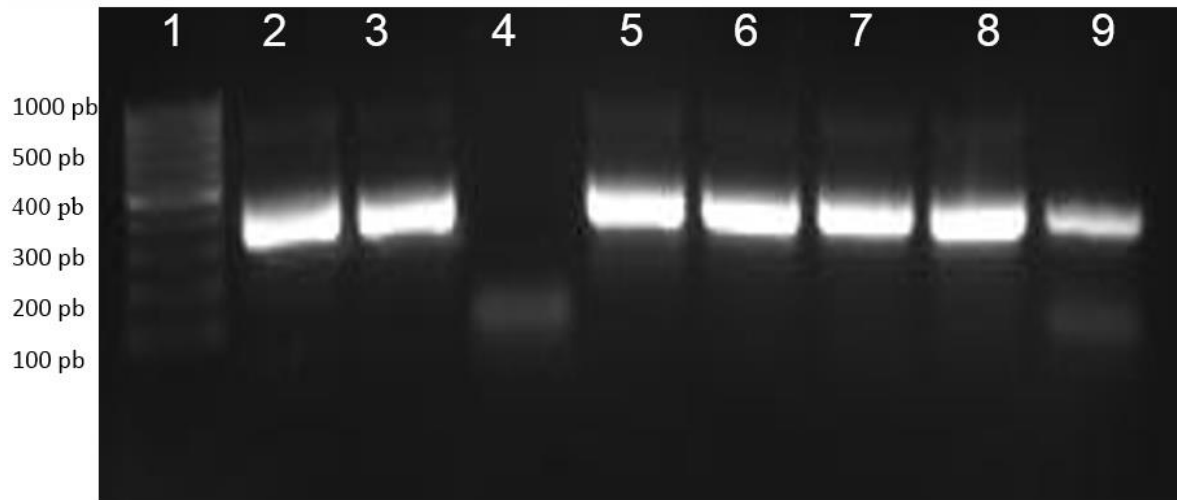


Fig. 2. Productos de PCR del gen MSP4 de *A. marginale* visualizados en la electroforesis del gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb, (2) Inóculo Mex-30-184-1 clarín 02 bov 48 30.5 DED 28/02/08, (3) Inóculo Tlapacoyan 2 bov. 6962 DED 1.3x10⁹ EI 03/05/15, (4) Control Negativo, (5) Día 10 pi (post-infección), (6) Día 15 pi, (7) Día 25 pi, (8) Día 28 pi, (9) Día 30 pi.

Confirmación de la Infección de *A. marginale* en *R. microplus*

Con el objetivo de verificar la infección de *A. marginale* en *R. microplus*, se extrajo el DNA de 5 ejemplares de *R. microplus* y se llevó a cabo la PCR punto final. Los resultados permitieron observar la amplificación del gen MSP4 con un tamaño molecular esperado de 345 pb. Figura 3.

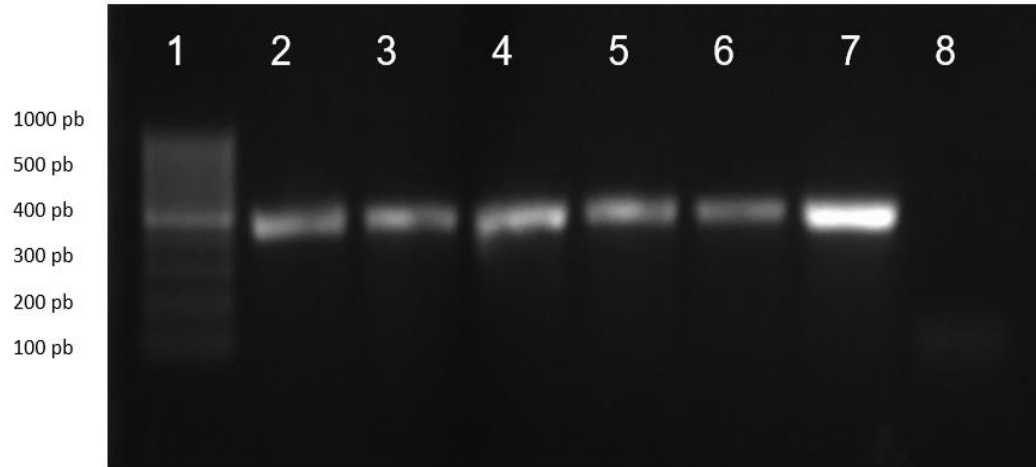


Figura 3. Análisis de la infección de *R. microplus* con *A. marginale* por PCR punto final. Productos de PCR obtenidos en la electroforesis del gel de agarosa al 1.5%, (1) Marcador de tamaño molecular: 100 pb, (2) Inóculo Mex-30-184-1 clarín 02 bov 48 30.5 DED 28/02/08, (3) Día 25, (4) Día 26, (5) Día 27, (6) Día 28, (7) Día 30, (8) Control Negativo.

Amplificación del gen de subolesina a partir de tejido de *R. microplus* infectado con *A. marginale*

Una vez verificada la infección de *A. marginale* en *R. microplus*, se llevó a cabo la disección del tejido de glándula salival de 60 garrapatas. Posteriormente se procedió a la extracción de DNA, RNA y proteína de dichos tejidos. Después se realizó la técnica de RT-PCR y electroforesis con las condiciones mencionadas anteriormente. Como se puede observar en la figura 4 existió una amplificación del gen de subolesina con un tamaño molecular esperado de 400 pb.

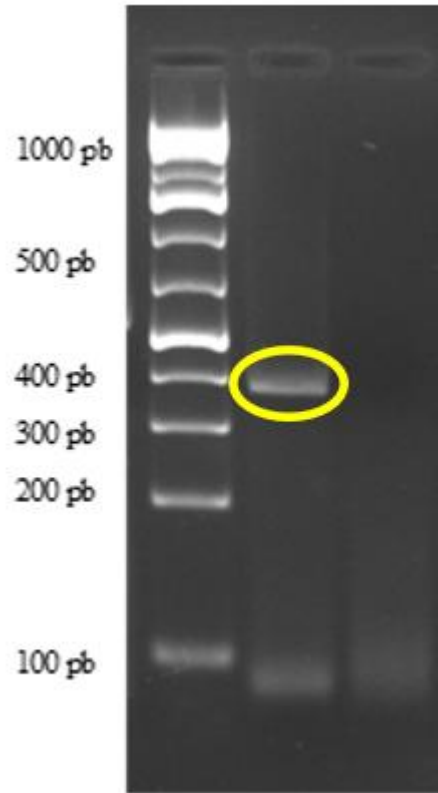


Figura 4. Productos de RT-PCR obtenidos en la electroforesis del gel de agarosa al 1.5% (1) Marcador de peso molecular: 100 pb, (2) Subolesina, (3) Control Negativo.

Detección de Subolesina a través de Western Blot

Con la finalidad de comprobar la presencia de la proteína subolesina en las glándulas salivales de garrapatas infectadas se realizó la técnica de Western Blot. En esta se puede observar la presencia de una banda correspondiente con el peso molecular esperado de subolesina la cual tiene un peso de 40 kDa (Figura 5).

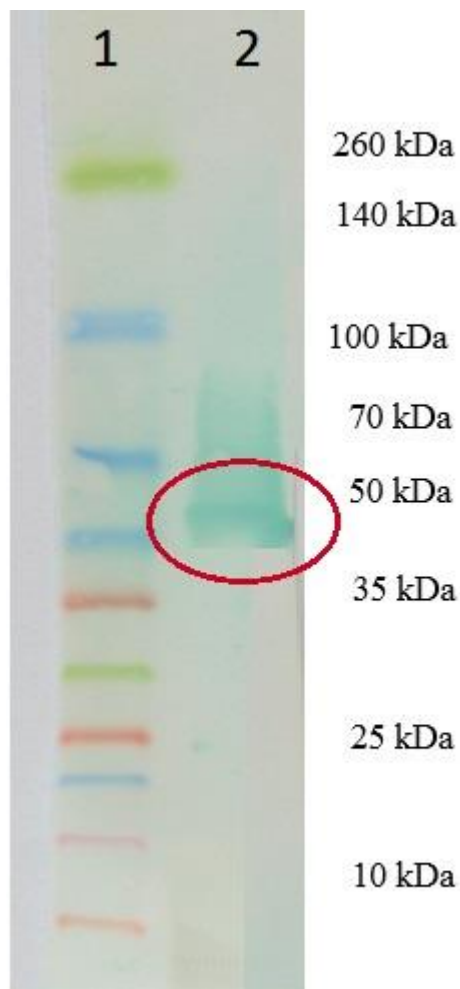


Figura. 5. Detección de la proteína subolesina en glándula salival de *R. microplus* mediante análisis de Western blot. (1) Marcador de peso molecular. (2) Subolesin. El círculo rojo indica el tamaño del péptido de subolesina (40 KDa).

Análisis en la expresión diferencial de Subolesina en tejidos de glándula salival en las garrapatas infectadas y no infectadas utilizando RT-PCR en Tiempo Real.

Se compararon los niveles de los transcritos de subolesina normalizados entre garrapatas alimentadas con sangre de bovino infectadas y sin infectar, en la cual se pudo observar diferencias estadísticamente significativas en *R. microplus* infectadas con *A. marginale*, en comparación con las no infectadas ($p < 0.05$)(control, Figura 6).

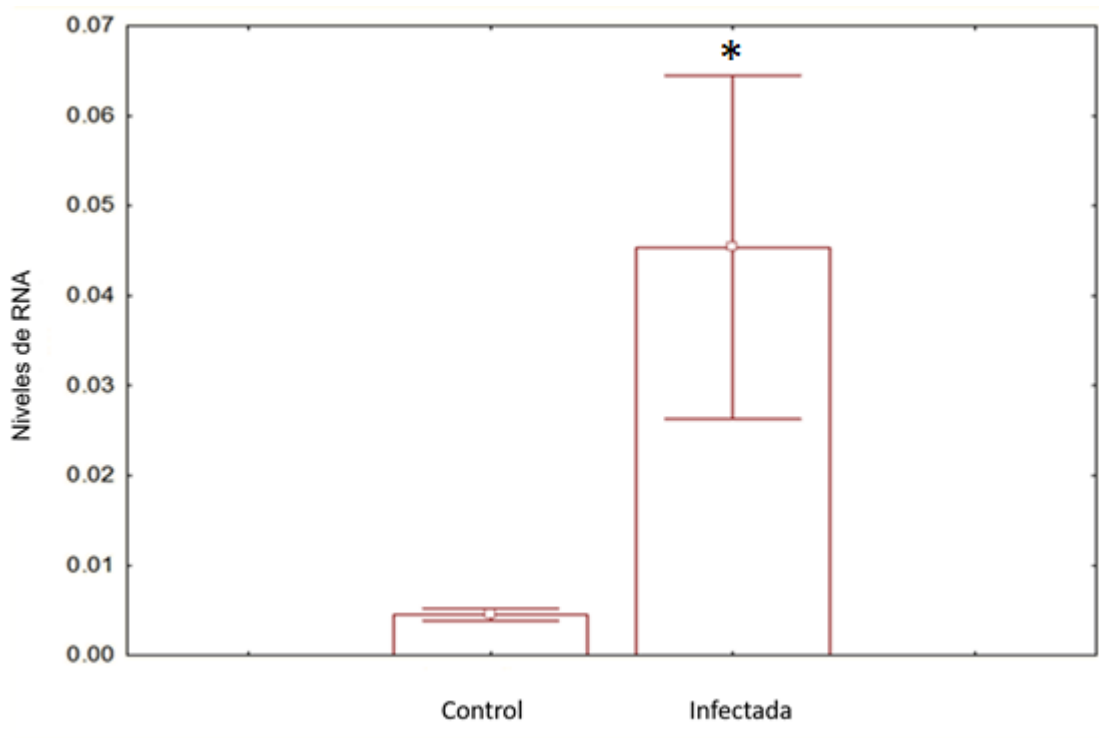


Figura. 6. Análisis de niveles de subolesina mediante PCR-Tiempo Real donde se puede observar los niveles transcritos de subolesina normalizada de garrapatas no infectadas e infectadas con *A. marginale*. Las barras indican los promedios \pm desviación estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

Discusión

En México, el método más utilizado para el diagnóstico de infecciones de Anaplasma se basa principalmente en la identificación de la rickettsia en eritrocitos infectados a través de la observación microscópica de frotis teñidos con Giemsa. Sin embargo, un diagnóstico preciso utilizando ésta técnica depende de números factores incluyendo la calidad del frotis sanguíneo y la experiencia del personal del laboratorio. Además, los niveles de detección disminuyen considerablemente cuando existen parasitemias menores de 10^7 de eritrocitos infectados por mL de sangre. Por lo tanto, este método no es recomendable para la detección de anaplasmosis en bovinos persistentemente infectados (de la Fuente *et al.*, 2001). En esta investigación el PCR punto final resultó específico y sensible para la identificación de *A. marginale* utilizando el DNA genómico extraído de las garrapatas infectadas, pudiendo detectarse éste

hemoparásito mediante la amplificación del gen MSP4, donde se produjo un producto de tamaño molecular esperado (banda de 345 pb)(Contreras *et al.*, 2017) (Fig. 1). La utilización del PCR punto final para el diagnóstico de *A. marginale*, debe ser considerado como un método de diagnóstico, el cual puede ser enfocado en estudios epidemiológicos relacionados a la sanidad animal y a la fauna silvestre, así como determinar si esta última pudiera estar involucrada como reservorio de la anaplasmosis (de la Fuente *et al.*, 2005; Ocampo *et al.*, 2012).

En la búsqueda de vacunas más eficaces para el control de infestaciones de garrapatas y patógenos que transmiten, numerosos antígenos candidatos han sido identificados. Una proteína que está recibiendo gran atención es la subolesina (inicialmente llamada 4D8) la cual fué descubierta en el 2002 como un antígeno protector de garrapata en *I. scapularis*. No obstante, ésta proteína se ha descrito en muchas otras especies de garrapatas (Moreno-Cid *et al.*, 2013).

En un ensayo de vacunación con subolesina recombinante, se demostró un efecto protector significativo contra *R. microplus*, donde se observó una disminución en su supervivencia (causando la degeneración del intestino medio, glándulas salivales y tejidos reproductivos), así como la disminución de la alimentación y la ovoposición (de la Fuente *et al.*, 2006). Además, los anticuerpos anti-subolesina han mostrado una reducción en el peso y la ovoposición de las garrapatas alimentadas con sangre infectada con *Babesia bigemina*. No obstante, aquellas alimentadas con sangre infectada de *A. marginale* no mostraron diferencias significativas (Merino, 2013).

En estudios posteriores, se descubrió que el gen de la subolesina, se ha considerado estar involucrado en la respuesta inmune y estar regulado por el factor nuclear NF- κ B, factor regulador de la transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune, así como en la expresión de genes que son importantes para la multiplicación de patógenos (Naranjo *et al.*, 2013). Además, el silenciamiento del gen de subolesina utilizando RNA de interferencia redujo significativamente la capacidad de las garrapatas para infectarse con *Anaplasma marginale* y *A. phagocytophilum* (Merino *et al.*, 2011). Antunes *et al.* (2014) mostraron que la expresión de subolesina aumenta con la infección de varios patógenos en las glándulas salivales en distintas especies de garrapatas. En el presente estudio se confirmó que el gen de subolesina se sobre expresó en respuesta a la infección de garrapatas con *A. marginale* en comparación con las garrapatas no infectadas.

Se ha propuesto que la subolesina tiene una función similar a la akirina (una proteína ortóloga en insectos) en la regulación de la expresión de genes dependientes e independientes del factor nuclear-kappa B (NF- κ B) (de la Fuente *et al.*, 2011; Moreno-Cid *et al.*, 2013). Por lo tanto, la subolesina también participa en la regulación de su propia expresión a través de la interacción con los factores de transcripción NF- κ B (Naranjo *et al.*,

2013). En este estudio, el análisis de Western blot y los datos de RT-PCR confirmaron que la subolesina desempeña un papel activo en la interacción huésped-patógeno; ya que la expresión del gen que codifica esta proteína fue sobre expresada en la infección de *R. microplus* con *A. marginale* como lo sugirió Galindo en 2009.

La expresión de subolesina y la magnitud de su expresión podrían depender de varios factores incluyendo el nivel de infección de patógenos. En una investigación anterior, el aumento en los niveles de infección de patógenos dio lugar a una mayor variación en la expresión de subolesina en el intestino y las glándulas salivales de *R. sanguineus* en comparación con *Dermacentor spp.* (Zivkovic *et al.*, 2010). Para continuar con nuestra investigación, se sugiere realizar ensayos experimentales adicionales con el fin de evaluar la dimensión de la expresión de subolesina mediante el uso de un mayor número de *R. microplus* utilizando diferentes niveles de parasitemia. Así mismo, otros investigadores han encontrado que la expresión de subolesina fué significativamente aumentada en las glándulas salivales de *D. variabilis* y en las células de garrapatas IDE8 (derivadas de *I. scapularis* embrionaria) pero no en los intestinos de garrapatas infectadas con *A. marginale* (de la Fuente *et al.*, 2008a; Zivkovic *et al.*, 2010). El aumento de la expresión de subolesina en las garrapatas infectadas confirma el papel que tiene esta proteína en la respuesta inmune innata.

En otro estudio, realizado por Kocan *et al.* (2009), encontraron que la expresión de subolesina aumentaba en las glándulas salivales, pero no en los intestinos de garrapatas infectadas con *A. marginale*. Estos hallazgos sugieren que la expresión de subolesina y, posteriormente, la inmunidad innata mediada por subolesina difiere considerablemente dependiendo del tejido infectado de la garrapata. *A. marginale* es ingerida por las garrapatas durante la alimentación, por lo que el intestino es la primera barrera de defensa de las garrapatas durante la infección (Kocan *et al.*, 2004). Por lo tanto, es posible que la subolesina no esté involucrada en la protección de las garrapatas contra infecciones por *A. marginale* debido a diferentes mecanismos que los patógenos y sus vectores han co-evolucionado, donde la garrapata vectora permite la transmisión del patógeno mientras que éste no le provocan daño. Sin embargo, en las glándulas salivales, la subolesina puede controlar los niveles de infección del patógeno, por lo que no son dañinos para las garrapatas (Kocan *et al.*, 2008).

Conclusiones

La presente investigación fue dirigida con el fin de evaluar la expresión diferencial de Subolesina bajo condiciones de infección con *A. marginale*. De acuerdo con los resultados se concluye que los niveles de expresión de este gen en las glándulas salivales de *R. microplus* expuestas a la infección de *A. marginale* aumentó significativamente en comparación con aquellas no infectadas. Esta diferencia podría estar relacionada con las funciones autoregulatoras de la expresión de la proteína subolesina influenciada por la infección y al igual que en otros experimentos, dicha expresión ha demostrado jugar un papel importante en la interacción hospedador-patógeno-vector. Sin embargo es necesario llevar a cabo más investigaciones para caracterizar el impacto que la modificación en la expresión tiene sobre el desarrollo de la infección en el vector o la transmisión hacia el hospedador mismo. Finalmente, al tener un mejor conocimiento sobre los mecanismos moleculares responsables de controlar la expresión de subolesina pueden proveer herramientas para un mejor entendimiento de los mecanismos inmunológicos de protección utilizados por las garrapatas lo cual contribuirá a desarrollar nuevas y mejores vacunas para el control de infestaciones de garrapatas y patógenos que transmiten.

Referencias

- Almazán, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., de la Fuente, J. (2003). Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*. 21, 1492–1501. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00683-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00683-7)
- Almazán, C., Kocan, K.M., Blouin, E.F., de la Fuente, J. (2005). Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*. 23, 5294–5298. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.004>
- Almazán, C., Blouin, E.F., Villar, M., Nijhof, A.M., Mani, R., La Barbera, G., Caracappa, S., Jongejan, F., de la Fuente, J. (2010). Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. *BMC Immunology*. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-7>
- Antunes, S., Merino, O., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Bell-Sakyi, L., Fragkoudis, R., Weisheit, S., Pérez De La Lastra, J.M., Alberdi, P., Domingos, A., de la Fuente, J. (2014). Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen

interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasites and Vectors*. 7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-42>

Contreras, M., Alberdi, P., Mateos-Hernández, L., Fernández de Mera, I.G., García-Pérez, A.L., Vancová, M., Villar, M., Ayllón, N., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J.J., Stuen, S., Gortazar, C., de la Fuente, J. (2017). *Anaplasma phagocytophilum* MSP4 and HSP70 Proteins Are Involved in Interactions with Host Cells during Pathogen Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00307>

de la Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J.C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H., Leonart, R. (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): The experience with the Bm86-based vaccine Gavac((TM)), in: Genetic Analysis - Biomolecular Engineering. pp. 143–148. [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(99\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(99)00018-2)

de la Fuente, J., Van Den Bussche, R.A., Kocan, K.M. (2001). Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Veterinary Parasitology*. 97, 65–76. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00378-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00378-8)

de la Fuente, J., Lew, A., Lutz, H., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Shkap, V., Molad, T., Mangold, A.J., Almazán, C., Naranjo, V., Gortázar, C., Torina, A., Caracappa, S., García-Pérez, A.L., Barral, M., Oporto, B., Ceci, L., Carelli, G., Blouin, E.F., Kocan, K.M. (2005). Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Animal Health Research Reviews*. 6, 75–89. <https://doi.org/10.1079/AHR2005104>

de la Fuente, J., Almazán, C., Blas-Machado, U., Naranjo, V., Mangold, A.J., Blouin, E.F., Gortazar, C., Kocan, K.M. (2006a). The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. *Vaccine*. 24, 4082–4095. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.046>

de la Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E.F., Naranjo, V., Kocan, K.M. (2006b). Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitology Research*. 100, 85–91. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0244-6>

de la Fuente, J., Blouin, E.F., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Almazán, C., De La Lastra, J.M.P., Zivkovic, Z., Massung, R.F., Jongejan, F., Kocan, K.M. (2008a).

- Differential expression of the tick protective antigen subolesin in *Anaplasma marginale*- and *A. phagocytophilum*-infected host cells, in: *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp. 27–35. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.056>
- de la Fuente, J., Maritz-Olivier, C., Naranjo, V., Ayoubi, P., Nijhof, A.M., Almazán, C., Canales, M., de la Lastra, J.M.P., Galindo, R.C., Blouin, E.F., Gortazar, C., Jongejan, F., Kocan, K.M. (2008b). Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC Genomics*. 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-372>
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Canales, M., Villar, M., de la Lastra, J.M.P., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazán, C., Blouin, E.F. (2011). Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Veterinary Parasitology*. 181, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.018>
- de la Fuente, J., Merino, O. (2013). Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine*. 31, 5923–5929. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.049>
- García-García, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., Rodríguez, M., Joglar, M., MacHado, H., González, I.L., Valdés, M., Méndez, L., De La Fuente, J. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*. 18, 2275–2287. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00548-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00548-4)
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., Yadav, M.P. (2007). Upcoming and future strategies of tick control: A review. *Journal of Vector Borne Diseases*. 44(2), 79–89.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. 129:285–300. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004700>
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F. (2008). Advances toward understanding the molecular biology of the *Anaplasma*-tick interface. *Frontiers in bioscience*. 13, 7032–7045.
- Kröber, T., Guerin, P.M. (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science*. 63, 17–22. <https://doi.org/10.1002/ps.1293>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego),

Calif.) 25, 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., De la Fuente, J. (2011). Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine*. 29, 8575–8579. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.023>
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Rosario-Cruz, R., Rodríguez, S., Domingos, A., de la Fuente, J. (2013). Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*. 31, 5889–5896. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.037>
- Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Villar, M., Jiménez, M., Pinal, R., Estrada-Peña, A., Molina, R., Lucientes, J., Gortázar, C., de la Fuente, J., Alarcón-Elbal, P.M., Delacour, S., Oropeza, V., Ruiz, I., Prudencio, C.R., Galindo, R.C., Almazán, C., Nijhof, A.M., Mangold, A.J. (2013). Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine*. 31, 1187–1196. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.073>
- Naranjo, V., Ayllón, N., Pérez de la Lastra, J.M., Galindo, R.C., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Mitra, R., Alberdi, P., Villar, M., de la Fuente, J. (2013). Reciprocal Regulation of NF-kB (Relish) and Subolesin in the Tick Vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065915>
- Ocampo, R.J., Camarillo, S.D.R., Cruz, R.R., Vega, L.E.O., de la Fuente, J. (2012) *Anaplasma marginale*: análisis de las secuencias del fragmento variable del gen msp1 alpha y del gen msp4 de cuatro nuevas cepas mexicanas. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 46(1), 69–78
- Patton, T.G., Dietrich, G, Brandt, K., Dolan, M.C., Piesman, J., Gilmore, R.D. (2012) Saliva, salivary gland, and hemolymph collection from *Ixodes scapularis* ticks. *J Vis Exp*. 60:3894. <https://doi.org/10.3791/3894>
- Pipano, E., Alekceev, E., Galker, F., Fish, L., Samish, M., Shkap, V. (2003). Immunity against *Boophilus annulatus* induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. *Experimental and Applied Acarology*. 29, 141–149. <https://doi.org/10.1023/A:1024246903197>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., Pérez de León, A.Á., Sliva Villeda, H., Torres-Acosta, J. Felipe de J., Sánchez Fragoso, H., Salas Romero, D., Rosario Cruz, R., Saldiema, F., García Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle

parasites in Mexico . Review Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu.* 8, 61–74. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22319/rcmco.v8i1.4305>

Villar, M., Marina, A., de la Fuente, J. (2017). Applying proteomics to tick vaccine development: where are we? *Expert Review of Proteomics.* 14(3), 211–221. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1284590>

Zivkovic, Z., Torina, A., Mitra, R., Alongi, A., Scimeca, S., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazán, C., Blouin, E.F., Villar, M., Nijhof, A.M., Mani, R., La Barbera, G., Caracappa, S., Jongejan, F., de la Fuente, J. (2010). Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. *BMC Immunol* 11:7. <https://doi.org/10.1186/14712172-11-7>

CAPITULO 3. EVALUATION ON MICE OF THE IMMUNOGENICITY OF TWO TICK CHIMERIC ANTIGENS AS A VACCINE CANDIDATES TO CONTROL TICKS AND *ANAPLASMA SPP.* INFECTION.

Verónica Carvajal-de la Fuente^{1,2*}, Fernando A. Muñoz-Tenería¹, José Octavio Merino-Charrez²,
Milagros González-Hernández¹, Catalina Arenas-Huertero³, Berenice Hernández-Castro⁴,
Marinela Contreras⁵, José de la Fuente⁵.

¹ Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Km. 14.5 Carretera San Luis Potosí-Matehuala, Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, S.L.P. CP. 78321.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tamaulipas, km 5, Carretera Victoria-Mante, Ciudad Victoria, Tamaulipas, CP 87000, México.

³ Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Salvador Nava s/n. CP 78290. Col. Lomas. San Luis Potosí (SLP) México.

⁴ Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina CICSaB Universidad Autónoma de Luis Potosí. Ave. Sierra Leona 550, Lomas de San Luis, 78210 San Luis, S.L.P. México.

⁵ SaBio, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC-CSIC-UCLM-JCCM, Ciudad Real, Spain.

*e-mail: vcarvajal@docentes.uat.edu.mx

Introduction.

Ticks are responsible for the spread and transmission of several viral, bacterial, and protozoal diseases of human and animals and are considered as a significant economic pest of the livestock industry in tropical and subtropical countries (de la Fuente, 2008). In cattle, Anaplasmosis caused by *Anaplasma spp.*, is one of the most important disease transmitted by *Rhipicephalus spp.* ticks (Merino *et al.*, 2011). Current control methods of tick infestations is mainly based on the use of acaricides. Nonetheless, the use of these chemicals has serious drawbacks associated with tick acaricide resistance, adverse environmental impacts and severe side effects on animals and humans (Kröber and Guerin, 2007)(Ghosh *et al.*, 2007). To overcome these negative effects, vaccination has emerged as an eco-friendly alternative with fewer negative consequences to the animal being treated (Almazán *et al.*, 2005)(De la Fuente and Merino, 2013). Bm86, a glycoprotein expressed largely on the surface of the digestive tract of *R. microplus* females, became the first anti-tick vaccine commercially available (de la Fuente *et al.*, 1999; García-García *et al.*, 2000). Nevertheless, vaccine based on Bm86 in several immunological trials, showed highly variable protective immune responses against *R. microplus*, which was largely attributable to the genetic variability of tick and bovine populations (Freeman *et al.*, 2010; Penichet *et al.*, 1994, Andreotti, *et al.*, 2008). Hence, the interest in searching for more efficient target

antigens for a cattle tick vaccine remains a scientific challenge. Currently, the development of a high-throughput techniques for the identification of suitable vaccine antigens, has enabled the inclusion of multiple antigens in order to target a large number of tick species, as well as, to block the transmission of one or more pathogens carried by the vector (de la Fuente *et al.*, 2011; Villar *et al.*, 2017). For instance, vaccination trials using recombinant subolesin, a protein discovered in *Ixodes scapularis*, (Almazán *et al.*, 2003), have demonstrated not only to protect hosts against tick infestations, but also to interfere with the ability of tick to transmit *A. phagocytophilum* and *A. marginale* (de la Fuente *et al.*, 2006; Merino *et al.* 2013).

Proteins exposed on the cell membrane such as major surface proteins are good targets for vaccine development (Contreras *et al.*, 2015). Recently, recombinant chimeras containing tick proteins (BM95 a variant of BM86 and Subolesin) and the N-terminal region of the *A. marginale* Major Surface Protein 1a (MSP1a) were produced in *Escherichia coli* as membrane-bound and exposed proteins (Canales *et al.*, 2008; Almazán *et al.*, 2012). Furthermore, the use of these antigens as vaccine were proved to be effective for the control of cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *R. annulatus* infestations and to reduce the frequency of *A. marginale* and *B. bigemina* (Almazán *et al.*, 2012; Canales *et al.*, 2009; Torina *et al.* 2014). Additionally, *A. phagocytophilum* transmembrane and surface proteins play an important role during infection and multiplication in host cells and tick vector cells. In a study conducted by Villar *et al.* (2015) shown that *A. phagocytophilum* activates different mechanisms associated with bacterial cell stress and membrane surface proteins (MSP) in order to evade the tick cell defense response and favor pathogen infection. Their results showed that MSP4 and Heat shock protein 70 (HSP70), interfere with pathogen infection in ticks (Villar *et al.*, 2015) (Espinosa *et al.* 2017; Contreras *et al.*, 2017). Although, these new proposed tick vaccines could be one of the most sustainable and cost-effective approach in the control of tick infestations and vector-borne diseases, important issues still need to be addressed before these proteins could be used in commercial vaccine formulations. For example, the success of a vaccine in inducing a protective antibody response depends on the longevity of both long-lived plasma cells and memory B cells (Radbruch *et al.*, 2006; O'Connor *et al.*, 2004). Memory B cells are responsible for eliciting a strong immune response upon re-exposure to antigen. Upon encounter with antigen, B cells either differentiate into short-lived plasma cells that secrete low-affinity antibodies, or participate in a germinal center reaction accompanied by class switch recombination and somatic hypermutation, to produce long-lived plasma cells that secrete high-affinity antibodies (Radbruch *et al.*, 2006; Good-Jacobson and Shlomchik, 2010). These long-lived plasma cells finally reside in the bone marrow for prolonged periods and account for over 80% of the antibody present in immune serum.

Traditional surface marker of plasma cells, CD138 (Syndecan-1), which is upregulated during plasma cell maturation, is required in a cell-intrinsic manner to mount an effective long-term humoral immune response following immunization. Therefore, the aim of this study was to compare the immune response in a murine model two potential candidates for anti-tick vaccines (BM95-Sub-MSP1a and HSP70-MSP4) in lymphoid organs. B-cell and plasma cell populations were determined in spleen, lymph nodes and bone marrow by flow cytometer using the B-cell marker CD45R/B220 and the plasma cell marker CD138. Finally, serum IgG concentrations were measured at specific time points pre and post vaccination.

Materials and Methods

This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Faculty of Agronomy and Veterinary, Autonomous University of San Luis Potosí.

Vaccine preparation and vaccination

The vaccine containing bacterial membranes with surface-exposed *R. microplus* BM95-Sub-MSP1a, and HSP70-MSP1a chimeric antigens was prepared as previously described (Almazán 2012). Briefly, recombinant *E. coli* BL21 cells transformed with the pMBXAF3 expression vector were propagated in 1 litre flasks containing 250 ml Luria–Bertani (LB) broth supplemented with 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl, 50 µg/ml ampicillin and 0.4% glucose (Laboratories CONDA S.A., Madrid, Spain) for 2 h at 37°C and 200 rpm and then for 5.5 h after addition of 0.5 mM final concentration of isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside (IPTG) for induction of recombinant protein production (Canales et al 2008). The cells were harvested by centrifugation at 10,000 x g for 15 min at 4°C and then 1 g of cell pellet was resuspended in 5 ml of disruption buffer (100 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 5 mM MgCl₂ · 6H₂O and 0.1% (v/v) Triton X-100) and disrupted using a cell sonicator (Model MS73; Bandelin Sonopuls, Berlin, Germany). After disruption, the insoluble protein fraction containing the membrane-bound antigens was collected by centrifugation (21,500 x g for 15 min at 4°C), resuspended in PBS, pH 7.4. Protein adjuvation was done by mixing a solution of anhydromannitoletheroctadecenoate (Montanide ISA 50 V; Seppic, Paris, France) with the recombinant proteins in batch-by-batch processes using a high-speed mixer Heidolph DIAX 900 (Heidolph Elektro, Kelheim, Germany) at 8,000 rpm and the vaccine was filled

manually under sterile conditions in glass bottles of 2 ml (Wheaton, Millville, NJ, USA) at a concentration of 125 µg/1 ml dose.

Immunization trial.

Specific pathogen-free male BALB/c mice 6-week-old, were obtained from the animal facility at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) of Mexico City. The animals were caged at four mice per cage and fed with a commercial diet (Formulab chow Purina 5008, PMI Nutrition International) with free access to food and water. The mice were randomly assigned into 3 groups (n = 4) and immunized subcutaneously three times at weeks 0, 2 and 4 with 0.2 mL (25 µg) with the two recombinant chimeric immunogens. Group 1 received the protein BM95-Sub-MSP1a, Group 2 protein HSP70+MSP1a and Group 3 received only adjuvant (control group).

Blood and tissue collection

Four mice from each group were sacrificed by cervical dislocation at weeks 0, 3, 6, and 9. Blood was taken by cardiac puncture and their bone marrow, inguinal lymph nodes and spleens were harvested for flow cytometry. Serum was obtained by centrifugation at 1,000 g for 5 min. Serum aliquots were kept at 4°C for immediate use or at -80°C for long-term storage.

Cell isolation for flow cytometer

Inguinal lymph nodes and the spleen were finely crushed with syringe plungers and homogenized to single-cell suspensions using 70-µm nylon mesh sieves (BD Biosciences). Femurs and tibias were excised with dissecting scissors. A 23-gauge needle was inserted into the bone cavity and phosphate-buffered saline (PBS1X) was used to slowly flush the marrow out until the bones became pale (Sarah *et al.*, 2016). After rinsing each strainer with phosphate-buffered saline (PBS 1X), cells from the three organs were collected in a Petri dish containing 3 ml of PBS 1X. The resulting cell suspension was collected in a 15ml round-bottom polypropylene tubes (Falcon™, Corning®, USA) with a mixture of Ficoll–Hypaque (Sigma Chemical Co., USA, density: 1.077 g/mL) at a

1:3 ratio (Ficoll/cell suspension). All sample tubes were centrifuged at 2,500 rpm for 20 min at 22 °C. The ring of mononuclear cells collected at the Ficoll–Hypaque interface was transferred to another tube and washed twice with 1 ml of PBS1X. After the supernatant was discarded, the cell button was resuspended in 1 mL of PBS1X-1% BSA (Bovine serum albumin). A small volume of single cell suspension was mixed with 0.4% trypan blue solution, and then placed on hemocytometer to estimate cell number and cell viability. For labelling, 2×10^6 cells from each tissue were incubated for 20 min at 4°C with a biotinylated purified rat anti-mouse monoclonal antibody CD45R/B220 (553085 BD Pharmingen,) diluted 1:100 in PBS-BSA1% which was secondly conjugated with Streptavidin-Phycoerythrin (PE) (554061 BD Pharmingen,) and finally a rat anti-mouse CD138-FITC (BD Pharmingen,) was added (1µl per tube). After each incubation, cells were washed and resuspended in 1 ml PBS/BSA1%. Negative controls were generated by performing the staining procedure without the primary antibody. Stained cells were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS. The samples were analyzed by cytometry using a FACS Calibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). A minimum of 500,000 events were collected. Spectral overlap compensation was made with single color-stained samples for each detection channel. Data analysis was performed with the FlowJo software (FlowJo, San Carlos, CA).

Determination of serum antibody levels by ELISA assay.

Indirect ELISA was used to determine the serum IgG antibody titer against BM95-Sub-MSP1a, and HSP70-MSP4 antigens at week 0, 3, 6 and 9. Briefly, a high absorption capacity polystyrene microtiter plates ((MaxiSorp, Nunc Thermo Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania 15275, USA) were coated with 100 µl (0.01 µg/µl solution of purified recombinant BM95-Sub-MSP1a, or HSP70+MSP4 protein) per well in carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6. After an overnight incubation at 4°C, coated plates were blocked with 100 µl/well of blocking solution (PBS-BSA 5% DIFCO, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey 07417, USA) PBS). Serum samples or PBS as negative control were diluted (1:100, v/v) in blocking solution and 100 µl/well were added into duplicate wells of the antigen-coated plates. After an overnight incubation at 4°C, the plates were washed three times with a washing solution (PBS containing 0.05% Tween 20). A rabbit anti-mouse IgG-peroxidase conjugate (Abcam lot 97046) was added (diluted 1:1000 in blocking solution) and incubated at room temperature for 1 h. After three washes with washing solution, 100 µl/well of substrate solution (chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) was added and incubated at room temperature during 15 minutes in the dark. Finally, the reaction was stopped with 50 µl/well of 3N H₂SO₄. The ELISA plate readings (optical

density, or OD) were done using a Stat Fax-4200 microplate reader (Awareness Technology, Inc., Palm City, FL.) at a wavelength of 450 nm. Antibody titers were expressed as OD_{450nm}.

Statistical Analysis.

Statistical analysis was performed using MedCalc® software version 13.0. All variables were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. If normal, data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEMs). For comparison of the effect of BM95-Sub-MSP1a, and HSP70-MSP1a over time (weeks) on the B220 and CD138 expression (%) a Two-way ANOVA test was used for each organ (spleen, lymph nodes and bone marrow). In case of significant differences, a One-way ANOVA for each week was performed followed by the Tukey multiple comparison post-test. To assess the effect of the antibody titers between immunized and control groups with B220 and CD138 responses over weeks, a Two-way ANOVA test was used. Results are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEMs). A P-value < 0.05 was considered significant and were marked with asterisks in the figures.

Results and Discussion

Tick vaccine development is a fairly recent area in which over the last decade a number of potential candidate vaccine antigens have been identified. Largely, these type of vaccines are not designed to prevent tick infestations, but to reduce tick populations by affecting feeding, reproduction and development of ticks feeding on immunized animals and ingesting antigen-specific antibodies that interact with and affect protein function. In addition, vaccines containing tick-derived and/or pathogen-derived antigens involved in tick-pathogen interactions could also affect pathogen infection and transmission, thus controlling not only tick populations but also vector competence for tick-borne pathogens (de la Fuente and Contreras, 2015).

Most successful vaccines rely on the generation of protective antibodies that are produced by antibody-secreting B cells. With time, it is the long-lived plasma cells that are responsible for the continuous maintenance of serum antibody levels, whereas memory B cells are responsible for driving secondary responses upon antigen reexposure (Sallusto *et al.*, 2010). Moreover, these memory B cells survive long term and replenish the pool of long-lived plasma cells to maintain antibody titers in the absence of antigen or pathogen. Phenotypic markers can be used to discern these types of cells in different

tissues by flow cytometry. The B lineage marker B220 (the B cell isoform of CD45R) is a molecule that occupy $\approx 10\%$ of the surface of T and B cells and play important roles in the regulation of differentiation and activation of these cells (Watanabe and Akaike, 1994). On the other hand, during normal B-cell development, cells acquire expression of CD138 (syndecan-1), a marker highly specific for terminally differentiated normal plasma cells which is upregulated over a 1000-fold during cell differentiation (Calame 2001; Radbruch *et al.*, 2006; Nutt *et al.*, 2015).

In this study, the immune response of chimeric proteins BM95-Sub-MSP1a and HSP70-MSP4 was evaluated by determining the surface marker expression of B220 and CD138 in cells from the spleen, lymph node and bone marrow, as well as the IgG levels after different time points. The percentage of B220-expressing cells were significantly higher in the spleen at 3, 6 and 9 weeks after immunization in HSP70-MSP4 and control groups as compared with those in BM95-Sub-MSP1a mice (Fig 1A). In contrast, the levels of CD138-expressing cells (%) in BM95-Sub-MSP1a were significantly higher compared with the others two groups (Fig 1B). Since B cells proliferated and differentiated into CD138 plasmablasts to some extent, the increased number CD138 expressing cells is most likely a reflection of the B cells mature into terminal plasma cells, where they cease to express B220. It has been reported that plasma cell responses in the spleen decrease rapidly with a coincident increase in long-lived plasma cells in the bone marrow that have the potential to rapidly differentiate into antibody secreting cells during a secondary immune response (Geraldine *et al.*, 2009; Nutt *et al.*, 2015).

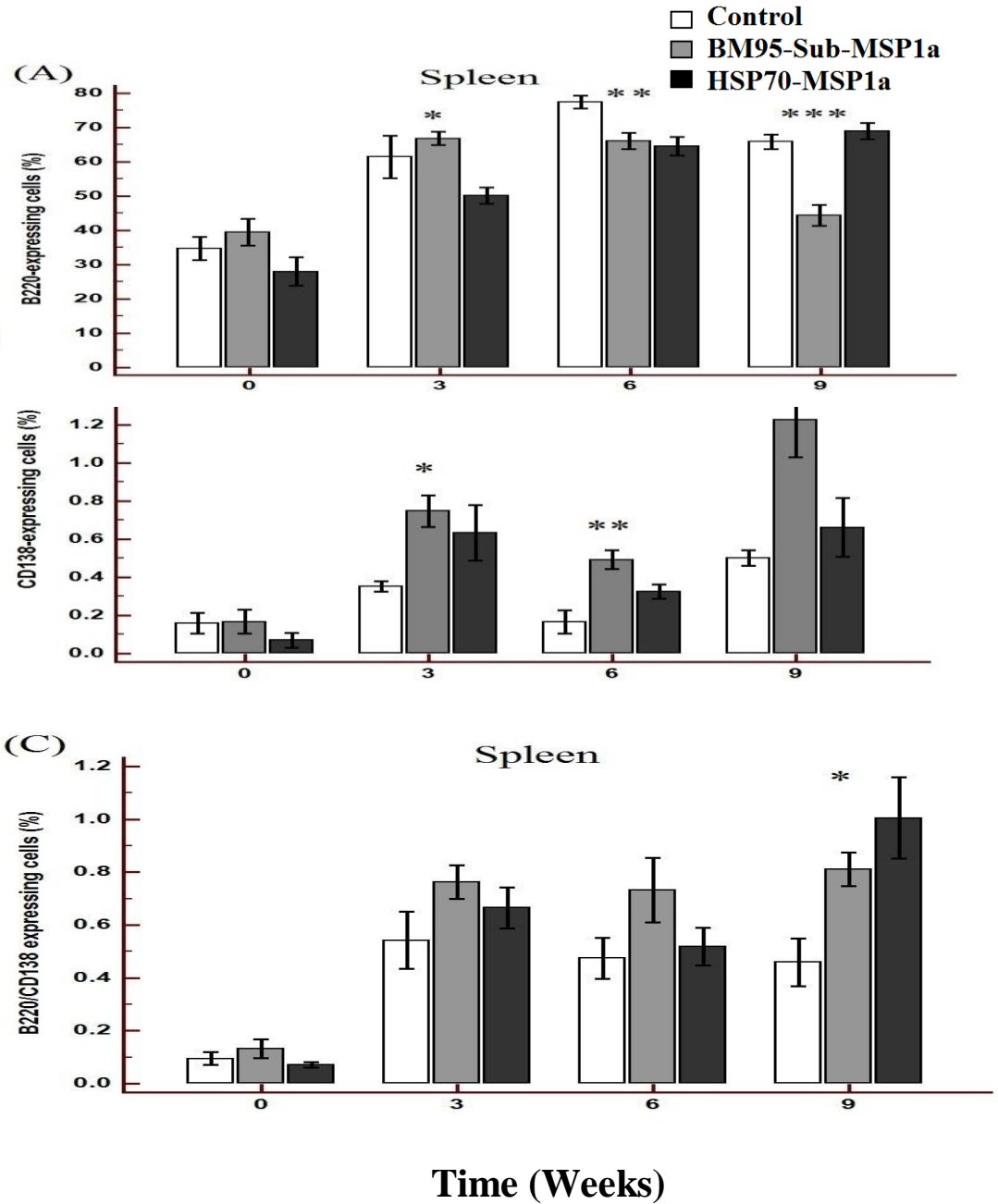


Figure 1. Flow cytometry analysis of spleen over 9 weeks post vaccination. Bars represent the mean value for each treatment and error bars are standard error of the mean. (A) Percentages of B220-expressing cells, (B) CD138-expressing cells (B) and (C) percentages of cells double-positive for B220 and CD138 (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

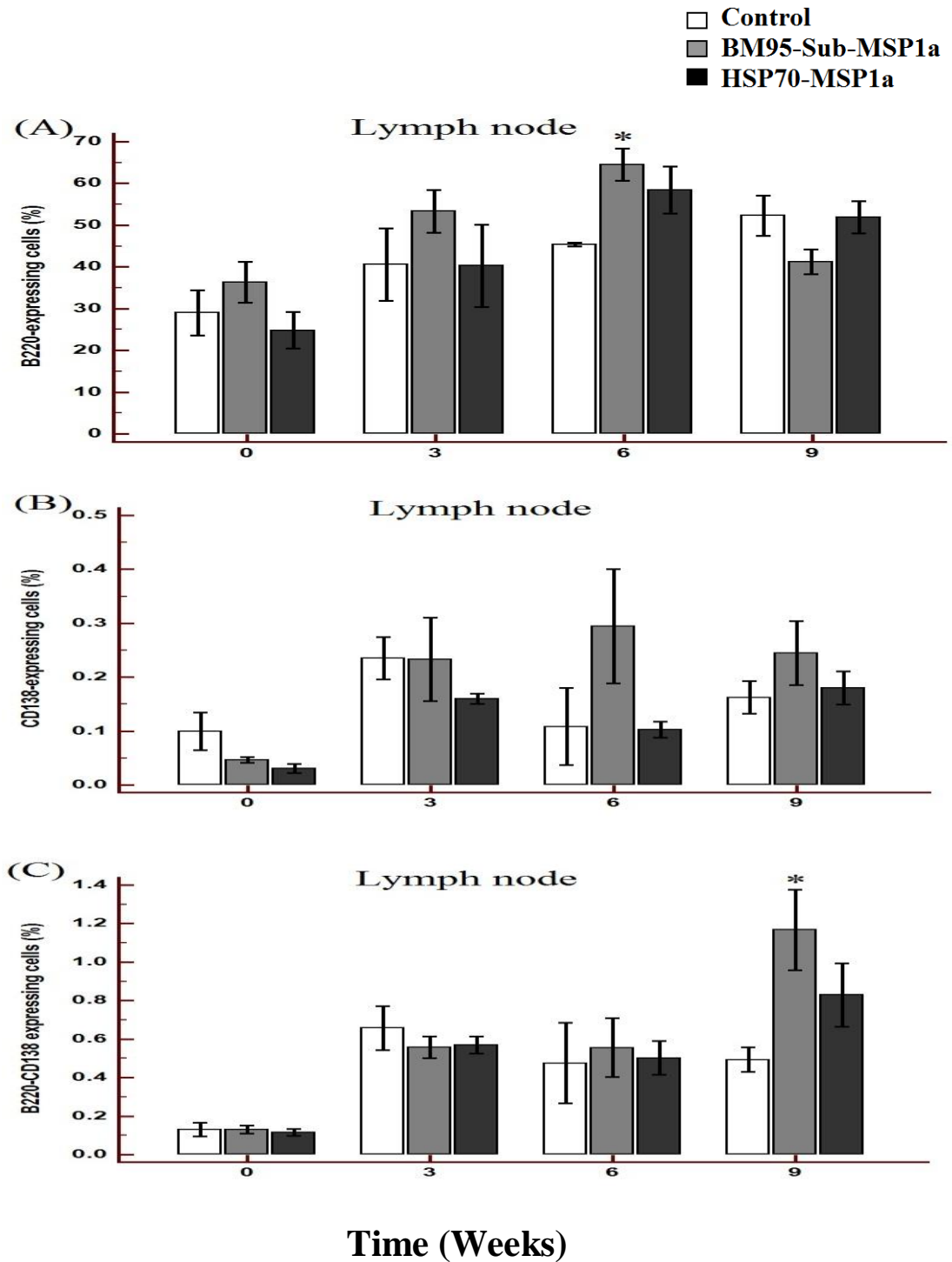


Figure 2. Flow cytometry analysis of lymph nodes over 9 weeks post vaccination. Bars represent the mean value for each treatment and error bars are standard error of the mean. (A) Percentages of B220-expressing

cells, (B) CD138-expressing cells (B) and (C) percentages of cells double-positive for B220 and CD138 (C). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

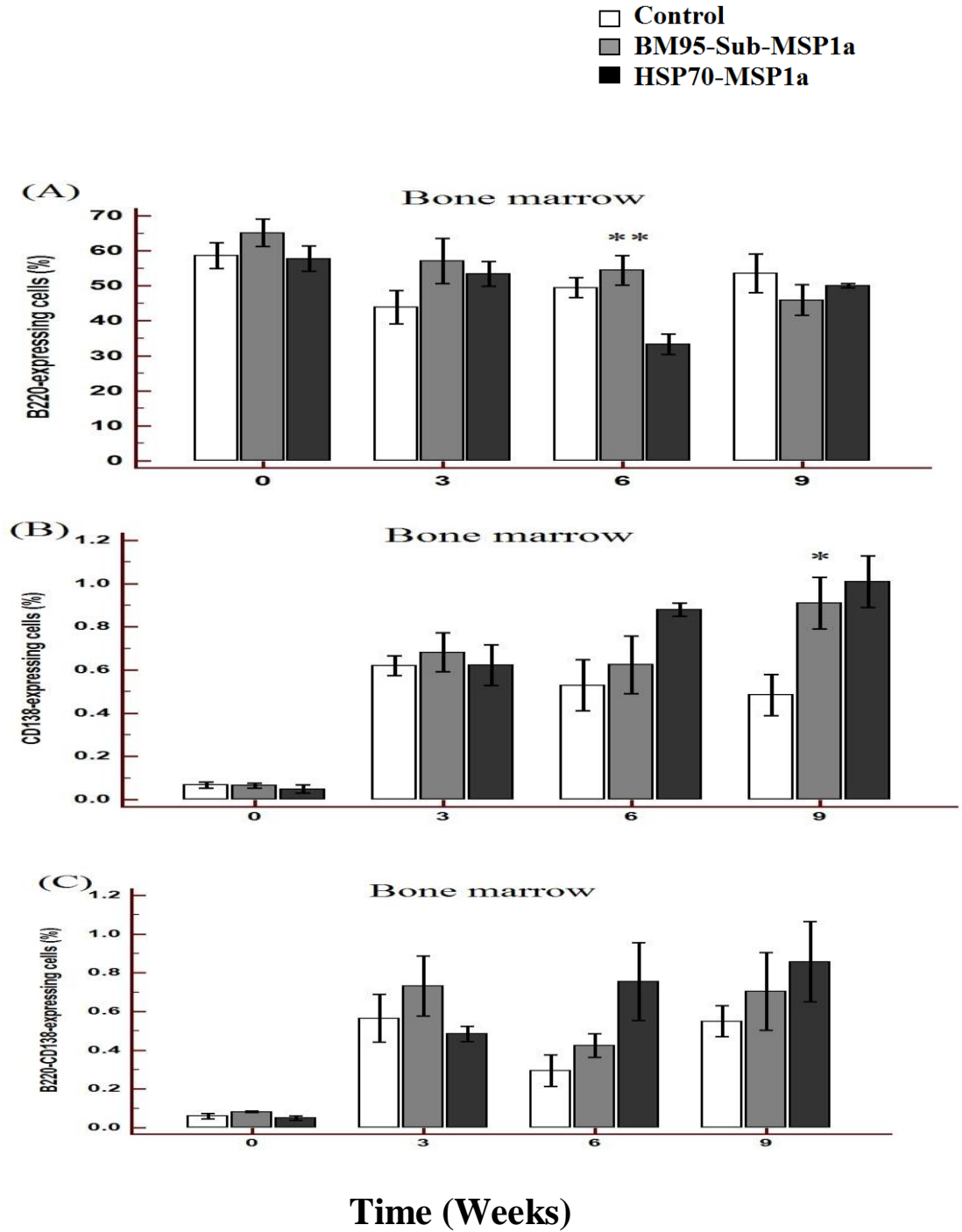


Figure 3. Flow cytometry analysis of bone marrow over 9 weeks post vaccination. Bars represent the mean value for each treatment and error bars are standard error of the mean. (A) Percentages of B220-expressing

cells, (B) CD138-expressing cells (B) and (C) percentages of cells double-positive for B220 and CD138 (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Data from this study showed that the B220 and CD138-expressing cells from bone marrow were unchanged in the three groups during the first 3 weeks, but significantly different following week 6 and 9 for both, the BM95-Sub-MSP1a and HSP70-MSP4 groups. Similar to what was observed in the spleen, during week 6 and 9, CD138 bone marrow lymphocytes were slightly increased, while B220 cells were significantly reduced (Fig 3). The results from this investigation provided evidence that plasma cells generated by these antigen vaccines, principally BM95-Sub-MSP1a, may be long-lived since they were located especially in bone marrow and to a lesser extent the lymph node and spleen.

Purified or recombinant vaccines, are often poorly immunogenic and require additional components (adjuvants) to help stimulate protective immunity based on T and B cell responses. Montanide, a water-in-oil emulsion composed of a mineral oil and a surfactant from the mannide monooleate family, is an adjuvant that has been used in experimental vaccines in mice, rats, dogs and cats using natural, recombinant and synthetic antigens. Moreover, it has been shown to be immunogenic, inducing both Th1-type cellular and humoral immune responses in humans and non-human primate vaccine studies ((Teena *et al.*, 2013; Van Doorn *et al.*, 2016). The results of this work demonstrate that subcutaneous administration of BM95-Sub-MSP1a, and HSP70-MSP1a chimeric antigens formulated with montanide generates a protective humoral immune response in BALB/c, characterized by a high production of the IgG. As shown in Figure 4, antibody titres against each antigens could be detected in all vaccinated animals. Even though all groups elicited a humoral immune response that was similarly detectable at the first 3 weeks after the first immunization, for control group there was a marked decrease by week 6 and 9. On the other hand, the IgG response in the protein treated groups showed an upward trend until the week 9; nonetheless, IgG serum levels revealed that the group of mice immunized with BM95-Sub-MSP1a reached values significantly higher than those obtained in HSP70-MSP4 and control groups. Besides, these serum levels remained elevated until the end of the study ($p < 0.05$). These results were similar to those previously obtained in cattle and sheep vaccinated with SUB-MSP1a where antibody titers persisted in vaccinated animals for three months after the last immunization when compared to control animals (Torina *et al.*, 2014).

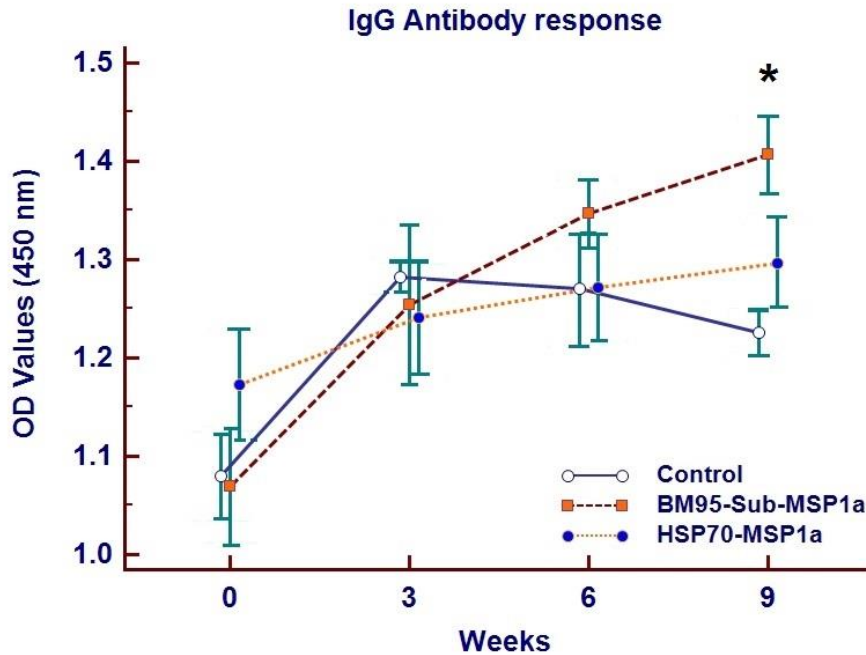


Fig. 4. Data shown indicate IgG values in each vaccination group. Antibody titers in recombinant protein vaccinated mice were expressed as the OD_{450nm} and compared to control groups by one and two-way ANOVA test followed by a multiple comparisons Tukey's test. The horizontal lines and error bars represent the mean and standard error of the mean (SEM). A p-value < 0.05 was considered significant (n=4).

Conclusions

To our knowledge, this is the first study investigating the CD138 and B220 expression on cells from different lymphoid tissues after immunization of mice with the anti-tick vaccine candidates BM95-Sub-MSP1a and the HSP70-MSP4. The main findings of these studies were: a) the percentage of B220-expressing cells were significantly higher in the spleen at 3, 6 and 9 weeks after immunization in HSP70-MSP4 and control groups as compared with those in BM95-Sub-MSP1a mice. b) the levels of CD138-expressing cells (%) in BM95-Sub-MSP1a were significantly higher compared with the others two groups. c) the immunized mice developed antibodies in response to all treated groups; nonetheless, the highest IgG serum levels were observed in the BM95-Sub-MSP1a group and these levels remained significantly elevated through the end of the experiment. Further studies should be performed to evaluate whether the long-lasting memory response of BM95-Sub-MSP1a persists over a longer period of time. The results of this study indicate that the BM95-Sub-MSP1a vaccine candidate was able to elicit a good immune response and provide further support for the development of multi-component

subunit vaccine ticks and *Anaplasma* sp. infection. A better understanding of the induction and maintenance of memory B and plasma cells of immunized animals, will allow us to define with greater certainty potential candidate antigens in order to design novel vaccines for the control of ticks and tick-borne pathogens.

References

- Almazán, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., De La Fuente, J., (2003). Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*. 21, 1492–1501.
- Almazán, C., Moreno-Cantú, O., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Canales, M., Villar, M., de la Fuente, J. (2012). Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*. 30, 265-272.
- Almazán, C., Kocan, K.M., Blouin, E.F., De La Fuente, J., (2005). Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*. 23, 5294–5298. .
- Andreotti A., M.S. Pedroso, A.R. Caetano, N.F.Martins. (2008). Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17, 93-98.
- Calame, K.L.. (2001). Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol*. 2,1103–1108.
- Canales, M., Almazán, C., de la Lastra, J.M.P., de la Fuente, J. (2008). *Anaplasma marginale* major surface protein 1a directs cell surface display of tick BM95 immunogenic peptides on *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 135, 326–332.
- Canales, M., Labruna, M., Soares, J., Prudencio, C., and de la Fuente, J. (2009). Protective efficacy of bacterial membranes containing surface exposed BM95 antigenic peptides for the control of cattle tick infestations. *Vaccine*. 27, 7244-7248.
- Canales, M., Moreno-Cid, J.A., Almazán, C., Villar, M., de la Fuente, J. (2010). Bioprocess design and economics of recombinant BM86/BM95 antigen production for anti-tick vaccines. *Biochem Eng J*. 52, 79–90.
- Contreras, M., Juan, A., Moreno-Cid, Ana-Domingos, Mario, Canales., Iratxe, Díez-

- Delgado., José, M. Pérez de la Lastr, Emilio, Sánchez., Octávio, Merino., Rigoberto, López-Zavala., Nieves, Ayllón., Mariana, Boadella., Margarita, Villar., Christian, Gortázar., de la Fuente, J. (2015). Bacterial membranes enhance the immunogenicity and protective capacity of the surface exposed tick Subolesin-*Anaplasma marginale* MSP1a chimeric antigen. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 6, 820-828.
- Contreras, M., Alberdi, P., Mateos-Hernández, L., Fernández de Mera, I.G., García-Pérez, A.L., Vancová, M., Villar, M., Ayllón, N., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J.J., *Stuen, S., Gortazar, C., de la Fuente, J., (2017)*. Anaplasma phagocytophilum MSP4 and HSP70 Proteins Are Involved in Interactions with Host Cells during Pathogen Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7.
- De La Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J.C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H., Leonart, R., (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): The experience with the Bm86-based vaccine Gavac((TM)), in: *Genetic Analysis - Biomolecular Engineering*. pp. 143–148. [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(99\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(99)00018-2)
- De La Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E.F., Naranjo, V., Kocan, K.M., (2006). Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitology Research*. 100, 85–91.
- de la Fuente, J. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*. Volume, 6938.
- de la Fuente, J., Moreno-Cid, J.A., Canales, M., Villar, M., de la Lastra, J.M.P., Kocan, K.M., Galindo, R.C., Almazán, C., Blouin, E.F., (2011). Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Veterinary Parasitology*. 181, 17–22.
- De la Fuente, J., Merino, O., (2013). Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine* 31, 5923–5929.
- de la Fuente, J., Contreras, M. (2015). Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev Vaccines*.14,1367-76 .
- Espinosa P.J., Alberdi P., Villar M., Cabezas-Cruz A., de la Fuente J. (2017) Heat Shock Proteins in Vector-pathogen Interactions: The *Anaplasma phagocytophilum* Model. In: Asea A., Kaur P. (eds) Heat Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences. Heat Shock Proteins, vol 12. Springer, Cham. pp 375-398.

- Freeman, J.M., R.B. Davey, L.S. Kappmeyer, D.M. Kammlah, P.U. Olafson (2010). Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasite Vectors*. 3, 101.
- García-García, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., Rodríguez, M., Joglar, M., MacHado, H., González, I.L., Valdés, M., Méndez, L., De La Fuente, J., (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*. 18, 2275–2287.
- Galindo, R.C., Doncel-Pérez, E., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Gortazar, C., Mangold, A. J., De la Fuente, J. (2009). Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Developmental y Comparative Immunology*. 33(4), 612-617.
- Geraldine, Blanchard-Rohner., Anoop, S. Pulickal., Cornelia, M. Jol-van der Zijde., Matthew, D., Snape and Andrew, J. Pollard. (2009). Appearance of peripheral blood plasma cells and memory B cells in a primary and secondary immune response in humans. *Blood*. 114, 4998-5002
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., Yadav, M.P., (2007). Upcoming and future strategies of tick control: A review. *Journal of Vector Borne Diseases*. 44,79-89
- Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2010). Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: The influence of germinal center interactions and dynamics. *J. Immunol*. 185, 3117–3125.
- Kröber, T., Guerin, P.M., (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science*. 63, 17–22.
- Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., De la Fuente, J., (2011). Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine*. 29, 8575–8579.
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Rosario-Cruz, R., Rodríguez, S., Domingos, A., De la Fuente, J., (2013). Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*. 31, 5889–5896.
- Nutt, S.L., et al., (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 15 (3), 160-71.

- O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J. Exp. Med.* 199, 91–98.
- Penichet M., M. Rodriguez, O. Castellano, S.Mandado, Y. Rojas, R. Rubiera, et al. (1994). Detection of Bm86 antigen in different strains of *Boophilus microplus* and effectiveness of immunization with recombinant Bm86. *Parasite Immunol.* 16, 493-500.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G., Dorner, T. et al. (2006) Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 6, 741–750.
- Ruiz, L.M.1., Orduz, S., López, E.D., Guzmán, F., Patarroyo, M.E., Armengol, G. (2007). Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm86 gene. *Vet Parasitol.* 144(1-2),138-45.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, K. Araki, and R. Ahmed. (2010). From vaccines to memory and back. *Immunity.* 33, 451–463.
- Sarah, R., Amend, Kenneth, C., Valkenburg, and Kenneth, J., Pienta. (2016). Murine Hind Limb Long Bone Dissection and Bone Marrow Isolation. *J Vis Exp.* 110), 53936.
- Teena Mohan., Priyanka Verma & D. Nageswara Rao. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J Med Res.* 138, 779-795.
- Torina, A., J.A. Moreno-Cid, V., Blanda, I., G. Fernandez, de Mera, J.M. de la Lastra., S. Scimeca., M. Blanda, M., E. Scariano, S., Brigano, R., Disclafani, A., Piazza, J. Vicente, C. Gortazar., S. Caracappa., R.C. Lelli and J. de la Fuente. (2014). Control of tick infestations and pathogen prevalence in cattle and sheep farms vaccinated with the recombinant Subolesin-Major Surface Protein 1a chimeric antigen. *Parasit Vectors.* 7, 10 .
- Van Doorn, E., Liu, H., Huckriede, A., Hak, E. (2016). Safety and tolerability evaluation of the use of Montanide ISA51 as vaccine adjuvant: a systematic review. *Hum Vaccin Immunother.* 12(1), 159–69.
- Villar, M., Ayllón, N., Kocan, K. M., Bonzón-Kulichenko, E., Alberdi, P., Blouin, E. F., et al. (2015). Identification and characterization of *Anaplasma phagocytophilum* proteins involved in infection of the tick vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS ONE* 10:e0137237.

Villar, M., Marina, A., de la Fuente, J., (2017). Applying proteomics to tick vaccine development: where are we? *Expert Review of Proteomics*.
<https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1284590>

Watanabe Y, Akaike T. (1994). Activation signal induces the expression of B cell-specific CD45R epitope (6B2) on murine T cells. *Scand J Immunol.* 39, 419.

DISCUSIÓN GENERAL

El control de las garrapatas en la ganadería se convirtió en un gran problema en las últimas décadas, sobre todo por la aparición de poblaciones resistentes luego del uso indiscriminado de acaricidas (Kröber y Guerin, 2007). Debido a la falta del surgimiento de químicos más eficaces, la vacunación surge como una nueva alternativa de control. Durante la década de los 90'se desarrollaron y comercializaron dos vacunas anti-garrapata: TickGARD® en Australia y GAVAC® en Latinoamérica las cuales se produjeron en *Rhipicephalus microplus* y se basan en el antígeno Bm86, que es una glicoproteína expresada en la superficie de las células intestinales (Willadsen, 2006). Aunque la eficacia de estas vacunas ha sido variable, se ha demostrado que la vacunación de los animales es un método sostenible de control de las poblaciones de garrapatas y que su implementación en programas de control integrado, permite disminuir considerablemente el uso de acaricidas (de la Fuente *et al.*, 2007; Willadsen, 2006; Vargas *et al.*, 2010; Guerrero *et al.*, 2012).

En la búsqueda de nuevo antígenos protectores más eficaces contra infestaciones por garrapatas se han identificado varias proteínas de interés, sin embargo, a la fecha existe un número reducido de proteínas que se han probado en ensayos controlados para determinar su eficacia en la protección contra infestaciones artificiales (de la Fuente y Kocan, 2006).

Los estudios de la interacción entre las garrapatas del género *Ixodes*, vector del patógeno *Anaplasma phagocytophilum*, condujo al descubrimiento de la proteína subolesina la cual ha sido eficaz como un antígeno protector y, es estructural y funcionalmente ortóloga a las akirinas en insectos y vertebrados. Se ha reoprtado que ésta proteína es capaz de regular la expresión génica y, por lo tanto, interviene en múltiples procesos celulares, como la digestión, la respuesta inmunitaria, la reproducción y el desarrollo de la garrapata (Almazán, *et al.*, 2005; de la Fuente, *et al.*, 2006). El antígeno subolesina se expresa en los distintos estadios de la garrapata (Almazán *et al.*, 2003). El silenciamiento del gen que codifica para dicha proteína produce degeneración de intestinos, glándulas salivales y sistema reproductor tanto de hembras como de machos (de la Fuente *et al.*, 2005), esto demuestra su papel en la modulación de la alimentación y reproducción, ocasionando una reducción en la progenie (de la Fuente *et al.*, 2006).

Tanto la subolesina como la akirina son proteínas altamente conservadas en distintas especies de artrópodos, ofreciendo así ser candidatos ideales para la elaboración de vacunas capaces de proteger frente a la infestación con diferentes vectores hematófagos y

asi disminuir la infección de patógenos transmitidos por dichos vectores. Los experimentos de vacunación con antígenos recombinantes ortólogos de subolesina de garrapata o de mosquito muestran una reducción de la fertilidad y/o de la supervivencia de los artrópodos, como garrapatas, mosquitos y pulgas de arena. En rumiantes, las infestaciones de la garrapata *Ixodes scapularis* son reducidas mediante la vacunación con ortólogos de subolesina procedentes de garrapata y de mosquito con una eficacia similar. No obstante, diferentes ensayos han demostrado que la subolesina o akirina de algunas especies producen un efecto mayor que otras frente a diferentes especies de vectores (Canales, M. et al., 2009; Almazán *et al.*, 2010).

En investigaciones previas se ha valorado la eficacia de Subolesina como vacuna demostrando tener un efecto en el control de infestaciones de *R. microplus* e infecciones de *A. marginale* (Merino *et al.*, 2011). Además, la presencia de anticuerpos anti-subolesina provocaron una reducción en el peso y la ovoposición de las garrapatas alimentadas con sangre infectada con *Babesia bigemina*. No obstante, cuando las garrapatas se alimentaron con sangre infectada con *A. marginale* no se observaron diferencias significativas (Merino *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la expresión de subolesina aumenta en los tejidos de garrapatas en respuesta a la infección con *A. marginale* (Antunes *et al.*, 2014). En el presente estudio se comprobó que las *R. microplus* infectadas con este microorganismo mostraron una sobre expresión del gen de Subolesina en las glándulas salivales en comparación con las no infectadas.

Además de participar en los procesos fisiológicos antes mencionados, la proteína subolesina participa en la respuesta inmune frente a la infección de diferentes patógenos así como en la regulación de la expresión de genes que son importantes para la infección (de la Fuente *et al.*, 2006; Merino *et al.*, 2013; Naranjo *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en Western blot y Tiempo Real en este estudio permitieron establecer que la Subolesina tiene un efecto en la interacción hospedador patógeno en la expresión génica en *R. microplus* tal y como lo sugirió Galindo en 2009. No obstante, se ha reportado que el grado de la expresión de la subolesina depende de factores como el nivel de infección por patógenos, estos resultados pudieran ser replicados con un número mayor de *R. microplus*, para realizar un análisis donde se pueda utilizar diferentes niveles de parasitemias.

Los resultados obtenidos de la expresión diferencial de subolesina de este estudio también concuerdan con los reportados en tejidos de glándulas salivales de *Dermacentor variabilis* y en cultivo de células IDE8 de garrapata infectadas con *Anaplasma marginale* en los cuales se observó una mayor expresión de subolesina en las glándulas salivales. Sin embargo, al comparar la expresión en tejidos de intestinos infectados, no se mostró

ninguna diferencia significativa comparada con los no infectados (de la Fuente *et al.*, 2007; Zivkovic *et al.*, 2010). De igual manera, no se observaron cambios significativos en la expresión del gen de subolesina en células cultivadas e infectadas de ISE6 de garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2008).

Actualmente, existe la necesidad de desarrollar vacunas capaces de desencadenar en el hospedador una respuesta inmune protectora frente a las infestaciones por varias especies de garrapatas y patógenos que transmiten. Así, las vacunas actuales actúan mediante la inducción de anticuerpos de tipo IgG los cuales se asocian con la respuesta tipo th1 donde el complemento produce la destrucción de las células intestinales. Sin embargo, los valores de los anticuerpos suelen declinar tras la vacunación si no se produce una revacunación (McGuire *et al.*, 1979; Tellam *et al.*, 1992). El objetivo principal de una vacuna es inducir una inmunidad protectora de larga duración, mimetizando en lo posible la infección natural, intentando producir las modificaciones que ésta produce en el sistema inmune.

Las células B de memoria son importantes mediadores de protección inducida por vacunas, debido que posterior a un reencuentro con su antígeno, estas células se diferenciarán hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos protectores. Las células plasmáticas de larga vida, migran de los centros germinales hacia la médula ósea donde pueden llevar a cabo la producción de anticuerpos (Nutt *et al.*, 2015). Por otro lado, durante el desarrollo normal de las células B a células plasmáticas se adquiere la expresión de una proteína llamada Sindecano 1 o CD138, la cual es sobre expresada hasta 1000 veces durante su diferenciación (Calame 2001; Radbruch *et al.*, 2006)

En este segundo experimento se evaluó la respuesta inmune de las proteínas quiméricas BM95-Sub-MSP1a y HSP70-MSP4 a través de la expresión de los marcadores B220 y CD138 en células del bazo, ganglio linfático y médula ósea, así como también los niveles de anticuerpos de IgG a diferentes semanas antes y después de la vacunación. Aquí se pudo observar que el porcentaje de expresión de las células B220 positivas fue significativamente mayor en el bazo a las 3, 6 y 9 semanas para HSP70-MSP4 y grupo control comparado con el grupo BM95-Sub-MSP1a. En contraste, los porcentajes de células con niveles de expresión de CD138 en el mismo órgano fue significativamente mayor para el grupo de BM95-Sub-MSP1a. Una explicación a esto podría ser que debido a que las células B proliferaron y se diferenciaron hacia plasmoblastos, disminuyó la expresión B220 y expresaron en cierta medida, un mayor número de la proteína CD138. Es probable que esto sea un reflejo de las células B maduras que se están transformando a células plasmáticas terminales, donde dejan de expresar el marcador B220. Se ha reportado que la respuesta de las células plasmáticas en el bazo disminuye rápidamente con un aumento simultáneo en las células plasmáticas de larga vida en la médula ósea que

tienen el potencial de diferenciarse rápidamente en células secretoras de anticuerpos durante una respuesta inmune secundaria (Geraldine *et al.*, 2009; Nutt *et al.*, 2015). Además, se mostró que las células B220 y CD138 de la médula ósea se mantuvieron sin cambios en los tres grupos durante las primeras 3 semanas, pero fueron significativamente diferentes después de la semana 6 y 9 para los grupos tratados con BM95-Sub-MSP1a y HSP70-MSP4. Similar a lo que se observó en el bazo, durante las semanas 6 y 9, los linfocitos de médula ósea CD138 aumentaron ligeramente, mientras que las células B220 se redujeron significativamente.

Los resultados de esta investigación proporcionaron evidencia de que las células plasmáticas generadas por estas vacunas, principalmente BM95-Sub-MSP1a, pueden ser de larga duración ya que estas células se encontraron principalmente en la médula ósea y en menor medida en el ganglio linfático y el bazo. 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 que se refiere al desarrollo de una ganadería sustentable, amigable con el ambiente y con la salud humana.

CONCLUSIONES

La investigación actual se realizó para evaluar la expresión diferencial de subolesina en las glándulas salivales de *R. microplus* en respuesta a la infección por *A. marginale*. De acuerdo con los resultados, se concluyó que los niveles de expresión de subolesina en garrapatas expuestas a *A. marginale* aumentaron significativamente en comparación con las garrapatas no infectadas.

Los resultados de la segunda investigación proporcionaron evidencia de que las células plasmáticas generadas por estas proteínas, principalmente BM95-Sub-MSP1a, pueden inducir una respuesta de larga duración ya que estas células se encontraron principalmente en la médula ósea y en menor cantidad en los linfonodos y el bazo.

Los ratones inmunizados desarrollaron anticuerpos en respuesta a todos los grupos tratados; sin embargo, los niveles séricos más altos de IgG se observaron en el grupo BM95-Sub-MSP1a y estos niveles se mantuvieron significativamente elevados hasta el final del experimento.

LITERATURA CITADA

- Ahuja, A., Anderson, S.M., Khalil, A., Shlomchik, M.J. (2008). Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Allen, C.D., Okada, T. and Cyster, J.G. (2007). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 27, 190–202.
- Almazán, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., de la Fuente, J. (2003). Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*. 21, 1492-501
- Almazán-García, C., Rosario-Cruz, R., Torres-Rodríguez, L., de la Fuente, J. (2006). La genómica funcional y el desarrollo de vacunas contra artrópodos de importancia veterinaria. En memorias del Simposium Internacional de resistencia a pesticidas en artrópodos: un enfoque toxicológico y molecular. Manzanillo, Col, México, 29 y 30 de mayo.
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F., et al. (2010). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res*. 106, 471-9.
- Antunes, S., Galindo, R.C., Almazán, C., Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., et al. (2012). Functional genomics studies of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks in response to infection with the cattle protozoan parasite *Babesia bigemina*. *Int. J. Parasitol*. 42, 187-195.
- Alonso-Díaz, M.A., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Angel-Sahagún, C., Rodríguez-Vivas, R.I., Fragosó-Sánchez, H. (2007). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 147, 336-340.

- Anderson, J.F, Magnarelli, L.A. (2008). Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am.* 22, 195-215.
- Antunes, S., Merino, O., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Bell-Sakyi, L., Fragkoudis, R., de la Fuente, J. (2014). Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasites & Vectors.* 7, 42.
- Bar-Or A., Oliveira, E.M., Anderson, D.E., Krieger, J.I., Duddy, M., O'Connor, K.C., Hafler, D.A. (2001). Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state. *J. Immunol.* 167, 5669–5677.
- Blood, D.C., R. (1992). *Medicina veterinaria, McGRAW volumen II* (7ma ,McGRA.). México.
- Calame, K.L. (2001). Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol.* 2, 1103–1108.
- Carreño, A.D., Alleman, A.R., Barbet, AF., Palmer, G.H., Noh, S.M., y Johnson, C.M. (2007). In vivo endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Veterinary Pathology.* 44, 116–118.
- Dawes, R., Petrova, S., Liu, Z., Wraith, D., Beverley, P.C., Tchilian, E.Z. (2006). Combinations of CD45 isoforms are crucial for immune function and disease. *J Immunol.* 176(6), 3417-25.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Megret, J., Storck, S., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10, 1292–1299.
- de la Fuente. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine.* 18, 2275-2287.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E.F., Naranjo, V., Kocan, K.M. (2005). RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol Res.* 96, 137–141.
- de la Fuente, J. y Kocan, K.M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 28, 275-283.

- de la Fuente, J., Blouin, E. F., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Almazán, C., de la Lastra, J. M. P., y Kocan, K. M. (2007). Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics*. 90(6), 712-722.
- de la Fuente, J., Blouin, E. F., Manzano-Roman, R., Naranjo, V., Almazán, C., La Lastra, D., y Kocan, K. M. (2008). Differential Expression of the Tick Protective Antigen Subolesin in *Anaplasma marginale*-and *A. phagocytophilum*-infected Host Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1149(1), 27-35.
- De Meneghi, D., Stachurski, F., and Adakal, H. (2016). Experiences in Tick Control by Acaricide in the Traditional Cattle Sector in Zambia and Burkina Faso: Possible Environmental and Public Health Implications. *Front Public Health*. 4, 239.
- Fernandes, E.K.K., Bitencourt, V.R.E.P., Roberts, D.W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of tick. *Experimental Parasitology*. 130, 300-305.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Misse, D., Pages, F., Fusai, T., Rogier, C., Almeras, L., (2011). Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasite and Vectors*. 4,187.
- Fragoso-Sánchez, H., García-Vázquez, Z., Tapia-Pérez, G., Ortiz-Najera, A., Rosario-Cruz, R., Rodríguez-Vivas, I. (2011). Response of Mexican *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks to selection by amitraz and genetic analysis of attained resistance. *J Entomol*. 8, 218-28.
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*. 14, 2051-2088.
- Fragoso, H., Hoshmand, Rad P., Ortiz, M., Rodríguez, M., Redondo, M., Herrera, L., de la Fuente J. (1998). Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine*. 16, 1990-1992.
- Fragoso-Sanchez, H., Garcia-Vazquez, Z., Tapia-Perez, G., Ortiz-Najera, A., Rosario-Cruz, R., Rodriguez-Vivas, I. (2011). Response of Mexican *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks to selection by amitraz and genetic analysis of attained resistance. *J Entomol*. 8, 218-28.

- Galindo, R.C., Doncel-Pérez, E., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Gortazar, C., Mangold, A. J., De la Fuente, J. (2009). Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Developmental y Comparative Immunology*. 33(4), 612-617.
- García-García, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boué, O., Rodríguez, M., Joglar, M., Machado, H., González, I., Valdés, M., Méndez, L., de la Fuente J. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*. 18, 2275–2287.
- George, J.E. (2008). The effects of global change on the threat of exotic arthropods and arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1149, 249-254.
- Geraldine, Blanchard-Rohner., Anoop, S., Pulickal, Cornelia, M. Jol-van der Zijde., Matthew, D., Snape, and Andrew, J., Pollard. (2009). Appearance of peripheral blood plasma cells and memory B cells in a primary and secondary immune response in humans. *Blood*. 114, 4998-5002.
- Guerrero, F.D., Miller, R.J., Perez de Leon, A.A. (2012). Cattle tick vaccines: many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *International Journal for Parasitology*. 42, 421-427.
- Halliley, J.L., Christopher, Tipton., Jane, Liesveld., Alexander, F. Rosenberg., *et al.* (2015). Long-lived Plasma Cells Are Contained Within the CD19–CD38hiCD138+ Subset in Human Bone Marrow. *Immunity*. 21; 43(1), 132–145.
- Hargreaves, D.C. et al. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 194, 45–56.
- Hermiston; M.J., Xu, Z., Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of Immunology*. 21, 107-37.
- Hikida, M., Casola, S., Takahashi, N., Kaji, T., Takemori, T., Rajewsky, K., and Kurosaki, T. (2009). PLC-gamma2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *J. Exp. Med.* 206, 681–689.
- Jonsson, N.N., Matschoss, A.L., Pepper, P., Green, P.E., Albrecht, M.S., Hungerford, J., Ansell, J. (2000). Evaluation of tick-GARD (PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Veterinary Parasitology*. 88, 275-285.

- Jonsson, N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*. 137, 1-10.
- Kaewmongkol, S., Kaewmongkol, G., Inthong, N., Lakkitjaroen, N., Sirinarumitr, T., Berry, M., Jonsson, N.N., Stich, R.W. and Jittapalapong, S. (2015). Variation among Bm86 sequences in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks collected from cattle across Thailand. *Exp Appl Acarol*. 66(2), 247-56.
- Kazimírová, M. y Stibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3, 43.
- Kemp, D. H ., Pearson, R. D ., Gough, .J.M. and Willadsen,P. (1989). Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on the tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp.Appl.Acarol*. 7, 43-58.
- Kocanm, K.M., De La Fuente, J., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C. (2004). *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. 129, 285–300. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004700>.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F. (2008). Advances toward understanding the molecular biology of the Anaplasma-tick interface. *Front Biosci*. 13, 7032–7045.
- Kocan, K. M., Zivkovic, Z., Blouin, E. F., Naranjo, V., Almazán, C., Mitra, R., y de la Fuente, J. (2009). Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC developmental biology*. 9(1), 1.
- Kröber, T., Guerin, P.M., (2007). An in vitro feeding assay to test acaricides for control of hard ticks. *Pest Management Science*. 63, 17–22. <https://doi.org/10.1002/ps.1293>
- Kunkel, E.J. & Butcher, E.C. (2003). Plasma-cell homing. *Nature Rev. Immunol*. 3, 822–829.
- Liu, D., Lin, P., Hu, Y., Zhou, Y., Tang, G., Powers, L., Medeiros, L.J., Jorgensen, J.L., Wang, S.A. (2012). Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma. *Journal of Clinical Pathology*. 65, 823–829.

- McGuire, T.C., Musoke, A.J., Kurti, T. (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*. 38, 249-257.
- Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., Gonzalez-Garcia, I., Brieva, J.A. (2002). The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood*. 99, 2154–2161.
- Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J. A., Galindo, R. C., De la Fuente, J. (2011). Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine*. 29(47), 8575-8579.
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Pérez-de la Lastra, J.M., Rosario-Cruz, R., De la Fuente, J. (2013). Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*. 31(49), 5889–5896.
- Miller, R.J., Almazan, C., Ortíz, M., Ronald, B., Davey, John, E. George. (2008). A survey for fipronil- and ivermectin-resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected in northern Mexico and the options for the management of acaricide-resistant ticks with pesticides. VI Seminario Internacional de Parasitología Animal. Boca del Río, Ver.
- Naranjo, V., Ayllón, N., De la Lastra, J.M.P., Galindo, R.C., Kocan, K.M., Blouin, E.F., de la Fuente, J. (2013). Reciprocal regulation of NF- κ B (Relish) and Subolesin in the tick vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS One*. 8(6), e65915.
- Nutt, S.L., et al., (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 15(3), 160-71.
- O'Connor, B.P., Cascalho, M., Noelle, R.J. (2002). Short-lived and long-lived bone marrow plasma cells are derived from a novel precursor population. *J. Exp. Med*. 195, 737–745.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodriguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Cruz-Vázquez, R. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

- mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2 (2), 177-192.
- Oracki, S.A., Walker, J.A., Hibbs, M.L., Corcoran, L.M., Tarlinton, D.M. (2010). Plasma cell development and survival. *Immunological Reviews*. 237:140–159.
- Parola P, Raoult D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infec Dis*. 32, 897-928.
- Peter, R., Vandenbossche, P., Penzhorn, B., Sharp, B. (2005). Tick, fly, and mosquito control-Lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary Parasitology*. 132, 205-215.
- Quiroz, R.H. 2005. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Limusa, México. Pag. 796-802.
- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol*. 6, 741–750.
- Ribeiro, J.M., Labruna, M.B., Mans, B.J., Maruyama, S.R., Francischetti, I.M., Barizon, G.C., de Miranda Santos, I.K. (2012). The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 42, 332-342.
- Rodríguez, V.M., Montero, C., Machado, H. and Joglar, M. (2001). The evaluation of yeast derivatives as adjuvants for the immune response to the Bm86 antigen in cattle. *BMC Biotechnol*. 1, 2.
- Rodríguez-Vivas, R.I, Rosado, A.A., Basto, E.G., García, V.Z., Rosario-Cruz, R., Fragoso, S.H. 2006. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino., Cenid-Pavet, INIFAP, Pag.1-7.
- Rodríguez-Vivas, R.I., y Rosado-Aguilar, A. (2006). *Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado Bovino en Yucatán, México* (1a. Edición).
- Rodríguez-Vivas R.I., Ojeda-Chi M.M., Pérez-Cogollo L.C., Rosado-Aguilar, JA. (2011) Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México.

- Capítulo 33. En: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Editores: Quiroz RH, Figueroa CJA, López AME. AMPAVE. pp: 477-504.
- Rosario-Cruz, R., Almazán, C., Miller, R.J., Domínguez-García, D.I., Hernandez-Ortiz, R., de la Fuente, J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Front Biosci* (Landmark Ed). 1 (14), 2657-65.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, K. Araki, and R. Ahmed. (2010). From vaccines to memory and back. *Immunity Review*. 33, 451–463.
- SAGARPA.(2006) [http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/campana nacional contra la garrapata Boophilus spp.](http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/campana_nacional_contra_la_garrapata_Boophilus_spp)
- Slifka, M.K., Ahmed, R. (1998). Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Curr Opin Immunol*. 10, 252–258.
- Sossai, S., Peconick, P., Sales-Junior, P., Marcelino, F., Vargas, M., Neves, E., Patarroyo, J. (2005). Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*. 37, 199-214.
- Stibraniova, I., Lahova, M., and Bartikova, P. (2013). Immunomodulators in tick saliva and their benefits. *Acta Virol*. 57 (2), 200–216.
- Sun, J.C., Ugolini, S., Vivier, E. (2014). Immunological memory within the innate immune system. *EMBO Journal*. 33, 1295–303.
- Tabor, A.E., Abid, Ali., Gauhar, Rehman., Gustavo, Rocha-Garcia., Amanda, Fonseca-Zangirolamo., Thiago, Malardo., and Nicholas, N. Jonsson. (2017). Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and Susceptible Host Responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7, 1-18.
- Tellam, R.L., Smith, D., Kemp, D.H. and Willadsen, P. (1992). Vaccination against ticks. In : Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology. pp. 303-331, W.K.Wong (ed.), CRC Press Inc, Boca Raton.
- Vargas, M., Montero, C., Sanchez, D., Perez, D., Valdes, M., Alfonso, A., Joglar, M., Machado, H., Rodriguez, E., Mendez, L., Leonart, R., Suarez, M., Fernandez, E., Estrada, M.P., Rodriguez-Mallon, A., Farnos, 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. *BMC Veterinary Research*. 6, 43.

Wikel, S. (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in Microbiology*. 4, 337.

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

Willadsen, P. (2006). Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet Parasitol*. 138, 161–168.

Xu, Y. Bruno, J. Luft, J. (2005). Identification of novel tick salivary gland proteins for vaccine development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 326: 901–904.

Yuseff, M.I., Pierobon, P., Reversat, A. and Lennon-Duménil, A.M. (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nature Reviews Immunology*. 13: 475-486.

Zivkovic, Z., Torina, A., Mitra, R., Alongi, A., Scimeca, S., Kocan, K. M., y Nijhof, A. M. (2010). Subolesin expression in response to pathogen infection in ticks. *BMC Immunology*. 11(1), 1.