

## EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PREPRODEFENSINA DE *Rhipicephalus microplus* HORAK, 2002 (IXODOIDEA: IXODIDAE) EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Anaplasma marginale* Y *Staphylococcus saprophyticus*

Guadalupe Karina Salazar-Morales, Hugo Aguilar-Díaz✉, Raquel Cossío-Bayúgar y Estefan Miranda-Miranda

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, carretera federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, C.P. 62550

✉Autor de correspondencia: hugoaguilar@ciencias.unam.mx

**RESUMEN.** El artrópodo *Rhipicephalus microplus*, es un ectoparásito hematófago que representa un serio problema en la industria ganadera mundial, por su gran capacidad expoliativa y vectorial para transmitir organismos patógenos al ganado bovino, como *Babesia spp.* y *Anaplasma spp.*, En este sentido, *R. microplus*, posee una amplia variedad de mecanismos inmunológicos de protección, que incluyen la producción de péptidos antimicrobianos. Al momento, existen escasos reportes del papel del sistema inmune de *R. microplus*, ante la exposición con bacterias patógenas. Por lo anterior, este trabajo pretende comparar el papel de un péptido antimicrobiano (Preprodefensina), involucrado en la interacción patógeno-vector de la garrapata con bacterias patógenas. Nuestros resultados muestran un cambio en la expresión de la Preprodefensina presente en hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus*, y ausente en hemolinfa de garrapatas infectadas con *A. marginale*. Así mismo, se demostró la expresión basal del péptido antimicrobiano en hemolinfa de garrapatas sin infección. Estos hallazgos, corroboran la idea de la alta plasticidad que presenta la respuesta inmune de los artrópodos, dependiente del patógeno. El avance en el conocimiento de la biología de *R. microplus*, contribuye al descubrimiento de blancos, para el desarrollo de nuevos fármacos y/o vacunas para el control integrado de plagas.

**Palabras clave:** *Rhipicephalus microplus*, péptidos antimicrobianos, Preprodefensina, *Anaplasma*, *Staphylococcus*.

### Evaluation of Preprodefensin expression in *Rhipicephalus microplus* Horak, 2002 (Ixodoidea: Ixodidae) in response to the infection for *Anaplasma marginale* y *Staphylococcus saprophyticus*

**ABSTRACT.** The hematophagous ectoparasite Arthropod *Rhipicephalus microplus*, represent a serious problem in the world livestock industry, due to its vector capacity to transmit pathogenic bacteria in the cattle, such as *Babesia spp.* and *Anaplasma spp.* In this regard, *R. microplus*, has a wide variety of immunological mechanisms, that include production of antimicrobial peptides (AMP's). At the moment, few reports describe the role of the immune system when the tick are exposed to pathogenic bacteria. For the above, the goal of this work were compared the role of AMP-Preprodefensine involved in the pathogen-tick relationship. Our results show a change in Preprodefensin expression, present in hemolymph ticks infected with *S. saprophyticus*, and absent in hemolymph of infected ticks with *A. marginale*. Likewise, the basal expression of this antimicrobial peptide in hemolymph of ticks without infection was demonstrated. These findings support the idea of high plasticity presenting the immune response of arthropods. The advance in knowledge of the biology of *R. microplus*, contributes to the discovery of targets for the development of new drugs and, vaccines for pest control.

**Key words:** *Rhipicephalus microplus*, Antimicrobial peptides, Preprodefensin, *Anaplasma*, *Staphylococcus*.

## INTRODUCCIÓN

La garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus microplus*, es un ectoparásito hematófago obligado, el cual, se encuentra distribuido en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Este artrópodo, es considerado uno de los ectoparásitos más importantes en salud veterinaria, debido a su capacidad expoliativa y vectorial para transmitir enfermedades al bovino asociadas a pérdidas económicas. Actualmente, el uso desmedido de ixodicidas, ha resultado en el surgimiento de

poblaciones resistentes a estos compuestos, aunado a la plasticidad del sistema inmunológico de *R. microplus*, que juega un papel primordial en la detoxificación y protección contra diversos agentes patógenos. Este sistema presenta un conjunto de mecanismos asociados a la defensa celular, humoral y enzimática de la garrapata, para la protección y prevención de infecciones de origen microbiano (Sonenshine *et al.*, 2002).

**Acaropatógenos.** Las bacterias *Staphylococcus saprophyticus* son las causantes de la enfermedad del pico amarillo en las garrapatas de *R. microplus*. Esta infección, produce un exudado amarillento en las hembras del artrópodo, que bloquea el poro genital impidiendo la oviposición que resulta en la muerte de la garrapata (Miranda-Miranda *et al.*, 2010). Anaplasmosis: Esta infección es causada por *Anaplasma marginale*, una bacteria Gram negativa, que representa un serio problema en la productividad bovina (Kocan *et al.*, 2003). La carencia de componentes como el peptidoglicano (PGN) y lipopolisacáridos (LPS) en la pared celular de esta especie, genera una respuesta inmune celular que puede ser diferente a la convencional (Lin y Rikihisa, 2003). En el vector *R. microplus*, existen escasos reportes del papel de los péptidos antimicrobianos (AMP's), en la respuesta inmune del artrópodo. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la presencia de *A. marginale* en la garrapata, induce un aumento en los niveles de expresión de AMP's como Varisina y Microplusina (Young, 2004).

**Respuesta inmune en artrópodos.** El sistema inmune de los invertebrados presenta múltiples mecanismos, se componen por barreras estructurales, las cuales, constan de una cutícula protectora y epitelios de revestimiento que forman parte de las primeras líneas de defensa contra los patógenos. Por tanto, en garrapatas, así como en insectos y otros invertebrados, la hemolinfa contiene toda la maquinaria biológica que constituye la principal fuente inmunológica del organismo. Este sistema básicamente se divide en dos respuestas, una de tipo celular dirigida por los hemocitos, que reconocen, controlan y eliminan patógenos cuando han traspasado las barreras estructurales (Hoffmann, 2003; Strand, 2008), activando diversos mecanismos de defensa como la fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) (Palmer, 2002). Por otra parte, la respuesta inmune humoral consiste en moléculas efectoras solubles como lisozimas, defensinas, factores de coagulación, lectinas, glicoproteínas, proteasas e inhibidores de proteasas, y un vasto repertorio de AMP's (Sonenshine y Hynes, 2008; Iwanaga y Lee, 2005; Mcphee y Hancock, 2005; Taylor 2006;). En garrapatas, los AMP's son considerados componentes limitantes de la infección, multiplicación y transmisión de patógenos, inhibiendo la viabilidad de los microorganismos, son polipéptidos genéticamente codificados y sintetizados en los ribosomas que se almacenan en gránulos citoplasmáticos presentes en los hemocitos. Primordialmente, se sintetizan en el cuerpo graso y se liberan en la hemolinfa de manera rápida y efectiva, como consecuencia de la invasión por microorganismos. Al ser moléculas efectoras clave en la inmunidad innata, actúan generalmente ante una infección o mediante reconocimiento de componentes superficiales de microorganismos como el LPS y PGN generados por las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estos péptidos pueden ser clasificados en 3 clases de defensinas (Xiang, *et al.*, 2012; De la Fuente, *et al.*, 2001; Bulet, Hetru y Dimarcq, 1999): Péptidos lineales que forman  $\alpha$ -hélices sin residuos de cisteína, Péptidos cíclicos con residuos de cisteína y Péptidos con una representación excesiva en residuos de aminoácidos.

De acuerdo con esto, las defensinas forman parte de los tipos de péptidos antimicrobianos más estudiados, mostrando un arreglo conservado de residuos de cisteína Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, y Cys-3-Cys-6, los cuales, están unidos entre sí por tres puentes disulfuro que estabilizan la molécula y mantienen la estructura terciaria (Ganz, 2003). Asimismo, cuentan con un amplio espectro bactericida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, mediados por la interacción entre el péptido catiónico y la membrana aniónica de un microorganismo a causa de la atracción

electrostática. Este mecanismo se da por la formación de poros en la membrana por incorporación de los péptidos en la membrana, y su organización en poros, generando una lisis celular resultado del choque osmótico generado (Boman, 1995; Ogata, 1992; Miyakawa, 1996). Dentro de este grupo de defensinas podemos encontrar 2 péptidos antimicrobianos reportados para *R. microplus*, la Microplusina (presente en hemolinfa y huevos) (Fogaça *et al.*, 2004), y la Ixodicina (aislada de hemocitos) (Fogaça, *et al.*, 2006). El sistema de clasificación de los AMP's es un sistema que posibilita caracterizar los péptidos según su tamaño, estructura, propiedad y actividad antimicrobiana, así como, agrupar y calcular el número de péptidos ante la gran biodiversidad existente especie-específica. En general, los AMP's se componen de 12 a 50 aminoácidos, donde el 88.6 % son moléculas catiónicas por ser ricos en residuos de lisina, arginina e histidina, que son residuos básicos de carácter anfipático cuando el pH es menor o igual a 7 (Hancock, 2001). Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue caracterizar los mecanismos asociados a la respuesta inmune de *R. microplus* durante la infección con *Staphylococcus saprophyticus* y *Anaplasma marginale*.

## MATERIALES Y MÉTODO

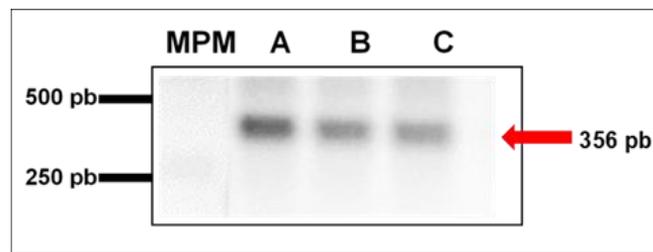
**Infección de garrapatas *R. microplus* con *S. saprophyticus* y *A. marginale*.** Para la expansión de la colonia de garrapatas se llevó a cabo una infestación de un bovino macho infectado con *A. marginale*, con 1g de huevos equivalente a 20,000 larvas de *R. microplus* susceptibles a ixodicidas (cepa Media Joya CA). La comprobación de la infección se realizó por amplificación de la secuencia del gen *msp5* de *Anaplasma*, a partir de DNA de carcas de garrapatas infectadas, mediante ensayos de PCR punto final. Asimismo, para las infecciones de garrapatas con *S. saprophyticus*, se llevó a cabo una infestación de un bovino hembra como lo descrito anteriormente, con un refuerzo de 0.5 g de larvas (10,000 larvas) de la misma cepa. A los 21 días post-infestación se llevó a cabo la recolección de garrapatas hembras ingurgitadas, y fueron lavadas con antibiótico/antimicótico e infectadas por baño en medio líquido selectivo en presencia de *S. saprophyticus*. Los controles internos fueron garrapatas ingurgitadas sin infección, pero tratadas bajo las mismas condiciones en presencia de medio selectivo. La confirmación de la presencia de la bacteria se llevó a cabo por la amplificación del gen 18s Ribosomal de *S. saprophyticus* por PCR punto final. Análisis *in silico*: actualmente, no se encuentra reportada la secuencia de Preprodefensina para *R. microplus*, por lo tanto, se realizaron análisis *in silico* por homología para la obtención de la secuencia. Una vez identificada la secuencia, se llevaron a cabo un análisis de BLASTn en 3 diferentes bases de datos con el fin de corroborar la identidad de la secuencia encontrada (todos los análisis *in silico* se realizaron en los servidores Pubmed, SwissProt y KEGG).

A partir de la secuencia obtenida se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen (Fw: 5'-TGCGGTCTTGTCTTCTGGACT-3', Rv: 5'-TTGATTAGGCCAGCGCAGTA-3'). Todas las extracciones de ácidos nucleicos, se realizaron por el método de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, y reactivo de Trizol, (DNA y RNA respectivamente), a partir de hemolinfa de garrapatas infectadas con bacterias patógenas (*A. marginale* y *S. saprophyticus*), y de los controles sin infección). Para la validación del gen constitutivo, se realizaron ensayos de PCR punto final y RT-PCR de la secuencia parcial del gen de la Fosfolipido-hidroperoxidasa glutatión peroxidasa (*phgpx*) de *R. microplus* (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2007). Para comprobar la presencia de la secuencia del gen de la Preprodefensina en el genoma de la garrapata *R. microplus*, se realizó un ensayo de PCR punto final, a partir de DNA de células embrionarias de *R. microplus*. La determinación de los niveles de expresión relativa de Preprodefensina, en garrapatas infectadas con diferentes bacterias patógenas, se realizó mediante RT-PCR, con los oligonucleótidos previamente mencionados. A partir de la secuencia obtenida, se realizaron modelajes en el programa

SwissModel para la predicción de la estructura tridimensional, junto con la validación estereoquímica y energética de la estructura de la molécula, además, por comparación de la estructura y composición del AMP, basada en la estructura básica de los péptidos antimicrobianos de insectos (Ganz, 2003). Para determinar las regiones conservadas de cisteínas, se realizó un análisis de alineamiento con el programa MUSCLE, a partir de secuencias previamente reportadas para *Drosophila melanogaster* (Ganz, 2003). Por otra parte, se realizó un análisis filogenético comparando secuencias de preprodefensina de otras especies con la de *R. microplus*. Todas las secuencias obtenidas, fueron alineadas mediante el programa *Muscle* del servidor ExPASy, y el análisis filogenético en el programa MEGA 7, resultando en un árbol filogenético con 500 *Bootstraps*, y un grupo externo, por el método de Máxima Verosimilitud y Jones-Taylor-Thornton.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

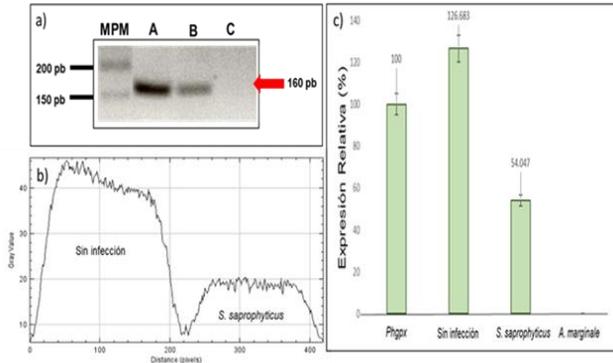
**Determinación de la presencia de Preprodefensina en el genoma de la garrapata *R. microplus* mediante PCR punto final.** La determinación de la presencia de la secuencia de la Preprodefensina, en el genoma de *R. microplus*, se realizó mediante un ensayo de PCR punto final. Los templados utilizados, son el resultado de tres diferentes extracciones de ADN genómico, obtenido a partir de tres cultivos de células embrionarias de *R. microplus* de la cepa Media joya. Los resultados de la PCR mostraron amplificación de una banda de aproximadamente 356 pb, en las tres diferentes extracciones de ADN realizadas (Fig. 1)



**Figura 1.** PCR para determinar la presencia de la secuencia del gen de la Preprodefensina en el genoma de *R. microplus*. Se observan tres bandas de aproximadamente 356 pb. Los carriles A, B y C corresponden a ADN genómico extraído de tres diferentes muestras. MPM: corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb.

**Determinación de los niveles de expresión relativa de Preprodefensina mediante RT-PCR.** La determinación de la expresión relativa de la Preprodefensina en hemolinfa, con las bacterias patógenas *A. marginale* y *S. saprophyticus*, y sin infección (control), mostraron una banda de 160 pb, con expresión relativa diferencial (Fig. 2, panel a). Cabe resaltar, que esta expresión se ve aumentada en la condición donde no existe ninguna infección, en contraste con las garrapatas infectadas con *A. marginale*, donde no se observa expresión del mensajero (Fig. 2, panel a). Así mismo, en los tratamientos con *S. saprophyticus*, se observa menor expresión relativa en comparación con los controles, pero mayor, que la observada en las infecciones con *A. marginale* (Fig. 2. panel a). Los análisis densitométricos de los amplicones obtenidos, se normalizaron con el gen constitutivo *phgpx*. Los resultados mostraron, un porcentaje de expresión relativa en hemolinfa de garrapatas sin infectar (control) de 126.683% (Fig. 2, panel c), mientras que, en la hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus*, se observó una disminución de 2.3 veces el porcentaje de expresión relativa, quedando en 54.047% (Fig. 2, panel c). Interesantemente, en hemolinfa de garrapatas infectadas con *A. marginale*, no existe presencia de expresión del péptido (Fig. 2, panel c). Adicionalmente, los resultados del *plot profile*, revelan una marcada variación en la intensidad

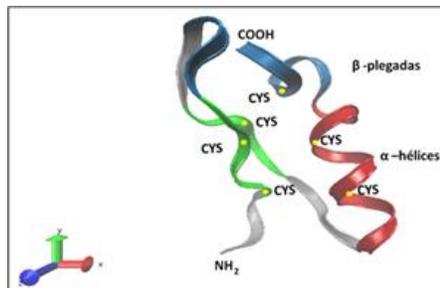
de los amplicones, en hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus* y *A. marginale* (Fig. 2, panel b).



**Figura 2.** Expresión relativa de Preprodefensina expuesta a *S. saprophyticus* y *A. marginale* mediante ensayos de RT-PCR. Panel a) carril A: expresión relativa en hemolinfa sin infectar (control); carril B: expresión relativa en hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus*; carril C: expresión relativa en hemolinfa de garrapatas infectadas con *A. marginale*; MPM: marcador de peso molecular 50 pb.

Todos los amplicones obtenidos presentan un peso de 160 pb. Panel b) *plot profile* (Image j), muestra la variación de intensidad de las bandas correspondientes a hemolinfa de garrapatas sin infección, y hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus*. Panel c) hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus* y *A. marginale*. La gráfica muestra expresiones relativas diferenciales entre el control constitutivo (*phgpx*) y los experimentales de las diferentes infecciones en hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus* y *A. marginale*.

**Análisis estructural de Preprodefensina.** La validación estereoquímica y energética de la estructura 3D (Z-score, Local Quality Estimate y Comparison PDB structures), mostró valores dentro de los parámetros establecidos para la calidad del modelo estimado. Interesantemente, los resultados muestran regiones altamente conservadas, con el patrón clásico Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, y Cys-3-Cys-6, descrito en otros AMP's presentes en insectos (Ganz, 2003) (Fig. 3). Con base a la estructura conservada de los AMP's reportados en insectos, se realizó un análisis, para demostrar el arreglo espacial de cisteínas presentes en la Preprodefensina (Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, y Cys-3-Cys-6). Los resultados de los alineamientos de las secuencias homólogas mostraron regiones de cisteínas altamente conservadas, como las presentes en *D. melanogaster*. (Fig. 4).

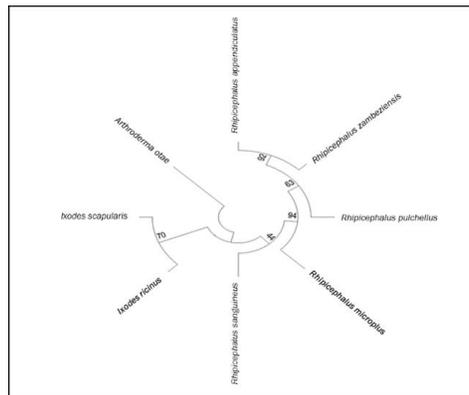


**Figura 3.** Predicción de estructura 3D de Preprodefensina, con el programa *Swiss-Model* y *VMD 1.9.3*. El modelo muestra la presencia de  $\beta$ -plegadas y  $\alpha$ -hélices, con 6 residuos de cisteínas conservados en la familia de las defensinas, (arreglo Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, y Cys-3-Cys-6).

1. <i>Drosophila melanogaster</i>	C	D	L	L	S	K	W	N	N	H	T	A	C	A	G	H	C	I	A	K	G	F	K	G	G	Y	C	N	D	-	-	K	A	V	C	V	C	-	R	N			
2. <i>Amblyomma cajennense</i>	C	P	F	-	-	-	-	-	-	-	-	N	Q	G	A	C	H	N	H	C	R	S	I	R	R	R	G	G	Y	C	A	G	L	F	K	Q	T	C	T	C	Y	R	N
3. <i>Haemaphysalis longicornis</i>	C	P	L	-	-	-	-	-	-	-	-	N	Q	G	A	C	H	R	H	C	R	S	I	R	R	R	G	G	Y	C	S	G	I	I	K	Q	T	C	T	C	Y	R	N
4. <i>Rhipicephalus microplus</i>	C	P	F	-	-	-	-	-	-	-	-	N	Q	G	A	C	H	R	H	C	R	S	I	R	R	R	G	G	Y	C	A	G	L	I	K	Q	T	C	T	C	Y	R	N
5. <i>Ixodes ricinus</i>	C	P	F	-	-	-	-	-	-	-	-	N	Q	G	A	C	H	R	H	C	R	S	I	G	R	R	G	G	Y	C	A	G	F	L	K	Q	T	C	T	C	Y	R	S

**Figura 4.** Análisis del arreglo espacial de residuos de cisteína con el programa MEGA 7. Se muestra, el alineamiento de cinco secuencias homólogas a la Preprodefensina de *R. microplus*, alineadas con la secuencia de *D. melanogaster*. El cuadro rojo indica el arreglo espacial Cys-1-Cys-4, Cys-2-Cys-5, y Cys-3-Cys-6 presente en la mayoría de los AMP's.

**Análisis Filogenético.** Para determinar las distancias evolutivas entre las diferentes secuencias del péptido, se realizó un análisis de máxima verosimilitud con el método evolutivo de Jones-Taylor-Thornton (JTT), con un bootstrap de 500 y utilizando como grupo externo la secuencia de *Arthroderma otae* (tr|IIT3C7|IIT3C7\_ARTOT). El árbol filogenético (Fig. 5) muestra la secuencia de *R. microplus* como grupo monofilético, dentro un grupo donde se encuentra *R. pulchellus*, *R. appendiculatus*, *R. zambeziensis*, y un grupo hermano donde se agrupa *R. sanguineus*.



**Figura 5.** Análisis Filogenético de la secuencia de la Preprodefensina de *R. microplus* mediante un análisis de Máxima Verosimilitud y el método evolutivo de Jones-Taylor-Thornton. La imagen muestra un árbol filogenético con un bootstrap de 500. Los números cercanos a los nodos muestran los replicados del bootstrap. Como grupo externo se utilizó la secuencia de *Arthroderma otae* (tr|IIT3C7|IIT3C7\_ARTOT).

Nuestros resultados muestran el análisis de expresión relativa de la Preprodefensina, en diversas condiciones, que resulta un gran avance en la biología de la garrapata de ganado bovino *R. microplus*. En este trabajo, se muestra por primera vez el papel de Preprodefensina como mediador de la respuesta inmune de la garrapata, como resultado a la exposición a dos bacterias patógenas con fenotipos y ciclos biológicos diferenciales. Uno mediado por la presencia de una bacteria gram positiva (*S. saprophyticus*), altamente patógena para la garrapata, y otra, gram negativa (*A. marginale*), bacteria transmitida por *R. microplus* al bovino. Interesantemente, ambas bacterias son capaces de generar una respuesta inmune, donde la Preprodefensina presenta un patrón de expresión diferencial, apoyando la idea de la alta plasticidad que presenta la respuesta inmune de los artrópodos, donde se ha observado que, dependiendo del patógeno, es el tipo de respuesta que se monta. Adicionalmente, la estructura terciaria de la Preprodefensina, confirma el arreglo espacial de los residuos de cisteína clásico (cys-1-cys-4, cys-2-cys-5, y cys-3-cys-6) presentes en los AMP's de los insectos. Finalmente, los análisis filogenéticos demostraron la cercanía evolutiva de la Preprodefensina de *R. microplus* con secuencias presentes en otros géneros de garrapatas, agrupadas en un solo clado, y con altos valores de bootstrap. Los resultados de este trabajo, contribuyen al avance en el conocimiento y dilucidación de las interacciones vector-patógeno, abriendo la posibilidad de la búsqueda de nuevos blancos, que coadyuven al avance en el desarrollo de nuevas estrategias, para el control integrado de plagas.

## CONCLUSIONES

Se determinó por primera vez la presencia del gen de Preprodefensina en el genoma de *R. microplus*. La expresión relativa del ARNm de Preprodefensina mostró que se expresa de forma basal en hemolinfa de garrapatas sin infección, se mantiene en hemolinfa de garrapatas infectadas con *S. saprophyticus*, y está ausente en hemolinfa de garrapatas infectadas con *A. marginale*.

Se comprobó el arreglo espacial de los residuos de cisteína según lo que describe Ganz en el 2003. La secuencia de la Preprodefensina de *R. microplus* muestra cercanía evolutiva con las de otros géneros de garrapatas.

## AGRADECIMIENTOS

El siguiente trabajo se realizó en el laboratorio de Artropodología del CENID-PAVET del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, con apoyo de INIFAP FONDOS FISCALES, No. de Proyecto SIGI 13512934133. Karina Salazar Morales agradece a la Universidad Politécnica del Estado de Morelos.

## LITERATURA CITADA

- Boman, HG. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*, 13:61-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.000425>.
- Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.L. y D. Hoffmann. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*. 23(4-5): 329-344. PMID:10426426.
- De la Fuente J., Garcia-Garcia J.C., Blouin E.F. y K. M. Kocan. 2001. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *International Journal of Parasitology*. 31(14): 1705-1714, <https://doi.org/10.1017/S0031182003004700>.
- Fogaça A.C., Almeida I.C., Eberlin M.N., Tanaka A.S., Bulet P. y S. Daffre. 2006. Ixodidin a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity on serine proteinases. *Peptides*. 27(4): 667-674. DOI: 10.1016/j.peptides.2005.07.013.
- Fogaça A.C., Lorenzini D.M., Kaku L.M., Esteves E., Bulet P. y S. Daffre. 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Development & Comparative Immunology*. 28(3): 191-200. PMID: 14642886.
- Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3,710. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Hancock, R.E.W. 2001. Cationic peptides: effector in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infectious Diseases*. 1(3): 156-164. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00092-5.
- Horak IG, Camicas JL y JE Keirans. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol*. 28(1-4):27-54. PMID: 14570115
- Kocan KM, de la Fuente J., Guglielmone, A.A. y Meléndez 2003. Antigenes and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(4): 698-712. PMID:14557295
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M., y A. F. Azad. 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second Rickettsia. *Journal of medical entomology*, 39(6):809-813. DOI: 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003.
- Miranda-Miranda, E., Cossio-Bayugar, R., Del Rosario Quezada-Delgado, M., Sachman-Ruiz, B., y E. Reynaud. (2010). *Staphylococcus saprophyticus* is a pathogen of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Biocontrol Science and Technology*, 20(10):1055–1067. PMID: 12495176.
- Young N.Y. y M.R. Yeaman. 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(19): 7363-7368. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/675391>