



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Efecto de una vacuna con el antígeno recombinante rGSTHI sobre algunos parámetros reproductivos de *Rhipicephalus microplus* en bovinos de Uruguay**

**por**

**Juan Ignacio CUROTTO ARAUJO**

**Caio Rafael LEITE MIRANDA**

**TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el Título de Doctor en Ciencias Veterinarias**

**Orientación: Producción Animal**

**Modalidad: Estudio de Caso**

**MONTEVIDEO**  
**URUGUAY**  
**2012**

## **PÁGINA DE APROBACIÓN**

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

---

Dra. Jacqueline Maisonnave

Segundo miembro (Tutor):

---

Dr. Uruguaysito Benavides

Tercer miembro:

---

Dra. Eleonor Castro Janer

Cuarto miembro (Co- tutor):

---

Dr. Ulises Cuore

Fecha:

28/12/2012

Autor:

---

Br. Juan Ignacio Curotto Araújo

Autor:

---

Br. Caio Rafael Leite Miranda

## **AGRADECIMIENTOS:**

- Al Dr. Uruguaysito Benavides por aceptar ser nuestro tutor y guía para hacer posible la realización de nuestro trabajo.
- A la Dra. Fernanda Alzugaray por todo el apoyo e información brindados en momentos difíciles durante la ejecución de la tesis.
- A las Dras. Eleonor Castro y Jacqueline Maisonnave por las sugerencias, correcciones brindadas y tiempo dedicado.
- Al Dr. Ulises Cuore, quien aceptó ser nuestro co-tutor, nos brindó información y realizó sugerencias productivas para un mejor desempeño del trabajo.
- Al Departamento de Parasitología de la DILAVE (MGAP) por todo el material y comodidades brindadas.
- A la señora Leticia Ogando por su paciencia, colaboración y dedicación.
- A nuestros compañeros, amigos y familiares que nos acompañaron y apoyaron durante toda la carrera.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b> .....	2
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	3
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>SUMMARY</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	8
Generalidades del parásito.....	8
Ciclo biológico.....	8
Problemas productivos y económicos de la garrapata.....	9
Legislación.....	10
Métodos de control y desarrollo de resistencia a plaguicidas.....	10
Control químico.....	10
Métodos alternativos de control.....	11
Control no químico.....	11
Vacunas para el control de <i>R. microplus</i> del ganado bovino.....	11
rGST como posible antígeno vacinal para la lucha contra <i>R. microplus</i> .....	13
<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
Animales.....	17
Inmunización de los bovinos e infestación.....	17
Recolección y análisis de garrapatas.....	18
Análisis de resultados.....	19
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	20
<b>CONCLUSIONES</b> .....	25
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	26
<b>ANEXOS</b> .....	34

## LISTA DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICAS

<b>Cuadros:</b>	Página
Cuadro 1.....	21
Cuadro 2.....	23
Cuadro 3.....	24
Cuadro 4.....	24
<b>Figuras:</b>	
Figura 1.....	9
Figura 2.....	9
<b>Gráficos:</b>	
Gráfica 1.....	20
Gráfica 2.....	22
Gráfica 3.....	22

## RESUMEN

La garrapata, *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) es uno de los parásitos de mayor importancia para la ganadería debido a las grandes pérdidas que ocasiona. La estrategia más utilizada para controlar las garrapatas consiste en cortar su ciclo, a través de la aplicación de tratamientos con garrapaticidas, sin embargo el uso excesivo ha ocasionado la generación de cepas de *R. microplus* resistentes a la acción de la mayoría de estos productos. Para superar estos problemas, se están desarrollando nuevas alternativas no químicas para el control de parásitos, incluyendo el desarrollo de vacunas. En éste trabajo evaluamos la capacidad de la proteína recombinante rGSTHI de *Haemaphysalis longicornis* para ser usado como antígeno en el desarrollo de una vacuna. Se utilizaron 8 bovinos de 1 año de edad, los cuáles se dividieron en 2 grupos (grupo A y grupo B) de 4 animales cada uno. Al grupo A se lo vacunó con el antígeno recombinante rGSTHI, mientras que los animales del grupo B, fueron usados como controles negativos inoculados con adyuvante. Luego de 10 días de la última inoculación los bovinos fueron desafiados con 9.000 larvas. Las garrapatas ingurgitadas fueron colectadas y se le realizó análisis del número y peso de garrapatas y de la performance reproductiva de las mismas. Los resultados mostraron que la vacuna recombinante usando la proteína rGSTHI disminuyó la oviposición y el porcentaje de eclosión de las teleóginas, pero no logró disminuir el número ni el peso de las mismas. Concluimos que la rGSTHI no sería capaz de controlar ésta parasitosis en el ganado vacuno, pero podría ser incluida en una vacuna multivalente y ser usada en un Programa de Control Integrado de Parásitos.

## SUMMARY

The tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*R. microplus*), is one of the most important types of parasite in stockbreeding, and is responsible for important economic losses. Control of tick infection consists in breaking the tick life cycle. This is achieved through the application of acaricide treatments, however, the irrational use has developed generation of resistant *R. microplus* strains. In order to overcome this problem, a number of non-chemical alternatives are being developed. One of the most promising are the vaccines. In this work we study the effects of the vaccination with rGSTH1 recombinant protein obtained from the tick *Haemaphysalis longicornis*, on cattle infected with *B. microplus*

For that we used eight one year old bovines, divided in two groups (group A and group B) of 4 animals each. Group A was immunized with rGSTH1 recombinant vaccine, and grupo B was used as a negative control inoculated with adjuvant. Ten days after the last inoculation, we infested the cattle with 9000 larvae of *R. microplus* "Mozo" strain and collected the engorged tick to study the number and reproductive performance. The result showed a lower reproductive performance, reduced the oviposition and percentage of eclosion of telogenas of the tick *B. microplus* in the immunized group, but it did not influenced the number and weight of them.

We conclude that rGSTH1 recombinant vaccine has an acceptable protective efficacy. This vaccine by itself would not be able to control the infestation. The rGSTH1 recombinant protein antigen seems to be good candidate to be included in a polyvalent vaccine in an Integrated Parasite Control Program.

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades de la garrapata *Rhipicephalus microplus*

Las garrapatas *R. microplus* son parásitos hematófagos de ciclo directo (monoxeno). El género *R. microplus* es vulgarmente conocido como "garrapata común del ganado vacuno" o "garrapata común con ojos", es originaria de la India y se introduce en América con los ganados traídos por los conquistadores en el transcurso del siglo XVI al XVIII. Los vacunos y sus parásitos se expanden rápidamente por toda América, al encontrar un ambiente favorable para su desarrollo (Cardozo y col., 1994).

Mundialmente se distribuye desde el paralelo 32° Norte al 34° Latitud Sur, ubicándose el 75 % de los bovinos de América Latina en dichas regiones. En Uruguay la garrapata adquiere gran importancia en el ganado vacuno, ya que se presenta en un 70% de los predios ganaderos ubicados al norte del Río Negro y en el 45% de los del sur (Cardozo y col., 1994).

### Ciclo biológico

El ciclo de vida de *R. microplus* se divide en dos fases: una fase de vida libre y una fase de vida parasitaria.

La fase de vida libre tiene una duración de 20 días a varios meses, dependiendo de las condiciones climáticas. Esa fase tiene inicio cuando la hembra ovígera madura (teleógina) se desprende del huésped cayendo al suelo. Las teleóginas poseen geotropismo positivo y buscan lugares sombríos y protegidos en la vegetación para iniciar el período de pre-postura que dura de 2 a 3 días, dependiendo de la temperatura ambiente (Alvarado & González, 1979). Después de ese período de tiempo necesario para la formación de los huevos, las teleóginas realizan la postura, que puede llegar a 3.000 huevos por hembra y luego mueren. Aproximadamente 18 días después de terminar la postura, se inicia la eclosión de los huevos, cuando las condiciones son ideales para el desenvolvimiento del embrión, o sea, temperatura 28°C y humedad relativa superior a 70% (Nuñez, 1982). Después de un período de aproximadamente 7 días, las neolarvas se transforman en larvas infectantes y trepan al pasto ascendiendo al extremo de las hojas (Fig.2), donde localizan al huésped (Sonenshine, 1991). La fase de vida libre termina cuando la larva encuentra al hospedero.

La fase de vida parasitaria de *R. microplus* se desenvuelve sobre el bovino y tiene un período de duración medio de 21 días, pasando por los estadios de larva, ninfa y adulto. Una vez en el huésped, las larvas caminan rápidamente buscando los lugares más apropiados para fijarse: éstos son por lo general las zonas de piel laxa y con rica vascularización (Nuñez, 1982). Las larvas pasan a alimentarse de linfa y luego de 7 días aproximadamente, sufren la primera muda transformándose en ninfa. Una segunda muda ocurre a 8 días después dando origen a adulto con dimorfismo sexual. En la fase adulta ocurre la cópula y las hembras pasan a alimentarse de sangre hasta su ingurgitación total y cae al suelo. Los machos, a su vez, permanecen en el hospedero en procura de nuevas hembras. Las garrapatas adultas machos reciben la denominación de gonandros cuando llegan a su tamaño máximo. Las hembras adultas son



denominadas neóginas, luego de la muda; partenóginas, cuando se encuentran parcialmente ingurgitadas y teleóginas, cuando están ingurgitadas y prontas para desprenderse del hospedero (Fig. 1).



Figura 1. Hembras adultas (teleóginas) de garrapata *R. microplus* en postura.  
Fuente: Rodríguez-Valle (2011).



Figura 2. Larvas trepadas en pasturas a la espera del hospedador.  
Fuente: Junquera 2011

## Problemas productivos y económicos de la garrapata bovina

Un estudio económico sobre garrapata y las enfermedades infecciosas que transmite realizado por FAO (2003) tomando en cuenta los gastos de la campaña sanitaria, las pérdidas por cueros dañados, los costos y pérdidas a nivel del productor (tratamientos, pérdida de peso, muertes), representaban por año más de 7 billones de dolares. En un informe realizado por DILAVE “Miguel C. Rubino” conjuntamente con IAEA-FAO, se destacó lo siguiente. En el ejercicio 1997 la estimación de gastos en Uruguay fue de 32,7 millones de dólares distribuidos en:

- 4,5% por acciones del Estado.
- 6,3% se dejó de percibir por concepto de cueros dañados por garrapatas.
- 44,6% por gastos del productor en tratamientos garrapaticidas.
- 31,1% en disminución de producción de kilos de carne por hemoparásitos.
- 12,8% debido a tratamientos y muertes por hemoparásitos.

Estos costos y pérdidas en Uruguay actualizados al año 2004 se podrían estimar en el entorno de los US\$ 45.000.000 (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. – Legislación Sanitaria Animal).

Las pérdidas se pueden dividir en directas e indirectas, dentro de las pérdidas directas podemos mencionar: El daño en cueros causado por acción mecánica que producen apreciables pérdidas en el valor de los mismos, acceso de bacterias, micosis dermales y larvas de moscas (miasis) que penetran por las perforaciones producidas en el cuero, pérdida de sangre debido al hábito alimentario durante su fase parasitaria, lo cual puede producir anemia en infestaciones importantes, ya que las garrapatas ingieren entre 2-3 ml de sangre durante esa etapa del estadio evolutivo, disminución de la producción de carne o leche (MGAP-Legislación Sanitaria Animal, 2004).

Las pérdidas indirectas más importantes se deben al efecto inoculante de microorganismos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Solari, 2006). *Babesia* y *Anaplasma* se ubican en el interior del glóbulo rojo y al destruirlo originan la anemia característica y muerte (Radostits y col., 2002).

Otras pérdidas indirectas son las restricciones comerciales por la contaminación de la carne, leche y medio ambiente debido a la utilización de productos químicos para el combate de dicho ectoparásito (Cuore y col., 2006).

## **Legislación**

La lucha contra el *R. microplus*, se comenzó a legislar en el año 1910 con la Ley 3.606, en abril de 2008, se aprobó una nueva Ley N°18.268 en la cual se determina declarar Zonas Libres (a los departamentos de Canelones, San José, Florida, Flores, Colonia, Soriano y Durazno excepto la 7° Seccional Policial) y al resto del país se lo considera en saneamiento (lucha activa). Se reglamentó la asignación activa de los Médicos Veterinarios en lo que respecta al despacho de tropas, certificación de animales a playas de faena y atención de focos, además de la participación activa de productores (Grupo Técnico de Garrapata (MGAP/DIGESEGA, 2008). (Ver anexo1).

## **Métodos de control y desarrollo de resistencia a plaguicidas**

Existen diversos tipos de tratamientos preventivos y curativos contra esta parasitosis, a destacar:

**Control químico:** La estrategia más utilizada para controlar las garrapatas consiste en cortar el ciclo de ésta, a través de la aplicación de tratamientos con garrapaticidas, siendo las familias de productos químicos más utilizadas: Organofosforados + piretroides sintéticos, Piretroides sintéticos, Fipronil, Lactonas Macroclínicas, Amidinas y Fluazurón. Estos productos han sido utilizados con éxito en su control; sin embargo, el uso excesivo ha ocasionado la generación de cepas de *R. microplus* resistentes a la acción de la mayoría de estos productos químicos (Cuore, 2006). Por definición resistencia es el aumento significativo de individuos, de la misma especie dentro de una población, capaces de tolerar dosis de droga/s que han resultado letales para la mayoría de los individuos de su especie (FAO, 2003).

Lo que debemos manejar es que un garrapaticida desde el punto de vista de la resistencia es un producto no renovable, una vez que se genera resistencia su reversión es imposible (Kemp, 1998; Frago, 2005) y la droga se deja de usar. Mucho tiempo y costo insume la investigación y desarrollo de un nuevo garrapaticida (hasta US\$ 300 millones en 10 años), como para que en pocos años su uso quede limitado o fuera del mercado (FAO, 2003).

Si tenemos en cuenta los núcleos químicos que se usan en Uruguay, se ha diagnosticado resistencia a, Organofosforados, Piretroides sintéticos y sus mezclas (Cardozo, 2007), al Fipronil (Cuore y col. 2007; Castro Janer y col.,

2010) y en 2008/2009, a las Amidinas (Cuore, 2012), e Ivermectina (Castro Janer y col., 2012).

## **Métodos alternativos de control**

**Control no químico:** Las actuales estrategias de control contra las garrapatas de los bovinos se basan en el uso de productos químicos, sin embargo, la resistencia del parásito se está convirtiendo en un problema global (George y col., 2004). Pero una de las principales preocupaciones en el uso de estos productos es la contaminación ambiental y la presencia de residuos en los alimentos de origen animal. Para superar estos problemas, están en curso algunas alternativas no químicas para el control de parásitos.

1- Resistencia del hospedero: Las razas *Bos indicus*, son más resistentes a infestaciones graves de garrapatas que las razas *Bos taurus* (Cardozo y col., 1984).

2- Control biológico: Se conoce la existencia de hormigas, ácaros y hongos con capacidad depredadora sobre las diferentes etapas del ciclo de la garrapata. En los últimos años se ha demostrado que el control biológico podría ser una alternativa y es muy discutido como parte del control integrado de parásitos (FAO, 2003).

3- Manejo: Esta actividad, se basa fundamentalmente en modificar el hábitat natural de la garrapata para afectar el desarrollo y viabilidad en su fase no parasítica. El descanso de praderas para el control de las garrapatas es un método que funciona y está basado en el período de vida que tiene el estado no parasítico (FAO, 2003).

### **4- Vacunas para el control de la garrapata *R. microplus* del ganado bovino:**

El desarrollo de vacunas es una herramienta importante por abrir nuevas perspectivas en el control parasitario y para ser incluida en el Control Integrado de la garrapata del ganado vacuno junto con los acaricidas. Por otra parte, las estrategias eficaces de inmunización del ganado podría reducir significativamente la incidencia de hemoparásitos transmitidos por éstos (de la Fuente y col., 2006).

El control de las garrapatas por vacunación tiene las ventajas de ser rentable, causar menor contaminación ambiental y previene la selección de garrapatas resistentes a los medicamentos que resultan de la aplicación repetida de acaricidas. Sin embargo, la identificación de antígenos protectores de garrapatas sigue siendo la etapa limitante para el desarrollo de una vacuna eficaz (de la Fuente y col., 2006).

Dos enfoques principales han sido considerados para el desarrollo de las vacunas recombinantes contra parásitos: el uso de antígenos "expuestos" y el uso de antígenos "ocultos". Antígenos expuestos son los que se exponen de

forma natural al sistema inmune del huésped durante la infestación por la garrapata, y el sistema inmune es activado por la propia infestación parasitaria. Antígenos “ocultos” son aquellos antígenos de los parásitos que no están expuestos al sistema inmune del huésped y por lo tanto son antígenos a los que el huésped no podrá adaptarse y tampoco podrá crear tolerancia y verlos como propio, y por lo tanto son capaces desarrollar en el huésped un mecanismo inmunológico de protección contra la infestación más que de tolerancia. Es por esa razón que los antígenos “ocultos”, como el antígeno intestinal Bm86 de *R. microplus*, es el único antígeno hasta el momento utilizado en una vacuna comercial con niveles excelentes de eficacia de protección en algunos lugares y cepas de *R. microplus* (Nutall y col., 2006; de la Fuente y col., 2006).

A principios de 1990, se desarrollaron vacunas que indujeron protección inmunológica en huéspedes vertebrados contra infestaciones de garrapatas. Estas vacunas contenían una glicoproteína expresada por el gen Bm86, que se obtuvo de las células epiteliales del intestino de las garrapatas. El antígeno Bm86 fue clonado tanto en *E. coli* o *Pichia pastoris* (Rodríguez y col., 1995).

A partir de esta fecha se registraron dos vacunas con el recombinante Bm86. La vacuna cubana (Gavac®) y la australiana (TickGARD®). Estas vacunas reducen el número de teleóginas ingurgitadas, su peso y su capacidad reproductiva. Así, el efecto mayor de la vacuna es la reducción de las infestaciones por larvas en generaciones posteriores.

Estudios controlados han demostrado que entre una cepa y otra de *R. microplus*, hay variaciones en la susceptibilidad a la vacunación con Bm86 (Almazán y col., 2010). Las diferencias en la susceptibilidad a vacunas con Bm86 se deben en gran parte al polimorfismo de los genes utilizados para el desarrollo de las mismas, las características fisiológicas de las garrapatas, las diferentes cepas de garrapatas entre otros factores no bien conocidos. Y ésta ha sido la causa de muchos 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. A nivel mundial la eficacia en la generación de inmunidad dada por éstas vacunas recombinantes, varían entre 31 y 91% en el campo (García-García y col., 2000).

En Colombia se desarrolló una vacuna comercial, TickVac®, la cual no es una vacuna recombinante sino un macerado de larvas de garrapatas, su forma de acción es similar a las recombinantes, los anticuerpos se unen a las proteínas del intestino de las garrapatas y producen lesiones tanto intestinales como del aparato reproductor de éstas. En un ensayo experimental realizado en Colombia con 12 terneros raza Holstein se obtuvieron como resultados finales, que las garrapatas desprendidas de los terneros vacunados demostraron una reducción en los índices reproductivos, con un 44,31% de reducción en el peso de las teléoginas, una inhibición de la oviposición de 48,88%, una reducción de la eclosión de huevos del 69,02% y un porcentaje de eficiencia global del 74% (Gutierrez , 2006).

Otras proteínas recombinantes están en estudio como posibles antígenos para formar parte de una vacuna contra este parásito. Entre éstas están, el Bm95 que debido a la no susceptibilidad de algunas cepas de garrapatas en

Argentina a la vacuna cubana Gavac®, es que se produce la proteína recombinante obtenida del mismo gen Bm86 pero de esas garrapatas no susceptibles a la misma, obteniéndose así, una nueva proteína recombinante a la cual se la denominó Bm95. Para hacer esta evaluación se tomaron un total de 9 animales de un año de edad, a éstos se los dividió aleatoriamente en tres grupos de igual tamaño, a un grupo lo inmunizaron con Bm95 (grupo 1), al otro con Bm86 (grupo 2) y al otro solo con el adyuvante (grupo 3). Posterior a las dos semanas de la última inoculación se infectaron a los animales con 2000 larvas de garrapatas susceptibles y no susceptibles al Bm86 ambas al mismo tiempo, una cepa de cada lado del dorso del animal, los resultados muestran que el porcentaje de eficacia en los animales vacunados con Bm86 fue del 0% para la cepa no susceptible y del 84% para la cepa susceptible, mientras que en el grupo inmunizado con el Bm95 el porcentaje de eficacia fue de 58% para cepas no susceptibles y del 89% para susceptibles. Esto demuestra que la vacuna en base a Bm95 podía proteger con un 58% de eficacia de la infestación con garrapatas no susceptibles a la vacuna con Bm86 Gavac®. Pero al intentar incluir esta proteína en una vacuna comercial los niveles de eficacia no fueron satisfactorios, (Garcia-Garcia y col., 2000).

Lightowlers y col. (1994), han propuesto a la Ferritina como posible antígeno vacinal, pues al inmunizar al ganado vacuno obtuvieron una eficacia del 64% y 72% contra *R. microplus* y *R. annulatus*, respectivamente. Almazan y col., (2005), publicaron datos que demuestran que la inmunización de bovinos con una proteína recombinante denominada Subolesin obtenida del *R. microplus*, y desafiando a los animales con *R. annulatus* y *R. microplus*, la eficacia de la vacuna fue del 60% para *R. annulatus* y el 51% para *R. microplus*, en comparación con el grupo control. Seixas y col., (2003, 2008) en un estudio, utilizando una endopeptidasa de cisteína llamada VTDCE para inmunizar animales obtuvieron una protección global de 21% con respecto al grupo control. Al inmunizar un grupo de animales *Hereford* con rBYC (*Boophilus* *Yolk pro-catepsina*) se obtuvo una eficacia global contra *R. microplus* de 25,24% en comparación al grupo control (Leal y col., 2006).

Otra estrategia para mejorar la eficacia de la vacuna contra las garrapatas sería combinar dos o más antígenos. La prueba inicial de apoyo a este enfoque se obtuvo de experimentos de vacunación, en el que las mezclas de antígenos fueron más eficaces que experimentos con un solo componente, incluyendo Bm86 (Carreon y col., 2012).

### **rGST como posible antígeno vacinal para la lucha contra *R. microplus***

Como se ha dicho anteriormente sería interesante encontrar una proteína que se encuentre en la mayoría o en todos los organismos parasitarios, para producir una vacuna universal, muchos investigadores han sugerido que esta proteína podría ser la Glutación S-transferasa (GST). Que son una familia de enzimas involucradas en la desintoxicación del metabolismo de xenobióticos (acaricidas) y compuestos endógenos (excretados por el organismo). Éstas son proteínas diméricas compuestas por subunidades idénticas o relacionadas estructuralmente. Cada subunidad de 25 kDa está constituida por dos dominios

y además un sitio activo que consiste en un G-site (sitio de unión del glutatión) y un H-site (Sitio de unión al sustrato hidrofóbico) (Agianian y col., 2003).

Una de las principales funciones de esta enzima es catalizar una reacción de conjugación del glutatión reducido (GSH), con una gran variedad de compuestos que tienen un sitio electrofílico, como los xenobióticos (plaguicidas). Además, las enzimas GST también tienen un papel importante en la metabolización y el transporte de diversos metabolitos endógenos. En los insectos, esta familia de enzimas ha sido implicada como uno de los principales mecanismos de neutralización de los efectos tóxicos de insecticidas (Reddy y col., 2011).

De acuerdo a su estructura, propiedades bioquímicas y a su localización celular, la familia supergénica de GST se ha clasificado en tres categorías: (a) las formas solubles, Citosólicas o Canónica (que se encuentran presentes en el citoplasma), (b) Mitocondrial (tipo primitivo de GST, se encuentra en los peroxisomas) y (c) Asociados (GST Microsomal) (Reddy y col., 2011).

GST Citosólica (cGSTs), es una subfamilia, que por doquier se encuentra en los organismos aeróbicos, siendo la más abundante. Por ejemplo, en el hombre y los mamíferos, han sido identificados 15-20 diferentes genes cGSTs, 40-60 en las plantas, 10-15 en las bacterias y más de 10 en los insectos (Parizi y col., 2011).

Además se han clasificado, un total de 13 diferentes clases de GST sobre la base de la homología de secuencia, y algunas de ellas son específicas de cada especie, por ejemplo, *Phi-*, *Tau*, *Lambda* son clases específicas de plantas, mientras que *Theta-*, *Zeta-*, *Omega*, tienen amplia distribución taxonómica (Parizi y col., 2011).

Todas estas clases poseen la capacidad de conjugación, del glutatión con los centros electrofílicos de origen endógena y/o exógena, lo que indica que participan en una amplia variedad de metabolismos celulares (Parizi y col., 2011).

Las categorías, Citosólicas y Mitocondriales están estructuralmente relacionadas, y son diferentes de GST Microsomal. Hasta la fecha, las GST Mitocondriales no son identificadas en los insectos (Parizi y col., 2011).

El análisis filogenético, de *Ixodes* en relación a GST ha revelado la presencia de cinco familias diferentes de enzimas que pertenecen a la categoría GST-Canónica; en total, 35 genes pertenecen a estas cinco clases diferentes de GST, a saber, *Delta* (7 genes), *Epsilon* (5), *Mu* (14), *Omega* (3), y *Zeta* (3 genes), y dos clases corresponden a la forma Mitocondrial que son dos genes GST, clase *Kappa*, y un solo gen GST correspondiente a la forma Microsomal fue encontrado (Sharp y col., 1991).

Algunas de las clases de GST tienen distintas funciones en distintos organismos, como por ejemplo, en los mamíferos, GSTs (*Sigma*) está fuertemente implicada en la síntesis de prostaglandinas, *Theta*-GST se encontró con actividad de glutatión peroxidasa y se considera relacionada a enzimas del estrés en las plantas (Parizi y col., 2011).

Se ha nombrado que las clases *Delta* y *Epsilon* están involucradas en la resistencia a insecticidas, es así establecido al menos en los mosquitos. (Parizi y col., 2011). Recientemente, Pettersson y col. (2005) reportaron la presencia de la clase Delta-GST en *Sarcoptes scabiei*, en la garrapata del perro americano y *Dermacentor variabilis* (Parizi y col., 2011).

La actividad GST en la desintoxicación de acaricidas y/o insecticidas en los artrópodos, así como el efecto de varios acaricidas sobre la actividad de la enzima recombinante GST de *R. microplus* (da Silva Vaz y col., 2004) apoyan el uso de esta enzima como candidato de una vacuna contra parásitos (Parizi y col., 2011).

La proteína recombinante glutatión S-transferasa de *Haemaphysalis longicornis* (rGST-HI), se expresó en *Escherichia coli* y fue purificada por cromatografía de afinidad y luego utilizada para la inmunización de algunos animales. Luego de la vacunación, con la técnica de Western blot analizaron la presencia de anticuerpos específicos contra este inóculo, donde observaron una respuesta positiva. Algunos estudios demuestran que animales vacunados, con un recombinante de esta proteína (rGSTHI), experimentan una reducción del 53% y el 52% en número y peso de garrapatas ingurgitadas, respectivamente, mientras que la puesta de huevos fértiles y capacidad de postura de huevos fue 0,6% y 8% inferior que el grupo control. La relación de eficacia general en contra de *R. microplus* fue del 57%, en comparación para el grupo control (Parizi y col., 2011).

Según Carreon (2012), la búsqueda de nuevos antígenos recombinantes para ser incluidos en vacunas comerciales con el fin de aumentar la eficacia, la producción de nuevas recombinantes así como la determinación de la eficacia en ensayos experimentales con bovinos en establo es un procedimiento que se debería seguir haciendo.

En el presente trabajo, se estudiará el potencial de la GST recombinante de *Haemaphysalis longicornis* como candidato para el desarrollo de una vacuna contra la infestación por garrapatas. Fue utilizada una rGST proveniente de la garrapata *H. longicornis* ya que datos de Parizi y col., (2011) demuestran que rGST proveniente del *H. longicornis* es más inmunogénica que la proveniente del *R. microplus*, y datos del mismo experimento demuestran que la inmunización de bovinos con proteínas de una especie de garrapatas pueden inducir inmunidad cruzada capaz de proteger contra otras especies de garrapatas.

No siempre una alta concentración de antígeno o un alto número de inmunizaciones mejora la respuesta inmune. Entonces por razones económicas es más conveniente usar una menor cantidad de inóculo. En un ensayo realizado por Jackson y col., 1989 no se encontraron diferencias en los porcentajes de reducción en la postura y porcentaje de eclosión, al utilizar dosis bajas, dosis altas de antígenos y menor número de inoculaciones. La hipótesis de éste trabajo es que los parámetros reproductivos de las teleóginas son influidos negativamente por la utilización de una vacuna con proteína recombinante.

**Objetivo general:**

**El objetivo general de este trabajo fue determinar el efecto** de una vacuna elaborada con la proteína recombinante rGSTHI, sobre los parámetros reproductivos de *R. microplus* en bovinos de Uruguay infestados artificialmente.

**Objetivos particulares:**

- determinar el efecto de la vacuna recombinante rGSTHI en el número y peso de las teleóginas.
- determinar el efecto en el peso y eclosión de los huevos.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento fue conducido en las instalaciones de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE, Miguel C. Rubino) ubicadas en ruta 8 km17,5 Montevideo. Entre el 5/11/2011 y el 15/04/2012.

### **Animales:**

Se seleccionaron ocho bovinos de la raza Hereford (*Bos taurus taurus*) de entre 150 y 200Kg de peso vivo, provenientes de un bioterio, mantenido por la DILAVE (MGAP), en islas del Río Negro, Uruguay. Previo a la inclusión de los animales al ensayo se realizó un exhaustivo análisis clínico con el fin de determinar algún grado de alteración física y así decidir si permanecía o no en el ensayo. Estos animales estaban sin infestación de garrapatas, enfermedades aparentes, ni enfermedades congénitas y no habían sido tratados con ningún químico 30 días antes de la infestación experimental con *R. microplus*.

Fueron identificados con caravanas de trazabilidad y se mantuvieron a campo natural durante la etapa de inmunización (hasta día + 60 de comenzado el ensayo) en el centro de Investigación de la DILAVE en Montevideo. Luego ingresaron a boxes individuales con rejilla en el piso, estos boxes fueron diseñados para la recolección de teleóginas, permanecieron aquí hasta que finalizó la caída de las teleóginas (día +110). Entre el día +60 y +70 fue un período de adaptación al encierro.

Los mismos fueron alimentados durante la primera etapa en un sistema pastoril, y durante la segunda etapa ya en los Boxes individuales, tuvieron administración de agua *ad libitum* y alimentación al 3% de peso vivo con ración peleteada.

### **Inmunización de los bovinos e infestación:**

Los bovinos fueron designados a cada grupo al azar, en el cual los primeros cuatro animales que ingresaron al tubo fueron asignados al grupo vacunado. Éstos bovinos presentaban igual tamaño y estado corporal. Una vez separados los grupos, se les asignó el tratamiento correspondiente a cada grupo, Grupo control (bovinos 2, 7, 8 y 10), y el Grupo tratado (bovinos 3, 4, 5 y 6). El grupo control recibió 0.5 ml de suero fisiológico + 0.5 ml de adyuvante (Montanide 888 y Marcol 52) por dosis, vía intramuscular y los animales del grupo tratado recibieron 200 ug de rGST de *Haemaphysalis longicornis*(\*), en 0.5 ml de suero fisiológico + 0.5 ml de adyuvante (Montanide 888 y Marcol 52), 3 veces con un intervalo de 30 días entre cada vacunación, la primer dosis se aplicó el día cero, la segunda el día 30 y la tercera el día 60 a ambos grupos. Estos fueron inmunizados intramuscularmente y desafiados con 1000 larvas de *R. microplus* cada vez, con un total de 9 infestaciones los días 70; 72; 74; 77; 79; 81; 84; 86 y 88 desde el inicio del ensayo.

(\*)Producida y cedida por el grupo del Dr. Itabajara da Silva Vaz en el Centro de Biotecnología de la Universidad Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Se usaron larvas de la cepa "Mozo" cedida por el Laboratorio de Parasitología de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) "Miguel C. Rubino". Esta cepa susceptible a los acaricidas es conocida internacionalmente y mantenida en el laboratorio desde 1973, a través de pases sucesivos en bovinos cada 70 días.

### **Recolección y análisis de garrapatas:**

Luego de 20 días de la primera infestación (día +90 de comenzado el ensayo) se comenzó a recolectar las teleóginas ingurgitadas que se desprendían de cada animal espontáneamente y al caer al piso del box eran arrastradas por agua durante un lavado del piso del box que se realizaba todas las mañanas, junto al agua y desechos del animal llegaban hasta una gradilla de decantación, donde eran filtradas y recolectadas una vez por día.

Una vez colectadas las teleóginas, eran lavadas con abundante agua durante unos 40-60 segundos debajo de una canilla para eliminar detritos, luego se las secaba con papel absorbente, se las contaba, pesaba y clasificaba en, cadáveres (muertas), chicas (< a 4mm) y normales (garrapatas ingurgitadas sin alteraciones morfológicas). Luego se tomaba al azar una alícuota (n=20) del total, cada alícuota era nuevamente pesada y llevada a oviponer, los sobrantes de garrapatas eran desechados mediante congelación, envueltas en papel absorbente que a su vez era pegado con cinta leuco, e iban a temperatura de -5° centígrados durante una semana, luego de este tiempo se las desechaba en un paquete especial para residuos biológicos.

Una vez seleccionadas las muestras de teleóginas se las incubaba en una caja de Petri previamente identificada, con fecha, peso de la caja, peso de la alícuota de garrapatas e identificación del animal. La incubación fue realizada en condiciones óptimas de temperatura, humedad y fotoperíodo, en un cuarto estufa a 28 grados centígrados y más de 80% de humedad, el cuarto estufa está regulado para darle las condiciones de fotoperíodo requeridos por la garrapata para oviponer y eclosionar, dicho cuarto estaba regulado para que permanezca 12 horas con luz y 12 horas con oscuridad.

A los 14 días (día +104 de iniciado el experimento) luego de comenzada la oviposición se registró el peso de la masa de huevos de cada alícuota (retirándose las Xenóginas de cada caja de Petri); luego se colocó cada masa de huevos en el cuarto estufa a eclosionar para calcular la fertilidad (relación huevos no eclosionados/cascarones).

A partir del día +130 luego de haber comenzado el ensayo se empezó a registrar la eclosión de los huevos, mediante un método visual, midiendo porcentaje de larvas eclosionadas. El día +150 finalizó la experiencia.

## **Análisis de resultados**

Debido al bajo número de animales usados en el experimento no fue posible realizar ningún análisis estadístico en relación a la eficacia. Pero se realizó un análisis descriptivo a través del cálculo de los siguientes parámetros:

Se usó el Test de Student para ver diferencias entre ambos grupos de las siguientes variables: número de cadáveres, de chicas, normales, número y peso del total de garrapatas desprendidas, número y peso de teleóginas incubadas y peso de huevos en conocimiento de las limitaciones del presente diseño.

### **Coeficiente de reducción del número de teleóginas desprendidas (CRD)**

CRD=  $\frac{\text{Número total de teleóginas desprendidas en el grupo vacunado}}{\text{Número total de teleóginas desprendidas en el grupo control}}$

Número total de teleóginas desprendidas en el grupo control

### **Coeficiente de reducción de la repleción (CRT)**

CRT =  $\frac{\text{Peso promedio de las teleóginas incubadas en el grupo vacunado}}{\text{Peso promedio de las teleóginas incubadas en el grupo control}}$

Peso promedio de las teleóginas incubadas en el grupo control

### **Coeficiente de reducción de la oviposición (CRO)**

CRO=  $\frac{\text{Peso promedio del aove de las teleóginas en el grupo vacunado}}{\text{Peso promedio del aove de las teleóginas en el grupo control}}$

Peso promedio del aove de las teleóginas en el grupo control

### **Coeficiente de reducción de la eclosión (CRE)**

CRE =  $\frac{\text{Porcentaje de eclosión del aove en el grupo vacunado}}{\text{Porcentaje de eclosión del aove en el grupo control}}$

Porcentaje de eclosión del aove en el grupo control

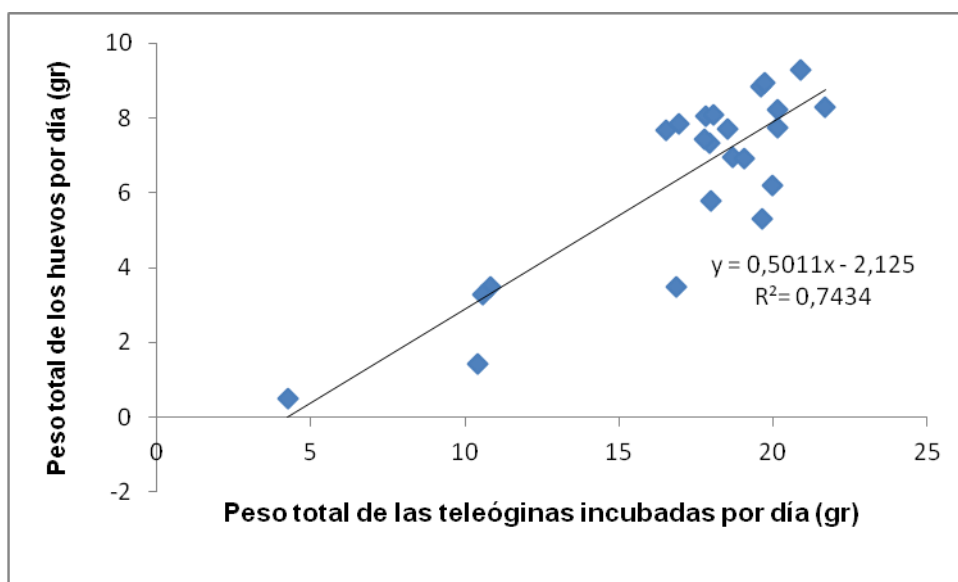
Para el cálculo de los coeficientes fueron utilizados los promedios generales, o sea primero se hizo un promedio para cada parámetro de las garrapatas desprendidas de cada animal tomando en cuenta todos los días de mediciones, luego utilizando dichos promedios se calculó un promedio general para cada grupo, es decir por un lado para los animales tratados y por el otro para los del grupo control, considerando siempre los valores de las distintas alícuotas que fueron tomadas al azar antes de colocarlas a oviponer. También se calculó el Desvío standard (DS) para cada parámetro.

Se determinó el coeficiente de correlación entre el peso de las teleóginas incubadas (en la alícuota) y el peso de los huevos provenientes de éstas, para las garrapatas del grupo control y para las garrapatas provenientes de los animales vacunados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtuvimos una correlación entre peso de teleóginas incubadas ( $n=20$ , en 92 observaciones) y peso de la masa de huevos obtenidos después de 14 días de comenzada la oviposición, que para el grupo vacunado fue de 0,74 (Gráfica N°1) y para el grupo control un  $R^2=0,73$ .

Si comparamos nuestros datos con datos presentados por Nuñez y col., (1982) y Rifran y Silveira (2010) la correlación entre éstos parámetros debería ser superior al 0,90 para el grupo control, sin embargo la correlación para el grupo control también fue inferior a éste, según Nuñez y col., (1982), cuanto mayor es el peso de las garrapatas mayor es el peso de la masa de huevos ovipositados. La baja correlación que obtuvimos para las teleóginas del grupo control puede estar influenciada por las características de las alícuotas, ya que éstas eran formadas con teleóginas seleccionadas al azar, además de haber un pequeño número de garrapatas ingurgitadas por alícuota y que no siempre representaban el mismo porcentaje del total de teleoginas desprendidas diariamente.



Gráfica N°1. Correlación entre el peso total diario de las teleóginas incubadas y el peso los huevos para el grupo de animales tratados.

Obtuvimos que hay diferencia “significativa” ( $P < 0,05$ ) al comparar el número de cadáveres y de garrapatas chicas entre el grupo control y el grupo tratado, a su vez el total de garrapatas dañadas en el grupo control representó 1,3% del total de teleóginas desprendidas (Cuadro N° 1), mientras que en el grupo tratado representó el 3,7%. Jackson y Opdebeeck (1989) utilizando un macerado de intestino para inmunizar 8 terneros obtuvieron un 4% de teleóginas dañadas en el grupo control y entre 39 y 46% en grupo tratado. Por lo tanto nuestra proteína recombinante se comportó peor que el macerado.

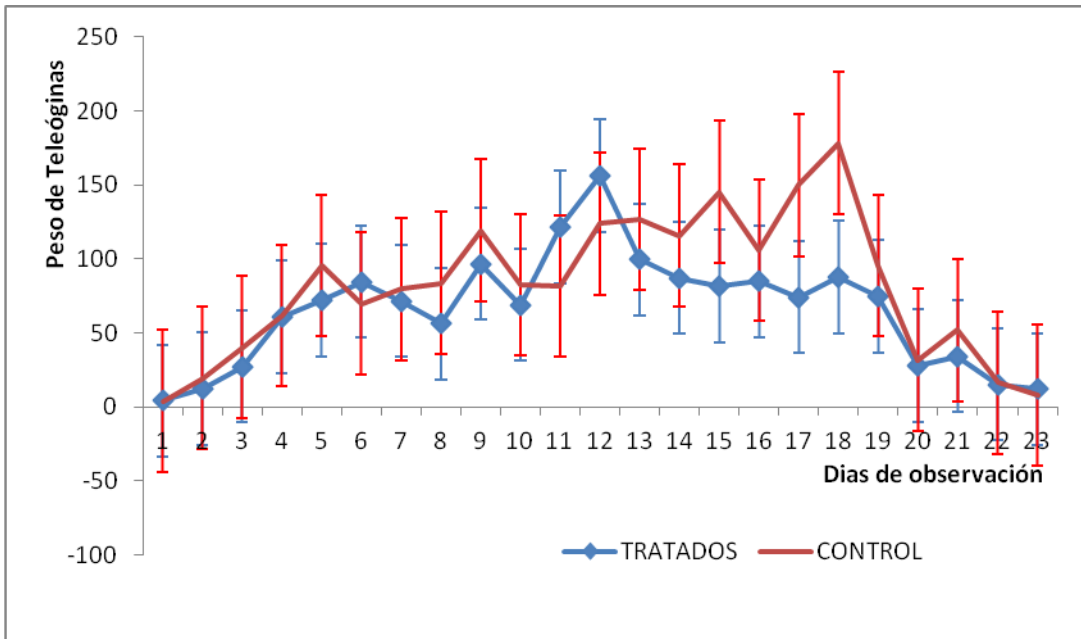
Si bien no hubo diferencia significativa en la reducción del número total de garrapatas, murieron más garrapatas en el grupo vacunado y también hubieron mas garrapatas chicas con relación al grupo control (Cuadro N°1).

El peso y número total de las teleóginas desprendidas del grupo tratado fue de 13% y 6% respectivamente inferiores que el grupo control, pero ésta diferencia no fue significativa  $P=0,104$  y  $P=0,349$  respectivamente, (Gráfica N° 2 y 3), resultado similar al obtenido por Parizi y col., (2011) que en un experimento obtuvieron que el peso y número total de garrapatas desprendidas de los bovinos inmunizados tampoco fue significativamente diferente al compararlo con el grupo control. Éste hecho podría ser una consecuencia del pequeño número de terneros en cada grupo y de la variabilidad de la respuesta inmunológica individual de los bovinos (da Silva Vaz y col., 2004). En nuestro ensayo utilizamos la misma proteína recombinante que Parizi y col., (2011), pero distinta concentración de antígeno y número de inoculaciones, ellos utilizaron una concentración total de antígeno de 1600ug distribuidos en 6 dosis (4 dosis de 200ug y 2 de 400ug, todas aplicadas por la vía intramuscular) en nuestro ensayo disminuimos la concentración de antígenos a 600ug ya que en un experimento de Jackson y Opdebeeck (1989) fue demostrado que al disminuir la concentración de un antígeno no disminuye el nivel de anticuerpos desarrollados por los bovinos. El número de dosis fue disminuido porque al tratarse de una vacuna en desarrollo en la cual aún no hay nada especificado sobre qué número de inoculaciones utilizar se resolvió aplicar tres dosis porque este es el número utilizado para calcular el efecto de las vacunas comerciales en Cuba, Australia y Colombia (Rodríguez y col., 1995). Además comparando nuestro ensayo con el realizado por Parizi y col., (2011) el número total de larvas utilizadas para desafiar a los animales de ambos grupos (control y tratado) luego de las inmunizaciones también fue menor (9000 larvas utilizadas en nuestro ensayo vs 20000 grupo Parizi), realizamos ésta disminución por razones económicas, sin tener en cuenta al momento de realizar el ensayo el efecto estimulante del sistema inmune debido a una mayor carga parasitaria y mayor cantidad de antígenos que potencialmente se ponen en contacto con el sistema inmune de los animales, como ha sido demostrado por Johnston y col., (1986). (Cuadro N° 2).

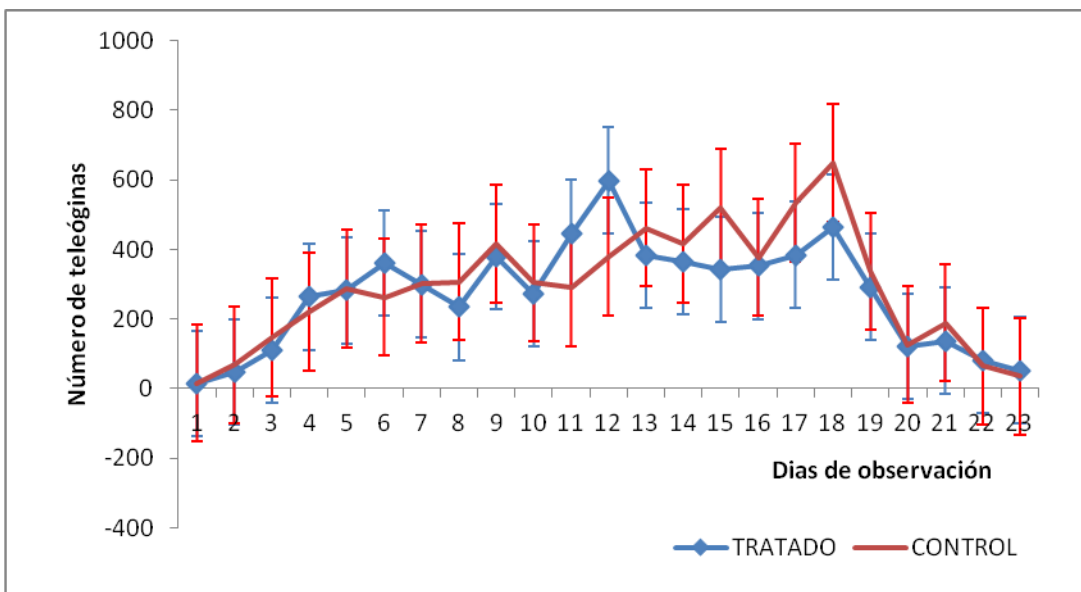
Cuadro N°1: Efecto del tratamiento sobre el número y peso de las teleóginas desprendidas.

Grupo	Teleóginas			Peso total (grs)
	Cadáver	Chicas	Normales	
Control	48	36	6624	1886
Vacunado	91	143	6050	1512
$P^*$	0,036	0,0003	0,30	0,104

\* Valor Test student.



Gráfica N°2 Dinámica del peso (media  $\pm$  DS) del total de las teleóginas de *R. microplus* desprendidas de los animales inmunizados con rGSTH1 y de los animales del grupo control.



Gráfica N°3 Dinámica del número (media  $\pm$  DS) del total de las teleóginas de *R. microplus* desprendidas de los animales inmunizados con rGSTH1 y de los animales del grupo control.

Cuadro N° 2 Comparación con los datos del ensayo realizado por Parizi y col., (2011)

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>PARIZI y col. 2011</b>	<b>rGSTHI en ROU (2012)</b>
Recombinante	RGSTHI	rGSTHI
Concentración	1600 ug	600 ug
Adyuvante	Montanide 888 y Marcol 52	Montanide 888 y Marcol 52
N° dosis	6	3
Intervalo de aplicación	15 días	30 días
Vía de administración	Intramuscular	Intramuscular
Cepa de garrapata	Porto Alegre	Mozo
N° de larvas	20.000	9.000
N° de animales	7	8
N° de grupos	2	2
Animales/ grupo	3 control y 4 tratados	4

Hubieron diferencias significativas tanto en el peso de los huevos y peso de las teleóginas incubadas del grupo tratado pues fue un 18% inferior al del grupo control, siendo ésta una diferencia significativa ( $P=0,041$ ), además en el grupo tratado fueron incubadas un 2,4% menos de garrapatas que en el grupo control, (Cuadro N°3).

La proteína recombinante rGST actúa principalmente sobre los parámetros reproductivos: porcentaje de eclosión y peso de los huevos. El porcentaje de eclosión promedio del grupo tratado fue un 12% inferior al grupo control, éste junto con la disminución en el peso de los huevos, indican un menor nivel de infestación de las pasturas, por consiguiente el efecto mayor de la vacuna es la reducción de las infestaciones por larvas en generaciones posteriores. Reduce el nivel de contaminación de huevos y larvas en la pastura disminuyendo la frecuencia de tratamientos con ixodicidas, por lo tanto podría ser considerada como un complemento para formar parte de un plan de control integrado de parásitos (MGAP, 2006).

Cuadro N°3: Efecto del tratamiento sobre los parámetros reproductivos de las 20 teleóginas incubadas.

Grupo	Teleóginas Incubadas		Huevo
	Número	Peso (grs)	Peso (grs)
Control	1688	462*	180,7*
Vacunado	1649	394*	148,7*
<i>P</i> *	0,365	0,016	0,041

Número de observaciones= 23

\*Diferencia significativa para ( $P < 0,05$ ).

En nuestro experimento el porcentaje de recuperación de garrapatas fue del 18,6% para el grupo control y de 17,5% para las garrapatas de los terneros del grupo tratado, cifras menores a la calculada por Cuore y col., (2007). Estos autores infestaron terneros dos veces por semana con 100mg (2.000 larvas) obteniendo un porcentaje de recuperación de 38%. Observando estos resultados vemos que nuestra proteína recombinante no produce volteo de los adultos, sino más bien que actúa sobre los parámetros reproductivos de éstos como son peso de los huevos y porcentaje de eclosión.

Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la recombinante GSTHI podría considerarse como antígeno potencial para convertirse en parte de una vacuna multiantigénica contra *R. microplus*. La respuesta inmune contra GST en nuestro ensayo afectó el peso de los huevos y el porcentaje de eclosión y su uso junto a otros antígenos como BYC (Leal y col., 2006), que afecta a la capacidad reproductiva, podría mejorar el efecto de la vacuna.

Cuadro N°4: Diferencias obtenidas en distintos parámetros medidos y sus respectivos desvíos estándar entre el grupo vacunado y el grupo control.

Grupo	Vacunado	Peso promedio de hembras incubadas		Peso promedio de huevos		% Promedio Eclosión
		Gramos	±DS	Gramos	±DS	%
Box	3	4,35	1,084	1,65	0,523	55,65
Box	4	4,5	1,332	1,52	0,824	70,87
Box	5	4,55	1,605	1,76	0,803	73,04
Box	6	3,74	1,174	1,54	0,71	76,52
<b>Promedio</b>		<b>4,29</b>	<b>1,299</b>	<b>1,62</b>	<b>0,715</b>	<b>69,02</b>
<b>Grupo</b>	<b>Control</b>					
Box	2	4,8	1,26	1,57	0,646	66,3
Box	7	5,41	1,205	2,22	0,835	84,78
Box	8	5,1	1,619	2,1	0,881	81,6
Box	10	5,0	1,119	2,1	0,752	82,4
<b>Promedio</b>		<b>5,1</b>	<b>1,301</b>	<b>2,0</b>	<b>0,779</b>	<b>78,8</b>



## **CONCLUSIONES**

La proteína rGSTHI disminuyó la oviposición y el porcentaje de eclosión de las teleóginas.

La proteína rGSTHI no logró disminuir el número ni el peso de las telóginas.

La proteína rGSTHI no podría ser considerada como una alternativa única para el control de la garrapata en Uruguay.

La vacuna podría ser contemplada para el control de la fase extraparasitaria de la garrapata.

Se debería continuar en ésta línea de investigación para determinar si éste antígeno puede ser incluido o no en una vacuna multiantigénica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Cruz, RR., Jongejan, F., de la Fuente, J., (2010). Identification and characterization of Rhipicephalus (Boophilus) microplus candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations Parasitol Res 106: 471-479.
2. Alonso, M., Rodríguez, R., Fragoso, H., Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Archivo Médico 2006, vol. XXXVIII, n° 2 p.105-113. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/amv/v38n2/art03.pdf> Fecha de consulta: 26/1/2012.
3. Alvarado, R.U. & Gonzalez, J.C. A postura e a viabilidade do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina, Ixodidae) en condiciones de laboratorio. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 21, 31-36, 1979.
4. Baltazar Garcia A. (2011). Ciclo biológico del *Boophilus microplus*. Disponible en: [www.uv.mx/fispa/Control-biologico.ppsx](http://www.uv.mx/fispa/Control-biologico.ppsx) Fecha de consulta: 1/07/2012.
5. Barriga, OO., (1994). A review on vaccination against protozoa and arthropods of veterinary importance. Veterinary Parasitology 55: 29-55.
6. Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Liao, M., Tanaka, T., Xuan, X., Fujisaki, K., (2010). Multiple vitellogenins from the Haemaphysalis longicornis tick are crucial for ovarian development. Journal of Insect Physiology 56: 1587-1598.
7. Canales, M., Almazán, C., Naranjo, C., Jongejan, F., de la Fuente, J., (2009). Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology*, 9:29 doi: 10.1186/1472-6750-9-29.
8. Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., López, A., Donatti, N. (1984). Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. Veterinaria (Montevideo) 20: 4-10.
9. Cardozo, N. (2007). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los acaricidas. Disponible en: <http://vademecum.com.uy/articulos-tecnicos/bovinos-articulos-tecnicos/resistencia-de-la-garrapata-b-microplus-a-los-acaricidas.html> Fecha de consulta: 12/5/2011.
10. Carreon, D., Perez de la Lastra, J., Almazan, C., Canales, M., Ruiz-Fons, F., Boadella, M., Moreno-Cid, J., Villar, M., Gortazar, C., Reglero, M., Villarreal, R., de la Fuente, J., (2012). Vaccination with BM86, subolesin and akirin protective antigens for the control of tick infestations in white tailed deer and red deer. Vaccine 30: 273- 279.
11. Castro Janer, E.; Rifran, L.; González, P.; Piaggio, J.; Gil, A.; Schumaker, T.T.S. (2010). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by *in vitro* bioassays. Veterinary Parasitology 169: 172-177
12. Castro Janer, E.; Rifran, L.; González, P.; Niell, C.; Piaggio, J.; Gil, A., (2012). Diagnóstico de resistencia de la garrapata *R. (B.) microplus* a fipronil e ivermectina en establecimientos agropecuarios de Uruguay. *In: Garrapata: Resistencia a fipronil e ivermectina en rodeos vacunos de*

- Uruguay y Brasil. Serie Técnica: INIA FPTA 35. Uruguay, Montevideo. p; 41-48
13. Centrá, B.; Benitez, D.; Caspe, G.; Sala, J.; Zimmer, P. (2012). Garrapata común del bovino. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/garrapata-comun-del-bovino-bfque-factores-afectan-la-lucha-en-corrientes-septiembre> Fecha de consulta: 3/11/2012.
  14. Chevillon, C., Ducornez, S., de Meeus, T., Basile Koffi B., García, H., Delathiere, JM., Barre, N., (2007). Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. *Veterinary Parasitology* 147: 276–288.
  15. Cortez Vecino, J. (2011). Garrapatas: estado actual y perspectivas. *Parasitología veterinaria. Congreso XX Latinoamericano de parasitología: Bogotá, Colombia*, pp.313-315.
  16. Cossio, R., Miranda, B., Holmanb, P., (2005). Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1378–1387
  17. Crampton, A., Vanniasinkam, T., (2007). Parasite vaccines: The new generation. *Infection, Genetics and Evolution* 7: 664–673.
  18. Cuore, U. (2006). Resistencia a los acaricidas, manejo y perspectivas. *Jornadas Uruguayas de Buiatría, N° 34, Paysandú, Uruguay*, p. 30-35
  19. Cuore, U., Cardozo, H., Trelles, A., Nari, A., Solari, M. (2008). Características de los garrapaticidas utilizados en Uruguay. *Eficacia y poder residual. Veterinaria (Montevideo)* 43: 13-24.
  20. Cuore, U., Solari, M., Cicero, L., Gayo, V., Nari, A., Trelles, A. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Parasitolog%C3%ADa/Publicaciones/20Tratamiento%20Generacional%20de%20la%20Garrapata..pdf> Fecha de consulta: 27/8/2012.
  21. Cuppa, MS., Cupp, E., Navarre, C., Wisnewski, N., Brandt, K., Silver, G., Zhang, D., Panangala, V., (2004) Evaluation of a recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. *Vaccine* 22: 2285–2297.
  22. da Silva Vaz, I., Logullo, C., Sorgine, M., Velloso, F., Rosa de Lima, M., Gonzales, J., Masuda, H., Oliveira, P., Masuda, A., (1998). Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66: 331-341.
  23. da Silva Vaz, I., Torino Lermen, T., Michelon, A., Sanchez Ferreira, C., Reis, D., de Freitas, J., Termignoni, C., Masuda, A., (2004). Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S- -transferase. *Veterinary Parasitology* 119: 237–245.
  24. De la Fuente, J., Kocan, KM., (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* 28: 275–283.
  25. Drugueri, L. (2004). Garrapatas del ganado bovino. Disponible en: <http://www.zoetecnocampo.com/forog/Forum2/HTML/000226.html> Fecha de consulta: 20/08/2011.

26. FAO (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO, Producción y Sanidad Animal, 157: 1-51.
27. Food and Agricultural Organization, (FAO) (2006). Aplicación del control integrado de parásitos (CIP) a la garrapata *Boophilus microplus* en Uruguay. Disponible en: [http://www.rlc.fao.org/es/ganaderia/pdf/uru\\_3003.pdf](http://www.rlc.fao.org/es/ganaderia/pdf/uru_3003.pdf) Fecha de consulta: 25/9/2012.
28. Fragoso, H., Radt, PH., Ortiz, M., Rodriguez, M., Redondo, M., Herrera, H., de la Fuente, J., (1998). Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* BmS6-containing vaccine Gavac. *Vaccine*, 16 (20): 1990-1992.
29. Freitas, D., Rosa, M., Moraes, J., Campos, E., Logullo, C., da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., (2007). Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146: 688–694.
30. Frova, C., (2006). Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomolecular Engineering* 23: 149–169.
31. García- García, JC., Gonzalez, LL., Gonzalez, MM., Valdes, MM., Méndez, L., Lamberti, J., D'agostino, B., Citroni, D., Fragoso, H., Ortiz, O., Rodríguez, M., de la Fuente, J., (1999). Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Experimental and Applied Acarology* 23: 883–895.
32. García- García, JC., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., Rodríguez, M., Joglara, M., Machado, H., Gonzalez, IL., Valdez, M., Mendez, 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.
33. Grupo Técnico de Garrapata (MGAP/DIGESEGA). (2008). Una nueva ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay. Disponible en: [http://www.planagro.com.uy/publicaciones/revista/R131/R\\_131\\_42.pdf](http://www.planagro.com.uy/publicaciones/revista/R131/R_131_42.pdf). Fecha de consulta: 7/9/2012.
34. Guglielmone, A.A. (1994). Epidemiología y control de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) de los vacunos en la Argentina. Enfermedades parasitarias de importancia económica en la Argentina y el Uruguay. Montevideo, Hemisferio Sur, pp. 461-479.
35. Gutierrez, J. (2006). Identificación de órganos blanco en la garrapata *Boophilus microplus* para anticuerpos-antigarrapata de bovinos inducidos por el inmunogeno TickVac. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis265.pdf> Fecha de consulta: 27/11/2012
36. Harnnoi, T., Sakaguchi, T., Nishikawa, Y., Xuan, X., Fujisaki, K., (2007). Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147: 93–101.

37. Havlikova, S., Roller, L., Koci, J., Trimnell, A., Kazimirova, M., Klempa, B., Nuttall, P., (2009). Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine antigen from the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *International Journal for Parasitology* 39: 1485–1494.
38. Huntley JF, Machell J, Nisbet AJ, Van den Broek A, Chua KY, Cheong N, Hales BJ, Thomas WR., (2004). Identification of tropomyosin, paramyosin and apolipoporphin/vitellogenin as three major allergens of the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunology* 26:335-342.
39. Jackson LA, Opdebeeck, JP., (1995). The effect of various adjuvants on the humoral immune response of sheep and cattle to soluble and membrane midgut antigens of *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 58: 129-141.
40. Jackson LA, Opdebeeck, JP., (1989). The effect of antigen concentration and vaccine regimen on the immunity induced by membrane antigens from the midgut of *B. microplus*. *Immunology* 68: 272-276.
41. James, R., Xub, J., (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 175–182.
42. Junquera, P. (2011). Garrapatas *Boophilus* en el ganado Bovino: biología, prevención y control. Disponible en: [http://parasitopedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=26&Itemid=471](http://parasitopedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=26&Itemid=471). Fecha de consulta: 10/10/2012.
43. Kocan, KM., Zivkovic, Z., Blouin, E., Naranjo, V., Almazán, C., Mitra R., de la Fuente, J., (2005). Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC Developmental Biology* 10: 1186-1197.
44. Konanz, S., Nauen, R., (2004). Purification and partial characterization of a glutathione S-transferase from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* *Pesticide Biochemistry and Physiology* 79: 49–57.
45. Leal, AT., Pohl CA., Ferreira, CAS., Nascimento-Silva, MCL., Sorgine, MHF., Logullo, C., Oliveira, PL., Farias, SE., da Silva Vaz IJ., Masuda, A (2006). Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 45: 107–114.
46. Leal, AT., Seixas, A., Pohl, PC., Ferreira, C., Logullo, C., Oliveira, P., Farias, S., Termignoni, C., da Silva Vaz I., Masuda A., (2006). Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114: 341–345.
47. Lew-Tablor, A., Kurscheid, S., Barrero, R., Gondro, C., Moolhuijzen, P., Rodriguez Valle, M., Morgan, J., Covacin, C., Bellgard, M., (2011). Gene expression evidence for off-target effects caused by RNA interference-mediated gene silencing of Ubiquitin-63E in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *International Journal for Parasitology* 41: 1001–1014.
48. Liao, M., Hatta, T., Umemiya, R., Huang, P., Jia, H., Gong, H., Zhou, J., Nishikawa, Y., Xuan, X., Fujisakia, K., (2007). Identification of three protein disulfide isomerase members from *Haemaphysalis longicornis* tick. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 641–654.
49. Linares Villalba, S. (2008). Manejo integral de las garrapatas, una propuesta eficiente y sostenible con el medio ambiente. Disponible en:

[http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia16\(2\)\\_3.pdf](http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia16(2)_3.pdf)

Fecha de consulta: 24/9/2012.

50. Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J., Estrada-Peña, A., Kocan, K., de la Fuente, J., (2011). Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. *Vaccine* 29: 2248–2254.
51. Miller, R., Estrada-Peña, A., Almazán, C., Allen, A., Jory, L., Yeater, K., Messenger, M., Ellis, D., Perez de Leon, A., (2011). Exploring the use of an anti-tick vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *G Model JVAC* 1323:1 1–6.
52. Nakajima, M., Kodama, M., Yanase, H., Iwanaga, T., Mulenga, A., Ohashi, K., Onumaa, M., (2003). Production and characterization of monoclonal antibodies against midgut of ixodid tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Veterinary Parasitology* 115: 355–363.
53. Nari, A., Fiel, C. (1994). Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 365 p.
54. Nascimento-Silva, M., Leal, AT., Daffre, SA., Juliano, L., da Silva Vaz, I., Paiva-Silva, GO., Oliveira, PO., Sorgine, MH., (2008). BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 149: 599–607.
55. Nijhof, AM, Balk, JA., Postigo, M. and Jongejan, F., (2009). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and Determination of the expression profile of Bm86. *BMC Molecular Biology*, 10:12 doi: 10.1186/1471-2199-10-112.
56. Niranjana Reddy, BP., Prasad, G., Raghavendra, K., (2011). In silico analysis of glutathione S-transferase supergene family revealed hitherto unreported insect specific and GSTs and mammalian specific GSTs in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Computational Biology and Chemistry* 35: 114–120.
57. Nuñez, J. L.; Muñoz Cobenas, M. E. & Moltedo, H. L. *Boophilus microplus*. La garrapata del Ganado vacuno. Buenos Aires, Hemisfério Sur, 1982
58. Oliveira, L., Masuda, A., (1998). Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66: 331-341.
59. Opdebeeck, J., Wong, J., Jackson, L., Dobson, D., (1998). Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunology* 63: 363-367.
60. Ortíz RD, da Silva Vaz IJ., Gonzales JC, Masuda A (1997). Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. *Veterinary Parasitology* 69: 297-306.
61. Parizi, LF., Utiumi, KU., Imamura, S., Onuma, M., Ohashi, K., Masuda, A., da Silva Vaz, I., (2011). Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-Transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Experimental Parasitology* 127: 113–118.

62. Parizi, L.F., Pohl, P.C., Masuda, A., da Silva Vaz, Jr., (2009). New approaches toward anti-Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet.* 18:1-7.
63. Parizi, L., Reck, J., Oldigers, D., Guizzo, M., Seixas, A., Logullo, C., de Oliveira, P., Termignoni, C., Martins, J., da Silva Vaz, I., (2012). Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. *Vaccine* 30: 1-6.
64. Parizi, L., Githaka, N., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva Vaz, I., (2012). The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvj.2012.05.023> Fecha de consulta: 25/11/2012.
65. Pettersson, E.U., Ljunggren, E., Morrison, D., Mattsson, J., (2005). Functional analysis and localisation of a delta-class glutathione S-transferase from *Sarcoptes scabiei*. *International Journal for Parasitology* 35: 39–48.
66. Prudencio, C., Marra, A., Cardoso, R., Goulart, L., (2010). Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology* 172: 122–131.
67. Pruett, P., Untalan, P., Davey, R., (2006). Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. *Veterinary Parasitology* 140: 148–157.
68. Quinn, B., Crane, T., Kocal, T., Best, S., Cameron, R., Rushmore, T., Farber, E., Hayes, M., (1990). Protective Activity of Different Hepatic Cytosolic Glutathione STransferases against DNA-Binding Metabolites of Aflatoxin B1. *Toxicology and Applied Pharmacology* 105: 351-363.
69. Radostitis, O. (2002). *Medicina Veterinaria*. 9ª ed. Madrid, McGraw Hill Interamericana, 2215p.
70. Rodríguez, M., de la Fuente, J., Penichet, M., Mouris, A., Labarta, V., Lorenzo Luaces, L., Rubiera, R., Cordovés, C., Sanchez, P., Ramos, E., Soto, A., Canales, M., Palenzuela, D., Triguero, A., Leonart, R., Herrera, L., (1995). Control of *B. microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary Parasitology* 57: 339-349.
71. Rodríguez Vivas, I.; Rosado, A.; Basto, G.; García Vasquez, Z.; Rosario, R. (2006). Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Disponible en: [http://ampave.org/archivos%20apoyo/Manual\\_tecnico.pdf](http://ampave.org/archivos%20apoyo/Manual_tecnico.pdf) Fecha de consulta: 15/6/2012.
72. Rodríguez, AM., Fernández, E., Encinosa, PE., Bello, Y., Méndez-Pérez, L., Ruiz, LC., Pérez, D., González, M., Garay, H., Reyes, O., Méndez, L., Estrada, MP., (2012). A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine* 30: 1-8.
73. Sanchis, J.; Cuore, U.; Gayo, V.; Silvestre, D.; Invernizzi, F.; Trelles, A.; Solari, M.A. (2008). Estudios sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas del Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Parasitolog%C3%ADa/Publicaciones/5Ecolog%C3%ADa%20de%20Boophilus%20microplus.pdf> Fecha de consulta: 23/09/2012

74. Seixas, A., Leal, A., Nascimento-Silva, MC., Masuda, A., Termignoni, C., da Silva Vaz Jr., I., (2008). Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 30: 1-9.
75. Shahein, YE., El Sayed EL-Hakim, A., Kamal Aboueella, M., Reda Hamed, R., Abdul-Moez Allam, S., Mahmoud, N., (2008). Farid Molecular cloning, expression and characterization of a functional GSTmu class from the cattle tick *Boophilus annulatus*. *Veterinary Parasitology* 152: 116–126.
76. Sharp, P., Smith, D., Bach, W., Waglands B., Cobon, G., (1991). Purified Glutathione S-Transferases From Parasites as Candidate Protective Antigens. *International Journal for Parasitology* 21(7): 835-846.
77. Solari, M., Quintana, S., (1994). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos. En *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos*. Montevideo, Hemisferio Sur, pp.481-504.
78. Solari, M.A. (2006). Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Parasitolog%C3%ADa/Publicaciones/8Epidemiolog%C3%ADa%20y%20perspectivas%20en%20el%20control%20de%20hemopar%C3%A1sitos.pdf> Fecha de consulta: 21/3/2012.
79. Solari, M.A.; Cuore, U.; Gayo, V.; Sanchis, J. (2008). Control integrado de parásitos con énfasis en *Boophilus microplus* y *Babesia* spp. Aplicado en un establecimiento. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Parasitolog%C3%ADa/Publicaciones/4Control%20Integrado%20de%20Par%C3%A1sitos%20aplicado%20a%20un%20establecimiento.pdf> Fecha de consulta: 10/06/2012.
80. Solari, M.A.; Cuore, U.; Trelles, A.; Mautone, G. (2006). Taxonomía de los 5 géneros de garrapatas diagnosticadas en bovinos en Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Parasitolog%C3%ADa/Publicaciones/19Taxonom%C3%ADa%20de%20los%205%20g%C3%A9neros%20de%20garrapatas%20diagnosticadas%20en%20.pdf> Fecha de consulta: 19/07/2012.
81. Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi K., Onum, M., (2003). A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine* 21: 2844–2851.
82. Sugumar, P., Chandran, D., Sudha Rani, G., Vijayan Shahana, P., Keshavrao Maske, D., Narasimhan Rangarajan, P., Narasu Mangamoori, L., Alwar Srinivasan, V., (2011). Recombinant mid gut antigen (Bm95) as a vaccine against Indian *Rhipicephalus haemaphysaloides* in *Bos indicus* cattle. *Research in Veterinary Science* 90: 262–268.
83. Thomas, WR., Smith, WA., Hales, BJ., (2004). The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J.*, 27(8):563-9.
84. Trimnell, AR., Davies, GM., Lissina, O., Hails, RS., Nuttall, PA. (2005). A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23: 4329–4341.



85. Umemiya, R., Hatta, T., Liao, M., Tanaka, M., Zhou, J., Inoue, N., Fujisaki, K., (2007). *Haemaphysalis longicornis*: Molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks. *Experimental Parasitology* 115: 135–142.
86. Valmonte, GR., Cauyan, GA., Ramos, JD., (2012). IgE cross-reactivity between house dust mite allergens and *Ascaris lumbricoides* antigens. *Asia Pac Allergy*. 2(1):35-44.
87. Wan, Q., Whang, I., Lee, J., (2008). Molecular characterization of mu class glutathione-S-transferase from disk abalone (*Haliotis discus discus*), a potential biomarker of endocrine-disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 150: 187–199.
88. Whalen, K., Morin, D., Yu Lin, C., Tjeerdema, R., Goldstone, J., Hahn, M., (2008). Proteomic identification, cDNA cloning and enzymatic activity of glutathione S-transferases from the generalist marine gastropod, *Cyphoma gibbosum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 478: 7–17.
89. Willadsen, P., Bird, P., Cobon., G.S., Hungerford, J., (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 110: 43-50.
90. Xu, Y., Bruno, J., Luft, B., (2005). Identification of novel tick salivary gland proteins for vaccine development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326: 901–904.
91. Yamada, S., Konnai, S., Imamura, S., Ito, T., Onuma, M., Ohashia, K., (2003). Cloning and characterization of *Rhipicephalus appendiculatus* voraxin and its effect as anti-tick vaccine. *Vaccine* 27: 5989–5997.

## ANEXOS

### 1) LEGISLACIÓN

#### Ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay:

La lucha contra la garrapata común del ganado bovino, y las enfermedades que ella transmite, han significado y significan para el país una constante preocupación por las pérdidas directas e indirectas que ocasiona principalmente para el sector productivo (Grupo Técnico de Garrapata (MGAP/DIGESEGA). (2008).

Antecedentes:

- La lucha contra el *Boophilus microplus*, tiene base legal desde la Ley 3.606 del 13 de abril de 1910.
- La Ley de garrapata N°12.293 de 3 de julio de 1956, complementada por un número importante de Decretos, Resoluciones y Ordenes de Servicio, hacía muy difícil su interpretación para dar cumplimiento a sus objetivos, la estrategia y las metas de la lucha contra este ectoparásito y las enfermedades infecciosas que transmite.

Con fecha 17 de abril de 2008, se aprobó la nueva Ley de garrapata N°18.268. Los elementos más destacables incorporados en la Ley son:

1-Un articulado que permite adecuar la estrategia de la campaña sanitaria de lucha contra garrapata *Boophilus microplus* mediante:

- La zonificación del país en zonas libres, de control y erradicación.
- La calificación de riesgo epidemiológico.
- El uso responsable de los específicos veterinarios para proteger la inocuidad de los alimentos, la salud y el medio ambiente.
- Mayores responsabilidades a los propietarios del ganado y a los veterinarios de libre ejercicio.

2-Establecer la división del país en Zonas o Áreas Libres, de Control o en Erradicación. Es a la Autoridad Sanitaria que le compete establecer la zonificación del país en: Zonas o Áreas Libres, de Control o en Erradicación en base a factores de riesgo epidemiológico, productivos, ecológicos, culturales, socioeconómicos y geográficos.

- Zonas o Áreas Libres: es aquella en la cual no está presente la garrapata *R. microplus*, ya sea por intervención planificada de la Autoridad Sanitaria y/o por condiciones ambientales en la cual no prospera el ectoparásito.

- Zona o Área de Control: es aquella en la cual la garrapata *Boophilus microplus* se encuentra presente y la Autoridad Sanitaria establece medidas tendientes a disminuir la prevalencia del ectoparásito y de las enfermedades transmitidas por el mismo.
- Zonas o Áreas de Erradicación: es aquella en la que la Autoridad Sanitaria establece medidas para lograr el estatus de Zona o Área Libre.

Actualmente en el país debido a la lucha contra el *Boophilus microplus* se logró declarar Zonas Libres (Dpto de Canelones, San José, Florida, Flores, Colonia, Soriano y Durazno excepto la 7° Seccional Policial) y al resto del país se lo considera en saneamiento (lucha activa). Se reglamentó la asignación activa de los Médicos Veterinarios en lo que respecta al despacho de tropas, certificación de animales a playas de faena y atención de focos, además de la participación activa de productores a través de organizaciones oficiales de la CONHASA y de las CODESA (Grupo Técnico de Garrapata (MGAP/DIGESEGA, 2008).

El despacho de tropa es el procedimiento que se debe cumplir para que el tránsito de bovinos de campo a campo se realice con animales libres de garrapata, y así evitar la diseminación del parásito y preservar las zonas libres, en erradicación o de control de su ingreso. Comprende a todos los movimientos de bovinos provenientes de los predios de zonas de garrapatas (de control o erradicación) con destino a predios de zonas libres, de control o en erradicación. El procedimiento de Despacho de Tropa establece que en la extracción de bovinos con destino a campo desde las zonas de control o en erradicación del ectoparásito, los animales deberán ser previamente identificados, inspeccionados y tratados por un Veterinarios de Libre Ejercicio autorizado por la Autoridad Sanitaria Grupo Técnico de Garrapata (MGAP/DIGESEGA). (2008).

El objetivo actual de la campaña es mantener las zonas libres y reducir la presencia e incidencia del parásito en el resto del territorio, para disminuir las pérdidas directas e indirectas que ocasiona. Mantener un estricto control del movimiento de hacienda para evitar la diseminación de la garrapata y salvaguardar las zonas declaradas libres o en saneamiento Grupo Técnico de Garrapata (MGAP/DIGESEGA). (2008).

Figura 3: Zonas epidemiológicas de garrapata *R. microplus*



ZONAS DE CONTROL

ZONAS LIBRES

Fuente: DSA/Departamento de Programas Sanitarios

## 2) DATOS DEL ENSAYO

Producto: BOX 2

Fecha: Enero 2012

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL HEMBRAS CAIDAS	NUMERO HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HUEVOS	% ECLOSION
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES					
1	09-ene	0	0	3	3	0,8	3	0,8	0,1	80
2	10-ene	0	0	13	13	3,63	13	3,63	0,36	65
3	11-ene	0	0	18	18	4,44	18	4,44	0,9	45
4	12-ene	0	0	27	27	7,8	20	5,98	1,35	55
5	13-ene	0	0	40	40	10,82	20	5,51	1,45	70
6	14-ene	0	0	23	23	6,62	20	5,65	1,2	55
7	15-ene	0	0	31	31	8,2	20	5,4	1,25	70
8	16-ene	0	0	39	39	10,92	20	5,39	1,51	55
9	17-ene	1	0	147	148	45,57	20	6,75	1,56	75
10	18-ene	0	0	36	36	9,93	20	5,64	2,54	80
11	19-ene	0	1	40	41	10,72	20	5,37	1,75	70
12	20-ene	0	0	45	45	11,69	20	5,25	1,59	65
13	21-ene	0	0	43	43	11,44	20	5,42	2,23	90
14	22-ene	3	0	46	49	13,2	20	5,13	1,79	75
15	23-ene	0	0	46	46	12,95	20	5,27	2,3	70
16	24-ene	0	1	43	44	11,58	20	5,2	2,65	90
17	25-ene	2	2	42	46	10,07	20	5,01	2,23	75
18	26-ene	0	0	70	70	18,48	20	5,08	2,11	60
19	27-ene	0	0	17	17	3,63	17	3,63	1,58	50
20	28-ene	0	0	16	16	4,18	16	4,18	1,47	65
21	29-ene	1	1	23	25	6,41	20	5,22	1,79	65
22	30-ene	3	0	12	15	3,87	15	3,87	1,77	50
23	31-ene	1	0	9	10	2,51	10	2,51	0,66	50
							<b>Promedios</b>	<b>4,8</b>	<b>1,57</b>	<b>66,3</b>

Producto Box3  
 Fecha: Enero 2012

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL HEMBRAS CAIDAS	NUMERO HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HUEVOS	% ECLOSION
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES					
1	09-ene	0	0	3	3	0,95	3	0,95	0,14	70
2	10-ene	0	0	27	27	7,74	20	5,79	1,1	50
3	11-ene	0	0	43	43	11,67	20	5,52	1,02	40
4	12-ene	0	0	63	63	15,9	20	4,83	1,48	45
5	13-ene	0	0	57	57	14,78	20	5,27	1,63	60
6	14-ene	0	0	55	55	12,94	20	4,6	1,78	75
7	15-ene	0	0	91	91	22,04	20	4,99	1,52	60
8	16-ene	1	0	66	67	15,96	20	5,1	2,2	70
9	17-ene	1	0	58	59	13,35	20	4,64	2,27	75
10	18-ene	0	4	59	63	12,95	20	4,39	2,02	60
11	19-ene	0	4	71	75	16,64	20	4,22	1,83	60
12	20-ene	1	1	52	54	11,33	20	4,34	1,57	65
13	21-ene	1	0	44	45	9,62	20	4,55	1,85	70
14	22-ene	3	0	63	66	12,94	20	4,85	2,17	65
15	23-ene	3	0	42	45	10,42	20	4,44	1,42	50
16	24-ene	2	3	32	37	7,94	20	4,13	1,42	50
17	25-ene	0	1	30	31	6,1	20	3,76	1,32	40
18	26-ene	1	1	28	30	6,23	20	4,13	1,69	50
19	27-ene	0	1	49	50	13,34	20	5,91	2,6	75
20	28-ene	1	4	11	16	2,98	16	2,98	2,13	50
21	29-ene	0	0	14	14	4,62	14	4,62	2,09	50
22	30-ene	3	0	19	22	2,85	19	2,85	1,17	20
23	31-ene	2	0	14	16	3,23	16	3,23	1,47	30
							<b>Promedios</b>	<b>4,35</b>	<b>1,65</b>	<b>55,65</b>

Producto: BOX 4  
 Fecha: Enero 2012

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL HEMBRAS CAIDAS	HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HUEVOS	% ECLOSION
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES					
1	09-ene	0	0	3	3	0,74	3	0,74	0,05	50
2	10-ene	0	0	5	5	1,19	5	1,19	0,16	70
3	11-ene	0	0	8	8	2,04	8	2,04	0,16	85
4	12-ene	2	0	40	42	10,1	20	4,77	0,41	50
5	13-ene	0	0	54	54	14,31	20	5,44	1,02	65
6	14-ene	5	3	58	66	15,43	20	4,83	1,78	95
7	15-ene	0	0	29	29	7,89	20	5,62	2,61	85
8	16-ene	1	2	71	74	18,59	20	5,46	2,11	95
9	17-ene	2	0	57	59	16,14	20	5,66	2,24	75
10	18-ene	0	0	22	22	5,6	20	5,1	1,2	40
11	19-ene	0	0	68	68	24,79	20	5,29	2,64	90
12	20-ene	0	2	151	153	40,66	20	5,16	2,44	75
13	21-ene	2	2	95	99	25,54	20	5,11	2,48	70
14	22-ene	3	2	90	95	19,12	20	5,07	2,25	70
15	23-ene	1	3	139	143	34,07	20	4,46	1,98	75
16	24-ene	4	1	152	157	38,03	20	4,79	2,13	75
17	25-ene	4	2	219	225	36,84	20	4,72	0,97	50
18	26-ene	1	4	284	289	46,65	20	4,59	1,79	95
19	27-ene	1	2	168	171	42,9	20	5,25	1,9	70
20	28-ene	1	2	45	48	10,5	20	4,17	1,22	60
21	29-ene	3	1	72	76	18,36	20	4,63	1,54	70
22	30-ene	4	0	38	42	8,9	20	4,43	0,97	75
23	31-ene	2	1	24	27	6,6	20	5,07	0,95	45
							<b>Promedios</b>	<b>4,5</b>	<b>1,52</b>	<b>70,87</b>

Producto: BOX 5

Fecha: Enero 2012

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL HEMBRAS CAIDAS	NUMERO HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HEMBRAS INCUBADAS	PESO(grs) HUEVOS	% ECLOSION
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES					
1	09-ene	0	0	6	6	2,09	6	2,09	0,19	25
2	10-ene	0	0	4	4	1,04	4	1,04	0,02	70
3	11-ene	0	0	34	34	9,23	20	5,78	1,58	95
4	12-ene	0	0	78	78	19,3	20	6,06	2,31	95
5	13-ene	0	0	121	121	33,45	20	5,43	2,04	85
6	14-ene	0	0	195	195	47,4	20	4,97	1,96	80
7	15-ene	0	0	139	139	32,36	20	5,73	2,03	90
8	16-ene	1	0	55	56	14,72	20	5,61	2,44	85
9	17-ene	0	6	215	221	58,57	20	5,5	1,78	75
10	18-ene	0	8	157	165	45,14	20	4,96	2,28	75
11	19-ene	0	10	252	262	71,37	20	4,78	1,54	85
12	20-ene	0	2	345	347	94,51	20	5,07	2,21	90
13	21-ene	4	3	174	181	52,08	20	5,55	2,48	85
14	22-ene	6	1	157	164	45,85	20	5,11	1,97	65
15	23-ene	1	3	118	122	30,57	20	4,93	2,05	70
16	24-ene	6	4	135	145	35,73	20	4,84	1,83	70
17	25-ene	3	0	92	95	23,95	20	5,25	1,4	75
18	26-ene	3	2	98	103	25,98	20	5,23	2,54	70
19	27-ene	0	0	50	50	13,91	20	5,61	2,76	65
20	28-ene	0	2	15	17	3,67	17	3,67	1,66	80
21	29-ene	1	0	29	30	7,76	20	5,27	2,68	65
22	30-ene	1	0	5	6	1,18	6	1,18	0,35	50
23	31-ene	0	0	4	4	0,89	4	0,89	0,36	35
							<b>Promedios</b>	<b>4,55</b>	<b>1,76</b>	<b>73,04</b>



## BOX 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL HEMBRAS CAIDAS	NUMERO HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HUEVOS	% ECLOSION
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES					
1	09-ene	0	0	3	3	0,46	3	0,46	0,11	70
2	10-ene	0	0	12	12	2,41	12	2,41	0,15	50
3	11-ene	0	2	24	26	4,37	20	3,53	0,72	60
4	12-ene	0	4	77	81	15,6	20	4,01	1,11	70
5	13-ene	0	0	50	50	9,73	20	3,84	1,51	80
6	14-ene	0	2	42	44	8,84	20	4,31	1,42	85
7	15-ene	0	2	39	41	9,29	20	5,36	2,13	90
8	16-ene	0	2	35	37	6,98	20	3,99	1,46	85
9	17-ene	2	8	30	40	8,49	20	4,33	1,44	70
10	18-ene	0	2	21	23	5,33	20	4,6	1,41	80
11	19-ene	0	6	36	42	8,64	20	3,67	1,31	80
12	20-ene	0	3	41	44	9,49	20	3,96	1,47	90
13	21-ene	0	6	52	58	12,26	20	4,42	2,03	80
14	22-ene	2	0	37	39	9,13	20	4,71	2,55	85
15	23-ene	0	7	26	33	6,58	20	3,95	1,99	90
16	24-ene	0	0	13	13	3,2	20	3,2	2,47	60
17	25-ene	0	3	30	33	7,32	20	4,25	2,1	95
18	26-ene	1	8	33	42	8,72	20	3,88	2,04	90
19	27-ene	1	1	19	21	4,67	20	4,13	2,02	85
20	28-ene	4	0	36	40	10,9	20	5,69	2,65	95
21	29-ene	0	0	17	17	3,57	17	3,57	1,76	65
22	30-ene	0	0	10	10	2,37	10	2,37	1	70
23	31-ene	0	0	6	6	1,37	6	1,37	0,49	35
							<b>Promedios</b>	<b>3,74</b>	<b>1,54</b>	<b>76,52</b>

Producto: BOX 7  
 Fecha: Enero 2012

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO (grs) TOTAL HEMBRAS CAIDAS	NUMERO HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HUEVOS	% ECLOSION
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES					
1	09-ene	0	0	9	9	2,33	9	2,33	0,61	95
2	10-ene	0	0	25	25	6,89	20	5,37	0,98	65
3	11-ene	0	0	61	61	17,5	20	5,89	0,83	45
4	12-ene	0	0	97	97	28,05	20	5,96	1,96	95
5	13-ene	0	0	136	136	39,58	20	5,69	2,04	85
6	14-ene	0	0	52	52	14,25	20	5,45	2,11	90
7	15-ene	0	2	104	106	29,04	20	5,39	2,25	90
8	16-ene	0	1	58	59	17,18	20	6,05	2,39	95
9	17-ene	0	0	54	54	15,78	20	5,83	2,37	85
10	18-ene	0	0	58	58	16,72	20	6,03	3,64	75
11	19-ene	0	1	82	83	23,42	20	5,74	2,67	85
12	20-ene	0	1	11	12	33,46	20	6,19	2,98	85
13	21-ene	3	0	183	186	54,32	20	5,59	1,96	85
14	22-ene	2	0	119	121	35,68	20	6,05	2,6	90
15	23-ene	1	0	187	188	53,29	20	5,99	2,71	90
16	24-ene	1	0	88	89	26,15	20	5,84	2,87	95
17	25-ene	2	1	166	169	48,54	20	5,97	3,11	95
18	26-ene	5	0	210	215	61,14	20	5,45	2,08	90
19	27-ene	2	1	174	177	51,79	20	5,84	3,29	85
20	28-ene	1	2	22	25	6,38	20	5,21	2,14	80
21	29-ene	2	2	68	72	20,22	20	6	2,93	80
22	30-ene	4	1	15	20	5,35	20	5,35	2,13	75
23	31-ene	0	0	4	4	1,13	4	1,13	0,5	95
							<b>Promedios</b>	<b>5,41</b>	<b>2,22</b>	<b>84,78</b>

Producto: BOX 8  
 Fecha: Enero 2012

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL HEMBRAS CAIDAS	NUMERO HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HUEVOS	% ECLOSION
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES					
1	09-ene	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10-ene	0	0	16	16	4,93	16	4,93	0,48	40
3	11-ene	0	0	31	31	7,86	20	4,96	1,48	80
4	12-ene	0	0	69	69	18,6	20	5,66	1,25	75
5	13-ene	0	0	75	75	36,23	20	5,64	1,91	90
6	14-ene	0	0	137	137	34,6	20	6	2,38	95
7	15-ene	0	0	113	113	29,57	20	5,82	2,85	95
8	16-ene	0	1	102	103	27,94	20	5,65	2,5	80
9	17-ene	0	0	90	90	26,26	20	6,38	2,63	95
10	18-ene	0	0	48	48	12,87	20	5,2	2,32	80
11	19-ene	0	0	65	65	17,73	20	5,69	2,59	80
12	20-ene	0	0	81	81	21,97	20	5,4	1,57	70
13	21-ene	0	0	81	81	21,97	20	5,21	2,11	75
14	22-ene	0	0	144	144	38,03	20	5,6	3,09	95
15	23-ene	0	2	98	100	26,64	20	5,08	2,25	70
16	24-ene	0	2	74	76	19,76	20	5,32	2,56	85
17	25-ene	2	3	206	211	57,6	20	5,51	2,51	85
18	26-ene	0	2	139	141	36,93	20	5,28	2,68	80
19	27-ene	0	0	63	63	16,85	20	5,82	2,85	75
20	28-ene	0	2	50	52	13,18	20	4,79	1,67	85
21	29-ene	0	0	35	35	8,83	20	5,24	2,65	85
22	30-ene	0	0	7	7	1,58	7	1,58	0,74	90
23	31-ene	0	2	5	7	1,23	7	1,23	0,37	90
							<b>Promedios</b>	<b>5,1</b>	<b>2,1</b>	<b>81,6</b>

Producto: BOX 10  
 Fecha: Enero 2012

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL HEMBRAS CAIDAS	NUMERO HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HEMBRAS INCUBADAS	PESO (grs) HUEVOS	% ECLOSION
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES					
1	09-ene	0	0	3	3	0,79	3	0,79	0,06	50
2	10-ene	0	0	15	15	4,13	15	4,13	0,65	70
3	11-ene	0	0	37	37	10,44	20	5,45	0,93	50
4	12-ene	0	0	28	28	7,16	20	5,23	2,23	95
5	13-ene	0	0	36	36	8,83	20	4,96	1,99	95
6	14-ene	0	0	50	50	14,32	20	4,75	1,9	90
7	15-ene	0	0	52	52	12,85	20	4,91	2,13	95
8	16-ene	0	0	106	106	27,64	20	5,33	2,47	90
9	17-ene	1	0	123	124	31,63	20	5,53	2,28	90
10	18-ene	0	0	162	162	42,86	20	5,66	2,61	95
11	19-ene	0	0	101	101	29,88	20	5,41	2,38	90
12	20-ene	0	2	239	241	56,72	20	5,24	2,46	95
13	21-ene	2	1	148	151	38,96	20	5,46	2,82	90
14	22-ene	1	0	101	102	28,67	20	5,26	2,18	90
15	23-ene	0	0	185	185	52,38	20	6,18	3,07	95
16	24-ene	0	1	167	168	48,39	20	5,76	2,74	85
17	25-ene	0	0	108	108	33,59	20	5,2	2,45	90
18	26-ene	2	0	220	222	61,56	20	5,92	2,82	80
19	27-ene	0	0	81	81	23,36	20	6,08	2,79	75
20	28-ene	0	0	33	33	7,95	20	4,95	2,02	50
21	29-ene	1	0	56	57	16,3	20	5,4	1,92	75
22	30-ene	3	0	20	23	5,63	20	4,9	2,03	80
23	31-ene	2	1	12	15	3,2	15	3,2	1,07	80
							<b>Promedios</b>	<b>5,0</b>	<b>2,1</b>	<b>82,4</b>

Tabla con la sumatoria de los resultados diarios para las garrapatas de los 4 animales del grupo tratado.

	GRUPO	VACUNADO	BOX	3-4-5-6					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL	NUMERO HEMBRAS	PESO (grs)	PESO (grs)
		ADAVERE	CHICAS	NORMALES	TOTALES	HEMBRAS CAIDAS	INCUBADAS	HEMBRAS INCUBADAS	HUEVOS
1	09-ene	0	0	15	15	4,24	15	4,24	0,49
2	10-ene	0	0	48	48	12,38	41	10,43	1,43
3	11-ene	0	2	109	111	27,31	68	16,87	3,48
4	12-ene	2	4	258	264	60,9	80	19,67	5,31
5	13-ene	0	0	282	282	72,27	80	19,98	6,2
6	14-ene	5	5	350	360	84,61	80	18,71	6,94
7	15-ene	0	2	298	300	71,58	80	21,7	8,29
8	16-ene	3	4	227	234	56,25	80	20,16	8,21
9	17-ene	5	14	360	379	96,55	80	20,13	7,73
10	18-ene	0	14	259	273	69,02	80	19,05	6,91
11	19-ene	0	20	427	447	121,44	80	17,96	7,32
12	20-ene	1	8	589	598	155,99	80	18,53	7,69
13	21-ene	7	11	365	383	99,5	80	19,63	8,84
14	22-ene	14	3	347	364	87,04	80	19,74	8,94
15	23-ene	5	13	325	343	81,64	80	17,78	7,44
16	24-ene	12	8	332	352	84,9	80	16,96	7,85
17	25-ene	7	6	371	384	74,21	80	17,98	5,79
18	26-ene	6	15	443	464	87,58	80	17,83	8,06
19	27-ene	2	4	286	292	74,82	80	20,9	9,28
20	28-ene	6	8	107	121	28,05	73	16,51	7,66
21	29-ene	4	1	132	137	34,31	71	18,09	8,07
22	30-ene	8	0	72	80	15,3	55	10,83	3,49
23	31-ene	4	1	48	53	12,09	46	10,56	3,27

Tabla con la sumatoria de los resultados diarios para las garrapatas de los 4 animales del grupo control.

	GRUPO NO	VACUNADO	BOX	2,7,8,10						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
DIA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS				PESO TOTAL	NUMERO HEMBRAS	PESO (grs)	PESO (grs)	
		ADAVERE	CHICAS	NORMALES	TOTALES	HEMBRAS CAIDAS	INCUBADAS	HEMBRAS INCUBADAS	HUEVOS	
1	09-ene	0	0	15	15	3,92	15	3,92	0,77	
2	10-ene	0	0	69	69	19,58	64	18,06	2,47	
3	11-ene	0	0	147	147	40,24	78	20,74	4,14	
4	12-ene	0	0	221	221	61,61	80	22,83	6,79	
5	13-ene	0	0	287	287	95,46	80	21,8	7,39	
6	14-ene	0	0	262	262	69,79	80	21,85	7,59	
7	15-ene	0	2	300	302	79,66	80	21,52	8,48	
8	16-ene	0	2	305	307	83,68	80	22,42	8,87	
9	17-ene	2	0	414	416	119,24	80	24,49	8,84	
10	18-ene	0	0	304	304	82,38	80	22,53	11,11	
11	19-ene	0	2	288	290	81,75	80	22,21	9,39	
12	20-ene	0	3	376	379	123,84	80	22,08	8,6	
13	21-ene	5	1	455	461	126,69	80	21,68	9,12	
14	22-ene	6	0	410	416	115,58	80	22,04	9,66	
15	23-ene	1	2	516	519	145,26	80	22,52	10,33	
16	24-ene	1	4	372	377	105,88	80	22,12	10,82	
17	25-ene	6	6	522	534	149,8	80	21,69	10,3	
18	26-ene	7	2	639	648	178,11	80	21,73	9,69	
19	27-ene	2	1	335	338	95,63	77	21,37	10,51	
20	28-ene	1	4	121	126	31,69	76	19,13	7,3	
21	29-ene	4	3	182	189	51,76	80	21,86	9,29	
22	30-ene	10	1	54	65	16,43	62	15,7	6,67	
23	31-ene	3	3	30	36	8,07	36	8,07	2,6	

Cuadro N°5: distintos antígenos de *R. microplus* como candidatos para el desarrollo de vacunas recombinantes.

Antígenos	Protección	Función	Autor
<b>Bm 86</b> (proteína de membrana del intestino medio)	varían entre 31 y 91%	Endocitosis.	Garcia-Garcia y col., (2000)
<b>Bm 86</b> (ensayo contra <i>R. annulatus</i> )	99,9%	Endocitosis.	Miller, R. y col., (2012)
<b>Bm 95</b>	Reduce la carga de larvas, ninfas y etapas adultas, con una eficacia del 98,7%, 84,6%, y 78,9%	Endocitosis.	Garcia-Garcia y col., (2000)
<b>rGSTH1</b> (proteína recombinante glutatión S-transferasa de <i>Haemaphysalis longicornis</i> )	57%	Enzimas involucradas en la desintoxicación del metabolismo de xenobióticos y compuestos endógenos.	Parizi y col., (2011)
<b>Ferritina (IrFER2)</b>	64%	Proteína de almacenamiento de hierro, además es un transportador de hierro en la hemolinfa de la garrapata.	Lightowlers y col., (1994).
<b>VTDC:</b> (Vitelin-Degrading Cysteine Endopeptidase)	21%	Es una endopeptidasa de cisteína que naturalmente está asociada a vitelina. Implicada en la hidrólisis de vitelina durante la embriogénesis.	Seixas y col., (2008)
<b>BYC:</b> (Yolk pro-Cathepsin)	25,24%	Es una aspártico proteinasa encontrada en los huevos del <i>R. microplus</i> , está implicada en la embriogénesis, su papel ha sido demostrado en la degradación de vitelina (VT).	Leal, (2006).
<b>Subolesin</b>	51%	Implicado en la digestión de la sangre, reproducción y desarrollo.	Almazan y col., (2005)
<b>Macerado de larvas</b> (Colombia)	74%		Gutierrez, J., (2006).
<b>Extractos de intestino</b>	87%		Opdebeeck, J. y col.,(1988)