



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**RESISTENCIA GENÉTICA A *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*  
EN BOVINOS DE RAZA CRIOLLO ARGENTINO**

**Autor:** Ing. Zoot. Ortega Masagué, María Florencia

**Director:** Dr. Giovambattista, Guillermo

**Codirector:** Dr. Cutullé, Christian

**LUGAR DE TRABAJO:** Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido  
(IIACS-CIAP). INTA Leales, Tucumán. Argentina.

**Miembros del jurado**

**Dr. CORVA, Pablo**

**Dr. LIRÓN, Pedro**

**Dra. IGLESIAS, Gabriela**

**AÑO 2021**

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica:  
la voluntad” – Albert Einstein.*

*A mis hijas: Cande y Juli*

## **Agradecimientos**

Agradezco a las personas que, con su apoyo y colaboración, me acompañaron e hicieron posible el desarrollo de este trabajo:

A mis directores Dr. Guillermo Giovambattista y Dr. Christian Cutullé por su confianza, disposición y enseñanzas a nivel profesional y personal. A los miembros del jurado, Dr. Pablo Corva, Dr. Pedro Lirón y Dra. Gabriela Iglesias, por aceptar ser revisores de este trabajo y dedicar tiempo para las evaluaciones anuales y final.

Al programa de posgrado del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), cuya financiación posibilitó el desarrollo de esta tesis en el Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS). Al Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET-UNLP), y su amable grupo de investigadores, que permitió el progreso del trabajo y el aprendizaje de técnicas.

A la Asociación Argentina de Criadores de Ganado Bovino Criollo, en especial a Alicia Rabasa y Fernando Holgado, por el impulso para comenzar a trabajar en la raza, su estímulo y cariño.

A Martín Bonamy, docente de la Facultad de Cs. Veterinarias (UNLP) por su ayuda, sugerencias y paciencia y a Daniel Do Santos de la Facultad de Cs. Naturales (UNT) por su colaboración estadística.

A mis ayudantes de a caballo, Agustín y Lino, por su apoyo y colaboración. Sin ellos no hubiese sido posible haber llevado adelante este trabajo de tesis.

Finalmente, a mis hijas por su comprensión, amor y ayuda.

## Publicaciones parciales

### TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS PERIÓDICAS

1. Ortega Masagué, M. F., Pereira Rico, J. A., Loza Vega, A., & Giovambattista, G. (2020). Diversidad genética y estudios de asociación en genes de clase II del complejo principal de histocompatibilidad en bovinos Criollos americanos. Archivos Latinoamericanos De Producción Animal, 28(3-4), 121-132.

### RESÚMENES PRESENTADOS EN CONGRESOS

1. Ortega Masagué, M.F.; Holgado, F.; Giovambattista, G; Cutullé, C. 2018. Effect of genetic resistance in argentine Creole cattle on biological parameters of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Congreso Internacional de Medicina Veterinaria Tropical. 2° Reunión AITVM-STVM Meeting Animal Health in the Tropics: Building the puzzle from research to application. Hotel Panamericano, Buenos Aires, Argentina. 23 al 28 de septiembre de 2018.
2. Ortega Masagué, M.F.; Holgado, F. 2017. Resistencia genética a garrapata común del bovino en reproductores de raza Criollo Argentino. XLVI Congreso Argentino de genética y IV Jornada regional NOA. 2, 3 y 4 de octubre de 2017. Catamarca, Argentina. *Seleccionado para exposición oral de la sección Mejoramiento Animal.*

## Índice de contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 HIPÓTESIS .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
<b>2. RESEÑA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>8</b>
2.1 Garrapata común del bovino .....	8
2.2 Métodos de control de la garrapata común del bovino .....	12
2.3 Bovino Criollo Argentino .....	15
2.4 Resistencia genética del hospedador .....	19
2.5. Estudios de asociación genética .....	22
<b>3. CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>26</b>
3.1 Introducción.....	27
3.2 Materiales y Métodos .....	30
3.3 Resultados y discusión.....	35
3.4 Conclusiones.....	45
<b>4. CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>47</b>
4.1 Introducción.....	48
4.2 Materiales y métodos .....	52
4.3 Resultados y discusión.....	56
4.4 Conclusiones.....	73
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>80</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>81</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>114</b>

## RESISTENCIA GENÉTICA A *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* EN BOVINOS DE RAZA CRIOLLO ARGENTINO

**Palabras claves:** Garrapatas - Microarray - ADN - Genómica - *Bos taurus*

### Resumen

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es un ectoparásito habitual de los vacunos en regiones tropicales y subtropicales de Argentina, provocando una considerable disminución en los índices de producción. Su control se realiza principalmente a través de la aplicación de acaricidas químicos; siendo el desarrollo de garrapatas resistentes a sus efectos tóxicos el mayor inconveniente asociado a su utilización. La cría de animales resistentes al parásito es un método sustentable de producción que contribuye a reducir la aplicación de biocidas. El bovino Criollo Argentino representa una población que ha sufrido un proceso de selección natural durante muchos años, obteniéndose una raza capaz de producir en ambientes desfavorables. El objetivo de este trabajo fue identificar variaciones fenotípicas individuales en las cargas de *R. (B.) microplus* en bovinos Criollo Argentino y detectar regiones cromosómicas asociadas utilizando microarrays de mediana y alta densidad. Datos de conteo de garrapatas fueron obtenidos luego de infestaciones artificiales sucesivas en 231 animales. Se tomaron muestras de sangre para extraer ADN y se genotipificaron 192 animales utilizando los microarrays de Affymetrix (Bos 1 y ArBos). Luego del control de calidad, y para un total de 4227 animales incluidos en el pedigrí, se obtuvieron 48210 polimorfismos de un solo nucleótido comunes a ambos microarrays que fueron utilizados para el análisis. De manera exploratoria, se reconocieron regiones cromosómicas que contienen *loci* de rasgos cuantitativos en los cromosomas 27, 11, 10, 9, 16, 13, 3, 19, 8 y 18. Los resultados obtenidos permiten clasificar a la raza como de resistencia elevada a la carga de *R. (B.) microplus*, siendo una alternativa atractiva para el desarrollo de la ganadería en las regiones endémicas para el mencionado ectoparásito. Futuros estudios de variación genética y expresión génica

de genes candidatos presentes en las regiones detectadas permitirán el desarrollo de bioindicadores de resistencia a la infestación.

## GENETIC RESISTANCE TO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* IN ARGENTINE CREOLE BREED CATTLE

**Key words:** Ticks - Microarray - DNA - Genomics - *Bos taurus*

### Abstract

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a common ectoparasite of cattle in tropical and subtropical regions of Argentina, causing a considerable decrease in livestock production. Its control is carried out mainly through the application of chemical acaricides; the development of ticks resistant to its toxic effects being the major drawback associated with its use. The breeding of animals resistant to the parasite is a sustainable method of production that contributes to reducing the application of biocides. The Argentine Creole cattle represents a population that has undergone a process of natural selection for many years, obtaining a breed capable of producing in unfavorable environments. The objective of this work was to identify individual phenotypic variations in *R. (B.) microplus* burden in Argentine Creole cattle and to detect associated chromosomal regions using medium and high density microarrays. Tick count data was obtained after successive artificial infestations in 231 animals. Blood samples were taken to extract DNA and 192 animals were genotyped using the Affymetrix microarrays (Bos 1 and ArBos). After quality control, and for a total of 4227 animals included in the pedigree, 48210 single nucleotide polymorphisms common to both microarrays were obtained and used for the analysis. In an exploratory way, chromosomal regions containing loci of quantitative traits were recognized on chromosomes 27, 11, 10, 9, 16, 13, 3, 19, 8 and 18. The results obtained allow classifying the breed as resistance elevated to the burden of *R. (B.) microplus*, being an attractive alternative for the development of livestock in endemic regions for the aforementioned ectoparasite. Future studies of genetic variation and gene expression of candidate genes present in the detected regions will allow the development of bioindicators of resistance to infestation.



## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las regiones ganaderas de ambientes tropicales y subtropicales se caracterizan por presentar elevadas temperaturas y alta radiación solar. Adicionalmente, las fluctuaciones estacionales en la producción de forraje y la infestación por parásitos determinan que la explotación comercial bovina dependa en gran medida del potencial de producción de los animales y de su capacidad de adaptación al medio. En este sentido, es fundamental para el sector ganadero del país la adecuación de los recursos genéticos, condiciones ambientales y de mercado en búsqueda de una mayor competitividad (Lobo Arias y Medina Cano, 2009; Alencar y col., 2005). En la actualidad, la ganadería de carne bovina se encuentra en tensión entre la producción y el impacto ambiental, lo que se espera se profundice en los próximos años. Para la próxima década se estima un aumento anual de 1,36 % en la producción global y de 2,23 % en el comercio internacional de carne bovina (OECD/FAO, 2016). En el eslabón primario será necesario enfocarse en la “intensificación sostenible” de la producción, buscando producir más alimentos con la misma superficie de tierra y, al mismo tiempo, reducir externalidades ambientales y sociales bajo un planteo productivo rentable. El incremento en la producción estará localizado principalmente en países en vías de desarrollo (79%), con una contribución significativa de la Argentina (Feldkamp, 2019). En este sentido, como parte para abastecer las demandas en productos de origen animal de manera intensificada, cada vez se utilizan un menor número de razas. En muchas especies, los recursos genéticos locales se han cruzado de manera indiscriminada con razas exóticas, provocando la reducción o extinción de razas localmente adaptadas o nativas (Núñez-Domínguez y col., 2016). De acuerdo con datos del primer informe mundial sobre la situación de los recursos zoogenéticos, más del 90 % de la producción agropecuaria mundial la aportan 15 especies, reportándose 7616 razas de animales usadas para la alimentación y la agricultura, y encontrándose una cuarta parte de ellas en peligro de extinción (FAO, 2007).

Las infestaciones parasitarias (endo y ectoparásitos) producen una considerable disminución en los índices de producción animal. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, conocido vulgarmente como la garrapata común del bovino, es un ectoparásito artrópodo de la familia Ixodidae que se presenta de manera habitual en los vacunos de ciertas regiones de Argentina (Estrada Peña y col., 2006). Este parásito de distribución pantropical constituye una gran restricción a la productividad ganadera en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Jongejan y Uilenberg, 2004; De la Fuente y col., 2008), produciendo severas pérdidas económicas (Späth y col., 1994; de Castro, 1997; Jonsson y col., 2001). Esto fue entendido por el gobierno argentino de tal manera que aprobó y llevó adelante una campaña de erradicación del parásito (Ley N° 12.566) a partir de 1938. Recientemente, la actualización del marco normativo (Resolución 382/2017) se adecúa a los nuevos escenarios, problemáticas y exigencias referidas al control y/o erradicación de la garrapata común del bovino en el país.

El ciclo biológico de *R. (B.) microplus* presenta una fase parasitaria de aproximadamente 23 días, en la que los estadios de larva, ninfa y adulto se desarrollan sobre un único hospedero. La fase no parasitaria comienza cuando una garrapata hembra adulta se desprende del bovino y cae al suelo para poner sus huevos. La cantidad de ciclos anuales estará determinada por la duración de la fase no parasitaria, que es influenciada por factores abióticos como la temperatura y la humedad del ambiente (Guglielmone y col., 1983, 1990; Guglielmone y Nava, 2013).

Entre las pérdidas físicas directas de mayor importancia provocadas por este ectoparásito se pueden mencionar: disminución en la ganancia de peso, anemia provocada por hematofagia, desvalorización del cuero por la ocurrencia de lesiones y miasis y menor producción láctea (Jonsson, 2006); y otras asociadas a la transmisión de enfermedades, ya que *R. (B.) microplus* es el vector exclusivo de los agentes causales de la babesiosis bovina provocada por *Babesia bovis* y *B. bigemina* (Jongejan y Uilenberg, 2004). A nivel mundial, los

costos anuales provocados por este parásito son de alrededor de 22–30 billones de dólares (Lew-Tabor y Rodríguez Valle, 2016).

El uso de acaricidas químicos posee un rol indispensable en el control de *R. (B.) microplus*. Sin embargo, puede causar residuos en la carne y la leche, llegando a comprometer la seguridad alimentaria. Además, el uso indiscriminado de garrapaticidas determina la aparición de poblaciones de ectoparásitos resistentes a sus efectos químicos, generando grandes gastos con tratamientos ineficaces y la necesidad de altas inversiones para descubrir nuevos fármacos.

Para dar respuesta a la demanda de productos de alta calidad y logrados en forma sustentable en regiones tropicales y subtropicales, la selección de bovinos resistentes a *R. (B.) microplus* se ha tornado en un método alternativo de control no químico. De acuerdo a lo indicado por Shyma y col. (2015) el ganado seleccionado por su resistencia a las garrapatas ha logrado un progreso significativo con el desarrollo de razas resistentes a las mismas, y al mismo tiempo, con una buena productividad. En Australia ha sido indicado que la selección de ganado bovino resistente a garrapatas como estrategia de control se utiliza con buena eficiencia (Biegelmeier y col. 2012). En los últimos años ha sido ampliamente promovido a nivel mundial el concepto de control estratégico de garrapatas, que incluye combinaciones de productos acaricidas, manejo ambiental, vacunas contra antígenos de *R. (B.) microplus*, medidas de control biológico y utilización de razas (puras o compuestas) con resistencia natural a garrapatas (Jonsson y Piper, 2007; Shyma y col., 2015).

La resistencia natural del hospedador a un patógeno está referida a todos aquellos mecanismos que contribuyen en provocar una disminución de su efecto perjudicial sobre el animal. Una definición más específica de resistencia se refiere a los cambios bioquímicos y fisiológicos en el huésped que impiden el establecimiento adecuado del parásito, su supervivencia y/o desarrollo (Detilleux, 2005). En este sentido, la resistencia genética del hospedador además de afectar el número de garrapatas que se fijan sobre él, tiene efecto

diferencial sobre la duración de la fase de alimentación del parásito y por lo tanto sobre el peso de desprendimiento de las hembras ingurgitadas, lo que se traducirá en una menor descendencia.

Se conoce que la resistencia a la infestación por garrapatas está determinada genéticamente y ocurre debido a un conjunto complejo de respuestas. Sin embargo, los mecanismos específicos y su importancia continúan siendo objeto de discusión (Tabor y col., 2017). Luego de la exposición de los animales a infestaciones, diferentes estudios han asociado fenotipos de resistencia a mecanismos inmunológicos adquiridos (Kashino y col., 2005; Piper y col., 2009). Los mecanismos de defensa desarrollados por los hospederos incluyen vías efectoras como anticuerpos, sistema de complemento y células, y vías regulatorias como citocinas, células presentadoras de antígenos y linfocitos T (Lamoreaux y col., 2000; Valenzuela, 2005). Parte de la especificidad de la interfaz garrapata-huésped y del éxito reproductivo de la garrapata se explica por la complementariedad entre los componentes de la saliva de una determinada especie de garrapata y los componentes de las defensas inflamatorias, hemostáticas e inmunitarias de su huésped. En este contexto, el éxito del ciclo de vida de *R. (B.) microplus* depende de la raza del huésped bovino del que se alimenta (García y col., 2020).

Varios estudios han estimado la heredabilidad de la característica de resistencia a garrapatas, mostrando una amplia variabilidad entre distintas poblaciones, con valores de baja a alta magnitud que oscilan alrededor de 0,30 (Porto Neto y col., 2011). La gran variación en las estimaciones probablemente se deba a la diferencia en los métodos de infestación (natural o artificial), los modelos y métodos de análisis estadístico empleados, el control ambiental y las características intrínsecas de las poblaciones evaluadas. A pesar de esto, la información reportada demuestra que la heredabilidad de este carácter es lo suficientemente alta como para ser incorporada exitosamente en los programas de selección.

Evidencias paleontológicas, antropológicas e históricas indican que el ganado bovino fue introducido por primera vez en el continente americano por los conquistadores españoles. Cristóbal Colón incorporó los primeros bovinos en el Nuevo Mundo cuando en su segundo viaje (1493) desembarcó en la isla La Española (en la actualidad Haití y República Dominicana) (Giovambattista y col., 2010). La distribución de estos se extendió hasta el virreinato del Río de la Plata en Argentina, de la mano del conquistador Juan Núñez del Prado en 1549 (Sal Paz, 1986). En el transcurso de unos pocos años, y debido a su muy buena adaptación a las nuevas condiciones ambientales, la población aumentó con rapidez y ocupó gran parte del territorio nacional. Félix de Azara (Carrazzoni, 1998) estima que hacia 1780 existía un total de 42 millones de cabezas. En este sentido, el Criollo Argentino (*Bos taurus* de origen ibérico) fue el único recurso genético bovino presente en América durante más de 300 años. A partir de su introducción, la selección natural actuó sobre estos individuos conservando genotipos favorables a la resistencia a diversos factores bióticos y abióticos y perpetuando durante numerosas generaciones una gran variabilidad genética. Las razas criollas presentan un alto nivel de adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales, destacándose en regiones marginales donde las razas comerciales altamente seleccionadas evidencian una menor eficiencia productiva. Entre los factores de adaptación que presentan estas razas nativas, es mencionada la resistencia a enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y endo o ectoparásitos (leucosis, dermatofilosis, mastitis, babesia, garrapatas, etc.) (Ortega Masagué y col., 2020).

En Argentina, los rodeos vacunos en las regiones del noroeste (NOA) y noreste (NEA) están constituidos básicamente por las razas sintéticas Braford y Brangus (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) que combinan rusticidad y capacidad de adaptación con fertilidad y calidad carnicera. En ganadería, el término adaptación describe la habilidad manifestada por un determinado genotipo para adecuarse a las condiciones ambientales, sin que su producción se vea afectada o lo sea en el menor grado posible dentro de sus características

productivas (Turner, 1980). Las diferentes presiones de selección a las que fueron sometidos los bovinos a lo largo del proceso evolutivo son responsables de muchas de las diferencias fenotípicas y fisiológicas observadas en los biotipos raciales actuales.

En la especie bovina muchos genes han sido asociados a resistencia/susceptibilidad a diferentes enfermedades infecciosas, a variación en la respuesta inmune y a la respuesta a la vacunación (Takeshima y Aida, 2006). La detección y el mapeo de genes se realiza generalmente mediante el estudio de asociación de todo el genoma (*Genome wide association studies*, GWAS). Estos estudios utilizan tecnologías de genotipado para analizar los polimorfismos de un solo nucleótido (*Single nucleotide polymorphisms*, SNPs) y relacionarlos con las características de interés (Pearson, 2008). El GWAS clásico, y de uso más frecuente, se basa en el análisis de un marcador único, tratado como una covariable en el modelo, y prueba su asociación estadística con la característica evaluada (Hirschhorn y Daly, 2005). Sin embargo, este enfoque no permite la inclusión directa de información fenotípica de individuos no genotipados (Wang y col., 2012). El GWAS de un solo paso (*Single step*, ssGWAS) es un método que considera todos los marcadores simultáneamente en el modelo y estima los efectos de SNPs a través de estimaciones genómicas. Además, considera toda la información fenotípica, genotípica y de pedigrí (Wang y col., 2012) a través del uso de la matriz H, que combina el pedigrí y las relaciones genómicas (Aguilar y col., 2010, 2018). La familia de programas BLUPF90 es una colección de software en Fortran 90/95 para cálculos de modelos mixtos en mejoramiento animal. El objetivo del mismo es ser tan simple como un paquete matricial, y tan eficiente como un lenguaje de programación (Masuda, 2018). El análisis de GWAS es solo el primer paso en el proceso para encontrar variantes causales de la resistencia genética a garrapata común del bovino en la raza Criollo Argentino y estudios adicionales son necesarios para validar estos resultados.

El factor limitante para que los programas de mejoramiento genético animal incluyan la resistencia a enfermedades es la necesidad de medir los fenotipos. Esto puede ser costoso y

logísticamente difícil, y es una barrera significativa para la selección de animales en base a su comportamiento frente a las enfermedades. Por esta razón, las características de resistencia a la enfermedad son un motivo atractivo para los estudios genómicos y generalmente son objeto de estos análisis (Fioravanti y col., 2020).

## 1.1 HIPÓTESIS

La raza de bovinos Criollo Argentino presenta variaciones en los niveles de resistencia a la infestación por *R. (B.) microplus*, manifestándose como diferencias en las cargas parasitarias. A nivel genómico, estas variaciones permitirían identificar regiones cromosómicas asociadas a esta característica cuantitativa.

## 1.2 OBJETIVOS

### *General*

- Analizar la susceptibilidad/resistencia a *R. (B.) microplus* en bovinos de raza Criollo Argentino pertenecientes al rodeo del Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS).

### *Específicos*

- Identificar variaciones fenotípicas individuales en las cargas parasitarias de *R. (B.) microplus* en bovinos de raza Criollo Argentino.

- Detectar regiones cromosómicas mediante un estudio de asociación genómica utilizando los animales identificados previamente como susceptibles y/o resistentes a *R. (B.) microplus* y microarrays de mediana y alta densidad.

## 2. RESEÑA BIBLIOGRÁFICA

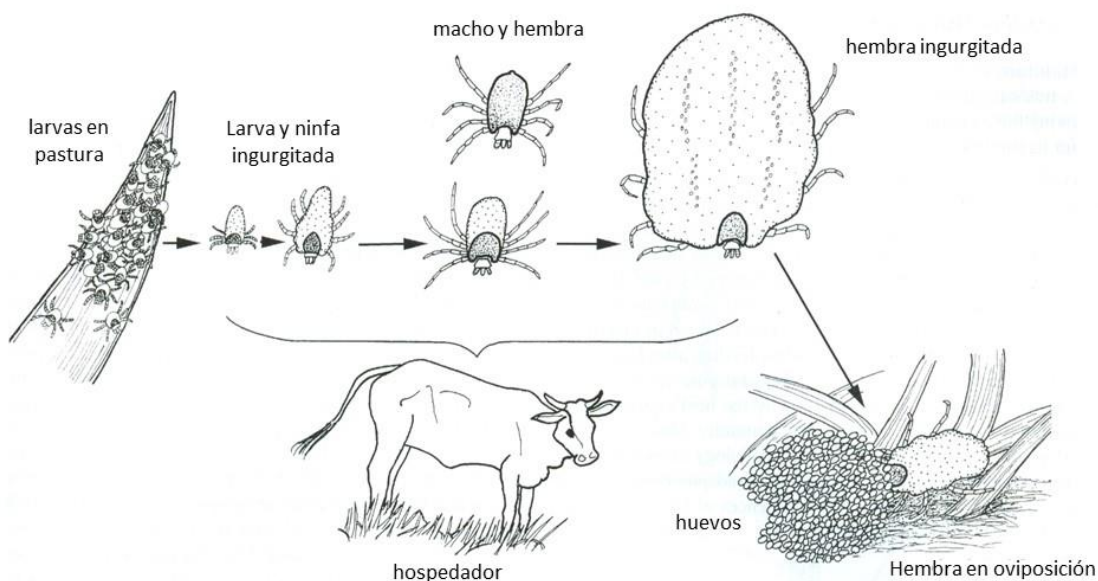
### 2.1 Garrapata común del bovino

*R. (B.) microplus*, conocido vulgarmente como garrapata común del bovino, es un ectoparásito hematófago que pertenece al Phylum Arthropoda, Clase Arachnida, Subclase Acari, Superorden Parasitiformes, Orden Ixodida, Superfamilia Ixodaidea (Krantz y Walter, 2009). Dentro de la familia Ixodidae, con 722 especies descritas, *R. (B.) microplus* pertenece al grupo de garrapatas duras (género *Ixodes*) (Nava y col., 2017). La garrapata *R. (B.) microplus* se adapta perfectamente a climas de áreas tropicales y subtropicales, donde el calor y la humedad propician condiciones favorables para la supervivencia y mantenimiento de la especie.

La garrapata común del bovino posee un ciclo biológico de un solo hospedador, donde los tres estadios parasitarios (larva, ninfa y adultos de ambos sexos) se alimentan, mudan y copulan sobre un mismo individuo (Figura 1). El ciclo de *R. (B.) microplus* se divide en dos fases: una fase parasitaria, en la cual la garrapata se desarrolla sobre el bovino, y una fase no parasitaria o de vida libre (Nava y col., 2011). A su vez, la fase no parasitaria se subdivide en diferentes períodos: la pre-oviposición de la hembra ingurgitada (teleogina) corresponde al espacio de tiempo desde que se desprende del animal hasta que pone el primer huevo, con una duración de 2 a 6 días (Nava y col., 2013). Luego, el lapso de tiempo desde la postura del primer huevo hasta el último se denomina período de oviposición, siendo el número habitual de huevos colocados de entre 2000 y 3000. Finalmente, el período que transcurre desde la oviposición hasta el nacimiento de las larvas se denomina de incubación, con una duración que puede variar entre 20 y 45 días, dependiendo principalmente de la temperatura y humedad ambiental (Canevari y col., 2017). Cuando las larvas que se encuentran en la vegetación acceden a un bovino, da comienzo la fase parasitaria que, a diferencia de la fase no parasitaria, es escasamente influida por las condiciones ambientales. Una vez sobre el



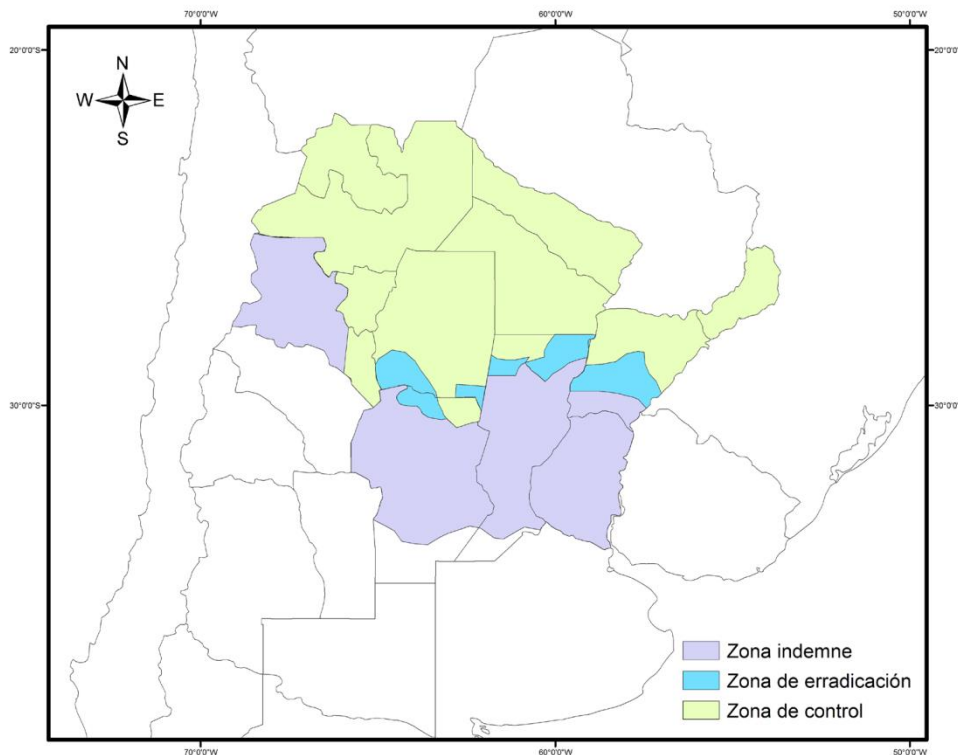
bovino, las larvas se alimentan (3 a 5 días) y mudan a ninfas. Estas continúan con su alimentación y hacia el día 9 a 12 aproximadamente, se ingurgitan, mudando sobre el hospedador a adultos (machos y hembras). Luego de la cópula, las hembras continúan ingurgitándose y finalmente caen al suelo para desovar. La duración modal de la fase parasitaria completa es de 23 días (Nava y col., 2011).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fuente: Modificado de Walker y col. (2003).

En Argentina, la garrapata común del bovino se distribuye principalmente en zonas tropicales y subtropicales del noreste (NEA) y noroeste (NOA) ubicadas al norte de los paralelos 30°-31° S, con excepción de la región andina. Se la encuentra en las provincias de Salta, Tucumán, Jujuy, Santiago del Estero, Santa Fe (al norte del paralelo 30° S), Córdoba, Catamarca, Formosa, Misiones, Corrientes y Chaco (Figura 2). La distribución de la garrapata en Argentina está relacionada a dos factores ambientales, el déficit hídrico y las temperaturas. En este sentido, la presencia de la garrapata requiere de inviernos benignos (mayoría de los

meses con temperaturas superiores a 14,5 °C) y déficit hídrico bajo (climas relativamente húmedos).



**Figura 2.** Zonificación del país en relación al plan de lucha contra la garrapata común del bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fuente: Nava y col. 2011.

El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa), dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación es el responsable de planificar, organizar y ejecutar los programas y planes específicos que reglamentan la producción, orientándola hacia la obtención de alimentos inocuos para el consumo humano y animal (<https://www.argentina.gob.ar/senasa>). Su “Programa de Garrapata” es responsable de generar las normas que enmarcan el control sanitario de este parásito y velar por el cumplimiento de los requisitos normativos vigentes a nivel nacional. El actual Plan Nacional de Control y/o Erradicación de la garrapata común del bovino se basa en cuatro pilares fundamentales: 1) preservar la zona libre de garrapatas; 2) salvaguardar la inocuidad de los

alimentos; 3) cumplir con los principios básicos de los tratamientos integrados, estratégicos y el uso racional de los productos garrapaticidas y 4) reconocer planes superadores provinciales y/o regionales. Este Programa se encuentra enmarcado en la Ley 12.566 del año 1938, el Decreto Reglamentario N° 7623 de 1954 y la Resolución Senasa N° 382 de 2017.

La importancia de control de este ectoparásito radica principalmente en que las infestaciones causadas por *R. (B.) microplus* pueden ocasionar considerables pérdidas económicas y daños en la salud pública. En promedio, cada garrapata hembra ingurgitada es responsable de la pérdida de  $1,37 \pm 0,25$  g de peso corporal en el ganado *Bos taurus*. El valor comparable para el ganado cruza entre *Bos taurus* y *Bos indicus* es  $1,18 \pm 0,21$  g/garrapata ingurgitada, sin diferir estadísticamente del valor anterior por lo que podría considerarse este umbral de pérdida de peso corporal independientemente del genotipo animal (Jonsson, 2006). La anemia es consecuencia inevitable frente a infestaciones con un gran número de garrapatas, siendo común la muerte de animales atribuida a la misma en combinación con una condición corporal deficiente. Además, la disminución de la ganancia de peso es debida a una supresión en el consumo de forraje (falta de apetito) (Seebeck, 1971) con efecto sobre la normal digestión y el metabolismo animal (componente hepatotóxico de *R. (B.) microplus*). Asimismo, el parasitismo elevado con garrapatas provoca lesiones en la piel, lo que conlleva a la atracción de la mosca *Cochliomyia hominivorax* (gusano barrenador) proporcionando un mayor riesgo de desarrollo de miasis (Reck y col., 2014). En forma indirecta, *R. (B.) microplus* es vector exclusivo de los agentes causales de la babesiosis bovina producida por *B. bovis* y *B. bigemina* y de anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) junto a otros insectos hematófagos; afectando principalmente a animales adultos no expuestos a estos hemoparásitos durante sus primeros meses de vida.

## 2.2 Métodos de control de la garrapata común del bovino

El control de *R. (B.) microplus* se realiza principalmente a través del uso de acaricidas químicos. Sin embargo, la incorrecta implementación de aplicaciones estratégicas conduce a la inevitable aparición de poblaciones de garrapatas resistentes a sus efectos tóxicos. Este fenómeno ocurrió en Argentina con los acaricidas arsenicales (George y col., 2004) y organofosforados (Grillo Torrado y Pérez Arrieta, 1977; Pérez Arrieta y col., 1980). Se diagnosticaron, además, poblaciones de garrapatas resistentes a los acaricidas elaborados sobre la base de piretroides (Caracostantologo, 1996; Aguirre y col., 2000; Mangold y col., 2004; Guglielmone y col., 2006), lo que incrementó el uso de formamidinas (amitraz) aplicado en forma convencional en bañaderos de inmersión. Sin embargo, un foco de garrapatas resistentes al amitraz fue detectado en la provincia de Corrientes (Cutullé y col., 2013). Recientemente, los resultados de bioensayos de prueba de paquete de larva (LPT- *larval packet test*) indican la presencia de poblaciones de *R. (B.) microplus* resistentes al fipronil (fenilpirazol) en Argentina (Torrents y col., 2020a), siendo esto observado previamente por Nava y col. (2018). Además, el frecuente uso de lactonas macrocíclicas en los rodeos bovinos del país determinó el desarrollo de diferentes niveles de resistencia a la ivermectina (Cutullé y col., 2019; Torrents y col., 2020b). La resistencia a los acaricidas químicos es una problemática que involucra a muchos países del mundo (Figura 3), siendo la multirresistencia una amenaza importante para el control químico de las garrapatas reportada en muchos de estas regiones (Benavides y col., 2000; Castro-Janer y col. 2010a, b; Fernandez Sala y col., 2012; Adehan y col., 2016; Klafke y col., 2017; Sagar y col., 2019).

Desde el punto de vista de salud pública, el uso inadecuado de acaricidas químicos en el control de la garrapata resulta perjudicial para el ser humano por su efecto tóxico y residual en carne y leche (Saueressig, 2002); pudiendo representar, además, una barrera comercial en la venta de estos productos a nivel nacional e internacional si no se respetan los períodos de restricción antes de su comercialización. Igualmente, dentro de las consecuencias medio

ambientales potenciales indicadas por el uso de estos productos, se describe el efecto nocivo sobre insectos coprófagos, nematodos del suelo y microorganismos que normalmente degradan y reciclan los excrementos del ganado (Martínez y Lumaret, 2006).



**Figura 3.** Distribución geográfica de la resistencia a los acaricidas en garrapatas *R. (B.) microplus* en todo el mundo. Fuente: Rodríguez-Vivas y col. (2018).

En este sentido, se plantea la principal necesidad de optimizar el uso de estos compuestos químicos en forma estratégica, teniendo en cuenta la bioecología del parásito y la rotación de productos, de manera de preservar la funcionalidad de los acaricidas actualmente disponibles para su control.

Asimismo, y en búsqueda de reducir la dependencia del control químico, otras herramientas son consideradas para el control de la garrapata común del bovino. La viabilidad de controlar las infestaciones de garrapatas mediante la inmunización de huéspedes con antígenos de garrapatas seleccionados fue demostrada por Allen y Humphreys (1979). A principios de la década del 90 se desarrolló la vacuna contra la garrapata, conteniendo el antígeno intestinal recombinante de *R. (B.) microplus*, Bm86. Subsecuentemente, dos vacunas fueron comercialmente registradas: una en Australia (TickGARD) y luego otra en Cuba (Gavac). Su utilidad está basada en que luego de su aplicación, la capacidad

reproductiva de las garrapatas hembras adultas e ingurgitadas de sangre, se vería disminuida por la destrucción de las células intestinales por la acción de los anticuerpos inducidos por la vacuna. Esto conllevaría a una menor contaminación de las pasturas con huevos de garrapata y por ende una menor cantidad de larvas disponibles para infestar a los animales. Sin embargo, el uso y difusión de estas dos vacunas es más bien escaso en los lugares donde *R. (B.) microplus* prolifera debido a que requiere al menos tres aplicaciones en el año, su costo es elevado con respecto a la dosis de un acaricida y su eficacia también es menor, comparado con el acaricida, cuando este último no presenta problemas de resistencia (Comunicación Personal entre Christian Cutullé y Eduardo Puente Casillas (Zoetis. Gerente Técnico de Ganadería para Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay) y Ulises Cuore (DILAVE “Miguel C. Rubino”, División de Laboratorios Veterinarios, Montevideo, Uruguay). A pesar del descubrimiento de nuevos antígenos, no se han registrado nuevas vacunas y se ha pausado la comercialización de las existentes; indicándose diferentes consideraciones que podrían justificar esta situación, entre ellas el aún atractivo mercado global de acaricidas para algunas empresas y, en comparación con estos, la limitada rentabilidad, seguridad y menor efectividad de las vacunas a determinadas especies tanto del vector como del hospedador (De la Fuente y col., 2007; De la Fuente y Estrada-Peña, 2019).

El uso de biocontroladores es una alternativa orgánica para el control de garrapatas. Dentro de ellos se encuentran, los hongos artrópodos patogénicos, especialmente *Metarhizium anisopliae* sensu stricto (s. str.) y *Beauveria bassiana* s. str, que presentan el mayor potencial de utilización debido a su mecanismo de acción basado en el contacto directo con la cutícula del parásito. Composiciones con otros agentes biológicos o extractos de plantas (Adenubi y col., 2018; Reis y col., 2021) poseen resultados promisorios y pueden resultar, junto a la rotación o clausura temporal de potreros, en una estrategia a ser considerada para el control biológico del ectoparásito (Cagnini y col., 2020).

Finalmente, la resistencia genética del hospedador es otra de las opciones de control no químico de *R. (B.) microplus*, ampliamente incluida en los programas de mejoramiento tradicionales de rodeos de zonas tropicales y subtropicales del mundo mediante la utilización de diversas razas bovinas. Diferentes grupos de investigación han trabajado para identificar marcadores genéticos del hospedador asociados con la susceptibilidad o resistencia a garrapatas, centrándose en la comparación de razas locales en regiones geográficas específicas. Además, estos estudios se han centrado en los perfiles de expresión génica, la localización de las respuestas inmunitarias humorales y celulares y los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) para identificar variantes genéticas funcionales asociadas a la característica (Kashino y col., 2005; Martínez y col., 2006; Wang y col., 2007; Regitano y col., 2008; Piper y col., 2008, 2009, 2010, 2017; Bagnall y col., 2009; Kongsuwan y col., 2010; Nascimiento y col., 2010, 2011; Constantinoiu y col., 2010, 2013, 2018; Jonsson y col., 2014; Carvalho y col., 2014; Dominguez y col., 2014; Mapholi y col., 2016; Mota y col., 2018; Robbertse y col., 2018; Moré y col., 2019; Marima y col., 2020). Asimismo, la proteómica del huésped puede proporcionar biomarcadores fiables para ayudar en la selección de animales resistentes a la infestación con garrapatas (Raza y col., 2019).

### **2.3 Bovino Criollo Argentino**

La primera introducción de bovinos al continente americano se produce en el segundo viaje de Colón a la isla La Española, hoy República Dominicana, en 1493. Este ganado, proveniente del sudeste de la península Ibérica y de las islas Canarias (Wilkins y col., 1982; Giovambattista y col., 2010) llega al Virreinato del Río de la Plata en Argentina en 1549 y se mantiene como único recurso genético bovino hasta mediados del siglo XIX.

A partir de 1850 en la Pampa Húmeda Argentina se inicia la introducción de razas bovinas británicas, en un inicio Shorthorn y luego Hereford y Aberdeen Angus, con el objetivo de obtener animales con mayor cantidad de grasa y mejor conformación en un sentido

convencional. Los cruzamientos generados con el ganado criollo existente resultaron sumamente exitosos, interpretándose en ese entonces, que se debía a la calidad de las razas introducidas y no al concepto de vigor híbrido de las primeras cruzas (Filial 1). De esta manera, el avance de las razas británicas determinó la absorción total del bovino criollo en la Pampa Húmeda Argentina y su desplazamiento hacia zonas marginales, especialmente el NOA; donde el calor, los parásitos y el monte obstaculizaron el desarrollo de las razas introducidas hasta el momento. Con la introducción de razas cebuinas un siglo después, es que la presencia del bovino Criollo se ve realmente amenazada a nivel nacional, con la posibilidad de ser absorbido progresivamente por el ganado exótico (Rabasa, com. pers).

En 1956, es creado en Argentina el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) con la misión de contribuir al desarrollo sostenible del sector agropecuario, agroalimentario y agroindustrial a través de la investigación y la extensión. La estación experimental de Leales, ubicada en la provincia de Tucumán, comienza sus actividades en 1959 evaluando cruzamientos de razas bovinas británicas con ganado Cebú (Nelore) y su comparación con los bovinos existentes en la región denominados criollos. De esta manera se conforma en el país el primer plantel experimental de animales bovinos criollos compuesto por 35 vacas y 2 toros adquiridos a productores locales de la provincia de Salta. Luego, el plantel se enriqueció con nuevas introducciones de animales desde las provincias de Jujuy, Chaco, Santiago del Estero y Tucumán (Sal Paz, 1986). Del total de animales incorporados, dos hembras fundadoras registraron condición de mochas (ausencia de cuernos); característica que se mantuvo en el plantel de INTA Leales a través de las hembras de reposición hasta 1988, año en el que se decide utilizar por primera vez un macho reproductor sin cuernos. Desde ese momento, y por ser un carácter dominante (Holgado y Rabasa, 2001), el número de animales mochos aumentó rápidamente en el rodeo.

Como consecuencia de la información generada por INTA en conjunto con otras universidades del país, se incrementó el interés por la raza y en 1985 fue conformada la Asociación Argentina de Criadores de Ganado Bovino Criollo (AACGBC) que nuclea en la



actualidad, a productores de distintas zonas del país, difunde las características de la raza a través de jornadas, exposiciones, etc., y es responsable de los registros genealógicos denominados “Base”.

Fenotípicamente la raza se caracteriza por la gran diversidad de colores de capa y por su cornamenta, aunque como se mencionó anteriormente existen también animales sin cuernos (Falomir-Lockhart y col., 2019) (Figura 4). La pigmentación de las mucosas externas de la piel es variable y permite la presentación de animales con hocico negro, con pintas y sin pigmentación melánica (hocico pardo) (Rabasa y col., 1986). Además, los bovinos Criollo Argentino se caracterizan por su tamaño corporal relativamente chico (Holgado y col., 2015) y su aptitud lechera moderada, por lo que los vientres de cría poseen bajos requerimientos energéticos de mantenimiento y producción (Rabasa y col., 2005). Bajo iguales condiciones de producción, el rendimiento carnicero de la res y la calidad de carne producida por animales criollos es similar al de otras razas bovinas (Garriz y col., 1991; Zimmerman y col., 2019). En ambientes nutricionales adversos, la raza posee alta capacidad de respuesta; destacándose por su fertilidad, facilidad de parto, capacidad de cría, longevidad y resistencia a diferentes factores ambientales. La raza Criollo Argentino es más resistente a la garrapata común del bovino que otras razas británicas y sus cruces (Guglielmone, 1990). Los mecanismos fisiológicos y genéticos asociados a la resistencia a *R. (B.) microplus* en los bovinos Criollo Argentino no están estudiados y es necesario su conocimiento.



**Figura 4.** Reproductor macho de raza Criollo Argentino sin cuernos (tocones) perteneciente al rodeo de INTA Leales (Tucumán).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) a través de su Plan de acción mundial sobre los recursos zoogenéticos y su declaración de Interlaken, reconoce el papel y el valor esenciales de los recursos zoogenéticos para la alimentación y la agricultura y, en concreto, su contribución a la seguridad alimentaria para las generaciones presentes y futuras (FAO, 2007). En América Latina y El Caribe las poblaciones de las razas Criollas han evolucionado en diferentes zonas agroecológicas en sistemas de producción con manejo tradicional, y debido a la percepción de que son poco productivas, están siendo paulatinamente sustituidas por genotipos exóticos. Esta percepción posiblemente es errónea en condiciones sanitarias y de alimentación limitadas, así como en condiciones climáticas extremas (Núñez-Domínguez y col., 2016). El bovino Criollo Argentino es considerado como un recurso zoogenético de fundamental importancia, debiendo ser preservado y evaluado por su variabilidad genética para hacer frente a los desafíos productivos que se planteen.

La unidad de INTA Leales, actualmente Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS), lleva un completo registro genealógico y productivo de los animales de raza Criollo Argentino desde sus inicios. Actualmente el rodeo está conformado por 120 vientres que ingresan a servicio anualmente asignando los toros de acuerdo a mínimo parentesco. La eficiencia reproductiva del plantel alcanza valores promedios de 94,6 % de preñez, 92,7 % de parición y 89 % de destete (Holgado y Ortega, 2019).

En Argentina, gran parte de los criadores de ganado bovino Criollo Argentino no realizan la toma de registros y análisis de datos, por lo que se desconoce dentro del sector agropecuario, a estas poblaciones animales con interés económico.

#### **2.4 Resistencia genética del hospedador**

El ganado bovino muestra una considerable variabilidad en sus respuestas a una amplia gama de enfermedades; y gran parte de esa variabilidad es genética, implicando la viabilidad de selección. Los hospedadores una vez infectados pueden, en principio, protegerse de daños posteriores de dos maneras: pueden atacar directamente al vector y así reducir la carga (resistencia), o pueden limitar el daño causado por una determinada carga (tolerancia). En este sentido, la resistencia protege al huésped a expensas del vector, mientras que la tolerancia salva al huésped del daño sin tener ningún efecto negativo directo sobre el mismo (Råberg y col., 2009).

Es reconocido que algunos animales o razas de animales, mantenidos bajo condiciones similares, se infestan con menos garrapatas que otros. Actualmente, se sabe que estas diferencias están originadas por las variaciones individuales de los animales para responder inmunológicamente a la infestación de las garrapatas. Asimismo, es sabido que la resistencia a las garrapatas está relacionada a una pre inmunización establecida a través del contacto continuo con el ectoparásito desde edad temprana del animal (Mattioli y col., 2000). La reducción del peso de la garrapata, la duración del ataque, el número de garrapatas

alimentándose, la masa de oviposición y el éxito de muda son algunos de los parámetros que determinan la capacidad inmunitaria del huésped contra las garrapatas (Trager, 1939). Asimismo, existen barreras físicas en el huésped que afectan la resistencia a *R. (B.) microplus* como ser: la densidad del pelaje, el grosor y la pigmentación de la piel, la vibración de la piel y/o la capacidad de acicalamiento, las papilas de la lengua y el olor asociado a componentes orgánicos volátiles (Riek, 1956; Bennet, 1969; De Castro y col., 1985; Spickett y col., 1989; Osterkamp y col., 1999; Veríssimo y col., 2002, 2015; Martínez y col., 2006; Gasparin y col., 2007).

La respuesta inmune del huésped ante la infestación con garrapatas ha sido previamente estudiada. Sin embargo, las diferencias en los diseños experimentales dificultan las comparaciones de los resultados (Tabor y col., 2017; Robbertse y col., 2017). En general, estos estudios demuestran un rol esencial de genes que codifican proteínas estructurales y de inmunidad celular a través de mecanismos innatos y adquiridos, que incluyen citocinas, quimiocinas, células T, células B, mastocitos y granulocitos (Tabla 7. Anexo).

Las razas bovinas presentan fenotipos contrastantes con componentes genéticos para la infestación por *R. (B.) microplus*, y especies de garrapatas relacionadas, como consecuencia de la evolución conjunta del ganado resistente a las garrapatas y también debido a décadas de cría selectiva. Durante muchos años, el bovino criollo (*Bos taurus*) convivió con la garrapata *R. (B.) microplus*, de modo que la selección natural actuó sobre estos individuos preservando genotipos favorables a la resistencia a ectoparásitos y perpetuando, a lo largo de incontables generaciones, muchos genes de pequeño efecto individual. Asimismo, la selección natural favoreció a aquellas garrapatas con cierta capacidad para evadir las defensas establecidas por los hospedadores, de modo que el interfaz parásito/huésped se basa en una relación de equilibrio. Los animales criollos se han adaptado a las garrapatas, como los parásitos a su sistema inmunológico.

La combinación de genes taurinos de origen británico y cebuinos en las razas compuestas más utilizadas en el NOA y NEA condiciona el comportamiento productivo de los animales. En este sentido, el nivel de infestación en estos rodeos será proporcional a la composición genética de los animales. Ante esto, muchos productores optan por criar razas consideradas más resistentes o aumentar el porcentaje de genes cebuinos en los rodeos. Si bien se minimiza el impacto resultante por altos niveles de infestación, esta práctica termina por oponerse a lo que podría ser una alternativa para incrementar la productividad de muchos sistemas de cría de ganado de carne y hacer que el sector sea más competitivo, aumentando la participación de animales *B. taurus* en los rodeos como una forma para mejorar características como por ejemplo la calidad de la carne (Biegelmeier y col., 2012).

La resistencia a las garrapatas es un carácter heredable; han sido reportados valores de heredabilidad variables desde 0,00 a 0,89 (Tabla 1) para distintas razas carniceras y lecheras evaluadas en diferentes ambientes a través de métodos diversos. Estos valores demuestran que la heredabilidad de este carácter es lo suficientemente alta como para ser incorporada exitosamente en los programas de selección. Asimismo, la estimación de parámetros genéticos confiables es un requisito para aplicar la selección con el fin de mejorar cualquier característica (Burrow y col., 2019; Junior y col., 2019; Simões y col., 2019).

**Tabla 1.** Valores de heredabilidad ( $h^2$ ) obtenidos por diversos autores para la característica resistencia a garrapatas utilizando diferentes razas bovinas y desafío experimental natural o artificial en países del mundo.

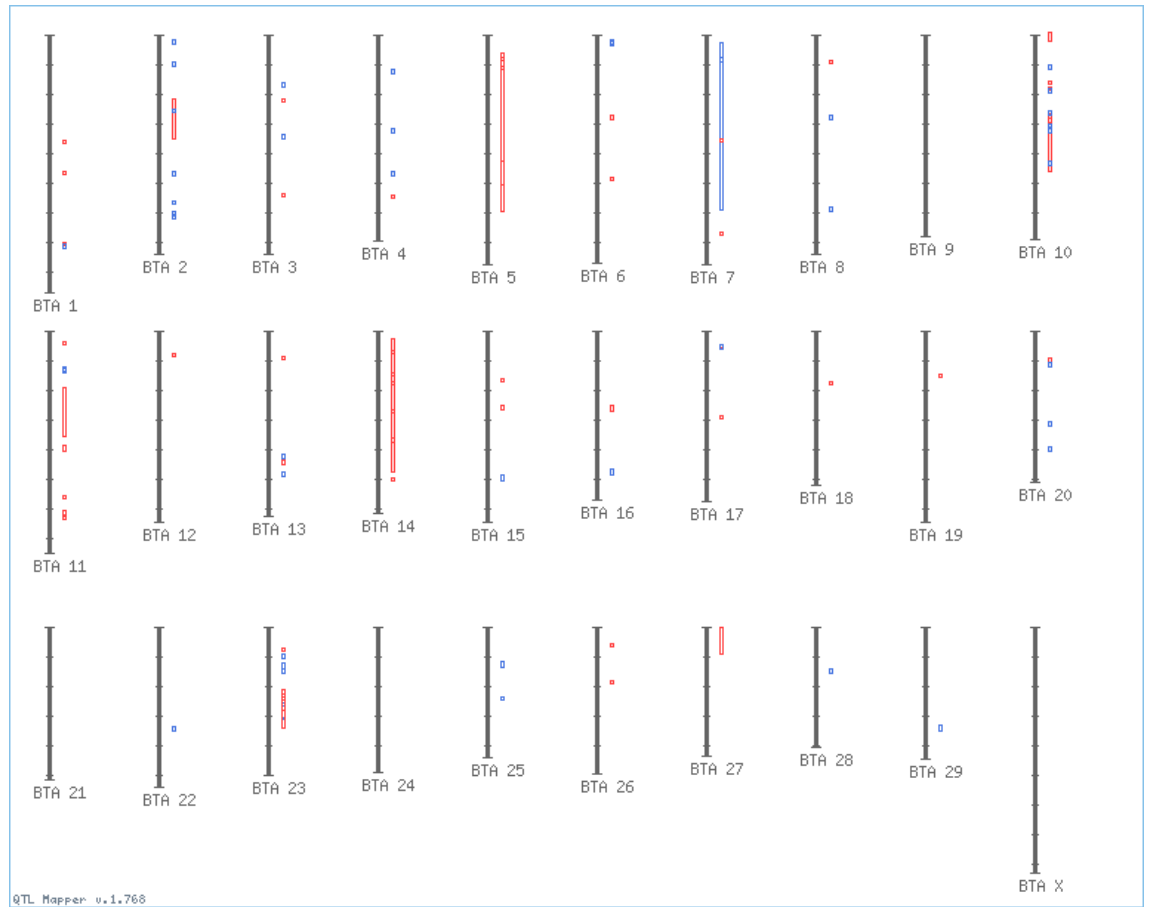
<i>Referencia</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Raza</i>	<i>Desafío Experimental</i>	<i>h<sup>2</sup></i>
<i>Burrow (2001)</i>	Australia	Belmont red	Natural	0.42
<i>Fraga y col. (2003)</i>	Brasil	Caracú	Natural	0.22
<i>Henshall (2004)</i>	Australia	Hereford x Shorton	Natural	0.44
<i>Prayaga y Henshall (2005)</i>	Australia	Razas indias, africanas y europeas y sus cruzas	Natural	0.13
<i>Cardoso y col (2006)</i>	Brasil	Braford	Natural	0.34
<i>Regitano y col (2006)</i>	Brasil	Nelore, Canchim, Aberdeen Angus, Simental y sus cruzas	Natural	0.15
<i>Peixoto y col (2008)</i>	Brasil	Gyr x Holstein	Artificial	0.21
<i>Prayaga y col (2009)</i>	Australia	Brahman	Natural	0.15

<i>Budeli y col (2009)</i>	Sudáfrica	Bonsmara	Natural	0.17
<i>Turner y col (2010)</i>	Australia	Ganado lechero <i>B. Taurus</i>	Natural	0.37
<i>Machado y col (2010)</i>	Brasil	Gyr x Holstein	Artificial	0.21
<i>Mapholi y col (2017)</i>	Sudáfrica	Nguni	Natural	0.02-0.17
<i>Biegelmeyer (2017)</i>	Brasil	Hereford y Braford	Natural	0.13-0.17
<i>Otto y col (2018)</i>	Brasil	Gyr x Holstein	Artificial	0.40-0.54

## 2.5. Estudios de asociación genética

Los factores genéticos afectan la susceptibilidad y/o resistencia a enfermedades e influyen en características cuantitativas relacionadas. Identificar los genes involucrados no es tarea sencilla, en parte porque cada gen causal realiza una pequeña contribución a la heredabilidad general. Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) ofrecen un enfoque potencialmente poderoso para mapear genes causales con efectos modestos. Estos análisis son posibles gracias a la disponibilidad de tecnología de microarrays que permite analizar simultáneamente miles de polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Los microarrays son una colección ordenada de secuencias de ADN (sondas) unidas a un soporte sólido. Cada una de esas sondas o secuencias específicas o secciones cortas de un gen u otro elemento de ADN se emplea para hibridar a una muestra de ADN (blanco o target) de manera específica.

Los estudios de GWAS realizados hasta el momento han identificado *loci* en razas bovinas que contribuyen a la variación de la resistencia a garrapatas en bovinos. Como muchos otros *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) para características adaptativas, cada *locus* explica un pequeño porcentaje de la variación (Figura 5).



**Figura 5.** Ubicaciones de loci de rasgos cuantitativos (QTL) y asociaciones (SNP) para la característica de resistencia a garrapatas en el genoma bovino. Color rojo: significativo; color azul: sugestivo. Extraído (agosto 2021) de <https://www.animalgenome.org>.

Los primeros estudios de asociación fueron realizados en la década del '60 por Francis y Ashton (1967), quienes publicaron la primera asociación entre el conteo de garrapatas y el fenotipo de amilasa sérica (polimorfismos bioquímicos). Más recientemente, se hallaron diferencias en las concentraciones de proteínas del suero (haptoglobina y transferrina) en bovinos Holstein y Nelore infestados naturalmente, por lo que se los propuso como biomarcadores del nivel de infestación (Carvalho y col., 2008). En la década del '80, y teniendo en cuenta su rol central en la respuesta inmune, comenzaron los estudios de asociación de la resistencia a garrapatas con los *loci* del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Bovino (BoLA), ubicado en el cromosoma 23 (Stear y col., 1984, 1989, 1990). La asociación fue

demostrada, aunque con inconsistencias entre los alelos resistentes o susceptibles reportados. El desarrollo de las técnicas de ADN permitió reportar asociaciones entre marcadores microsatélites (STRs) ligados al BoLA y alelos del gen BoLA-DRB3 con el conteo de garrapatas; confirmando de esta manera el rol de los *loci* del BoLA (Acosta-Rodríguez y col., 2005; Martínez y col., 2006; Untalan y col., 2007). Posteriormente, el desarrollo de paneles de STRs, y más recientemente, microarrays de SNPs, permitieron realizar estudios de asociación genómica (GWAS). Los trabajos con paneles de STRs permitieron detectar QTLs en los cromosomas 2, 10, 11, 23 y 27, que explicaron entre el 3,3 % y 5,9 % de la varianza fenotípica (Machado y col., 2010). Por otra parte, los estudios de tipo GWAS utilizando microarrays permitieron detectar regiones asociadas a resistencia en 13 cromosomas en ganado lechero con diferente composición genética, explicando cada uno alrededor del 1 % de la varianza (Barendse, 2007; Turner y col., 2010). Estos autores reportaron una baja correlación entre los alelos asociados con composición de la leche y el conteo de garrapatas, sugiriendo que se podría seleccionar a favor de la resistencia a este ectoparásito sin afectar la producción lechera. Los QTLs reportados en los cromosomas 3 y 10 fueron confirmados por Porto Neto y colaboradores (2010a, 2011) en ganado lechero y Brahman de Australia, donde también se logró identificar el gen ITGA11 (*Integrin alpha 11*) y ELTD1 (*adhesion G protein-coupled receptor L4*) como candidatos. Además, los mismos autores realizaron un meta-análisis combinando resultados de GWAS y transcriptómica en razas lecheras y Brahman (Porto Neto y col., 2010b) con resultados significativos para regiones de los cromosomas 2, 10, 13 y 19. El análisis de ontología de los 20 genes localizados en estas regiones permitió identificar procesos biológicos sobrerrepresentados (por ejemplo: quimiotaxis de leucocitos). Otros autores reportaron QTLs en los cromosomas 7, 10 y 19 en la raza sudafricana Nguni (Mapholi y col., 2016) y 10 y 23 en una población experimental F2 Gir × Holstein (Machado y col., 2012; Otto y col., 2018). En este último trabajo se identificaron genes involucrados en procesos biológicos importantes del sistema inmune (receptores de inmunoglobulinas TREM1, TREM2 y CD83; proteínas motoras MYO5A,



TREML1 y PRSS16). Recientemente, Marima y col., (2019) indicó al gen LUM (*lumican*) ubicado en el cromosoma 5 como potencial biomarcador para resistencia a garrapatas y otros genes con variación, asociados a disminuir el suministro de sangre para alimentación del parásito y a respuestas inmunes. Finalmente, los paneles de SNPs fueron evaluados en el contexto de programas de selección genómica, sugiriendo que estas herramientas podrían ser utilizadas para mejorar la resistencia genética a garrapata y desarrollar líneas resistentes (Cardoso y col., 2015; Mapholi y col., 2014; Sollero y col., 2017).

### 3. CAPÍTULO 1

#### **Variación fenotípica de la carga parasitaria de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos de raza Criollo Argentino**

##### **Resumen**

La evaluación fenotípica de la resistencia genética a garrapatas permite identificar individuos con variabilidad para la característica. El bovino Criollo Argentino representa una población que ha sufrido un proceso de selección natural durante muchos años. Esto permitió obtener una raza rústica, capaz de producir en ambientes desfavorables. El objetivo de este trabajo fue identificar variaciones fenotípicas individuales en las cargas parasitarias de *R. (B.) microplus* en bovinos de raza Criollo Argentino pertenecientes al Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido, Tucumán, Argentina. Se evaluaron 179 vaquillonas que fueron expuestas a infestaciones artificiales sucesivas durante los años 2015 a 2018, llegando a un total de 663 observaciones. Para describir la variable de conteo de garrapatas se utilizó un modelo lineal mixto, considerando los efectos fijos: año de evaluación, momento de infestación, edad de la madre y estado nutricional. El valor promedio del conteo de teologinas obtenido permite clasificar a la raza como altamente resistente a la carga de garrapatas. La condición nutricional previa a las evaluaciones realizadas no afectó la respuesta individual; sin embargo, la ganancia de peso durante las mismas influye significativamente en la característica. De esta manera, los animales con mayores ganancias de peso, cargan un menor número del mencionado ectoparásito. A partir de sucesivas infestaciones el hospedador desarrolla un mecanismo de defensa más fuerte, por lo que se propone como metodología de evaluación de la carga de garrapatas en animales de raza Criollo Argentino, la realización de dos infestaciones sucesivas con su correspondiente lectura los días 20 y 21 post infestación.

### 3.1 Introducción

El parasitismo producido por *R. (B.) microplus*, y los patógenos que transmite, constituyen una importante limitación en la producción pecuaria ya que ocasionan en los bovinos una disminución en las ganancias de peso y la producción láctea, daño en los cueros, mortalidad, morbilidad y mayores costos por control (Späth y col., 1994). Además, estos efectos pueden verse acrecentados por la asociación existente entre niveles elevados de carga de garrapatas y la ocurrencia de miasis (Reck y col., 2014).

La base genética de la variación de respuesta del huésped a la infestación de garrapatas, dentro y entre razas, ha sido reconocida desde hace muchos años (Wilkinson, 1955; Francis, 1966; Cardoso, 2014). Se considera que el ganado *Bos indicus* es generalmente más resistente a las garrapatas que las razas *Bos taurus* de origen europeo (Utech y col., 1978; Madalena y col., 1990; Frisch y O'Neill, 1998; Wambura y col., 1998; Bianchin y col., 2007; da Silva y col., 2007). Esto se debe probablemente a la presencia de genes seleccionados naturalmente a lo largo de su proceso evolutivo (Ibelli y col., 2012; Ayres y col., 2015). Además, se ha demostrado que las razas de ganado indígenas africanas (*B. taurus africanus*), como Afrikander, Nguni y N'Dama, presentan una elevada resistencia a las garrapatas (Scholtz y col., 1991; Fivaz y col., 1992; Mattioli y col., 1993; Mattioli y Dempfle, 1995; Mattioli y col., 2000). Con respecto a las razas criollas americanas, fue demostrado que el ganado Criollo Argentino presenta mayor resistencia a la infestación por garrapatas en relación a sus pares *B. taurus* no ibéricos (Guglielmone y col., 1990). Dentro de las razas que muestran resistencia o tolerancia a la carga de garrapatas, según lo notificado al Sistema de Información sobre la Diversidad de los Animales Domésticos (DAD-IS), se puede ubicar también a la raza criolla de Colombia Romosinuano (FAO, 2010). Asimismo, la raza local brasileña Criollo Lageano mostró resistencia a los ectoparásitos, con menos infestaciones graves por larvas de *Dermatobia hominis* y *R. (B.) microplus*; estando esto asociado con características de la raza como pelaje más fino (Cardoso y col. 2014). Recientemente,

Maiorano y col. (2019) indicaron para la raza Caracú (Brasil) una resistencia intermedia a garrapatas.

El bovino Criollo Argentino es una población que ha sufrido un proceso de selección natural durante aproximadamente 500 años, lo que permitió obtener una raza rústica y capaz de vivir en ambientes muy desfavorables (Rabasa y col., 2005). Estas características determinan que el Criollo Argentino pueda ser considerado como un reservorio genético de una especie sobre la que se ha ejercido una fuerte presión de selección por parte del hombre (Bouzat y col., 1998).

El Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS), perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), trabaja con bovinos Criollo Argentino desde la década del 50. En sus inicios, y en una primera etapa de evaluación, el rodeo de animales criollos cumplió el rol de testigo contra el cual contrastar los diferentes planteos de cruzamientos de razas europeas con ganado cebú (Nelore) (Viñas, 1976). Años posteriores, y fuertemente asociado a los resultados obtenidos en la primera etapa, se plantearon objetivos orientados a intensificar la caracterización de esta raza. A partir de allí, y hasta la actualidad, se avanza en profundizar los conocimientos existentes sobre este ganado poco valorado por su apariencia, pero destacado por su rusticidad y comportamiento.

En la región subtropical subhúmeda de Argentina, Canevari y col. (2017) determinaron que la actividad estacional de *R. (B.) microplus* en su fase parasitaria se caracteriza por presentar tres picos en abundancia; el primero de estos ocurre a mediados-fines de primavera, el segundo en verano, y el tercer y mayor pico se observa en otoño. En el área de estudio, *R. (B.) microplus* desarrollaría al menos tres generaciones por año. La dinámica de su fase no parasitaria se encuentra principalmente caracterizada por los siguientes rasgos: (a) Un período no parasitario total extenso observado tras la exposición de garrapatas hembras en febrero y marzo (mediados de verano hasta principios de otoño); (b) un período no parasitario total corto observado tras la exposición de garrapatas hembras en octubre-diciembre (fines

de primavera); (c) longevidad corta de larvas activas a principio y mediado de verano (diciembre-febrero); (d) un largo período de incubación de huevos producidos por hembras expuestas desde mediados de verano a principios de otoño; (e) un corto período de incubación de huevos producidos por hembras expuestas desde mediados de primavera hasta principios de verano, y (f) ninguna incubación de huevos producidos por hembras expuestas a mediados y finales de otoño e invierno.

La metodología, adoptada internacionalmente (FAO, 1987), para la evaluación fenotípica de la resistencia genética a garrapata en el ganado está basada en los trabajos de Villares (1941), Wilkinson (1955) y Wharton y Utech (1970). El método consiste en el monitoreo de la carga de garrapatas presente en los bovinos a través de conteos de teologinas (hembras ingurgitadas) de un determinado tamaño sobre el lateral del animal. Ha sido demostrado que el recuento de garrapatas, de entre 4,5 a 8 mm de largo en un día, proporciona una estimación confiable de los números de garrapatas ingurgitadas que caen al día siguiente (Wharton y Utech, 1970). En este sentido, Utech (1978) utilizó infestaciones parasitarias con aproximadamente 20.000 larvas y calculó la resistencia como el promedio en porcentaje de larvas de garrapatas que no lograron madurar a hembras ingurgitadas, asumiendo una relación 1:1 en el sexo de las larvas colocadas en los animales. Esto significa que el ganado con 100 y 1.000 hembras ingurgitadas (de las 20.000 larvas aplicadas) tendrían 99 y 90 % de resistencia, respectivamente. El ganado con más de un 98 % de resistencia se considera altamente resistente, entre 98 y 95 % moderada, 95 y 90 % baja, menos de 90 % muy baja (Jonsson y col., 2014).

Utilizando este sistema de recuento estandarizado luego de la infestación artificial con larvas de garrapatas, las estimaciones de heredabilidad han sido bastante altas y los cálculos de resistencia son más precisos (Porto Neto y col., 2011). Al emplear mediciones menos exigentes (infestaciones naturales o puntajes de infestación con garrapatas) se logran estimaciones de heredabilidad mucho más bajas. En este sentido, se reportaron valores de

heredabilidad de la resistencia genética a *R. (B.) microplus* en bovinos con una amplia variabilidad entre distintas poblaciones, oscilando alrededor de 0,30 (Porto Neto y col., 2011)

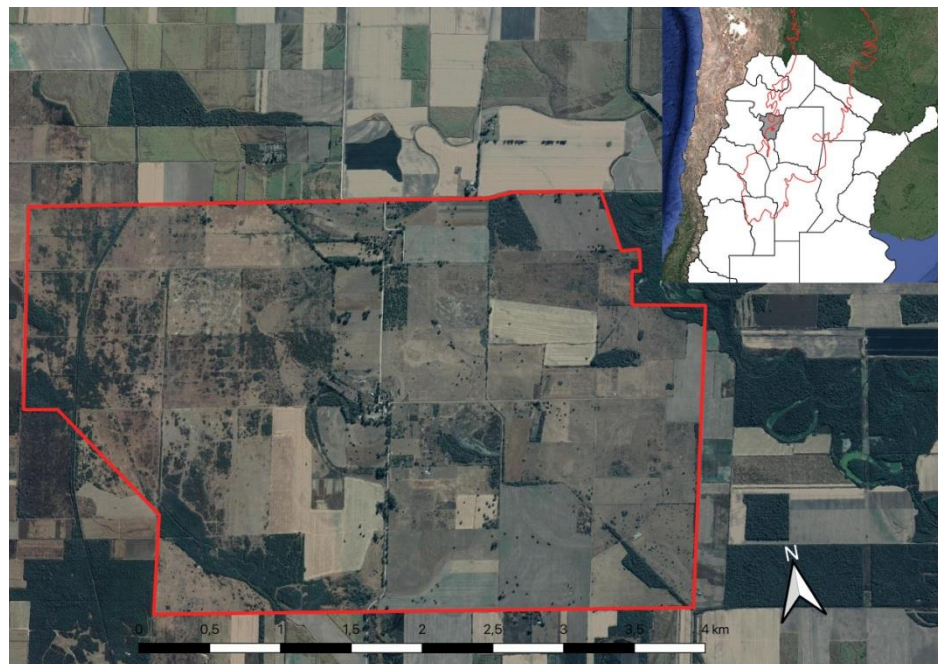
La evaluación de características adaptativas es de gran importancia para los sistemas de producción ganadera ya que permiten la identificación de individuos más tolerantes y/o resistentes a condiciones de estrés biótico y abiótico. Esta información podrá luego contribuir como criterio de selección en programas de mejoramiento.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue identificar variaciones fenotípicas individuales en las cargas parasitarias de *R. (B.) microplus* en bovinos de raza Criollo Argentino pertenecientes al rodeo del IIACS.

### 3.2 Materiales y Métodos

#### a) Condiciones ambientales

El IIACS se encuentra situado en la región de Llanura Deprimida, subregión salina seca-subhúmeda (Zuccardi y Fada, 1985) de la provincia de Tucumán, Argentina; ubicada a los 27° 11" de latitud sur y 65° 14" de longitud oeste (Figura 6).



**Figura 6.** Ubicación del Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (Leales, Tucumán, Argentina).

Esta región posee un mesoclima seco sub-húmedo cálido (Torres Bruchman, 1977). Entre los meses de mayo y septiembre se registra la ocurrencia de heladas, con una frecuencia de 16 heladas/año. La temperatura media anual es de 19,5 °C. La media de enero es de 25 °C y la de julio de 12 a 12,5 °C. La precipitación media anual calculada para el periodo de años 2010-2020 fue de 877,8 mm, con un coeficiente de variación entre años de 12,9 %. Entre los meses de octubre a abril se registra el mayor porcentaje de milímetros caídos (más del 90 %). La evapotranspiración potencial es de 1090 mm anuales.

#### b) Población experimental y datos fenotípicos

El rodeo de bovinos de raza Criollo Argentino del IIACS cuenta con un total de entre 115 y 125 hembras que ingresan a servicio anualmente. Se emplean 3 a 4 toros por año, asignados a lotes de 30 hembras aproximadamente y teniendo en cuenta mínimo parentesco entre reproductores. La monta es natural a campo, estacionada en los meses de diciembre, enero y febrero. Por lo tanto, los nacimientos ocurren entre septiembre y diciembre de cada año. La base forrajera está constituida por gramíneas megatérmicas (*Chloris gayana*, *Megathyrsus maximus*, *Brachiaria brizantha* y *Cynodon dactylon*). Anualmente, se destetan y recrían alrededor de 45 terneras, mientras que los machos son vendidos en su mayoría al destete para engorde.

Para este trabajo, 179 vaquillonas de raza Criollo Argentino fueron expuestas a infestaciones artificiales con aproximadamente 10.000 larvas de *R. (B.) microplus* durante los años 2015 a 2018. Del total de individuos evaluados, 126 animales tuvieron 4 conteos consecutivos de garrapatas y 53 tuvieron 3 conteos. Por lo tanto, el número de conteos realizados resulta en un total de 663 observaciones. Cada grupo contemporáneo de

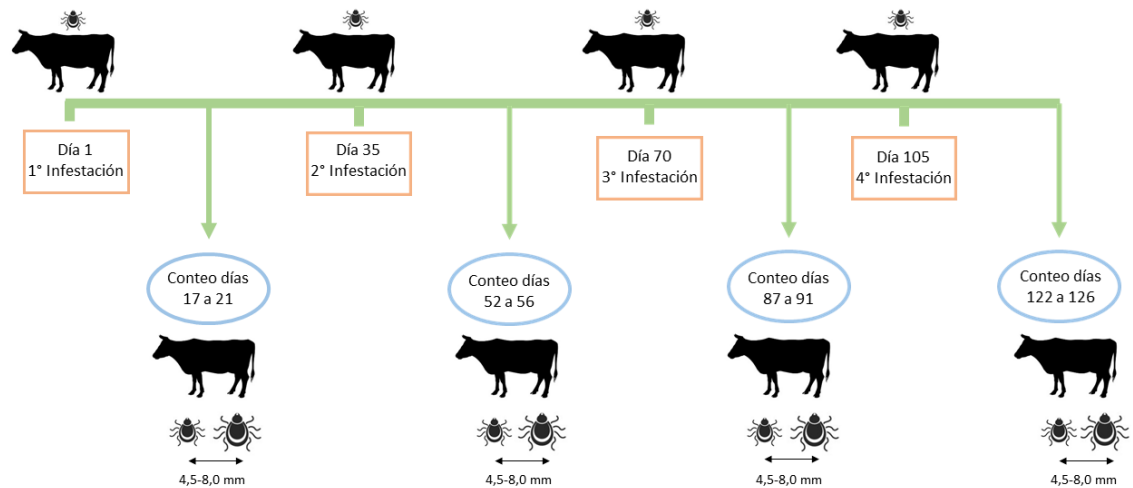
vaquillonas estuvo integrado por aproximadamente 45 animales, con edades de entre 9 a 15 meses y un peso inicial promedio de 144,1 kg.

Desde su nacimiento y hasta el destete los animales estuvieron expuestos a la infestación natural con garrapata común del bovino sobre pasturas megatérmicas. Antes de comenzar con las infestaciones artificiales en las vaquillonas, se evaluó la inmunidad poblacional para *Anaplasma* spp, *B. bovis* y *B. bigemina* a través de técnicas serológicas. Los sueros fueron procesados por ELISA de Competición (ELISA-c) para *Anaplasma* spp y ELISA Indirecto (ELISA-i) para *Babesia* spp en el laboratorio de Inmunología y Parasitología de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Rafaela. Además, previo al comienzo de la primera infestación de cada grupo contemporáneo, se aplicaron antiparasitarios para el control de parásitos internos (ricobendazol 15% inyectable) y externos (baño de inmersión con amitraz 12,5%), teniendo en cuenta los tiempos de residualidad de los insumos utilizados. Además, se aplicaron las vacunas anticlostridial y viral respiratoria. A partir de allí, y luego de cada infestación, los animales fueron mantenidos en potreros libres de garrapatas, logrados a través de la siembra de un verdeo anual (*Avena strigosa*) para evitar errores en el conteo posterior por incorporación de larvas en las pasturas. La alimentación de los animales con base forrajera fue suplementada con ración (grano de maíz molido 1 % de peso vivo; expeller de girasol 0,5 % de peso vivo) para lograr aumentos diarios de peso adecuados para la recría de las hembras y su ingreso posterior a servicio.

Las larvas de garrapatas utilizadas para las infestaciones fueron obtenidas luego de la incubación ( $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y humedad de al menos 85-86 %) de hembras adultas ingurgitadas recolectadas del ganado infestado naturalmente en el campo (población de garrapatas nativas del IIACS). Luego de 12 días de incubación, alícuotas de 0,5 g de huevos (correspondientes a  $\cong 10.000$  larvas) fueron colocadas en frascos individuales y devueltas a la cámara de incubación en las mismas condiciones hasta la eclosión. Todas las larvas utilizadas en las infestaciones tuvieron 15 a 20 días de edad. Dentro de cada grupo contemporáneo, los



animales fueron infestados artificialmente en períodos separados cada 35 días de diferencia, vaciando el contenido de un tubo en la zona dorsal de cada uno de ellos (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema experimental de las infestaciones artificiales con *R. (B) microplus* realizadas sobre vaquillonas de raza Criollo Argentino.

A los 17 a 21 días luego de cada infestación se evaluó la cantidad de teologinas (conteos sobre el lado izquierdo de las garrapatas hembras de 4,5-8,0 mm de longitud) que concluyeron el ciclo parasítico. Adicionalmente, se obtuvo el dato de peso de los animales mediante una báscula para hacienda al destete y al comienzo de los conteos de garrapatas en cada infestación. Muestras individuales de sangre obtenidas por punción de la vena yugular fueron colocadas en tubos con EDTA (anticoagulante) para su posterior genotipificación.

### c) Análisis estadístico

Para describir la variable de conteo de garrapatas (cuantitativa discreta no negativa) se utilizó un modelo lineal mixto (REML). Debido a la sobredispersión de los datos (varianza > media) su distribución resultó ser binomial negativa; sin embargo, para facilitar el cálculo se procedió con la transformación logarítmica de los mismos  $\log_{10}(x + 1)$ . La unidad experimental fue considerada como el flanco izquierdo del animal. Se asumió que la

infestación por garrapatas podría estar influenciada por los factores fijos: a) momento del conteo, b) edad de la madre, c) estado nutricional y d) año de evaluación. El momento de conteo está referido a los días de recuento de teologinas realizado en las correspondientes infestaciones sucesivas (1, 2, 3 y 4). La ganancia de peso previo al destete de terneros de raza Criollo Argentino es influenciada por la edad de la madre al momento de parición (Holgado y col., 2021), por lo cual fueron consideradas las categorías: vaquillona (edad de la madre hasta 3 años), vaca joven (edad de la madre entre 4 y 9 años) y vaca adulta (edad de la madre más de 10 años). Debido a que todos los procesos fisiológicos dentro del cuerpo, incluido el sistema inmunológico, están influenciados por la disponibilidad de nutrientes, se consideró la ganancia de peso de los animales evaluados desde el destete y hasta finalizar el ensayo teniendo en cuenta las categorías: pérdida de peso (valores negativos entre pesadas), aumento adecuado (ganancia de peso de entre 0 y 200 g/día), aumento elevado (más de 200 g/día).

El modelo matemático utilizado fue:

$$y_{ij} = \beta_1 x_{1ij} + \beta_2 x_{2ij}^2 + \dots + \beta_4 x_{4ij} + \beta_5 x_{4ij}^2 + b_{i1} z_{1ij} + b_{i2} z_{2ij} + b_{i3} z_{3ij} + b_{i4} z_{4ij} + \varepsilon_{ij}$$

donde  $y_{ij}$  corresponde a la variable respuesta del logaritmo de conteo promedio de garrapatas para el caso particular  $ij$ ,  $\beta_1$  a  $\beta_4$  son los coeficientes de efecto fijo,  $x_{1ij}$  a  $x_{4ij}$  son las variables de efecto fijo (predictores) para la observación  $j$  en el grupo  $i$ ,  $b_{i1}$  a  $b_{i4}$  son los coeficientes de efecto aleatorio que suponen ser multivariados normalmente distribuidos,  $z_{1ij}$  a  $z_{4ij}$  son las variables de efecto aleatorio (predictores), y  $\varepsilon_{ij}$  es el error para el caso  $j$  en el grupo  $i$  donde el error de cada grupo se supone es multivariante con distribución normal. Se incluyó el valor cuadrático para incorporar flexibilidad al modelo y mejorar su comportamiento.

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico R en el entorno RStudio versión 1.4.1103. El paquete utilizado fue el *lme4*, que proporciona una salida confiable y fácil de interpretar para modelos de efectos mixtos (Bates y Maechler, 2010).

Todos los procedimientos realizados sobre los animales fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Protocolo n° 41.2.14T).

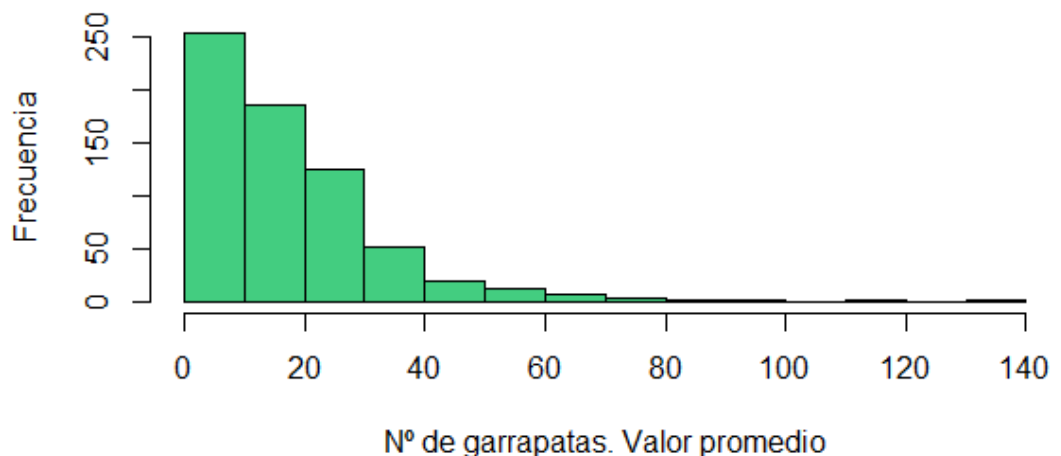
### **3.3 Resultados y discusión**

Los modelos de efectos mixtos se refieren a una variedad de modelos que tienen como característica clave tanto efectos fijos como aleatorios. Como señala Gelman (2005), existen varias definiciones, a menudo contradictorias, de efectos fijos y efectos aleatorios. El autor ofrece una solución intuitiva al proporcionar su propia definición: *“Definimos efectos (o coeficientes), en un modelo multinivel, como constantes si son idénticos para todos los grupos de una población; y variables si se les permite diferir de un grupo a otro”*. El uso de modelos mixtos hace posible la identificación del patrón de covarianza para un individuo debido a la inclusión del efecto aleatorio animal en el modelo. Por lo general, los estudios de investigación de resistencia a garrapatas utilizan medidas repetidas sobre el mismo animal, debido a que se realiza más de una observación por animal. Esta propiedad promueve la estructura de correlación entre las medidas sobre el mismo animal, y el modelo lineal mixto permite ajustar este tipo de dato.

La regresión de Poisson es el modelo más básico adecuado para variables de respuesta de recuento (Long, 1997), siendo propuesto por Ayres (2013) para la evaluación genética de resistencia a garrapata en bovinos cruza Hereford x Nelore. Además, suele suceder que los recuentos de parásitos están muy dispersos en relación con la distribución de Poisson y es preferible utilizar la distribución binomial negativa (Fu, 2016; Mairoano y col., 2019). Sin embargo, por facilidades de cálculo, numerosos trabajos relacionados al conteo de garrapatas realizan la transformación logarítmica de los datos para lograr la aproximación a una distribución normal (Wharton y col., 1970; Seifert, 1971; Marufu y col., 2011; Ibelli y col., 2012;

Biegelmeyer y col., 2015; Mapholi y col., 2016). Debido a un gran número de conteos de garrapatas igual a 0, la transformación de los datos se realiza mediante la fórmula  $\log_{10}(x + 1)$ .

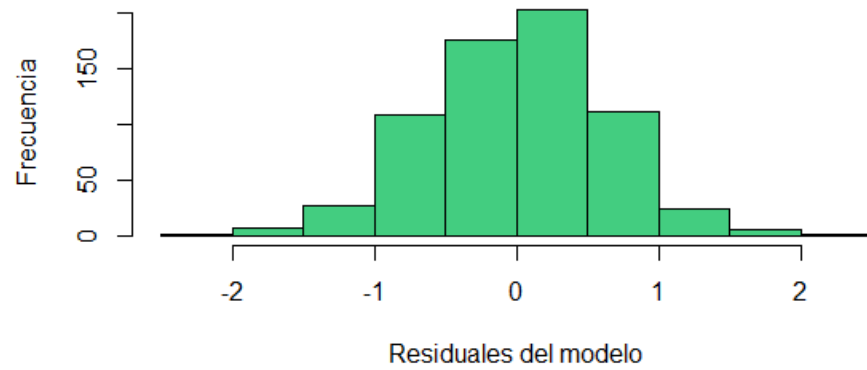
La variable respuesta de resistencia a *R. (B.) microplus* generalmente es considerada como el valor promedio del conteo de garrapatas durante los días 17 a 21 post-infestación. La Figura 8 exhibe la distribución de los conteos promedio de garrapatas realizados en este trabajo, en la que se observa un exceso de valores cercanos a 0. Esto define una sobredispersión de los datos de conteo (varianza = 831,53; media = 33,46), lo que sugiere una distribución hipotética binomial negativa, confirmada mediante la obtención de los parámetros (*size* y *mu*) del paquete de R *Mass* (Venables y Ripley, 2002). Esta distribución fue utilizada por Maiorano y col. (2019) para un estudio comparativo entre razas de la resistencia a las garrapatas utilizando modelos lineales generalizados mixtos, e indicaron que los modelos con distribución binomial negativa no se utilizan con mucha frecuencia en la metodología de estudios similares al llevado a cabo por ellos.



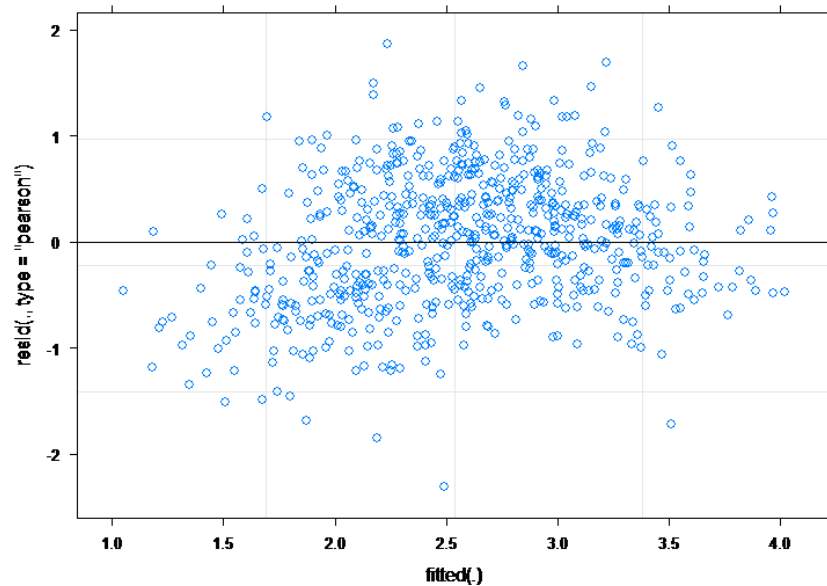
**Figura 8.** Histograma de distribución de los datos de conteo promedio de garrapatas sobre hembras de raza Criollo Argentino.

La Figura 9a revela los valores residuales del modelo utilizado en este trabajo, en el que se realizó la transformación logarítmica de los datos. Los mismos se distribuyen de manera aleatoria y con varianza constante (Figura 9b), cumpliendo con el requisito de normalidad.

a)



b)



**Figura 9.** a) Histograma de distribución de los valores residuales del modelo utilizado;  
b) Gráfico de residuos estandarizados vs. predichos.

El conteo de garrapatas sobre los animales evaluados varió entre 0 y 134 (CV 89 %). El valor de media obtenido (18 teologinas) en este trabajo para vaquillonas de raza Criollo Argentino permiten su clasificación como altamente resistente a la carga de garrapatas (Jonsson y col., 2014) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Medidas resumen de conteo promedio de garrapatas en bovinos de raza Criollo Argentino.

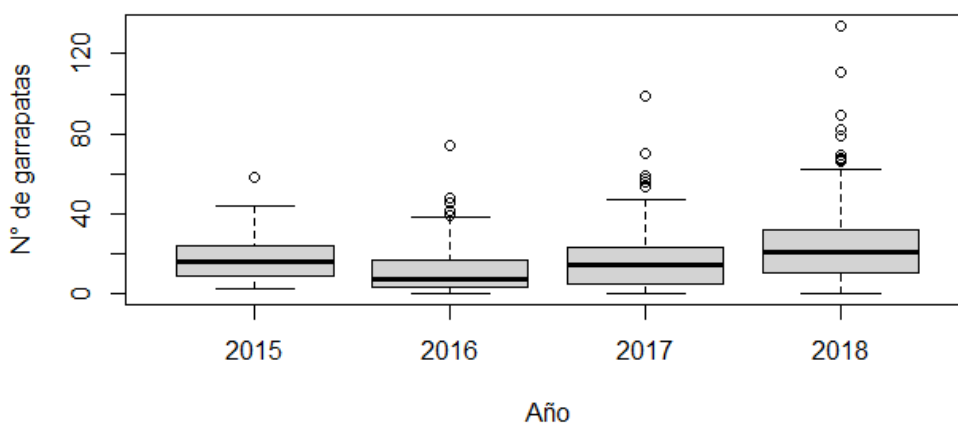
<i>Valor Min</i>	<i>1<sup>er</sup> Cuartil</i>	<i>Mediana</i>	<i>Media</i>	<i>3<sup>er</sup> Cuartil</i>	<i>Valor Max</i>
0	6	14	18	25	134

Coincidentemente, Guglielmone y col. (1990) evaluaron el parasitismo natural por *R. (B.) microplus* en diferentes biotipos bovinos, demostrando que el ganado Criollo Argentino presentó mayor resistencia a la infestación con respecto a sus pares *B. taurus* no ibéricos. Asimismo, la raza local brasileña Criollo Lageano muestra mayor resistencia a los ectoparásitos que aquellos animales media sangre Angus, con menos infestaciones graves por larvas de *Dermatobia hominis* y *R. (B.) microplus* (Cardoso y col. 2014). Según lo notificado por el DAD-IS (FAO, 2010), dentro de las razas que muestran resistencia a la carga de garrapatas se encuentra también la raza criolla colombiana Romosinuano. Más recientemente, Maiorano y col. (2019) determinaron una resistencia intermedia a garrapatas para la raza local de Brasil Caracú.

La convivencia por muchos años de los animales de raza Criolla con *R. (B.) microplus* en territorio americano permitió que la selección natural actúe sobre los individuos, preservando aquellos genotipos favorables a la resistencia al ectoparásito a lo largo de numerosas generaciones. Al mismo tiempo, la selección natural favoreció a aquellas garrapatas con cierta capacidad de evadir las defensas montadas por los hospederos, de manera que el interfaz parásito/hospedero está basada en una relación de equilibrio. De esta

forma, la raza Criollo Argentino pudo adaptarse a la presencia de garrapatas, así como también los ectoparásitos lo hicieron a su sistema inmune. En este sentido, se ha postulado, por ejemplo, que la resistencia a tripanosomiasis y a la infestación de garrapatas en la raza africana N'Dama (*Bos taurus*) se ha desarrollado a través del contacto continuo y prolongado entre el huésped y el parásito durante varios miles de años (Mattioli y Wilson, 1996; Mattioli y col., 2000). Similares hipótesis fueron formuladas por Bennet y Wharton (1968), Seifert (1971) y Barré y col. (1988) en relación a la resistencia a *R. (B.) microplus*, *R. (B.) decoloratus* y *A. variegatum* que se encuentra en las razas locales Brahman australiano, Africander y Cebú Criollo de la isla Guadalupe, respectivamente.

En las evaluaciones realizadas en este trabajo entre 2015 a 2018 se observaron diferencias en las distribuciones de los conteos de garrapatas. Visualmente, en el 2016 se presentaron los menores conteos de garrapatas sobre las vaquillonas de raza Criollo Argentino, mientras que en el 2018 los conteos fueron los que mayor valor alcanzaron (Figura 10).



**Figura 10.** Boxplot representando el número promedio de garrapatas sobre vaquillonas de raza Criollo Argentino durante 2015 a 2018.

La estimación del efecto fijo correspondiente al año de evaluación determinó la existencia de diferencias significativas (Tabla 3). El intercepto correspondió al año 2015, y por cada cambio respecto del nivel de base, el coeficiente para el 2016 representó una reducción significativa de 0,50 en el valor logarítmico de la carga de garrapatas (65 % menos garrapatas); mientras que para el 2018 el coeficiente se condijo con un aumento de 0,16 (17 % más garrapatas), aunque sin ser de magnitud significativa. El año 2017 evidenció una reducción no significativa de 0,16 con respecto al intercepto (17 % menos garrapatas). Estos valores surgen de la interpretación del coeficiente cuando la variable está transformada, de acuerdo a la fórmula  $(EXP(0,28291)-1)*100$  (Tabla 3).

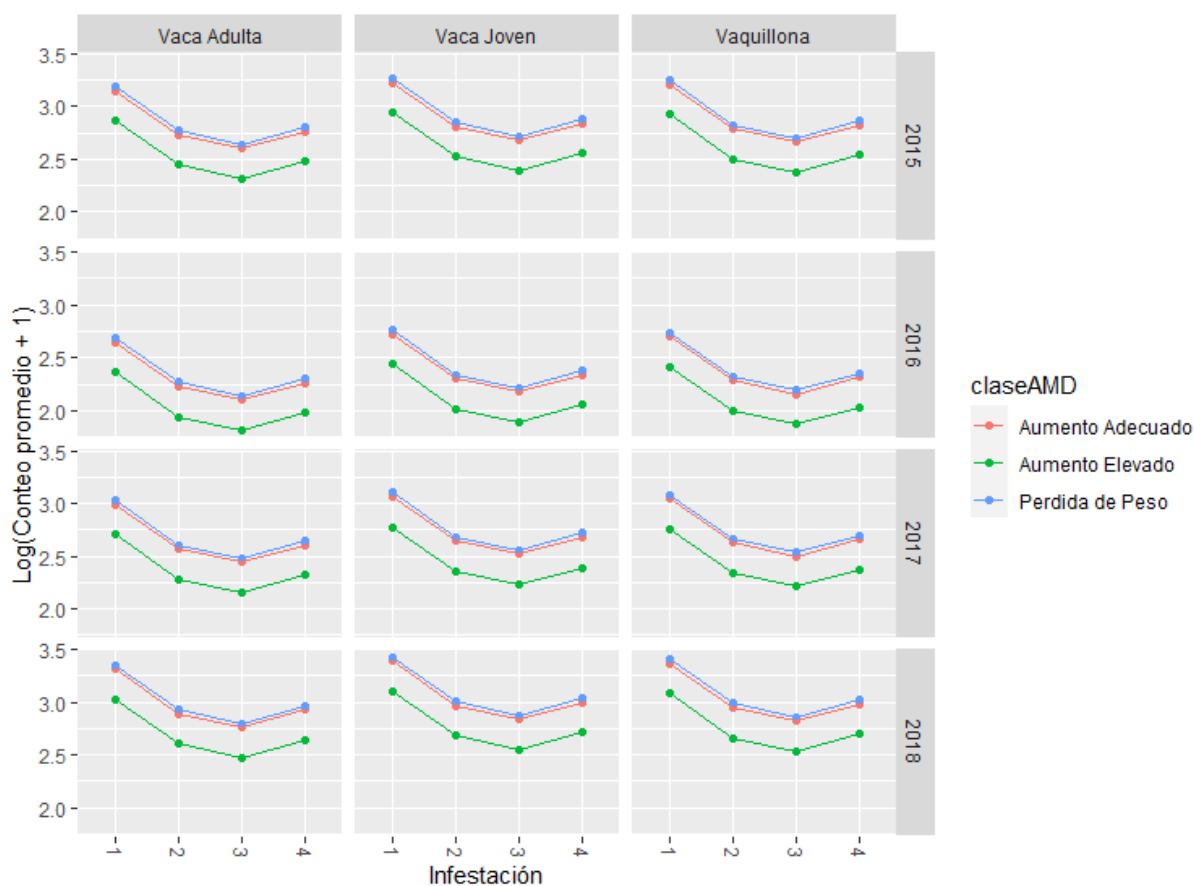
**Tabla 3.** Resultado de las estimaciones de los efectos fijos: año de evaluación, edad de la madre (EM) y ganancia de peso (Aumentos Medios Diarios, AMD). Niveles de base: Año 2015, EM Vaca adulta y AMD adecuado. Valor t: prueba estadística para t de Student de dos colas.

	Valor estimado	Error estándar	Valor t
(Intercepto)	-241,42	81,98	-2,945
Coef. término lineal	-2,2398	0,98320	-2,278
Coef. término cuadrático	3,5218	1,01522	3,469
EM Vaca Joven	0,1527	0,11264	1,356
EM Vaquillona	0,10212	0,14377	0,710
AMD Elevado	-0,28291	0,09937	-2,847
AMD Pérdida de peso	0,07243	0,10475	0,691
Año 2016	-0,50293	0,11857	-4,241



Año 2017	-0,15950	0,12366	-1.290
Año 2018	0,16081	0,11815	1,361

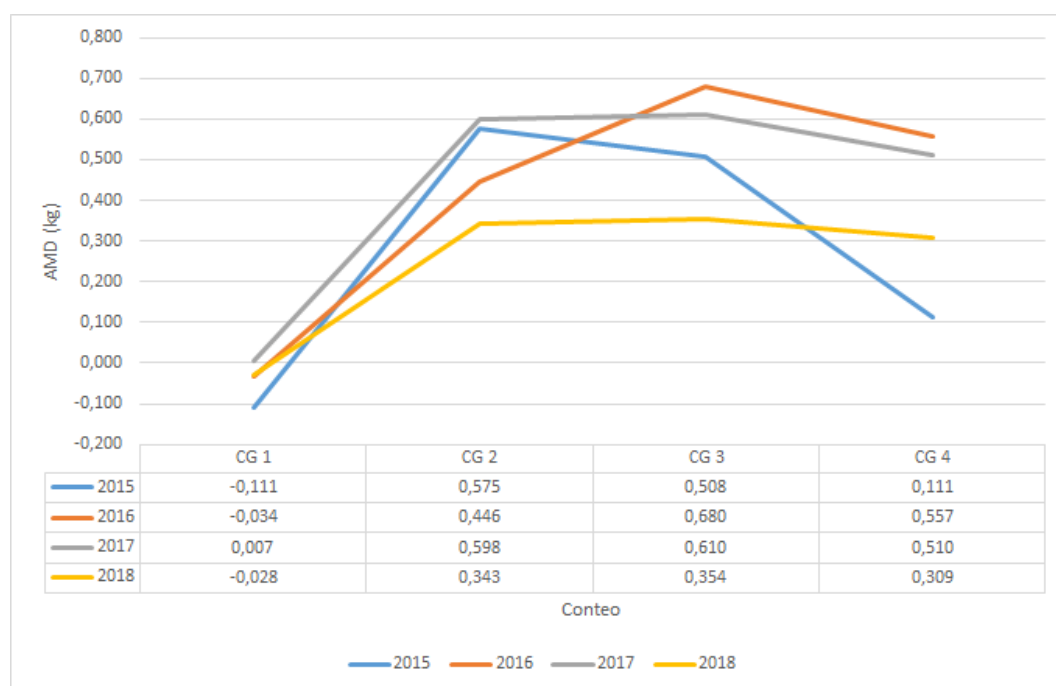
A partir de 2011, y hasta el 2017, en el rodeo de bovinos Criollo Argentino del IIACS se procedió con la evaluación de precocidad sexual de las hembras como parte de la caracterización productiva de la raza. Para ello, se incorporaron a servicio vaquillonas de 15 meses de edad y se obtuvieron terneros de bajo peso al nacimiento, baja ganancia de peso pre-destete debido a una limitada aptitud lechera de la madre y, en consecuencia, bajo peso de destete (Holgado y col., 2017). Las crías de vacas adultas de raza Criollo Argentino, de 7 a 10 años al parto, son las que logran los mayores valores de ganancia de peso pre-destete con respecto a vacas de otras edades (Holgado y col., 2021). Asimismo, Guitou (1983) estudiando diversos efectos sobre razas bovinas y sus cruizas (incluido el rodeo de bovinos Criollo Argentino del IIACS), indicó que la ganancia de peso en los terneros es afectada por la edad de la vaca al parto a través de una relación cuadrática, que asciende desde los 3 años de edad de la madre hasta alcanzar una meseta entre los 7 a 10 años, para luego descender nuevamente. Siendo la longevidad cualidad de la raza, la edad al parto de vacas Criollo Argentino pertenecientes al rodeo del IIACS puede ascender hasta los 17 años aproximadamente. Esta condición pre-existente en los animales evaluados podría alterar su estatus sanitario al momento de la evaluación (Galyean y col., 1999), teniendo en cuenta que la nutrición juega un papel fundamental en la respuesta inmunitaria y los nutrientes pueden influir en varios, si no en todos, los aspectos de la respuesta inmune (Ingvarsen y Moyes, 2013). En la estimación del efecto fijo de edad de la madre en la variable respuesta de conteo máximo de garrapatas de este trabajo, la condición nutricional previa de las vaquillonas evaluadas no tuvo resultado significativo (Tabla 3). Visualmente, cada año de evaluación presenta un patrón diferente, independientemente de la edad de las madres de las vaquillonas integrantes de cada grupo contemporáneo (Figura 11).



**Figura 11.** Representación gráfica de los datos transformados de conteo promedio de garrapatas en vaquillonas de raza Criollo Argentino en relación a la edad de la madre (vaca adulta, vaca joven y vaquillona), ganancia de peso corporal (claseAMD) y año de evaluación.

Como se mencionó anteriormente, la inmunidad del hospedador requiere de energía metabólica adecuada para mantener un funcionamiento óptimo y fluctúa dependiendo de las demandas de otros sistemas fisiológicos. Estas demandas, a su vez, serán variables según las condiciones ambientales, como la disponibilidad de nutrientes (Demas y col., 2010). Las vaquillonas evaluadas en este trabajo tuvieron diferentes ganancias de peso a lo largo del período de infestaciones artificiales realizadas (Figura 12). Un aumento de peso por encima de los 200 g/d permite diferenciar de manera significativa a los animales que cargan un menor número de garrapatas (32 % menos de carga de garrapatas). En este sentido, los resultados

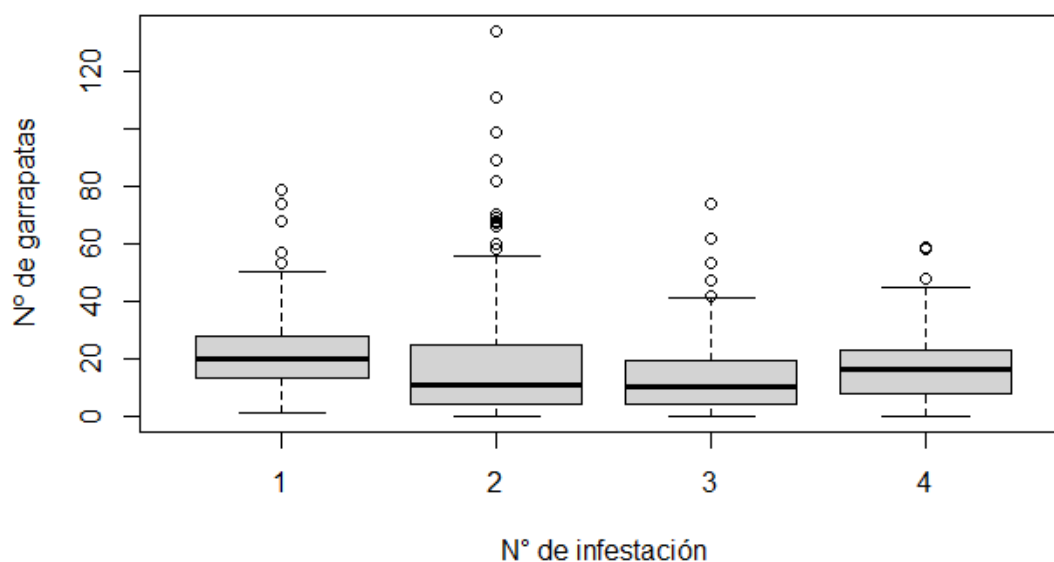
coinciden con lo indicado por Paul y Deay (2015), quienes señalan que el estado nutricional del hospedador determina críticamente el resultado de la “guerra” contra patógenos invasores; por lo cual una inmunocompetencia deficiente puede resultar en una mayor incidencia y duración de las infecciones.



**Figura 12.** Aumentos medios diarios (AMD, en kg) de vaquillonas de raza Criollo Argentino durante el período de evaluación de infestaciones artificiales con garrapatas (CG = Conteo de garrapatas) para los años 2015 a 2018.

Si consideramos el momento de cada infestación realizada, visualmente se puede señalar que los conteos de garrapatas disminuyen a medida que se avanza en el número de desafíos y que la segunda infestación presenta una mayor dispersión de los datos, lo que permite una mejor separación de genotipos con mayor y menor resistencia (Figura 13). Entre las primeras infestaciones se observó un efecto lineal decreciente significativo en la cantidad de garrapatas presentes en los animales (Tabla 3). Sin embargo, en la cuarta infestación se

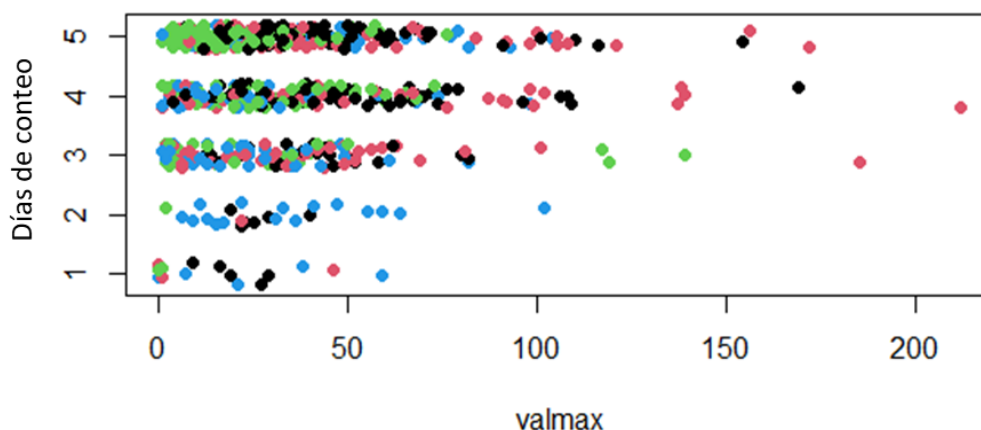
produjo un efecto cuadrático positivo correlacionado con un aumento no significativo en la cantidad de garrapatas. De manera combinada, ambos efectos describen un comportamiento parabólico en el conteo promedio de garrapatas. Puede sospecharse que luego de la segunda infestación, el hospedador desarrolla un mecanismo de defensa más fuerte. Se ha informado que tanto los animales domésticos como los de laboratorio adquieren resistencia a infestaciones repetidas de garrapatas (Trager, 1939; Dipeolu y Harunah, 1984; Jongejan y col., 1989; Dipeolu, 1990; Rechav y Kostrzewski, 1991; Dipeolu y col., 1992). Además, el estado nutricional de los animales a partir de la segunda infestación pudo colaborar en la respuesta a la infestación con garrapatas.



**Figura 13.** Boxplot de distribución de los conteos de garrapatas en las 4 infestaciones realizadas sobre vaquillonas de raza Criollo Argentino.

Finalmente, la fase parasitaria de la garrapata común del bovino se desarrolla íntegramente sobre el hospedador y su duración oscila entre 20 a 41 días, siendo normalmente de 23 días (día modal) (Nava y col., 2011). En la aplicación de infestaciones artificiales se establece ser adecuado para muchos propósitos los recuentos en los animales

entre los días 17 a 21 después de la infestación. La dinámica de desarrollo del ciclo parasitario de la garrapata en los animales de raza Criollo Argentino indica que los días 17 y 18 post infestación el conteo de garrapatas de entre 4,5 y 8 mm no es elevado; siendo mayor a partir del día 19 y llegando a valores máximos los días 20 y 21 (Figura 14).



**Figura 14.** Valor máximo de número de garrapatas en los 5 días de conteo luego de cada infestación (donde los días de conteo 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a los días 17 a 21 post infestación, respectivamente). Los colores de los puntos se corresponden con el número de infestación (1<sup>ra</sup>= negro; 2<sup>da</sup>= rojo; 3<sup>ra</sup>= verde; 4<sup>ta</sup>= azul).

En este sentido, es recomendado para el ganado cebú realizar los conteos de garrapatas los días 20 y 21 post infestación; mientras que en el ganado europeo lo adecuado es realizarlo en los días 19 y 20 (FAO, 1987). Para el caso de Criollo Argentino, el momento sugerido para realizar el conteo de garrapatas que completan su desarrollo sobre el animal luego de infestaciones artificiales, coincidiría con lo indicado para el ganado cebú, siendo posible realizarlo los días 20 y 21 post infestación.

### 3.4 Conclusiones

La raza bovina Criollo Argentino presenta valores de conteo de garrapatas luego de infestaciones artificiales que permiten clasificarla como de resistencia elevada y se propone como una alternativa atractiva para el desarrollo de la ganadería en las regiones endémicas para el mencionado ectoparásito, ya sea como raza pura o en cruzamientos. La condición nutricional previa a las evaluaciones de resistencia a *R. (B) microplus* no afecta la respuesta individual. Sin embargo, la ganancia de peso durante la evaluación de los animales influye significativamente en la característica, presentando el mejor comportamiento frente a la infestación las vaquillonas con ganancias de más de 200 g/d. Puede sospecharse que luego de la segunda infestación el hospedador desarrolla un mecanismo de defensa más fuerte; por lo que podría proponerse como metodología de evaluación de un número elevado de animales, la realización de dos infestaciones con su correspondiente lectura los días 20 y 21 post infestación. Esto promovería la obtención del dato fenotípico para la evaluación genética de la característica.

## 4. CAPÍTULO 2

### Estudio de asociación genómica para resistencia genética a *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en bovinos de raza criollo argentino

#### Resumen

En mejoramiento genético animal, uno de los principales métodos para realizar mapeos de regiones cromosómicas asociadas a características de importancia económica son los estudios de asociación del genoma completo (GWAS). Las razas bovinas presentan fenotipos contrastantes, con componentes genéticos, para la infestación por garrapatas como consecuencia de la evolución conjunta del ganado resistente al ectoparásito y también debido a décadas de cría selectiva. El objetivo de este trabajo fue detectar regiones cromosómicas asociadas a la resistencia a *R. (B.) microplus* mediante un estudio de mapeo asociativo utilizando microarrays de mediana y alta densidad en bovinos de raza Criollo Argentino. El registro fenotípico de conteo de garrapatas, luego de infestaciones artificiales, fue obtenido en 231 animales durante 2015 a 2020. Los datos fueron transformados utilizando  $\log_{10}(x + 1)$  para asegurar su distribución normal. A partir de las muestras de sangre se extrajo ADN genómico para la genotipificación de 192 animales utilizando los microarray de alta (Axiom™ Bos 1) y mediana densidad (ArBos1) de Affymetrix. Luego de los controles de calidad, y para un total de 4227 animales incluidos en el pedigrí, se obtuvieron 48210 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) comunes a ambos microarrays que fueron utilizados para el análisis. De manera exploratoria, se reconocieron regiones cromosómicas que contienen *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) en los cromosomas 27, 11, 10, 9, 16, 13, 3, 19, 8 y 18, asociados a la variación de la carga de *R. (B.) microplus* en la población de bovinos Criollo Argentino evaluado. Los genes detectados determinaron un enriquecimiento funcional de: sistema inmunológico, coagulación de la sangre, regeneración de tejidos, actividad endopeptidasa y fosforilación de proteínas. La información obtenida en este trabajo constituye un primer paso

y establece la base para análisis adicionales que contribuyan en la identificación de biomarcadores relacionados con la resistencia a la garrapata común del bovino en Argentina.

#### 4.1 Introducción

Los estudios de asociación de todo el genoma (*Genome wide association studies*, GWAS) utilizan un gran número de marcadores distribuidos en el genoma completo para detectar variantes asociadas con una enfermedad o característica particular (Meredith y col., 2012). La información aportada a través de marcadores de polimorfismo de nucleótido simple (*Single-nucleotide polymorphism*, SNP) permite detectar o mapear regiones cromosómicas asociadas a características de importancia económica (*Quantitative trait loci*, QTL), gracias al desequilibrio de ligamiento (*Linkage disequilibrium*, LD) existente entre marcadores y QTLs (Wiggans y col., 2009, Meredith y col., 2012).

Estos análisis se utilizan principalmente para identificar *loci* involucrados en caracteres de interés (Matukumalli y col., 2009), y brindan un mayor entendimiento de las bases moleculares y de regulación de las diferentes características (Meredith y col., 2012; Buzanskas y col., 2014). El mapeo asociativo a través de GWAS (o mapeo por desequilibrio de ligamiento) permite encontrar lugares específicos del genoma relacionados con la variación de un carácter fenotípico. A su vez, es conocido que estos análisis pretenden aumentar la productividad animal y la exactitud en las estimaciones del valor genético que determinan una selección más confiable en los programas de mejoramiento genético, aplicando la denominada selección genómica (Meuwissen y col., 2001). El poder de estos estudios está frecuentemente influenciado por el número de animales con información genotípica y fenotípica confiable. Suele suceder que existe un número considerable de animales con datos fenotípicos y registros genealógicos, pero sólo algunos de ellos están genotipados. Teniendo en cuenta esto, el análisis de asociación de un solo paso (ssGWAS), propuesto por Wang y col. (2012), permite superar esta limitación. Cuando el número de animales genotipados es



limitado, la inclusión de animales no genotipados en el análisis aumenta la potencia y la precisión en la estimación de los componentes de la varianza (Howard y col., 2015). Asimismo, la varianza desigual o ponderaciones para todos los efectos asociados del marcador SNP-QTL en el análisis, puede aplicarse en un método de estudio de asociación de todo el genoma de un solo paso ponderado (WssGWAS); permitiendo mejorar la exactitud de los valores genéticos estimados y la precisión en la estimación de los efectos de los marcadores (Wang y col., 2012).

El primer biomarcador identificado y asociado con la carga de garrapatas fue la amilasa sérica, que está codificada por un *locus* ubicado en el cromosoma bovino 3 (Ashton y col., 1968). Esto fue reafirmado por Carvalho y col. (2008), quienes indicaron que diferencias en la concentración sérica de algunas proteínas (haptoglobina y transferrina) podrían potencialmente usarse como biomarcadores para monitorear el nivel de garrapatas. El complejo mayor de histocompatibilidad bovino (MHC), conocido como antígeno leucocitario bovino (BoLA), tiene un importante rol en el procesamiento y presentación de antígenos. En la década del 70, se avanzó con la detección de asociaciones con marcadores del BoLA (Clase I) utilizando la prueba de microlinfocitotoxicidad en animales de razas compuestas expuestos a infestaciones naturales y artificiales con garrapatas (Stear y col., 1984; 1989; 1990). Esta metodología fue luego reemplazada por otras de mayor consistencia para describir la asociación entre los alelos del BoLA y la resistencia a garrapatas. En este sentido, en 2005 se proporcionó evidencia de asociación entre resistencia a garrapatas y marcadores microsatélites de ADN localizados en el MHC (Acosta-Rodríguez y col., 2005; Martínez y col., 2006; Untalan y col., 2007), confirmando la participación de esta región, ubicada en el cromosoma 23, en la resistencia al ectoparásito.

Los actuales enfoques, que combinan biología molecular y genética cuantitativa, han permitido una mejor comprensión de los mecanismos genéticos que subyacen a la resistencia de las garrapatas. El análisis de ligamiento se ha utilizado para identificar numerosos QTLs

asociados a la resistencia a las garrapatas. De esta manera, en una población F2 Holstein x Gyr de Brasil, utilizando marcadores microsatélites, se identificaron asociaciones de efecto significativo teniendo en cuenta la influencia ambiental, en los cromosomas 2, 10 y 23 (estación seca) y 5, 11, 23 y 27 (estación húmeda) (Gasparin y col., 2007; Regitano y col., 2008; Machado y col., 2010). Estos QTLs explicaron el 3,3 % y el 5,9 % de la varianza fenotípica en la carga de garrapatas y, al abarcar grandes fragmentos cromosómicos, no se pudo avanzar en la identificación de potenciales genes candidatos que confieren resistencia a garrapatas.

Desde hace algunos años, se utilizan marcadores de SNPs para identificar variantes genéticas asociadas con rasgos complejos. Para ello, cada marcador se prueba de forma independiente para detectar una asociación con el rasgo de interés mientras se controla la estratificación de la población causada por diferencias de composición de la raza o el pedigrí entre los animales. La expectativa es que la varianza explicada por cada marcador esté relacionada con el tamaño del efecto del polimorfismo causal subyacente en el rasgo, el grado de asociación entre el marcador y el polimorfismo y el error experimental asociado con la medición del rasgo. Por consiguiente, el análisis ideal requiere una gran cantidad de marcadores genotipados en un elevado número de individuos, que permitan que el análisis adquiera un poder significativo para detectar asociaciones; o bien un menor número de individuos evaluados bajo condiciones muy controladas.

En la literatura han sido informados algunos estudios de GWAS relacionados a la resistencia genética a garrapatas en bovinos. En Australia, trabajos utilizando microarrays permitieron detectar regiones asociadas a la característica en 13 cromosomas en ganado lechero con diferente composición genética, explicando cada uno alrededor del 1 % de la varianza (Barendse, 2007; Turner y col., 2010). Estos autores reportaron una baja correlación entre los alelos asociados con composición de la leche y el conteo de garrapatas, sugiriendo que se podría seleccionar a favor de la resistencia a este ectoparásito sin afectar la producción

lechera. En las regiones del genoma identificadas, las mayores superposiciones de asociación con la resistencia a garrapatas se encontraron en los cromosomas 2, 10, 13 y 19. Los QTLs reportados en los cromosomas 3 y 10 fueron confirmados y explorados con mayor detalle por Porto Neto y col. (2010a, 2011) en ganado lechero y Brahman de Australia, logrando identificar el gen ITGA11 (*Integrin alpha 11*) y ELTD1 (*adhesion G protein-coupled receptor L4*) como posibles candidatos. Además, los mismos autores realizaron un meta-análisis combinando resultados de GWAS y transcriptómica en razas lecheras y Brahman (Porto Neto y col., 2010b) con resultados significativos para regiones de los cromosomas 2, 10, 13 y 19. El análisis de ontología de los 20 genes localizados en estas regiones permitió identificar procesos biológicos sobrerrepresentados (por ejemplo: quimiotaxis de leucocitos). Otros autores reportaron QTLs en los cromosomas 7, 10 y 19 en la raza sudafricana Nguni (Mapholi y col., 2016) y 10 y 23 en una población experimental F2 Gir × Holstein (Machado y col., 2012; Otto y col., 2018). En este último trabajo se identificaron genes involucrados en procesos biológicos importantes del sistema inmune (receptores de inmunoglobulinas TREM1, TREM2 y CD83; proteínas motoras MYO5A, TREML1 y PRSS16). En otro trabajo, Sollero y col. (2017) identificaron SNPs asociados con resistencia a garrapatas en *Bos taurus* autosomas (BTA) 5, 11 y 15 en poblaciones de medios hermanos de ganado Hereford y Braford de Brasil. Recientemente, Marima y col., (2019) indicó al gen LUM (*lumican*) ubicado en el cromosoma 5 como potencial biomarcador para resistencia a garrapatas y otros genes con variación, asociados a disminuir el suministro de sangre para alimentación del parásito y a respuestas inmunes. Finalmente, los paneles de SNP fueron evaluados en el contexto de programas de selección genómica, sugiriendo que estas herramientas podrían ser utilizadas para mejorar la resistencia genética a garrapata y desarrollar líneas resistentes (Cardoso y col., 2015; Mapholi y col., 2014; Sollero y col., 2017).

En América Latina y el Caribe las poblaciones de las razas Criollas han evolucionado en diferentes zonas agroecológicas en sistemas de producción con manejo tradicional, y

debido a la percepción de que son poco productivas, han sido paulatinamente sustituidas por genotipos exóticos. En Argentina, como en el resto de países latinoamericanos, no se cuenta en la actualidad con información sobre el tamaño poblacional de estas razas. Sin embargo, se considera que existe un número reducido de individuos (con riesgo de extinción en algunos casos) debido a múltiples factores, entre los que se señalan principalmente los siguientes: uso indiscriminado de cruzamientos con razas introducidas; carencia de investigación con el énfasis necesario en las características o productos más sobresalientes; inestabilidad sociopolítica y cultural; carencia de incentivos para el uso de estas razas y, finalmente, falta de estrategias de comercialización (Martínez, 1999).

La mayor parte de las razas bovinas criollas han sido caracterizadas mediante marcadores genéticos autosómicos de tipo microsátélites y uniparentales del cromosoma Y y del ADN mitocondrial (Ginja y col., 2019). En este sentido, y a pesar de la restricción en el número de individuos evaluados, en la raza criolla Blanco Orejinegro (BON) de Colombia se informó evidencia preliminar de asociación de algunas variantes del gen del BoLA y la resistencia a *R. (B.) microplus* usando un marcador tipo PCR-RFLP (Martínez, 2005). Los estudios de genes involucrados en la respuesta inmune de las razas criollas han sido limitados (Ortega y col., 2020), considerándose de importancia evaluar estas poblaciones para estudiar regiones cromosómicas relacionadas a la resistencia a enfermedades infecciosas.

El objetivo de este trabajo fue detectar regiones cromosómicas asociadas a la resistencia a *R. (B.) microplus* mediante un estudio genómico utilizando microarrays de mediana y alta densidad en bovinos de raza Criollo Argentino.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **a) Población experimental**

Se obtuvieron muestras de sangre total mediante punción de vena yugular de bovinos de raza Criollo Argentino pertenecientes al Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido. Las muestras fueron conservadas en tubos con anticoagulante EDTA, acondicionadas y enviadas al Instituto de Genética Veterinaria “Ingeniero Fernando Noel Dulout” (IGEDET, CONICET FCV- UNLP) para su genotipificación. Para la obtención del dato fenotípico individual, los animales fueron evaluados mediante infestaciones artificiales sucesivas con *R. (B.) microplus* durante 2015 a 2020 de acuerdo a lo descrito en el Capítulo 1. El número de animales con registro fenotípico fue de 231, mientras que el número de animales genotipados fue de 192 para un total de 4.227 incluidos en el pedigrí.

Todos los procedimientos realizados sobre los animales fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Protocolo n° 41.2.14T).

b) Extracción de ADN y genotipado

A partir de las muestras de sangre se extrajo ADN genómico mediante kits comerciales [Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, EE. UU.) y DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen, Alemania)]. La concentración y pureza del ADN obtenido se evaluó en un espectrofotómetro NanoView (GE Healthcare, EE. UU.). Para el genotipado se utilizó una plataforma GeneTitan® de Affymetrix (Santa Clara, CA, USA), que permite realizar estudios de gran relevancia con alto rendimiento y de forma robusta y confiable al analizar microarrays de alta o de mediana densidad.

Para este trabajo, un grupo de individuos (68 animales) fue genotipado con el microarray de alta densidad Axiom™ Bos 1 (Affymetrix). Este microarray contiene 648.855 marcadores SNP y permite realizar estudios de asociación de todo el genoma para identificar variaciones asociadas con enfermedades. Los 124 animales restantes se analizaron con el microarray de

mediana densidad ArBos1. Este es un microarray de SNP bovino de bajo costo usado para el análisis simultáneo de selección genómica, selección asistida de genes asociados a caracteres de producción, diagnóstico de enfermedades de origen genético, paternidad y linajes (pedigrí). Este producto ArBos1, es de diseño argentino, utiliza la tecnología Axiom de Affymetrix, basada en la unión de sondas (oligonucleótidos de ADN) a un soporte físico mediante fotolitografía, lo que permite lograr mayor repetitividad entre corridas que otras tecnologías. Específicamente, la matriz de ArBos1 cuenta con 384 microarrays/muestras por placa, que contiene sondas para genotipificar 50.000 sitios polimórficos distribuidos en todo el genoma bovino, cubriendo los 29 cromosomas autosómicos, el par sexual y el ADN mitocondrial.

Los datos brutos obtenidos a partir de estos microarrays se procesaron utilizando el software Axiom™ Analysis Suite (Affymetrix). Los controles de calidad sobre los individuos y los marcadores se implementaron utilizando el programa Plink 1.9 (Whole genome data analysis toolset, <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) (Purcell, 2007). Se consideró excluir individuos con menos del 95% de call rate o éxito de genotipado (--mind 0.05) y excluir SNPs con error de genotipado >10% (--geno 0.1), MAF <5% (--maf 0.05), equilibrio de Hardy-Weinberg >0.001 (--hwe). Finalmente, los datos procesados se exportaron en formato .PED y .MAP. Los bloques de ligamiento fueron considerados en ventanas de 20 SNPs contiguos. La anotación de los SNPs se realizó utilizando el archivo Axiom\_GW\_Bos\_SNP\_1.na35.annot (Affymetrix) para el Bos1 y el archivo Axiom\_ArBos\_1.1.na35.annot (Affymetrix) para el microarray ArBos1, y las posiciones se asignaron de acuerdo con el ensamblaje del genoma bovino UMD 3.1. Para los pares de progenitor-progenie genotipados, los desajustes en los errores de pedigrí se verificaron mediante el porcentaje de conflictos mendelianos propuesto por Wiggans y col. (2009) por medio del uso del software seekparentf90 de la familia de programas BLUPF90 (<http://nce.ads.uga.edu/>). El desequilibrio de ligamiento entre los SNP y

los bloques de ligamiento se estimaron mediante los comandos `--r2` `--ld-window-r2` y `--blocks` implementados en el software Plink 1.9.

c) Análisis de asociación genómica

Los análisis para la estimación de los componentes de varianza y parámetros genéticos; así como los análisis de GWAS, se realizaron mediante el procedimiento BLUP de un solo paso (ssGBLUP) (Aguilar y col., 2010) implementado en BLUPF90 y POSTGSF90 de la familia de programas BLUPF90 (Aguilar y col., 2010, 2011; Masuda, 2018). La ponderación en los efectos de los SNP (WssGBLUP) contempló tres procesos iterativos (Wang y col., 2012). El modelo animal utilizado se refiere específicamente a un modelo mixto con un efecto genético aditivo individual como un efecto aleatorio.

El modelo empleado para este trabajo fue el siguiente:

$$y = Xb + Za + e$$

donde  $y$  es el vector de observaciones del conteo de garrapatas transformado (medidas repetidas);  $b$  es el vector de efectos fijos;  $a$  es el vector de efectos genéticos aditivos animales aleatorios;  $e$  es el vector de efectos residuales aleatorios;  $X$  y  $Z$  son matrices de incidencia que relacionan los efectos fijos y aleatorios respectivamente a  $y$ . Se asumieron distribuciones normales para los efectos aleatorios:  $a \sim N(0, H\sigma_a^2)$  y  $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$ , donde  $H$  es la matriz de relaciones que combina la información genómica y de pedigrí,  $I$  es la matriz de identidad de orden igual al número de animales y registros,  $\sigma_a^2$  es la varianza genética aditiva del rasgo y  $\sigma_e^2$  es la varianza residual. La inversa de  $H$  fue obtenida de la siguiente manera:

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix}$$

donde  $A$  es la inversa de la matriz de relaciones basada en el pedigrí para todos los animales,  $G$  es la matriz de relaciones genómicas,  $A_{22}^{-1}$  es la inversa de la matriz de relación

de pedigrí para animales genotipados (Aguilar y col., 2010). Para el análisis WssGWAS, la matriz  $G$  fue obtenida de acuerdo a VanRaden (2008) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$G = ZDZ'q$$

donde  $Z$  es la matriz de contenido de genes ajustada por frecuencia alélica,  $D$  es la matriz diagonal de ponderaciones para las varianzas de los SNP (inicialmente  $D = 1$ ), y  $q$  es un factor de ponderación.

Los efectos de los SNP se determinaron a partir de los valores genéticos y los porcentajes de la varianza explicada por las ventanas de 20 SNP adyacentes.

Los gráficos Manhattan se obtuvieron a través del programa estadístico R en el entorno RStudio versión 1.4.1103 (<http://www.rstudio.com/>). La identificación y visualización de los genes ubicados en las regiones cromosómicas asociadas se realizó mediante el buscador FAANGMine v1.2 (Functional Annotation of ANimal Genomes, <https://faangmine.elsiklab.missouri.edu/>). Los enriquecimientos funcionales fueron obtenidos a partir de la base de datos STRING (<https://string-db.org>).

## 4.3 Resultados y discusión

### 4.3.1 Descripción de la base de datos genética utilizada

El primer paso del análisis consistió en evaluar la eficiencia y el grado de información de los dos microarrays utilizados en la población de estudio, así como en la base de datos combinada. Para el microarray de mediana densidad ArBos 1 se obtuvo un total de 49.474 variantes (SNPs) con una tasa de genotipado de 0.9975. El Bos 1 determinó un total de 647.839 SNPs, siendo la tasa de genotipado de 0.9922. Al combinar ambos microarrays se obtuvo un total de 48.210 SNPs comunes. La aplicación de los filtros de calidad determinó que el total de marcadores resultantes sea de 42.690 SNPs y ningún animal fuera eliminado. La información de marcadores genéticos obtenida fue la utilizada para el análisis de



asociación genómica (Tabla 4), aportando un interesante conjunto de datos que reflejan la diversidad polimórfica en la especie y teniendo en cuenta que los análisis de GWAS son influenciados por el número y distribución de los mismos dentro del genoma

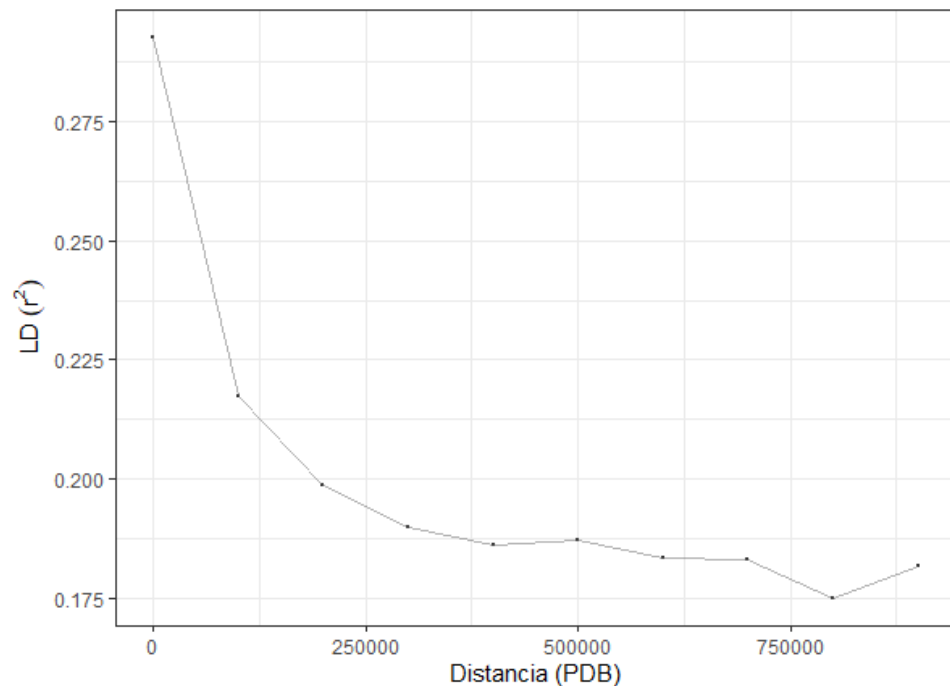
**Tabla 4.** Descripción del número de marcadores, el intervalo promedio entre marcadores y su desvío estándar para cada cada cromosoma autosómico de la base de datos de SNPs utilizada para el análisis de asociación genómica (GWAS).

<b>Cromosoma</b>	<b>Número de marcadores</b>	<b>Intervalos promedio (Kb)</b>	<b>Desvío estándar (Kb)</b>
BTA1	3145	50,31	42,53
BTA2	2392	56,88	67,39
BTA3	2270	52,78	62,68
BTA4	2337	50,82	47,70
BTA5	2181	55,17	74,86
BTA6	2294	51,79	62,07
BTA7	2170	51,75	52,81
BTA8	2196	51,44	43,03
BTA9	2267	46,35	40,93
BTA10	1962	52,89	65,90
BTA11	1859	56,08	63,73
BTA12	1476	59,92	104,09
BTA13	1433	58,62	67,42

BTA14	1461	57,11	59,68
BTA15	1543	55,06	68,20
BTA16	1744	46,57	54,82
BTA17	1317	55,83	61,97
BTA18	1267	51,82	106,16
BTA19	1024	62,03	79,65
BTA20	1452	48,95	52,72
BTA21	1339	53,23	59,41
BTA22	1188	51,15	55,68
BTA23	1487	35,05	66,46
BTA24	1301	48,04	47,81
BTA25	921	44,40	51,78
BTA26	1106	46,36	60,16
BTA27	1064	42,60	50,31
BTA28	968	47,51	51,30
BTA29	1046	47,71	52,61
Total	48210	51,58	62,04

El desequilibrio de ligamiento (LD) entre marcadores determina el poder y la precisión de los estudios de mapeo por asociación, lo que influye directamente en la capacidad para

localizar genes o *loci* responsables de características productivas o a resistencia a enfermedades (Goddard y Hayes, 2009; Porto Neto y col., 2014). La media y desviación estándar del coeficiente de correlación al cuadrado ( $r^2$ ) entre SNP adyacentes fue de  $0,22 \pm 0,25$  en todos los cromosomas de la población en estudio. El estimador  $r^2$  se acepta como una medida de LD en el contexto del mapeo de QTL, debido a la aplicabilidad para la estimación del número de *loci* necesarios para los estudios de asociación (Pritchard y Przeworski, 2001). En la figura 15 se presentan las estimaciones de LD en términos de la caída del valor del coeficiente de correlación  $r^2$  con respecto a la distancia entre marcadores, así como la persistencia de la fase.



**Figura 15.** Decaimiento del desequilibrio de ligamiento ( $r^2$ ) por distancia expresada en pares de bases (PDB) para los cromosomas de la población de bovinos Criollo Argentino.

En la comparación de razas, las estimaciones de LD de menor valor a distancias cortas son una indicación de grandes tamaños de población ancestral y se han informado para el ganado índico en comparación con el ganado taurino (Gibbs y col., 2009). De manera consistente a lo obtenido en este trabajo, Flores-Cardoso y colaboradores (2021)

determinaron valores similares de  $r^2$  en la raza taurina africana Nguni. De acuerdo a Meuwissen y col. (2001), la relevancia en conocer los valores de LD (en términos de correlación promedio) radica en que para que la selección sea mínimamente eficiente, el LD promedio para marcadores adyacentes debe ser igual o mayor a 0,2. Los resultados obtenidos evidencian que la población en estudio tiene una distribución de LD que permite los estudios de GWAS.

#### 4.3.2 Control de genealogía a través del uso de la genómica

La información genealógica es una herramienta fundamental para llevar a cabo cualquier programa de mejora genética y estudios de mapeo. A partir de la década del '60 el control del pedigrí en bovinos se llevó adelante a través de diversas tecnologías de identificación basada en marcadores genéticos; inicialmente se utilizaron grupos sanguíneos (Stormont, 1967), luego marcadores microsatélites (Davis y De Nise, 1998) y en la actualidad se transita hacia los SNPs (Heaton y col., 2002). En este sentido, la verificación de las inconsistencias mendelianas permite identificar animales para los que la información del pedigrí y la información del genotipo no coinciden (Calus, 2011).

A nivel mundial, se ha demostrado mediante el uso de diferentes técnicas de ADN que las asignaciones de paternidad tienen un error que varían entre 4 a 25 % (Banos y col., 2001). La población de bovinos Criollo Argentino del IIACS presentó una tasa de identificación errónea del 11 % al considerar los animales genotipados (22 animales de 192 genotipados). Se ha estimado que una tasa de error en el pedigrí del 10 % puede tener un efecto de entre el 6 al 13 % en el coeficiente de consanguinidad, 11–18 % de reducción en las estimaciones del valor de cría, 2–3 % de pérdida en la respuesta a la selección (Banos y col., 2001; Visscher y col., 2002) y subestimación de la heredabilidad (Geldermann y col., 1986; Israel y Weller, 2000). Sobre la base de la información genómica, se puede realizar la reasignación correcta de padre en el 50 % de las hembras con una tolerancia máxima del 1 % (umbral) en los errores

de genotipado previo al estudio de GWAS. En el resto de los animales se eliminó la información del padre excluido del pedigrí.

Las fuentes de error en la filiación de los animales pertenecientes el rodeo de bovinos Criollo Argentino del IIACS pueden deberse principalmente a equivocaciones en la carga de datos y/o a preñeces por “robo” debido al ingreso temporal de toros no asignados a los lotes de servicio debido a dificultades en el manejo y/o infraestructura.

#### 4.3.3 GWAS resistencia a garrapatas

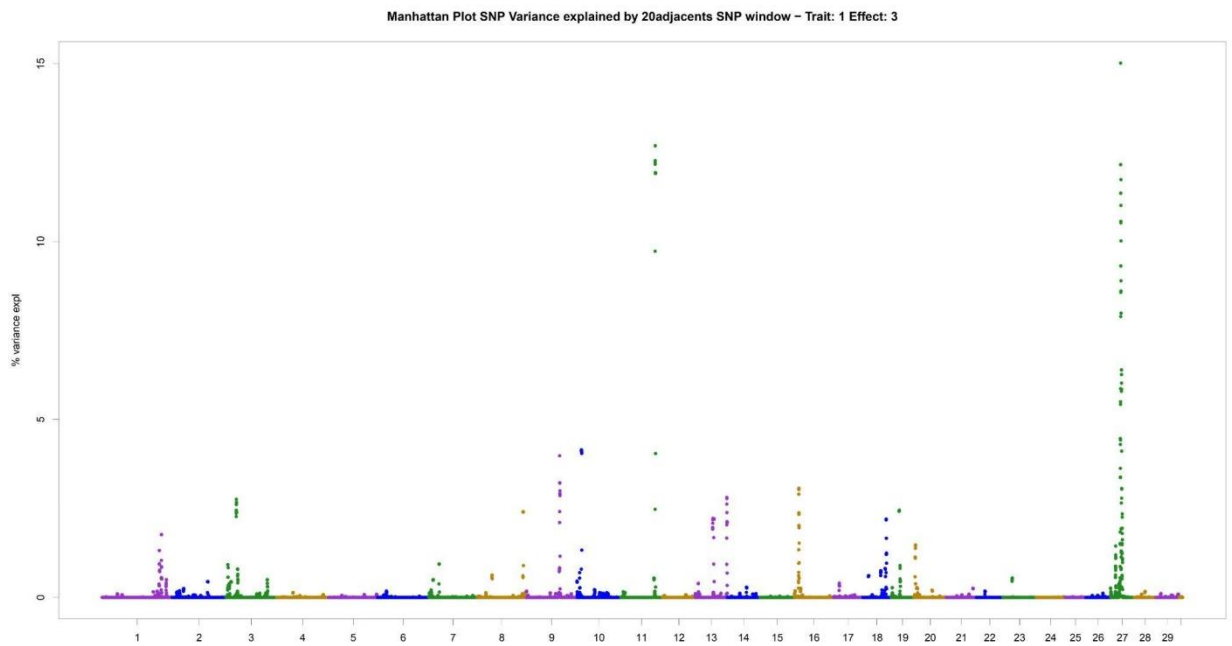
Utilizando una población de la raza africana Nguni, Mapholi y col. (2016) obtuvieron bajas a moderadas estimaciones de heredabilidad ( $h^2$ ) para los datos transformados del conteo de garrapatas; indicando que estos resultados podrían deberse a un tamaño de muestra pequeño y una variación genética reducida presente en las razas naturalmente resistentes al parásito. Los valores reportados por estos autores oscilaron entre  $0,00 \pm 0,00$  a  $0,17 \pm 0,04$  considerando diversas regiones corporales de evaluación en los animales. Otros autores han reportado estimaciones de heredabilidad más altas para la resistencia a las garrapatas utilizando diversas poblaciones. En este sentido, se reportaron valores de  $h^2$  de 0,37 en razas lecheras *B. taurus* (Turner y col., 2010), 0,39 en la raza Shorthorn (Wharton y Roulston, 1970), 0,41 en una raza compuesta tropical (Porto Neto y col., 2014), 0,42 en una raza compuesta de ganado de carne tropical (Burrow, 2001) y 0,54 en una población experimental Gir  $\times$  Holstein (Otto y col., 2018). Teniendo en cuenta las características de la población evaluada en este trabajo y la tasa de identificación errónea del pedigrí, para el análisis de GWAS se utilizaron los valores de varianza aditiva y residual obtenidos por Mapholi y col. (2016) ( $\sigma^2_a = 0,07$ ,  $\sigma^2_e = 0,55$ ,  $h^2 = 0,12$ ). Lograr una mejora genética de la resistencia en poblaciones con estas particularidades, en comparación con aquellas que presentan mayor variabilidad aditiva, se torna en un trabajo más arduo.

El análisis de GWAS considerando procedimientos que incluyen ponderaciones para una ventana de SNP pueden ser la mejor opción en comparación con un SNP único (Zhang y col. 2016). Esta metodología (WssGWAS) fue validada anteriormente por varios autores utilizando datos de campo y, como resultado, varias asociaciones fueron encontradas (Laodim y col., 2019; Marques y col., 2018; Medeiros De Oliveira Silva y col., 2017). En este trabajo, se logró la identificación de 14 regiones que explican al menos un 2 % de la variación del carácter de conteo de garrapatas (Tabla 5). Estas regiones están localizadas en los cromosomas BTA 27, 11, 10, 9, 16, 13, 3, 19, 8 y 18; demostrando la naturaleza poligénica de la característica de resistencia genética a *R. (B.) microplus* (Figura 16).

**Tabla 5.** Posición de regiones dentro de cada cromosoma (BTA) y porcentaje de varianza genética explicada para la característica de resistencia a garrapatas en bovinos Criollo Argentino.

BTA	Varianza (%)	Posición
27	15,01	16749958..17035351
11	12,69	80572397..81281306
27	6,39	17700709..19067353
10	4,14	7081150..7663038
9	3,98	65287509..66199183
16	3,07	10887294..11512366
13	2,81	83292226..83964916
3	2,75	21758458..22536402
19	2,45	18441557..19721894
8	2,41	106122266..107078238
27	2,34	20135410..20781570
13	2,22	45281222..46351414
13	2,20	47948217..49379048
18	2,19	56056964..57171570

La varianza explicada por los análisis de GWAS es útil cuando los objetivos están referidos a la cría, sin embargo, puede no ser apropiado por sí sólo en la detección de QTL si el propósito final es lograr una comprensión detallada de la acción de los genes. En este caso, considerar el valor de probabilidad en los análisis es una estrategia general y eficiente para identificar *loci* de rasgos cuantitativos (Aguilar y col., 2019). Al verificar si las variaciones explicadas por estas regiones se deben al azar, utilizando el análisis de tasa de falsos positivos (*False Discovery rate*, FDR) que emplea en RStudio la corrección Benjamini-Hochberg por defecto, no se obtuvieron marcadores significativos para la característica de resistencia a garrapatas en la población evaluada. Aunque el uso de las estimaciones de los efectos de los marcadores o las varianzas explicadas considera correctamente la magnitud de los mismos, no siempre considera correctamente la incertidumbre en la estimación de los efectos de los marcadores. A pesar de lo señalado, Hammond y col. (2021) indican que las restricciones biológicas en las señales de GWAS sub-significativas pueden revelar *loci* potencialmente verdaderos positivos. En este sentido, las señales adicionales que logran significación en todo el genoma en rondas sucesivas de GWAS son a menudo aquellas que no lograron el umbral ( $p = 5 \times 10^{-8}$ ) comúnmente utilizado en las rondas iniciales, una barra estricta que sólo se puede cumplir cuando se trabaja con tamaños de cohorte más grandes.



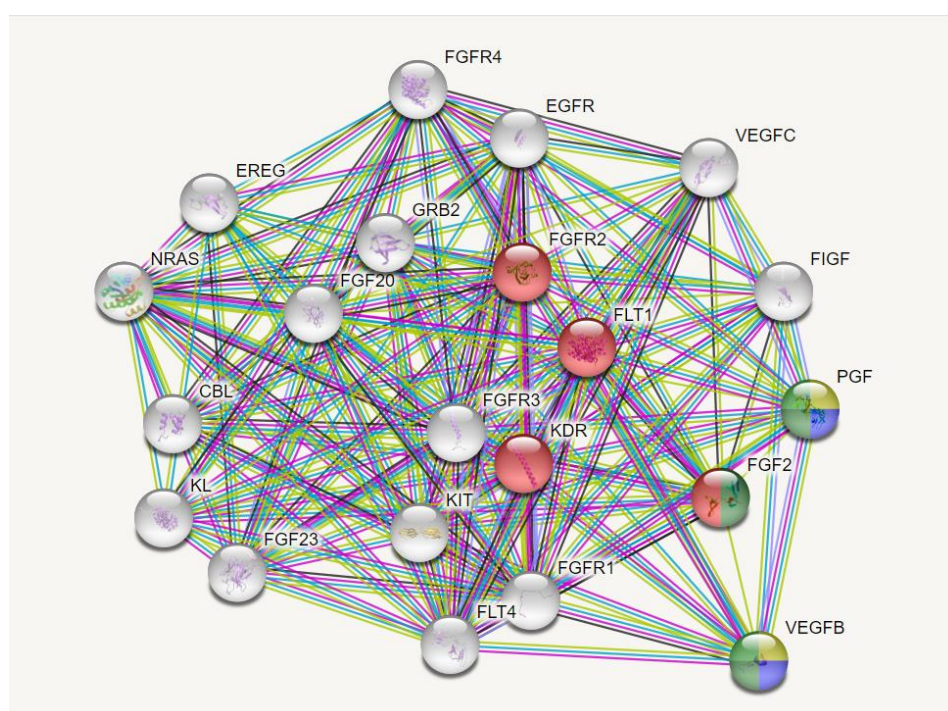
**Figura 16.** Manhattan plot del porcentaje de varianza genética, explicada en ventanas de 20 SNP, para resistencia genética a *R. (B.) microplus* en bovino Criollo Argentino.

A fin de realizar un análisis exploratorio de los posibles marcadores asociados a resistencia genética a garrapata común del bovino en la población de bovinos Criollo Argentino evaluada, se avanzó en indagar sobre las regiones involucradas de acuerdo al porcentaje de varianza explicada en orden decreciente (Tabla 5). El tipo de investigación exploratoria es utilizada para estudiar un problema que no está claramente definido, por lo que se lleva adelante con la finalidad de una mejor comprensión, pero sin proporcionar resultados concluyentes.

Luego del proceso iterativo de ssGWAS, el mayor porcentaje de varianza genética (15,01 %) estuvo explicado por una ventana en el BTA27, mientras que otras ventanas en el mismo cromosoma explicaron el 6,39 y 2,34 % respectivamente. Estudios anteriores realizados en Brasil reportaron la presencia de un QTL significativo en este cromosoma para una población F2 (Gyr x Holstein) durante la estación lluviosa, explicando este QTL un 3,31 % de la varianza genética detectada (Machado y col., 2010), aunque su ubicación no se



superpone con las encontradas en este trabajo. En la tabla 6 se detallan los genes localizados dentro de las ventanas del BTA27, y que guardan relación con la característica evaluada. Entre estos genes se destaca el gen FGF20 (*fibroblast growth factor*), interesante de nombrar teniendo en cuenta que la mayoría de los factores de crecimiento tienen acciones de inducción del crecimiento o la proliferación celular, entre otras. En este sentido, Whitehead y col. (2005) indicaron que las células epiteliales activadas por heridas comienzan a proliferar y a regenerar el tejido epidérmico en peces, siendo el gen FGF20 esencial para dar inicio a este mecanismo. Además, ha sido señalado que las células *club* en estos animales, consideradas como células inmunes innatas (Pandey y col., 2021), responden a los daños ocasionados por parásitos externos con un incremento en su tamaño y densidad (Päkk y col., 2011). En la especie bovina, este factor de crecimiento está involucrado en diferentes procesos biológicos relacionados con la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (Figura 17).



**Figura 17.** Red de asociación de proteínas del gen FGF20 obtenida de la base de datos STRING (<https://string-db.org>, consultado en agosto de 2021).

La ventana de SNPs ubicada en BTA11 explicó el 12,69 % de la varianza genética luego de tres procesos iterativos. Reportes anteriores indican otras ventanas con QTLs putativos en este cromosoma (Machado y col., 2010); mientras que Sollero y col. (2017), utilizando las razas Braford y Hereford en Brasil, identificaron un SNP (rs 110144789) significativo en BTA11 indicando genes candidatos posicionales. Además, en un estudio de asociación de todo el genoma en el ganado sudafricano Nguni, Mapholi y col. (2016) determinaron regiones significativas a un nivel sugerente en BTA11, como así también en BTA10 y 19 para la característica de resistencia a garrapatas. Adicionalmente a este estudio, en el cromosoma 10, otros QTL de resistencia a las garrapatas fueron identificados en una población F2 de Brasil utilizando marcadores microsatélites (Regitano y col., 2008; Machado y col., 2010). Asimismo, Turner y col. (2010) identificaron un QTL asociado con la carga de garrapatas en BTA 10 en ganado Brahman; el cual fue confirmado posteriormente por Porto Neto y col. (2010) quienes, al reducir el tamaño del intervalo que albergaba al mismo, identificaron un gen candidato posicional (ITGA11, *Integrin alpha 11*) utilizando ganado lechero australiano y Brahman. En el presente trabajo la ventana de SNPs ubicada en BTA10 permitió explicar el 4,14 % de variación para la característica en la población evaluada, lo que refuerza lo indicado por Porto Neto y col. (2010) quienes indican que entre los cromosomas con superposiciones más fuertes para la resistencia genética a garrapatas se encuentra el cromosoma 10 significativamente sobrerrepresentado ( $p < 0.01$ ). Entre los marcadores involucrados en la ventana de BTA10, nosotros identificamos al gen IQGAP2 (*IQ motif containing GTPase activating protein 2*). Este gen actúa en la unión de los interferones de tipo I (IFN) a su receptor, proporcionando la primera línea de defensa contra patógenos invasores (Brisac y col., 2016). Su participación en mejorar las respuestas inmunes innatas y adaptativas podría asociarse a la resistencia a *R. (B.) microplus* en la población de estudio.

Si bien no hay reportes de asociación entre marcadores y resistencia a garrapatas en BTA9, en nuestro análisis aproximadamente el 4 % de la varianza encontrada fue explicada por una ventana ubicada en este cromosoma. En esta región, ubicado en la posición 66.188.650, se localiza el gen THEMIS (*thymocyte selection associated*); el cual está involucrado en la respuesta adaptativa inmune de *Bos taurus* (GO:0002250). Esta respuesta se encuentra mediada por células que expresan receptores específicos para antígenos producidos a través de un proceso de diversificación somática y que permiten una reacción secundaria mejorada a exposiciones posteriores al mismo antígeno (memoria inmunológica); lo que provocaría en el animal disminuciones en la carga de garrapatas ante reiteradas exposiciones al ectoparásito (Karasuyama y col., 2020). Como se indicó en el Capítulo 1 de este trabajo, tanto los animales domésticos como los de laboratorio, adquieren resistencia a infestaciones repetidas de garrapatas, por lo que la participación del gen THEMIS podría guardar relación con el mecanismo mencionado.

Los marcadores ubicados en los cromosomas 13 y 16 explicaron en conjunto aproximadamente un 10 % de la varianza obtenida, aunque las ventanas encontradas no coinciden con lo informado a partir de otros estudios de GWAS utilizando el BeadChip Illumina BovineSNP50 (Sollero y col., 2017). En un metanálisis de estudios de expresión génica (GE) y GWAS se considera al BTA13 dentro de un número reducido de cromosomas en los que se reportan regiones superpuestas de asociación con la carga de garrapatas (Porto Neto y col. 2010). Esta lista está integrada además por el cromosoma 19, que en el GWAS representó un 2,45 % de la varianza obtenida. La ventana de marcadores obtenidos en este cromosoma permitió detectar QTL relacionados a resistencia a enfermedades (tuberculosis y enfermedad respiratoria bovina). Además, se detectaron genes de importancia, como EVI2 (*ecotropic viral integration site 2A y 2B*) que actúan regulando de manera positiva la diferenciación de granulocitos al activarse por reacciones inmunes alérgicas. Además, WSB1 (*WD repeat and SOCS box containing 1*) que se encuentra involucrado en la vía de ubiquitinación de proteínas

interviniendo en las rutas del sistema inmune adaptativo y procesamiento de antígenos. El gen KSR1 (*Kinase suppressor of ras 1*), encontrado en esta ventana, actúa en la actividad de la proteína quinasa que determina la fosforilación de proteínas. En relación a esto, la desfosforilación (GO0016311) ha sido mencionada como una de las vías sobrerrepresentadas en diez genes ubicados en siete cromosomas diferentes potencialmente relacionados a la resistencia a garrapatas (Porto Neto y col., 2010). Finalmente, entre los genes asociados a la carga de garrapatas se localizó al gen NOS2 (*nitric oxide synthase 2*). Este gen produce óxido nítrico (NO) que es una molécula mensajera con diversas funciones en todo el organismo, involucrándose en la inflamación a través de potenciar la síntesis de mediadores proinflamatorios como interleucinas (IL-6 e IL-8). En un estudio realizado en una población F2 *B. taurus* (Holstein) x *B. indicus* (Gyr), Reginato y col. (2008) indicaron que cuando se compararon vacas resistentes y susceptibles, la regulación de IL-8 se redujo en las primeras, representando una lectura molecular para el estudio de la activación de la vía inflamatoria.

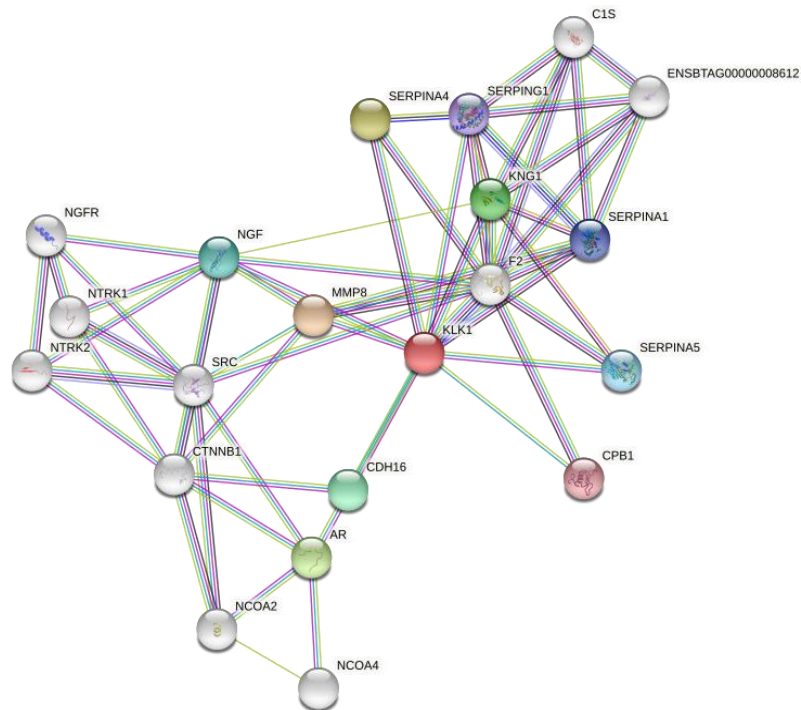
La ventana localizada en BTA3 permitió explicar un 2,75 % de la varianza resultante. Si bien no fueron detectados genes o QTL asociados a resistencia a garrapatas, en diversos trabajos su participación en la variación de la característica fue reportado (Mapholi y col., 2016; Sollero y col., 2017). Además, Porto Neto y col. (2011), al identificar de manera previa polimorfismos de un solo nucleótido asociados con la resistencia a las garrapatas en el cromosoma 3 a aproximadamente 70 Mb, también confirmaron la asociación del SNP intrónico rs 29019303 y su gen ELTD1 (*EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1*) con la carga de garrapatas.

Los marcadores de asociación detectados en la población de estudio ubicados en BTA8 coinciden con el QTL de resistencia a garrapatas reportado por Sollero y col. (2017) al estudiar las razas Hereford y Braford en Brasil. Además, se detectó el gen TLR4 (*Toll-like receptor 4*) que es activado por el regulador de la vía de señalización NMI que actúa como patrones moleculares asociados al daño (DAMP) en respuesta a la lesión celular o la invasión de

patógenos, promoviendo así la activación del factor nuclear NF-kappa-B (por similitud). Otros genes candidatos localizados en este cromosoma han sido propuesto como QTL de resistencia a garrapatas (Mapholi y col., 2016).

Finalmente, el BTA18 reveló un importante número de genes pertenecientes a la familia KLK (*calicreína*) que intervienen en la actividad endopeptidasa de tipo serina (GO:0004252). Se ha indicado, por ejemplo, que la regulación positiva de KLK12 en macrófagos murinos infectados con *Mycobacterium bovis* juega un rol sustancial en la regulación de la respuesta inmune protectora modulando la autofagia, la apoptosis y las vías proinflamatorias (Sabir y col., 2019). Ha sido reportado que las larvas de *R. (B) microplus* secretan inhibidores activos de tripsina, elastasa de neutrófilos, plasmina y calicreína plasmática para favorecer el proceso de alimentación sobre el hospedador (Sasaki y col., 2004; Tanaka y col., 1999). En este sentido, Moré y colaboradores (2019) en un estudio sobre los mecanismos genéticos subyacentes a la variación de la resistencia a la infestación por garrapatas en la raza Braford indicaron que las vías de degradación de tejido conectivo y regeneración de la matriz extracelular en la piel de los animales resistentes resultaron enriquecidas por la acción de genes como KLK1 y KLK6. Recientemente, Mantilla Valdivieso y colaboradores (2021) identificaron al gen KLK1 regulado de manera positiva en animales susceptibles a la carga de garrapatas, y señalaron su importancia al estar involucrado en la señalización de importantes vías que conducen a la regulación de la presión arterial, la permeabilidad vascular, la cascada inflamatoria y la quimiotaxis de neutrófilos, entre otros. Dentro de los genes pertenecientes a la familia calicreína identificados en el presente trabajo, KLK1 interacciona con otras proteínas a través de asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) (figura 17). Los enriquecimientos funcionales obtenidos a partir de la base de datos STRING involucran a KLK1 en procesos biológicos de regulación de la coagulación de la sangre (interacción con proteínas SERPING, KNG1 y F2) y función molecular de actividad inhibidora de

endopeptidasa (interacción con proteínas SERPING, KNG1, SERPINA1, SERPINA5 y NGF), entre otros.



**Figura 18.** Red de asociación de proteínas del gen *KLK1* obtenida de la base de datos STRING (<https://string-db.org>, consultado en agosto de 2021).

Se ha sugerido que los inhibidores de la serina proteasa de *R. (B.) microplus* pueden estar implicados en la adhesión de las larvas en el sitio de la picadura y en la alimentación a partir de la sangre del hospedero (Andreotti y col., 2002). Teniendo en cuenta ésto, la familia de proteínas tipo BPTI-Kunitz, que incluye inhibidores de serina proteasa, es utilizada en ensayos para la elaboración de vacunas contra las garrapatas (Andreotti y col., 2012).

A nivel general, entre las regiones detectadas en este estudio fueron evidenciados diversos QTLs asociados a resistencia a enfermedades (mastitis, tuberculosis,

paratuberculosis, carga de garrapatas) y otros relacionados al crecimiento y consumo de alimento de los animales, como así también al estrés térmico; los cuales podrían afectar en forma indirecta a la característica de resistencia genética a garrapatas en la población de bovinos Criollo Argentino evaluada (Tabla 6).

**Tabla 6.** Genes y QTLs involucrados en las regiones detectadas, de forma exploratoria, utilizando la base de datos FAANGmine en los cromosomas (BTA) 27, 11, 10, 9, 16, 13, 3, 19, 8 y 18 asociados a resistencia genética a *R. (B.) microplus* en bovinos Criollo Argentino y trabajos de otros autores que reportaron asociaciones significativas coincidentes en estos cromosomas. En negrita se resaltan los loci sugeridos como genes candidatos por función biológica de mayor relevancia encontrados en el presente trabajo, habiendo sido sólo considerados aquellos relacionados a bovinos para carne.

<b>BTA</b>	<b>Genes</b>	<b>QTL</b>	<b>Otros autores</b>
27	ENSBTAG00000050692, ENSBTAG00000050561, ENSBTAG00000052749		Machado y col. (2010)
11	ENSBTAG00000051528, KCNS3, MSGN1, GEN1, SMC6, VSNL1, RAD51AP2, TRNAC-GCA	Tolerancia al calor, Peso corporal	Machado y col. (2010), Sollero y col. (2017), Mapholi y col. (2016)
27	ENSBTAG00000045531, LOC112444625, 5S_rRNA, ENSBTAG00000047159, ENSBTAG00000051696, gene31184, ENSBTAG00000044896, U6, ENSBTAG00000005559	Eficiencia alimenticia, Ganancia diaria promedio, Peso corporal, Ingesta de materia seca	Machado y col. (2010)
10	ANKDD1B, POC5, SV2C, LOC101904784, ENSBTAG00000052974, LOC101904831, <b>IQGAP2</b>	Susceptibilidad a tuberculosis bovina	Regitano y col. (2008), Machado y col. (2010), Turner y col. (2010), Porto Neto y col. (2010), Mapholi y col. (2016)
9	MRAP2, CYB5R4, RIPPLY2, ENSBTAG00000026578, LOC101907989, <b>THEMIS</b> , TRNAC-GCA, PTPRK	Ingesta de alimento residual, Ingesta de materia seca	
16			Sollero y col. (2017)
13	LOC100298309		Porto Neto y col. (2010), Sollero y col. (2017)
3	GJA5, ACP6, 7SK, BCL9, ENSBTAG00000046242, LOC107132284, LOC107132285, ENSBTAG00000046872, LOC104971520, ENSBTAG00000035013, ENSBTAG00000054541, gene3531, U6, CHD1L, FMO5, ENSBTAG00000051677, LOC788724, PRKAB2	Aumento de peso corporal, Ingesta de materia seca, Ganancia diaria promedio	Mapholi y col. (2016), Sollero y col. (2017), Porto Neto y col. (2011)
19	LOC112442613, bta-mir-365-2, bta-mir-2333, bta-mir-193a, TRNAT-CGU, ENSBTAG00000050242, RAB11FIP4, <b>EV12A</b> , <b>EV12B</b> , OMG, LOC112442615, NF1, LOC112442614, <b>WSB1</b> , <b>KSR1</b> , TRNAR-CCU, gene23827,	Peso corporal, Susceptibilidad a tuberculosis bovina, Susceptibilidad a	Porto Neto y col. (2010), Mapholi y col. (2016)



	ENSBTAG00000043664, LOC100137897, ENSBTAG00000046372, LOC100848006, LGALS9, <b>NOS2</b> , LYRM9, ENSBTAG00000048943, NLK	enfermedades respiratorias bovinas, Aumento de peso corporal	
8	ASTN2, LOC112447849, TRNAS-AGA, ENSBTAG00000053221, <b>TLR4</b>	<b>Resistencia a garrapatas</b> , Susceptibilidad a paratuberculosis	Mapholi y col. (2016), Sollero y col. (2017)
27	MICU3, <b>FGF20</b>		Machado y col. (2010)
13	LOC104972869, ENSBTAG00000052659, ENSBTAG00000050649, ADARB2, ENSBTAG00000054346, WDR37, IDI1, GTPBP4	Ganancia media diaria	
13	SHLD1, CHGB, TRMT6, MCM8, LOC112449307, CRLS1, LRRN4, FERMT1, LOC112449308, TRNAC-GCA, BMP2, LOC104973807		
18	SCAF1, IRF3, BCL2L12, LOC101905357, PRMT1, ADM5, ENSBTAG00000049114, CPT1C, TSKS, AP2A1, FUZ, MED25, PTOV1, PNKP, AKT1S1, TBC1D17, IL4I1, LOC107131441, NUP62, ATF5, ENSBTAG00000016997, SIGLEC11, VRK3, LOC112442212, ZNF473, ENSBTAG00000053998, IZUMO2, ENSBTAG00000053322, LOC104974912, MYH14, KCNC3, LOC112442208, NAPSA, LOC101903509, ENSBTAG00000048283, LOC112442209, NR1H2, POLD1, SPIB, MYBPC2, FAM71E1, EMC10, LOC100335819, ENSBTAG00000048515, JOSD2, ASPDH, LRRC4B, SYT3, C18H19orf81, SHANK1, LOC112442210, CLEC11A, GPR32, LOC100848379, CP4, C18H19orf48, gene23057, SNORD88B, gene23058, ENSBTAG00000042742, gene23059, ENSBTAG00000042613, gene23060, SNORD88C, LOC101906828, <b>KLK1, KLK15, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8</b> , LOC107131443, <b>KLK9, KLK10</b> , LOC104974917, <b>KLK11, KLK12, KLK13</b> , TRNAC-ACA, <b>KLK14</b> , CTU1, CEACAM18, ENSBTAG0000004611, ENSBTAG00000049744, LOC508441, ENSBTAG0000004608, ENSBTAG00000049494, LOC100138951, LOC618463, ENSBTAG00000037537	Susceptibilidad a paratuberculosis, Peso corporal metabólico, Peso corporal	Moré y col. (2019) Mantilla Valdivieso y col. (2021)

A partir de 195 genes incluidos en la lista de FAANGmine, el análisis de enriquecimiento permitió identificar aquellos términos biológicos que están más relacionados a los mismos. El proceso biológico de mayor relevancia en el que los genes se involucran está referido a la regulación positiva de la vía de señalización del receptor acoplado a la proteína G (GO: 0045745). Las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas dependen de la coordinación y el control espacio-temporal de la dinámica de los leucocitos entre y dentro de los órganos linfoides y los tejidos periféricos. Los leucocitos perciben estas señales principalmente a través de receptores acoplados a la proteína G que, al unirse al agonista, inducen respuestas pro-migratorias intracelulares (Lämmermann y Kastenmüller, 2019), por lo que su regulación positiva puede relacionarse con la respuesta inmune del hospedador a *R. (B.) microplus*. La Figura 18 describe la secuencia del proceso y lesiones observadas en un número de animales evaluados luego de infestaciones artificiales con garrapata común del bovino, que apoyan las asociaciones con genes del sistema inmune, coagulación de la sangre y regeneración de tejidos encontradas en este trabajo. Se observa en los sitios de infestación: irritación, descamación, exudación, formación de costras y cicatrización del tejido, encontrándose esto en concordancia con los resultados obtenidos a partir del análisis de GWAS.



**Figura 18.** Secuencia de procesos y lesiones observadas sobre los animales de raza Criollo Argentino post infestación artificial con larvas de *R. (B.) microplus*.

#### 4.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron identificar, de manera exploratoria, SNP y regiones genómicas asociadas a la variación de la carga de la garrapata *R. (B.) microplus* en una población de bovinos Criollo Argentino en los cromosomas 27, 11, 10, 9, 16, 13, 3, 19, 8 y 18. El enriquecimiento funcional determinado por los genes de mayor relevancia (KLK, FGF20, Themis, IQGAP2, EVI2A, EVI2B, WSB1, KSR1, NOS2, TLR4) involucrados en la característica se relaciona con el sistema inmunológico del hospedador, la coagulación de la sangre, la regeneración de tejidos, la actividad de endopeptidasas y la fosforilación de proteínas. Ciertas regiones cromosómicas, que albergan *loci* asociados al conteo del ectoparásito sobre el animal, fueron consistentes con regiones previamente informadas en otras razas bovinas. Sería de importancia poder aumentar el número de individuos de raza

Criollo Argentino evaluados. Sin embargo, al existir un número de animales reducido de esta raza a nivel nacional y regional, y por requerir un elevado costo operativo y económico, considerar un meta-análisis de los estudios publicados parece ser un próximo paso útil para validar las regiones identificadas y/o determinar otras nuevas. Además, avanzar en futuros estudios de variación genética y expresión génica de los genes candidatos presentes en las regiones detectadas, permitirán el desarrollo de bioindicadores de resistencia y/o susceptibilidad a la infestación a la garrapata común del bovino.

## 5. DISCUSIÓN GENERAL

La garrapata *R. (B.) microplus* es un artrópodo hematófago de gran importancia en el ámbito de la producción ganadera bovina en todo el mundo. La resistencia del hospedador a este ectoparásito es uno de los factores más importantes que interviene en el control de las garrapatas, pero se descuida en gran medida debido al desafío de la determinación del fenotipo (Flores-Cardoso y col., 2021). En este sentido, colaborar en definir metodologías para la obtención de información fenotípica relacionada a la característica permitirá aumentar el número de individuos evaluados y la participación en evaluaciones conjuntas con varios países.

Al evaluar la carga de garrapatas en la población de bovinos Criollo Argentino perteneciente al IIACS, el valor promedio obtenido (18 teologinas) luego de infestaciones artificiales con 10.000 larvas de *R. (B.) microplus* permite caracterizarla como una raza de resistencia elevada al ectoparásito (Jonsson y col., 2014). Valores similares son obtenidos en razas índicas (Brahman), señaladas como las que poseen mayor resistencia a la carga de garrapatas (Piper y col., 2009). Existen numerosos trabajos que mencionan a las razas locales como una importante reserva de mecanismos de resistencia genética natural a las enfermedades debido a un proceso de adaptabilidad al medio ambiente. De acuerdo con Ginja y col. (2019), el ganado criollo representa un enorme reservorio de diversidad genética bovina, siendo esto consistente con estudios previos en subconjuntos más pequeños de razas criollas que utilizaron marcadores genéticos clásicos (Magee, 2002; Ginja y col., 2010; Liron y col., 2006; Delgado y col., 2012; Ginja y col., 2013; Egito y col., 2007; Carvajal-Carmona y col., 2003). Teniendo en cuenta ésto, resulta necesario intensificar los esfuerzos para llevar adelante programas dirigidos al manejo genético de las razas bovinas criollas, orientados a la caracterización, conservación y valoración de estos recursos genéticos. Es importante superar la brecha existente entre las herramientas genómicas de última generación actualmente

disponibles y su aplicación a las razas locales, especialmente en el caso de razas infravaloradas mantenidas en regiones marginales como las criollas (Ginja y col., 2019).

La nutrición es un modulador importante de la función del sistema inmunológico, pudiendo alterar el equilibrio entre salud y enfermedad. El frame de la raza Criollo Argentino se condice con un animal de tamaño adulto chico, llegando a pesar la vaca adulta 430 kg en una condición corporal 3 (escala 1 a 5). Para lograr pesos adecuados de ingreso a servicio, luego de su destete las hembras deben alcanzar ganancias de peso por encima de los 200 g diarios. En nuestro trabajo, esta categoría de vaquillonas fue la que presentó el mejor comportamiento frente a la infestación con *R. (B.) microplus*. Teniendo en cuenta que la anemia es una consecuencia inevitable de la infestación con garrapatas (Jonsson y col., 2006), sería de importancia considerar en estudios posteriores la evaluación de los parámetros hematológicos de los animales evaluados. Es posible que algunos efectos tóxicos de la secreción salival del ectoparásito puedan ayudar a explicar la lenta recuperación de algunos animales, incluso después de que se haya eliminado la infestación y se haya proporcionado un suministro adecuado de alimento.

Como se mencionó, para una alimentación exitosa de la sangre, las garrapatas inyectan saliva que contiene una amplia gama de sustancias bioactivas, incluidos reactivos vasodilatadores, anti-hemostáticos, antiinflamatorios e inmunosupresores (Nuttall, 2019). Para contrarrestarlos, los animales hospedadores activan numerosas vías de defensa, incluida la inmunidad innata y adquirida contra la infestación por garrapatas (Tabor y col., 2017); afectando el número de ectoparásitos que se fijan sobre él y la duración de la fase de alimentación. Esto último determina un menor peso de las hembras ingurgitadas que se desprenden del animal que, a su vez, se traduce en una menor oviposición durante la fase de vida libre de la garrapata y menor infestación de las pasturas. Para un mismo momento de evaluación, en este trabajo se observó diferencias en el tamaño de las garrapatas. Por lo

tanto, resulta necesario avanzar con estudios que contribuyan a comprender el impacto de los mecanismos implicados en la interacción huésped-microbioma-parásito.

La diversidad polimórfica de la raza permitió detectar de manera exploratoria un número de genes y QTL interesantes que podrían contribuir en el entendimiento de la resistencia genética a *R. (B.) microplus*. Si bien la tasa de identificación errónea de padres en la población de estudio no fue elevada, resulta relevante mencionar que, en los programas de mejoramiento y evaluaciones genéticas de los animales, aumentar la precisión de la información genealógica conduce a mejores estimaciones de los parámetros genéticos, así como conclusiones más fiables en estudios de asociación fenotipo-genotipo.

Las regiones cromosómicas asociadas a la resistencia genética a la carga de garrapatas son consistentes con la biología del sistema inmunológico. La protección más efectiva de un organismo es el rechazo al ingreso a través de barreras físicas. En este trabajo no se evaluaron características externas del animal, sin embargo, la densidad del pelaje, el grosor y la pigmentación de la piel, la vibración de la piel y/o la capacidad de acicalamiento, las papilas de la lengua y el olor asociado a componentes orgánicos volátiles han sido indicados como factores que afectan la resistencia a *R. (B.) microplus* (Riek, 1956; Bennet, 1969; De Castro y col., 1985; Spickett y col., 1989; Osterkamp y col., 1999; Veríssimo y col., 2002, 2015; Martínez y col., 2006; Gasparin y col., 2007). Obtener información relacionada a esta primera barrera de defensa en la raza Criollo Argentino seguramente sumará a la comprensión de la temática. Un segundo nivel de defensa del hospedador consiste en mecanismos tanto químicos como celulares de respuesta rápida. En este sentido, la respuesta innata de defensa en los sitios de invasión concentra un conjunto de reacciones que determinan un proceso de inflamación. Además, la inmunidad adquirida por otro lado, puede reconocer a los patógenos externos, defenderse y desarrollar una memoria de este encuentro. Tales mecanismos son puestos en acción con la participación de genes de respuesta inmune, y las diferencias genéticas entre individuos pueden modificar el fenotipo originando

alteraciones que desembocarían en cambios en los patrones de resistencia o susceptibilidad a las enfermedades. En el análisis de GWAS de este trabajo fueron identificados genes y QTL ligados a mecanismos de respuesta inmune innata y adquirida que podrían contribuir en la defensa del hospedador frente a la garrapata común del bovino. Además, el enriquecimiento funcional determinado por los genes de mayor relevancia involucró mecanismos relacionados con la coagulación de la sangre, la regeneración de tejidos, la actividad de endopeptidasas y la fosforilación de proteínas. El análisis de GWAS permitió también identificar un gran número de genes no caracterizados, identificados como ARN no codificantes largos (*lncRNA, long noncoding RNA*). Los genes *lncRNA* son estructural y transcripcionalmente similares a los genes que codifican proteínas, con exones, intrones y procesamiento postranscripcional; sin embargo, muestran una expresión más baja y más específica de tejido (Derrien y col., 2012). En humanos ha sido indicado que polimorfismos de un solo nucleótido en los genes de *lncRNA* pueden influir en la predisposición genética a enfermedades complejas, como enfermedades infecciosas y autoinmunes (Rautanen y col., 2016; Kumar y col., 2013). Teniendo en cuenta esto, es posible que los polimorfismos en los genes *lncRNA* detectados de manera exploratoria en este trabajo, contribuyan a la manifestación de la resistencia genética a la carga de garrapatas debido a su impacto en las interacciones moleculares.

Una limitación de los GWAS, dentro de la disciplina del mejoramiento genético animal, es el débil efecto de las pruebas de asociación entre los marcadores y los fenotipos evaluados, situación que tiene como consecuencia el requerimiento de un gran número de individuos para detectar asociaciones significativas (Minozzi y col., 2012). La identificación de *loci* significativos y/o nuevos *loci* requerirán tamaños de muestras más grandes, con un costo significativo de tiempo y dinero. Resulta de importancia poder sumarse a consorcios con otros grupos de investigación de países como Brasil, Australia y Sudáfrica para llevar adelante metanálisis de estudios de asociación. De acuerdo con Porto Neto y colaboradores (2012), incorporar datos de diferentes fuentes permiten: 1) incrementar la confiabilidad de los estudios



GWAS y 2) eliminar el ruido de los datos de la matriz. De esta manera, han sido identificados nuevos genes candidatos y regiones que parecen estar involucradas en conferir resistencia a la carga de garrapatas en el ganado bovino.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

La raza bovina Criollo Argentino presenta valores de conteo de garrapatas, luego de infestaciones artificiales, que permiten clasificarla como de resistencia elevada; y se propone como una alternativa atractiva para el desarrollo de la ganadería en las regiones endémicas para el mencionado ectoparásito, ya sea como raza pura o en cruzamientos. La condición nutricional de los animales durante las infestaciones con garrapatas influye significativamente en la característica, presentando el mejor comportamiento frente a la infestación las vaquillonas Criollo Argentino con ganancias de peso de más de 200 g/d. Puede sospecharse que luego de una segunda infestación artificial el hospedador desarrolla un mecanismo de defensa más fuerte (memoria inmunológica); por lo que se plantea como metodología de evaluación de un número elevado de animales, la realización de dos infestaciones consecutivas con su correspondiente lectura los días 20 y 21 post infestación.

De manera exploratoria, se identificaron genes y regiones asociadas a la variación de la carga de la garrapata *R. (B.) microplus* en la población de bovinos Criollo Argentino evaluada en los cromosomas 27, 11, 10, 9, 16, 13, 3, 19, 8 y 18. Ciertas regiones cromosómicas, que albergan *loci* asociados al conteo del ectoparásito sobre el hospedador, fueron consistentes con aquellas previamente informadas en otras razas bovinas relacionadas al sistema inmune, (Themis, IQGAP2, EVI2A, EVI2B, WSB1, NOS2, TLR4) y a procesos de coagulación de la sangre (KLK1), regeneración de tejidos (FGF20), actividad de endopeptidasas (familia KLK) y fosforilación de proteínas (KSR1). Resulta de interés ampliar el estudio de los genes lncRNA, por poder estar involucrados en procesos biológicos relevantes para la característica. Futuros estudios de variación genética y expresión génica de genes candidatos presentes en las regiones detectadas (Ej., KLK1) permitirán el desarrollo de bioindicadores de resistencia o susceptibilidad a la infestación a la garrapata común.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta-Rodríguez R, Alonso-Morales R, Balladares S, Flores-Aguilar H, García-Vazquez Z, Gorodezky C. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Veterinary Parasitology*. 2005; 127 (3–4): 313-321. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.007>.
2. Adehan SB, Biguezoton A, Adakal H, Assogba MN, Zoungrana SE, Gbaguidi AM, Tonouhewa A, Kandé S, Achi L, Kagone H, Adehan R. Acaricide resistance of *R. microplus* ticks in Benin. *African Journal of Agricultural Research*. 2016; 11:1199–1208.
3. Adenubi OT, Ahmed AS, Fasina FO, McGaw LJ, Eloff JN, Vinny N. Pesticidal plants as a possible alternative to synthetic acaricides in tick control: a systematic review and meta-analysis. *Industrial Crops and Products*. 2018; 123: 779-806. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.075>.
4. Aguilar I, Legarra A, Cardoso F. y col. Frequentist p-values for large-scale-single step genome-wide association, with an application to birth weight in American Angus cattle. *Genet Sel Evol* 2019; 51: 28. <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0469-3>.
5. Aguilar I, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor TJ. Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score<sup>1</sup>, *Journal of Dairy Science*. 2010; 93(2): 743-752. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2730>.
6. Aguilar I, Misztal I, Legarra A, Tsuruta S. Efficient computation of the genomic relationship matrix and other matrices used in single-step evaluation. *Journal of Animal Breeding Genetics*. 2011; 128: 422–428. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2010.00912.x>.

7. Aguilar I, Tsuruta S, Masuda Y, Lourenco DAL, Legarra A, Misztal I. BLUPF90 suite of programs for animal breeding with focus on genomics. Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 2018; 11. 751.
8. Aguirre DH, Viñabal AE, Salatin AO, Cafrune MM, Volpogni MM, Mangold AJ, Guglielmone AA. Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) populations of northwest Argentina: Preliminary results. Veterinary Parasitology. 2000; 88 (3–4): 329-334.
9. Alencar MM, Fraga AB, da Silva AM. Adaptação de genótipos a ambientes tropicais: resistência à mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*, linnaeus) e ao carrapato (*Boophilus microplus*, CANESTRINI) em diferentes genótipos bovinos. Agrociencia. 2005; 9 (1-2): 579 – 585.
10. Allen J, Humphreys S. Immunisation of guinea pigs and cattle against ticks. Nature. 1979; 280: 491–493. <https://doi.org/10.1038/280491a0>.
11. Andreotti R, Cunha RC, Soares MA, Guerrero FD, Leite FP, de León AA. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. Vaccine. 2012; 30 (47): 6678-85. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.08.066>.
12. Andreotti R, Gomes A, Malavazi-Piza KC, Sasaki SD, Sampaio CA, Tanaka AS. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. International Immunopharmacology 2002; 2 (4): 557-63. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00203-x](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00203-x).
13. Ashton GC, Seifert GW, Francis J. An Association Between Serum Amylase Phenotype and Tick Infestation in Cattle. Australian Journal of Biological Sciences. 1968; 21: 303-308. <https://doi.org/10.1071/BI9680303>.
14. Ayres D, Pereira R, Boligon A, Silva F, Schenkel F, Roso V, Albuquerque L. Linear and Poisson models for genetic evaluation of tick resistance in cross-bred Hereford x

- Nellore cattle. *Journal of Animal Breeding Genetics*. 2013; 130: 417-424. <https://doi.org/10.1111/jbg.12036>.
15. Bagnall N, Gough J, Cadogan L, Burns B, Kongsuwan K. Expression of intracellular calcium signalling genes in cattle skin during tick infestation. *Parasite Immunology*. 2009; 31: 177–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01092.x>.
  16. Banos G, Wiggans GR, Powell RL. Impact of paternity errors in cow identification on genetic evaluations and international comparisons. *Journal of Dairy Science*. 2001; 84: 2523-2529. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74703-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74703-0).
  17. Barendse W. Assessing Tick Resistance in a Bovine Animal for Selecting Cattle for Tick Resistance by Providing a Nucleic Acid from the Bovine Animal and Assaying for the Occurrence of a Single Nucleotide Polymorphism (SNP). 2007. Patent application WO2007051248-A1, p.1–146.
  18. Barré N, Matheron G, Rogez B, Roger F, Martinez D, Sheikboudou C. La dermatophilose des bovins à *Dermatophilus congolensis* dans les Antilles françaises. II. Facteurs de réceptivité liés aux animaux. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. 1988; 41(4): 339-345. <https://doi.org/10.19182/remvt.8638>.
  19. Benavides E, Rodríguez JL, Romero A. Isolation and partial characterization of the Montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multiresistant to different acaricides. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; (916): 668–671.
  20. Bennett GF, Wharton RH. Variability of host resistance to cattle tick. En: *Proceedings of the Ecological Society of Australia*. 1968; 150-4. <http://hdl.handle.net/102.100.100/323566?index=1>.
  21. Bennett GF. *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae): experimental infestations on cattle restrained from grooming. *Experimental Parasitology* 1969; 26: 323–328. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(69\)90125-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(69)90125-8).

22. Bianchin I, Catto JB, Kichel AN y col. The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*) in the central region of Brazil. *Tropical Animal Health Production*. 2007; 39: 287–296. <https://doi.org/10.1007/s11250-007-9017-1>.
23. Biegelmeyer P, Nizoli LQ, Cardoso FF, Dionello NJL. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Archivos de Zootecnia*. 2012; 61: 1-11.
24. Biegelmeyer P, Nizoli LQ, da Silva SS, dos Santos TRB, Dionello NJL, Gúlias-Gomes CC, Cardoso FF. Bovine genetic resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*. 2015; 208 (3–4): 231-237. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.010>.
25. Biegelmeyer P, Gúlias-Gomes CC, Mozaquatro Roso V, Laurino Dionello NJ, Flores Cardoso F. Tick resistance genetic parameters and its correlations with production traits in Hereford and Braford cattle. *Livestock Science*. 2017; 202: 96-100. ISSN 1871-1413. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.05.019>.
26. Bouzat JL, Giovambattista G, Golijow CD, Lojo MM, Dulout FN. Genética de la conservación de razas autóctonas: el ganado Criollo Argentino. *Interciencia*. 1998; 23: 151–157.
27. Brisac C, Salloum S, Yang V, y col. IQGAP2 is a novel interferon-alpha antiviral effector gene acting non-conventionally through the NF-κB pathway. *Journal of Hepatology*. 2016; 65 (5): 972-979. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.06.028>.
28. Budeli MA, Nephawe KA, Norris D, Selapa NW, Bergh L, Maiwashe A. Genetic parameter estimates for tick resistance in Bonsmara cattle. *South African Journal of Animal Sciences*. 2009; 39(4): 321-327.
29. Burrow HM, Mans BJ, Cardoso FF, Birkett MA, Kotze AC, Hayes BJ, Mapholi N, Dzama K, Marufu MC, Githaka NW, Djiken A. Towards a new phenotype for tick resistance in

- beef and dairy cattle: a review. *Animal Production Science*. 2019; 59 (8):1 401-1427. <https://doi.org/10.1071/AN18487>.
30. Burrow HM. Variances and covariances between productive and adaptive traits and temperament in a composite breed of tropical beef cattle. *Livestock Production Science*. 2001; 70 (3): 213-233. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00178-6](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00178-6).
  31. Buzanskas ME, Grossi DA, Ventura RV, Schenkel FS, Sargolzaei M, Meirelles SLC, y col. Genome-Wide Association for Growth Traits in Canchim Beef Cattle. *PLoS ONE*. 2014; 9(4): e94802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094802>.
  32. Cagnini EFT, Vargas GP, Fiorio MS y col. Métodos alternativos e sustentáveis de controle do carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*. *Revista Liberato: educação, ciência e tecnologia*. 2020; 20 (34): 24-37. <http://hdl.handle.net/10183/214380>.
  33. Calus MP, Mulder HA, Bastiaansen JW. Identification of Mendelian inconsistencies between SNP and pedigree information of sibs. *Genetic Selection Evolution*. 2011; 43: 34. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-43-34>.
  34. Canevari JT, Mangold AJ, Guglielmone AA, Nava S. Population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in a subtropical subhumid region of Argentina for use in the design of control strategies. *Medical and Veterinary Entomology*. 2017; 31 (1): 6-14. <https://doi.org/10.1111/mve.12199>.
  35. Caracostantógolo J, Muñoz Cobeñas ME, Eddi C, Ambrústolo RR, Bulman GM, Marangunich L. Primera determinación en la República Argentina de una población de *Boophilus microplus* (Can.) resistente al piretroide sintético alfacipermetrina, caracterizada mediante pruebas preliminares. *Veterinaria Argentina*. 1996; 13 (128): 575-582.
  36. Cardoso CP, Silva BF, Gonçalves DS, Tagliari NJ, Saito ME, Amarante AFT. Resistência contra ectoparasitas em bovinos da raça Crioula Lageana e meiosangue Angus avaliada em condições naturais. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 2014; 34: 141–146. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000200008>.

37. Cardoso FF, Gomes CC, Sollero BP, Oliveira MM, Roso VM, Piccoli ML, Higa RH, Yokoo MJ, Caetano AR, Aguilar I. Genomic prediction for tick resistance in Braford and Hereford cattle. *Journal of Animal Science*. 2015; 93 (6): 2693–2705. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8832>.
38. Cardoso V, Fries LA, Roso VM, Brito FV. Estimates of heritability for resistance to *Boophilus microplus* tick evaluated by an alternative method in a commercial Polled Hereford x Nelore population in Brazil. En: World congress on genetics applied to livestock production. Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, WCGALP, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2006.
39. Carrazzoni JA. El Bovino Criollo. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Tomo LII, N.º 16, Bs. As., Argentina, 1998.
40. Carvajal-Carmona LG, Bermudez N, Olivera-Angel M, Estrada L, Ossa J, Bedoya G, Ruiz-Linares A. Abundant mtDNA diversity and ancestral admixture in Colombian criollo cattle (*Bos taurus*). *Genetics*. 2003; 165 (3): 1457-1463. <https://doi.org/10.1093/genetics/165.3.1457>.
41. Carvalho WA, Bechara GH, Moré DD, Rossetti Ferreira B, da Silva J, Ferreira de Miranda Santos IK. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Distinct acute phase proteins vary during infestations according to the genetic composition of the bovine hosts, *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Experimental Parasitology*. 2008; 118 (4):587-591. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.10.006>.
42. Carvalho WA, Domingues R, de Azevedo Prata MC, da Silva MVGB, de Oliveira GC, Guimarães SEF, y col. Microarray analysis of tick-infested skin in resistant and susceptible cattle confirms the role of inflammatory pathways in immune activation and larval rejection. *Veterinary Parasitology*. 2014; 205: 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.018>.
43. Castro-Janer E, Rifran L, González P, Piaggio J, Gil A, Schumaker TT. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by



- in vitro bioassays. *Veterinary Parasitology*. 2010a; 169: 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.017>.
44. Castro-Janer E, Martins JR, Mendes MC, Namindome A, Klafke GM, Schumaker TTS. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. *Veterinary Parasitology*. 2010b; 173: 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.036>.
  45. Constantinoiu CC, Jackson LA, Jorgensen WK, Lew-Tabor AE, Piper EK, Mayer DG, y col. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *International Journal of Parasitology*. 2010; 40: 865–875. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.004>.
  46. Constantinoiu CC, Jonsson NN, Jorgensen WK, Jackson LA, Piper EK, Lew-Tabor AE. Immuno-fluorescence staining patterns of leukocyte subsets in the skin of taurine and indicine cattle. *Research in Veterinary Science*. 2013; 95: 854–860. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.08.014>.
  47. Constantinoiu CC, Lew-Tabor A, Jackson LA, Jorgensen WK, Piper EK, Mayer DG, Johnson L, Venus B, Jonsson NN. Local immune response to larvae of *Rhipicephalus microplus* in Santa Gertrudis cattle. *Parasite Immunology*. 2018; 40 (4): e12515. <https://doi.org/10.1111/pim.12515>.
  48. Cutullé C, La Valle E, Cabrera M, Burdet GM, Isetta AC, Reggi JH. Resistencia de la garrapata común del bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a los acaricidas químicos en Corrientes. VIII Congreso Argentino de Parasitología, Corrientes, Argentina, *Revista Argentina de Parasitología*, special number. 2019; p. 66.
  49. Cutullé C, Lovis L, D'Agostino BI, Balbiani GG, Morici G, Citroni D, Reggi J, Caracostantogolo JL. *In vitro* diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. *Veterinary Parasitology*. 2013; 192 (1–3): 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.014>.

50. Da Silva AM y col. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. *Genetics and Molecular Biology*. 2007; 30 (4): 1150-1155. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000600020>.
51. Davis GP, De Nise SK. The impact of genetic markers on selection. *Journal of Animal Science*. 1998; 76 (9): 2331–2339. <https://doi.org/10.2527/1998.7692331x>.
52. De Castro JJ, Cunningham MP, Dolan TT, Dransfield RD, Newson RM, Young AS. Effects on cattle of artificial infestations with the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Parasitology*. 1985; 90: 21–33. doi: 10.1017/S0031182000048988.
53. De Castro JJ. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*. 1997; 71(2-3): 77-97. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00033-2).
54. De la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research. Review*. 2007; 8: 23–28. doi:10.1017/S1466252307001193.
55. De la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience. (Landmark Ed)*. 2008; 13: 6938–46.
56. De la Fuente J, Estrada-Peña A. Why New Vaccines for the Control of Ectoparasite Vectors Have Not Been Registered and Commercialized? *Vaccines*. 2019; 7(3): 75. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030075>.
57. Delgado JV, Martínez AM, Acosta A, Alvarez LA, Armstrong E, Camacho E, Cañón J, Cortés O, Dunner S, Landi V, Marques JR, Martín-Burriel I, Martínez OR, Martínez RD, Melucci L, Muñoz JE, Penedo MC, Postiglioni A, Quiróz J, Rodellar C, Sponenberg P, Uffo O, Ulloa-Arvizu R, Vega-Pla JL, Villalobos A, Zambrano D, Zaragoza P, Gama LT, Ginja C. Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite

- markers. *Animal Genetics*. 2012; 43 (1): 2-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02207.x>.
58. Demas GE, Adamo SA, French SS. Neuroendocrine-immune crosstalk in vertebrates and invertebrates: implications for host defence. *Functional Ecology*. 2011; 25 (1): 29-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01738.x>.
59. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*. 2012; 22 (9): 1775-1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>.
60. Detilleux J. Genetic resistance and diseases. En: The 26th European Holstein and Red Holstein Conference, Prague. 2005 p. 7.
61. Dipeolu OO, Harunah EA. Studies on ticks of veterinary importance in Nigeria XVII. Resistance of rabbits to infestation with *Amblyomma variegatum* and *Boophilus decoloratus* (Acari: Ixodidae). *Folia Parasitologica*. 1984 ;31 (4): 357-362. PMID: 6510837.
62. Dipeolu OO, Mongi AO, Essuman S, Amoo AO, Ndungu JN. Studies on naturally acquired immunity to African ticks. II. Observations on cattle exposed to *Rhipicephalus appendiculatus* under varying periods of repeated infestations. *Veterinary Parasitology*. 1992; 41 (3-4): 293-320. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90088-Q](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90088-Q).
63. Dipeolu OO. Research on ticks of livestock in Africa: Review of the trends, advances and milestones in tick biology and ecology in the decade 1980-1989. *International Journal of Tropical Insect Science*. 1989; 10 (6): 723-740. <https://doi.org/10.1017/S1742758400012492>.
64. Domingues R, Wohlfres-Viana S, Reis DR, Teixeira HC, Ferreira AP, Guimarães SE, y col. Expression of immune response genes in peripheral blood of cattle infested with *Rhipicephalus microplus*. *Genet. Mol. Res.* 2014; 13: 4013-4021. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.May.23.12>.

65. Egito AA, Paiva SR, Albuquerque Mdo S, Mariante AS, Almeida LD, Castro SR, Grattapaglia D. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genet.* 2007; 7 (8): 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-8-83>.
66. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL y col. The Known Distribution and Ecological Preferences of the Tick Subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Apply Acarology.* 2006; 38: 219–235. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-0003-5>.
67. Falomir-Lockhart AH, Ortega Masague MF, Rudd Garcés G, Zappa ME, Peral García P, Morales HF, Holgado FD, Rogberg Muñoz A, Giovambattista G. Polledness in Argentinean Creole, five centuries surviving. *Animal Genetics.* 2019; 50 (4): 381-385. <https://doi.org/10.1111/age.12803>.
68. FAO. Plan De Acción Mundial Sobre Los Recursos Zoogenéticos Y La Declaración De Interlaken aprobados por la Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Zoogenéticos para la Agricultura y la Alimentación Interlaken, Suiza, 3–7 septiembre 2007. ISBN 978-92-5-305848-8.
69. Feldkamp C, Cañada P, Vázquez Amábile G. Aproximación a la huella de carbono de la carne bovina en Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal.* 2019; 39 (2):113-131.
70. Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology.* 2012; 183(3-4):338-342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.028>.
71. Fioravanti S, Freitas S, Costa L y col. Resistance and resilience to diseases in local ruminant breeds: a focus on South America. *Archivos de Zootecnia.* 2020; 69 (267): 338-352.

72. Fivaz BH, de Waal DT, Lander K. Indigenous and crossbred cattle-A comparison of resistance to ticks and implications for their strategic control in Zimbabwe. *Tropical Animal Health Production*. 1992; 24: 81–89. <https://doi.org/10.1007/BF02356949>.
73. Flores Cardoso F, Matika O, Djikeng A, Mapholi N, Burrow HM, Yokoo MJI, Campos GS, Gulas-Gomes CC, Riggio V, Pong-Wong R, Engle B, Porto-Neto L, Maiwashe A, Hayes BJ. Multiple Country and Breed Genomic Prediction of Tick Resistance in Beef Cattle. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12:620847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.620847>.
74. Fraga AB, Alencar MM, Figueiredo LA, Razook AG, Cyrillo JNG. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2003; 32 (6): 1578-1586. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982003000700006>.
75. Francis J, Ashton GC. Tick resistance in cattle: its stability and correlation with various genetic characteristics. *Immunology and Cell Biology*. 1967; 45 (2): 131-140. <https://doi.org/10.1038/icb.1967>.
76. Francis J. Resistance of Zebu and other Cattle to Tick Infestation and Babesiosis with Special Reference to Australia: An Historical Review. *British Veterinary Journal*. 1966; 122 (7): 301-307. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)40507-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)40507-0).
77. Franzin AM, Maruyama SR, Garcia GR, y col. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasit Vectors*. 2017; 10 (1): 51. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1945-z>.
78. Frisch J, O'Neill C. Comparative evaluation of beef cattle breeds of African, European and Indian origins. 2. Resistance to cattle ticks and gastrointestinal nematodes. *Animal Science*. 1998; 67 (1): 39-48. doi:10.1017/S1357729800009772.

79. Fu S. Hierarchical Bayesian LASSO for a negative binomial regression. *Journal of Statistical Computation and Simulation*. 2016; 86 (11): 2182-2203. <https://doi.org/10.1080/00949655.2015.1106541>.
80. Galyean ML, Perino LJ, Duff GC. Interaction of cattle health/immunity and nutrition. *Journal of Animal Science*. 1999; 77 (5): 1120–1134. <https://doi.org/10.2527/1999.7751120x>.
81. Garcia GR, Chaves Ribeiro JM, Maruyama SR y col. A transcriptome and proteome of the tick *Rhipicephalus microplus* shaped by the genetic composition of its hosts and developmental stage. *Science Reports*. 2020; 10: 12857. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69793-3>.
82. Garriz CA, Sal Paz F, Zamorano M, Gallinger MM. Rendimiento carnicero en reses de novillos Criollos y cruzas  $\frac{5}{8}$  Hereford-Nelore: peso y composición de músculo, grasa y hueso en cortes minoristas. *Ganado Bovino Criollo*. 1991; 2:49-62. Buenos Aires, Editorial Orientación gráfica.
83. Gasparin G, Miyata M, Coutinho LL, Martinez ML, Teodoro RL, Furlong J y col. Mapping of quantitative trait loci controlling tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. *Animal Genetics*. 2007; 38:453–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01634.x>.
84. Geldermann H, Pieper U, Weber WE. Effect of Misidentification on the Estimation of Breeding Value and Heritability in Cattle, *Journal of Animal Science*. 1986; 63 (6): 1759–1768. <https://doi.org/10.2527/jas1986.6361759x>.
85. Gelman A. Analysis of variance - why it is more important than ever. *The Annals of Statistics*. 2005; 33 (1): 1-53. <https://doi.org/10.1214/009053604000001048>.
86. George J, Pound J, Davey R. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*. 2004; 129 (S1): 353-366. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004682>.

87. Gibbs RA, Taylor JF, Van Tassell CP, Barendse W, Eversole KA, Gill CA, y col. Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. *Science*. 2009; 324: 528–32. <https://doi.org/10.1126/science.1167936>.
88. Ginja C, Gama LT, Cortés O y col. The genetic ancestry of American Creole cattle inferred from uniparental and autosomal genetic markers. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 11486. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47636-0>.
89. Ginja C, Gama LT, Cortes O, et al. Analysis of conservation priorities of Iberoamerican cattle based on autosomal microsatellite markers. *Genetic Selection Evolution*. 2013; 45 (1): 35. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-35>.
90. Ginja C, Penedo MC, Melucci L, Quiroz J, Martínez López OR, Revidatti MA, Martínez-Martínez A, Delgado JV, Gama LT. Origins and genetic diversity of New World Creole cattle: inferences from mitochondrial and Y chromosome polymorphisms. *Animal Genetics*. 2010; 41 (2): 128-41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01976.x>.
91. Giovambattista G, Lirón JP, It V, Bravi C, Prando A, Peral García P. El aporte de la genética a la elucidación de la historia de la domesticación y diferenciación de las especies domésticas. *Genética de animales domésticos*. Ed. Inter-Medica, Bs. As., Argentina, 2010. p. 73-103.
92. Goddard M, Hayes B. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Review Genetics* 2009; 10: 381–391. <https://doi.org/10.1038/nrg2575>.
93. Grillo Torrado J, Pérez Arrieta A. Nuevo tipo de fósforo-resistencia en la garrapata común del Ganado bovino (*Boophilus microplus*) en la República Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*. 1977; 58 (2): 101-105.
94. Guglielmone AA, Hadani A, Mangold AJ, De Haan L, Bermúdez L. Garrapatas (Ixodoidea-Ixodidae) del ganado bovino en la provincia de Salta: especies y carga en 5 zonas ecológicas. *RIA*. 1983; 18: 175.

95. Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle in Salta, northwest Argentina. *Veterinary Parasitology*. 1990; 35(1-2): 93-101. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(90\)90119-V](https://doi.org/10.1016/0304-4017(90)90119-V).
96. Guglielmone AA, Mangold AJ, Castelli M, Suárez VH, Aguirre DH, Alcaraz E, Cafrune MM, Cetrá B, Fader OW, Luciani CA, Medus PD, Nava S. Toxicidad in vitro de la cipermetrina para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Can.) y del diazinón para *Haematobia irritans* (L.) en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 2006; 35:31–41.
97. Guglielmone AA, Nava S. Epidemiología y control de las garrapatas de los bovinos en la Argentina. En: *Enfermedades Parasitarias con Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes: Fundamentos Epidemiológicos para su Diagnóstico y Control* (ed. A. Nari y C. Fiel), Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 2013; p. 441-456.
98. Guitou HR. Evaluation of crossbreeding in beef cattle in Tucumán, Argentina. Tesis de Master of Science. 1983. Iowa State University. Ames, IOWA, EEUU.
99. Hammond RK, Pahl MC, Su C, y col. Biological constraints on GWAS SNPs at suggestive significance thresholds reveal additional BMI *loci*. *Elife*. 2021; 10: e62206. <https://doi.org/10.7554/eLife.62206>.
100. Heaton M, Harhay G, Bennett G y col. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Incorporating Mouse Genome* 2002; 13: 272–281. <https://doi.org/10.1007/s00335-001-2146-3>.
101. Hirschhorn J, Daly M. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Review Genetics*. 2005; 6: 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrg1521>.
102. Holgado FD, Fernández JL, Ortega MF. Influencia del peso de servicio a los 15 meses sobre el peso al nacer y ganancia predestete de las crías en Criollo argentino. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 2017; 10: 57-62.



103. Holgado FD, Ortega Masague MF, Rabasa AE, Cantarella GE. Pre-Weaning Growth of Argentine Criollo Calves. *Latin American Archives of Animal Production*. 2021; 29 (3-4): 113-18. <https://doi.org/10.53588/alpa.293404>.
104. Holgado FD, Ortega MF, Fernández J. Evolución con la edad de diferentes medidas corporales en hembras bovinas de la raza Criollo argentino. *Actas Iberoamericas de Conservación Animal*. 2015; 6: 178-183.
105. Holgado FD, Ortega MF. Caracterización productiva del bovino Criollo Argentino: periodo 2006-2016. Ediciones INTA, Colección Investigación, Desarrollo e Innovación. Buenos Aires, Argentina. 2019. ISBN 978-987-521-987-8.
106. Holgado FD, Rabasa AE. Herencia del carácter “sin cuernos” en el bovino Criollo Argentino. *Zootecnia Tropical*. 2001; 19(2): 185-190.
107. Howard JT, Jiao S, Tiezzi F y col. Genome-wide association study on legendre random regression coefficients for the growth and feed intake trajectory on Duroc Boars. *BMC Genomic Data*. 2015; 16: 59. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0218-8>.
108. Ibelli AMG, Ribeiro ARB, Giglioti R, Regitano LCA, Alencar MM, Chagas ACS, Paço AL, Oliveira HN, Duarte JMS, Oliveira MCS. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. *Veterinary Parasitology*. 2012; 186 (3–4): 425-430. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.019>.
109. Ingvarsten K, Moyes K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*. 2013; 7(S1): 112-122. <https://doi.org/10.1017/S175173111200170X>.
110. Israel C, Weller JI. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding Vvalue in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science*. 2000; 83 (1): 181-187. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74869-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74869-7).
111. Jongejan F, Pegram RG, Zivkovic D y col. Monitoring of naturally acquired and artificially induced immunity to *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus*

- appendiculatus* ticks under field and laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*. 1989; 7: 181–199. <https://doi.org/10.1007/BF01194059>.
112. Jongejans F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004; 129 (S1): S3-S14. <http://doi:10.1017/S0031182004005967>.
113. Jonsson NN, Davis R, de Witt M. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. *Veterinary Journal*. 2001; 79 (12): 826-831. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10929.x>.
114. Jonsson NN, Piper EK, Constantinoiu CC. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasite Immunology*. Special Issue: Immunology of Ectoparasite Infections. 2014; 36 (11): 553-559. <https://doi.org/10.1111/pim.12140>.
115. Jonsson NN, Piper EK. Integrated control programs for ticks on cattle. Queensland University, Brisbane (Australia). School of Veterinary Science. 2007. p. 163.
116. Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*. 2006; 137 (1–2): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>.
117. Junior PB, Rodrigues VS, Garcia MV, de Oliveira Souza Higa L, Pinheiro Zimmermann N, Cavalcante Barros J, Andreotti R. Economic performance evaluation of Brangus and Nelore cattle breed naturally infested with *Rhipicephalus microplus* in an extensive production system in Central-West Brazil. *Experimental and Applied Acarology*. 2019; 78 (4): 565-577. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00404-1>.
118. Karasuyama H, Miyake K, Yoshikawa S. Immunobiology of Acquired Resistance to Ticks. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: 601504. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.601504>.
119. Kashino SS, Resende J, Sacco AM, Rocha C, Proença I, Carvalho WA, Firmino AA, Queiroz R, Benavides M, Gershwin IJ, de Miranda Santos IK. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations.

- Experimental Parasitology. 2005; 110: 12-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.01.006>.
120. Klafke GM, Webster A, Dall’Agnol B, Pradel E, Silva J, de La Canal LH, Becker M, Osório MF, Mansson M, Barreto R, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, dos Santos J, Reck J, Martins JR. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Disease*. 2017; 8:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>.
121. Kongsuwan K, Josh P, Colgrave ML, Bagnall NH, Gough J, Burns B, y col. Activation of several key components of the epidermal differentiation pathway in cattle following infestation with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal of Parasitology*. 2010; 40: 499–507.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.10.013>.
122. Krantz GW, Walter DE. A manual of acarology. 3<sup>ed</sup> Lubbock (TX): Texas Tech. University Press. 2009. p.807.
123. Kumar V, Westra HJ, Karjalainen J, et al. Human disease-associated genetic variation impacts large intergenic non-coding RNA expression. *PLoS Genetics*. 2013; 9 (1): e1003201. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003201>.
124. Lämmermann T, Kastenmüller W. Concepts of GPCR-controlled navigation in the immune system. *Immunology Reviews*. 2019; 289 (1): 205-231.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12752>.
125. Lamoreaux WJ, Needham GR, Coons LB. Evidence that dilatation of isolated salivary glands ducts from the tick *Dermatocenter varibialis* (Say) is mediated by nitric oxid. *Journal of Insect Physiology*. 2000; 46: 959-964. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00205-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00205-X).
126. Laodim T, Elzo MA, Koonawootrittriron S, Suwanasopee T, Jattawa D. Pathway enrichment and protein interaction network analysis for milk yield, fat yield and age at

- first calving in a Thai multibreed dairy population. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 2019; 32, 508–518. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0382>.
127. Lew-Tabor AE, Rodriguez Valle M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and Tick-borne Disease*. 2016; 7 (4): 573-585. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.012>.
128. Lirón JP, Peral-García P, Guillermo Giovambattista G. Genetic Characterization of Argentine and Bolivian Creole Cattle Breeds Assessed through Microsatellites. *Journal of Heredity*. 2006; 97 (4): 331–339. <https://doi.org/10.1093/jhered/esl003>.
129. Lobo Arias M, Medina Cano CI. Conservación de recursos genéticos de la agrobiodiversidad como apoyo al desarrollo de sistemas de producción sostenibles. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2009; 10(1): 33-42.
130. Long JS. Regression models for categorical and limited dependent variables. Thousand Oaks, CA, Sage Publications. 1997.
131. Machado MA, Azevedo ALS, Teodoro RL, Pires MA, Peixoto MGC, Freitas C, Prata MCA, Furlong J, Silva MVGB, Guimarães SEF, Regitano LCA, Coutinho LL, Gasparin G, Verneque RS. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). *BMC Genomics*. 2010; 11:1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-280>.
132. Madalena FE, Teodoro RL, Lemos AM, Monteiro JBN, Barbosa RT. Evaluation of Strategies for Crossbreeding of Dairy Cattle in Brazil. *Journal of Dairy Science*. 1990; 73 (7): 1887-1901. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78869-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78869-8).
133. Magee DA, Meghan C, Harrison S, Troy CS, Cymbron T, Gaillard C, Morrow A, Maillard JC, Bradley DG. A partial african ancestry for the creole cattle populations of the Caribbean. *Journal of Heredity*. 2002; 93 (6): 429-32. <https://doi.org/10.1093/jhered/93.6.429>.

134. Maiorano AM, Mota TS, Verdugo AC y col. Comparative study of cattle tick resistance using generalized linear mixed models. *Revista Brasileira de Biometria*. 2019; 37. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i1.341>.
135. Mangold AJ, Castelli ME, Nava S, Aguirre DH, Guglielmone AA. Poblaciones de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a los piretroides en Córdoba y Salta, Argentina. *Revista FAVE (Sección Ciencias Veterinarias)*. 2004; 3:55–59.
136. Mantilla Valdivieso E, Ross E, Hayes B, Jonsson N, James P, Tabor A. Investigating Host Biomarkers Associated with Cattle Tick Resistance. 2021; 33rd AAAS Conference, Australia. [http://www.animalscienceconference.com.au/wp-content/uploads/2021/01/2021AAAS\\_Mantilla\\_Emily\\_V2.pdf](http://www.animalscienceconference.com.au/wp-content/uploads/2021/01/2021AAAS_Mantilla_Emily_V2.pdf).
137. Mapholi NO, Maiwashe A, Matika O, Riggio V, Banga C, MacNeil MD, Muchenje V, Nephawe K, Dzama K. Genetic parameters for tick counts across months for different tick species and anatomical locations in South African Nguni cattle. *Tropical Animal Health Production*. 2017; 49 (6): 1201-1210. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1336-2>.
138. Mapholi NO, Marufu MC, Maiwashe A, Banga CB, Muchenje V, MacNeil MD, Chimonyo M, Dzama K. Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: A review, *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2014; 5 (5): 475-483. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.006>.
139. Marima JK, Nel CL, Marufu MC, Jonsson NN, Dube B, Dzama K. A genetic and immunological comparison of tickresistance in beef cattle following artificial infestation with *Rhipicephalus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*. 2020; 80: 569–590. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00480-8>.
140. Marques DBD, Bastiaansen JWM, Broekhuijse MLWJ. Y col. Weighted single-step GWAS and gene network analysis reveal new candidate genes for semen traits in pigs. *Genetic Selection Evolution*. 2018; 50: 40. <https://doi.org/10.1186/s12711-018-0412-z>.

141. Martínez CG. Censo y caracterización de los sistemas de producción del ganado criollo y colombiano. 1999. En: Memorias. Santafé de Bogotá, D.C. – Colombia. p. 13-64.
142. Martínez IM, Lumaret JP. Las prácticas agropecuarias y sus consecuencias en la entomofauna y el entorno ambiental. Folia Entomológica Mexicana. 2006; 45 (1): 57-68. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42445107>
143. Martinez ML, Machado MA, Nascimento CS, Silva MV, Teodoro RL, Furlong J y col. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. Genetic Molecular. Research. 2006; 5: 513–524. <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2006/vol3-5/pdf/gmr0211.pdf>
144. Martínez R, Toro R, Montoya F, Burbano M, Tobón J, Gallego J, Ariza F. Caracterización del locus BoLa-DRB3 en ganado criollo colombiano y asociación con resistencia a enfermedades. Archivos de Zootecnia. 2005; 54: 349-356.
145. Marufu MC, Qokweni L, Chimonyo M, Dzama K. Relationships between tick counts and coat characteristics in Nguni and Bonsmara cattle reared on semiarid rangelands in South Africa. Ticks and Tick-borne Diseases. 2011; 2 (3): 172-177. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.07.001>.
146. Masuda Y. Introduction to BLUPF90 suite programs. 2018. [http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=tutorial\\_blupf90.pdf](http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=tutorial_blupf90.pdf).
147. Mattioli RC, Bah M, Faye J, Kora S, Cassama M. A comparison of field tick infestation on N'Dama, Zebu and N'Dama×Zebu crossbred cattle. Veterinary Parasitology. 1993; 47 (1–2): 139-148. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90184-O](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90184-O).
148. Mattioli RC, Dempfle L. Recent acquisitions on tick and tick-borne disease resistance in N'dama (*Bos taurus*) and Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. Parassitologia. 1995; 37 (1): 63-67. PMID: 8532370.
149. Mattioli RC, Pandey VS, Murray M, Fitzpatrick JL. Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos*

- taurus*) and trypanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. *Acta Tropical*. 2000; 75 (3): 263-277. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00063-2).
150. Mattioli RC, Wilson RT. Trypanosomes, tsetse and trypanotolerance: coevolution in Tropical Africa. *Parassitologia*. 1996; 38: 531-535.
151. Matukumalli LK, Schroeder SG. Sequence Based Gene Expression Analysis. En: Edwards D, Stajich J, Hansen D. (eds) *Bioinformatics*. Springer, New York, NY. 2009. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92738-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92738-1_9).
152. Medeiros de Oliveira Silva R, Bonvino Stafuzza N, de Oliveira Fragomeni B, Miguel Ferreira de Camargo G, Matos Ceacero T, Noely Dos Santos Gonçalves Cyrillo J, Baldi F, Augusti Boligon A, Zerlotti Mercadante ME, Lino Lourenco D, Misztal I, Galvão de Albuquerque L. Genome-Wide Association Study for Carcass Traits in an Experimental Nelore Cattle Population. *PLoS One*. 2017;12 (1): e0169860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169860>.
153. Meredith BK, Kearney FJ, Finlay EK, Bradley DG, Fahey AG, Berry DP, Lynn DJ. Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. *BMC Genetics*. 2012; 13 (1): 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-21>.
154. Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps, *Genetics*. 2001; 157 (4): 1819–1829. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.4.1819>.
155. Minozzi G, Williams JL, Stella A, Strozzi F, Luini M, Settles ML, y col. Meta-Analysis of Two Genome-Wide Association Studies of Bovine Paratuberculosis. *PLoS ONE*. 2012; 7 (3): e32578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032578>.
156. Moré DD, Cardoso FF, Mudadu M y col. Network analysis uncovers putative genes affecting resistance to tick infestation in Braford cattle skin. *BMC Genomics*. 2019; 20: 998. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6360-3>.

157. Mota R, Silva F, Lopes P, Tempelman R, Sollero B, Aguilar I, Cardoso F. Analyses of reaction norms reveal new chromosome regions associated with tick resistance in cattle. *Animal*. 2018; 12 (2): 205-214. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001562>.
158. Nascimento CS, Machado MA, Guimarães SE, Guimarães MF, Peixoto JO, Furlong J, y col. Differential expression of genes in resistant versus susceptible Gyr x Holstein cattle challenged with the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetic Molecular Research*. 2010; 9: 1974–1979. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr905>.
159. Nascimento CS, Machado MA, Guimarães SE, Martins MF, Peixoto JO, Furlong J, y col. Expressed sequenced tags profiling of resistant and susceptible Gyr x Holstein cattle infested with the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Genetic Molecular Research*. 2011; 10: 3803–3816.
160. Nava S, Mastropaolo M, Guglielmone AA, Mangold AJ. Effect of deforestation and introduction of exotic grasses as livestock forage on the population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in northern Argentina. *Research in Veterinary Science*. 2013; 95 (3): 1046-1054. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.09.013>.
161. Nava S, Mastropaolo M, Mangold AJ. Ficha 5: Garrapata común del bovino: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. <https://inta.gob.ar/documentos/ficha-5-garrapata-comun-del-bovino-rhipicephalus-boophilus-microplus>. 2011.
162. Nava S, Morel N, Mangold AJ, Guglielmone AA. Un caso de resistencia de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) al fipronil detectado en pruebas de campo en el este de Santiago del Estero, Argentina. *Revista FAVE (Sección Ciencias Veterinarias)*. 2018; 17:1–5.
163. Nava S, Venzal JM, González-Acuña DG, Martins TF, Guglielmone AA. Ticks of the southern cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance, 1<sup>st</sup> ed. Elsevier, London, United Kingdom. 2017.



164. Núñez-Domínguez R, Ramírez-Valverde R, Saavedra-Jiménez LA, García-Muñiz JG. La adaptabilidad de los recursos zoogenéticos Criollos, base para enfrentar los desafíos de la producción animal. Archivos de Zootecnia. 2016; 65 (251): 461-468. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49549092032>.
165. Nuttall PA. Wonders of tick saliva. Ticks and Tick Borne Disease. 2019; 10 (2): 470-481. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.005>.
166. OECD/FAO. Agricultural Outlook 2016-2025, OECD Publishing, Paris. 2016.
167. Ortega Masagué MF, Rico JAP, Vega AL, Giovambattista G. Genetic diversity and association studies in Class II genes of the Main Histocompatibility Complex in American Creole Cattle. Latin American Archives of Animal Production. 2020; 28 (3-4): 121-32. [https://ojs.alpa.uy/index.php/ojs\\_files/article/view/2828](https://ojs.alpa.uy/index.php/ojs_files/article/view/2828).
168. Osterkamp J, Wahl U, Schmalfluss G, Haas W. Host-odour recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. Journal of Comparative Physiology. 1999; 185:59–67.
169. Otto PI, Guimarães SEF, Verardo LL, Azevedo ALS, Vandenplas J, Soares ACC, Sevillano CA, Veroneze R, Pires FA, de Freitas C, Prata MCA, Furlong J, Verneque RS, Martins MF, Panetto JCC, Carvalho WA, Gobo DOR, da Silva MV, Machado MA. Genome-wide association studies for tick resistance in *Bos taurus* × *Bos indicus* crossbred cattle: A deeper look into this intricate mechanism. Journal of Dairy Science. 2018; 101 (12): 11020-11032. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14223>.
170. Päck P, Hussar P, Pavear T. Alterations of club cell activity in epidermis of common carp, *Cyprinus carpio* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae), due to infection by *Ichthyophthirius multifiliis* (protista: ciliophora). Acta Ichthyologica et Piscatoria. 2011; 41 (3): 185-192. <https://doi.org/10.3750/AIP2011.41.3.06>.
171. Pandey S, Stockwell CA, Snider MR, Wisenden BD. Epidermal Club Cells in Fishes: A Case for Ecoimmunological Analysis. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22 (3): 1440. <https://doi.org/10.3390/ijms22031440>.

172. Paul SS, Dey A. Nutrition in health and immune function of ruminants. *Indian Journal of Animal Sciences*. 2015; 85 (2): 103–112.
173. Pearson T. How to Interpret a Genome-wide Association Study. *JAMA*. 2008; 299 (11): 1335-1344.
174. Pérez Arrieta A, Marti-Vidal J, Bulman G. Determinación y estudio de una nueva cepa argentina fósforo-resistente de *Boophilus microplus* (Can.) proveniente de Santo Tomé, (Corrientes), Argentina. *Revista Militar de Veterinaria*. 1980; 26 (123): 275-283.
175. Piper EK, Jackson LA, Bagnall NH, Kongsuwan KK, Lew AE, Jonsson NN. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008; 126 (1–2): 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.06.011>.
176. Piper EK, Jackson LA, Bielefeldt-Ohmann H, Gondro C, Lew-Tabor AE, Jonsson NN. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *International Journal for Parasitology*. 2010; 40 (4): 431-441. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.09.009>.
177. Piper EK, Jonsson NN, Gondro C, Lew-Tabor AE, Moolhuijzen P, Vance ME, Jackson LA. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009; 16: 1074-1086. <https://doi.org/10.1128/CVI.00157-09>.
178. Piper EK, Jonsson NN, Gondro C, Vance ME, Lew-Tabor A, Jackson LA. Peripheral cellular and humoral responses to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus* in Santa Gertrudis cattle. *Parasite Immunology*. 2017; 39 (1): e12402. <https://doi.org/10.1111/pim.12402>.
179. Porto Neto LR, Bunch RJ, Harrison BE y col. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle. *BMC Genet*. 2010; 11: 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-55>.

180. Porto Neto LR, Jonsson NN, D'Occhio MJ, Barendse W. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. *Veterinary Parasitology*. 2011; 180 (3-4): 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.048>.
181. Porto Neto LR, Jonsson NN, Ingham A y col. The RIPK2 gene: a positional candidate for tick burden supported by genetic associations in cattle and immunological response of knockout mouse. *Immunogenetics*. 2012; 64: 379–388. <https://doi.org/10.1007/s00251-012-0601-9>.
182. Porto Neto LR, Piper EK, Jonsson NN, Barendse W, Gondro C. Meta-analysis of genome wide association and gene expression studies to identify candidate genes for tick burden in cattle. 9th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany. 2010b; 1–6 p. 0664.
183. Porto-Neto LR, Kijas JW, Reverter A. The extent of linkage disequilibrium in beef cattle breeds using high-density SNP genotypes. *Genetic Selection Evolution*. 2014; 46: 22. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-22>.
184. Prayaga KC, Henshall JM. Adaptability in tropical beef cattle: genetic parameters of growth, adaptive and temperament traits in a crossbred population. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 2005; 45: 971-983. <https://doi.org/10.1071/EA05045>.
185. Prayaga KC, Corbe NJ, Johnston DJ, Wolcott ML, Fordyce G, Burrow HM. Genetics of adaptive traits in heifers and their relationship to growth, pubertal and carcass traits in two tropical beef cattle genotypes. *Animal Production Science*. 2009; 49 (6): 413-425. <https://doi.org/10.1071/EA08247>.
186. Pritchard JK, Przeworski M. Linkage Disequilibrium in Humans: Models and Data. *The American Journal of Human Genetics*. 2001; 69 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1086/321275>.
187. Rabasa AE, Holgado FD, Poli MA. bovino criollo de argentina: diferentes aspectos en su caracterización. *Agrociencia*. 2005; 9 (2-3): 473 - 477.

188. Rabasa S, Rabasa de Sal Paz A, Sal Paz F, Bergmann F. Genética de pelajes en bovinos Criollos. *Ganado Bovino Criollo*. 1986; 1:170-182. Buenos Aires. Ed Orientación Gráf.
189. Råberg L, Graham AL, Read AF. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical of Transactions of the Royal Society B*. 2009; B364: 37–49. <http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0184>.
190. Rautanen A, y col. Kenyan Bacteraemia Study Group; Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). Polymorphism in a lincRNA Associates with a Doubled Risk of Pneumococcal Bacteremia in Kenyan Children. *American Journal of Human Genetics*. 2016; 98 (6): 1092-1100. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.03.025>.
191. Raza A, James P, Tabor A. Proteomics as a Potential Tool for Identifying Biomarkers for Host Resistance to Cattle Tick. 2019; 36 (1): 131. <https://doi.org/10.3390/proceedings2019036131>.
192. Rechav Y, Kostrzewski MW. Relative resistance of six cattle breeds to the tick *Boophilus decoloratus* in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1991; 58 (3): 181-6. PMID: 1923380.
193. Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Agnol B, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Vargas R, Santos JS, Martins JR. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*. 2014; 201: 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.012>.
194. Reck J, Marks FS, Rodrigues RO, Souza UA, Webster A, Leite RC, Gonzales JC, Klafke GM, Martins JR. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? *Preventive Veterinary Medicine*. 2014; 113 (1) 59-62. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.006>.
195. Regitano LCA, Ibelli AMG, Gasparin G, Miyata M y col. On the search for markers of tick resistance in bovines. *Developments in Biologicals*. 2008; 132:225-230.

196. Regitano LCA, Oliveira MCS, Alencar MM, Carvalho ME, Andréo R, Moreira IC, Néo TA, Barioni Jr W, Silva AM. Avaliação da resistência de bovinos de diferentes grupos genéticos ao carrapato e à babesiose. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos, SP, 2006; p. 48.
197. Reis AC, Moreira König IF, de Carvalho Selvati Rezende DA, Romano Palmeira Gonçalves R, da Silva Lunguinho A, Silva Ribeiro JC, Cardoso M, Neodini Remedio R. Cytotoxic effects of *Satureja montana* L. essential oil on oocytes of engorged *Rhipicephalus microplus* female ticks (Acari: Ixodidae). 2021; 84 (7): 1375-1388. <https://doi.org/10.1002/jemt.23693>.
198. Riek RF. Factors influencing the susceptibility of cattle to tick infestation. Australian Veterinary Journal. 1956; 32: 204–209. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1956.tb05660.x>.
199. Robbertse L, Richards SA, Maritz-Olivier C. Bovine Immune Factors Underlying Tick Resistance: Integration and Future Directions. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017; 7:522. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00522>.
200. Robbertse L. Comparative immune-profiling of three cattle breeds infested with *Rhipicephalus microplus* and *Ixodes ricinus*-infested BALB/c mice. Philosophiae Doctor Thesis. Faculty of Natural & Agricultural Sciences, University of Pretoria. 2018.
201. Rodriguez-Vivas RI, Jonsson NN, Bhushan C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. Parasitology Research. 2018; 117 (1): 3-29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>.
202. Sabir N, Hussain T, Liao Y, Wang J, Song Y, Shahid M, Cheng G, Mangi MH, Yao J, Yang L, Zhao D, Zhou X. Kallikrein 12 Regulates Innate Resistance of Murine Macrophages against *Mycobacterium bovis* Infection by Modulating Autophagy and Apoptosis. Cells. 2019; 8 (5): 415. <https://doi.org/10.3390/cells8050415>.

203. Sal Paz FP. El ganado Criollo argentino: definición y principales características. Ganado Bovino Criollo. Ed Orientación Gráf. 1986; 1. Buenos Aires.
204. Sasaki SD, Azzolini SS, Hirata IY, Andreotti R, Tanaka AS. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. Biochimie. 2004; 86 (9-10): 643-9. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.010>.
205. Saueressig TM. Control racional de las parasitosis bovinas con bajo impacto ambiental. XI Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. 2002; p. 26.
206. Scholtz MM, Spickett AM, Lombard PE, Enslin CB. The effect of tick infestation on the productivity of cows of three breeds of cattle. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1991; 58: 71-74.
207. Seebeck RM, Springell PH, O'Kelly JC. Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*). I. Food intake and body weight growth. Australian Journal of Biology Science. 1971; 24: 373–380.
208. Seifert GW. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*). Australian Journal of Agricultural Research. 1971; 22: 159-168. <https://doi.org/10.1071/AR9710159>.
209. Shyma KP, Gupta JP, Singh V. Breeding strategies for tick resistance in tropical cattle: a sustainable approach for tick control. Journal of Parasitology. Disease. 2015; 39:1–6. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0294-5>.
210. Silva AM, Alencar MM, Regitano LCA, Oliveira MCS. Estimativas de herdabilidade e repetibilidade do grau de infestação por ectoparasitos em fêmeas de quatro grupos genéticos de bovinos de corte. En: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 43. Produção animal em biomas tropicais: Anais. 2006.
211. Simões MRS, Leal JJB, Minho AP, Gomes CC, MacNeil MD, Costa RF, Junqueira VS, Schmidt PI, Cardoso FF, Boligon AA, Yokoo MJ. Breeding objectives of Brangus cattle

- in Brazil. *Journal of Animal Breeding Genetics*. 2019; 137 (2): 177-188. <https://doi.org/10.1111/jbg.12415>.
212. Sollero BP, Junqueira VS, Gomes CCG y col. Tag SNP selection for prediction of tick resistance in Brazilian Braford and Hereford cattle breeds using Bayesian methods. *Genetic Selection Evolution*. 2017; 49: 49. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0325-2>.
213. Späth EJ, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. Parte 4. *Therios*. 1994; 23(119): 524-539.
214. Spickett AM, De Klerk D, Enslin CB, Scholtz MM. Resistance of Nguni, Bonsmara and Hereford cattle to ticks in a Bushveld region of South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1989; 56: 245–250.
215. Stear MJ, Hetzel DJS, Brown SC, Gershwin LJ, Mackinnon MJ, Nicholas FW. The relationships among ecto- and endoparasite levels, class I antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. *Veterinary Parasitology*. 1990; 34 (4): 303-321. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(90\)90077-O](https://doi.org/10.1016/0304-4017(90)90077-O).
216. Stear MJ, Newman MJ, Nicholas FW, Brown SC, Holroyd RG. Tick resistance and the major histocompatibility system. *Immunology and Cell Biology*. 1984; 62 (1): 47-52. <https://doi.org/10.1038/icb.1984.4>.
217. Stear MJ, Nicholas FW, Brown SC, Holroyd RG. Class I antigens of the bovine major histocompatibility system and resistance to the cattle tick (*Boophilus microplus*) assessed in three different seasons. *Veterinary Parasitology*. 1989; 31 (3–4): 303-315. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(89\)90080-0](https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90080-0).
218. Stormont C. Contribution of blood typing to dairy science progress. *Journal of Dairy Science*. 1967; 50: 253-260. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(67\)87401-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(67)87401-0).
219. Tabor AE, Ali A, Rehman G, Rocha Garcia G, Zangirolamo AF, Malardo T, Jonsson NN. Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-Host Interface: A Review of Resistant and

- Susceptible Host Responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017; 7: 506. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00506>.
220. Takeshima SN, Aida Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*. 2006; 77: 138–150. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00332.x>.
221. Tanaka AS, Andreotti R, Gomes A, Torquato RJ, Sampaio MU, Sampaio CA. A double headed serine proteinase inhibitor--human plasma kallikrein and elastase inhibitor from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology*. 1999; 45 (1-3): 171-177. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(99\)00074-0](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(99)00074-0).
222. Torrents J, Morel N, Rossner MV y col. *In vitro* diagnosis of resistance of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fipronil in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*. 2020a; 82: 397–403. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00554-7>.
223. Torrents J, Sarli M, Rossner MV, Toffaletti JR, Morel N, Martínez NC, Webster A, Mangold AJ, Guglielmone AA, Nava S. Resistance of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin in Argentina. *Research in Veterinary Science*. 2020b; 132: 332–337 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.012>.
224. Torres Bruchamann E. Atlas agroclimático y bioclimático de Tucumán (2ª parte). Publicación Especial N° 10, Universidad Nacional de Tucumán. 1977; p.13.
225. Trager W. Acquired Immunity to Ticks. *The Journal of Parasitology*. 1939; 25 (1): 57-81.
226. Turner JW. Genetic and biological aspects of zebu adaptability. *Journal of Animal Science*. 1980; 50: 1201-1205.
227. Turner LB, Harrison BE, Bunch RJ, Porto Neto LR, Li YT, Barendse W. A genome wide association study of tick burden and milk composition in cattle. *Animal Production Science*. 2010; 50: 235-245. <https://doi.org/10.1071/AN09135>.
228. Untalan PM, Pruett JH, Steelman D. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3\*4401 allele with host resistance to the Lone



- Star tick, *Amblyomma americanum*. *Veterinary Parasitology*. 2007; 145 (1–2): 190-195.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.003>.
229. Utech KBW, Wharton RH, Kerr JD. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1978; 29: 885-895. <https://doi.org/10.1071/AR9780885>.
230. Valenzuela JG. Blood-feeding arthropod salivary glands and saliva. En: Marquart WC, Black WC, Freier JE, Hagedorn HH, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B, Moore CG (editors). *Biology of Disease Vectors*, 2<sup>ed</sup>. San Diego: Elsevier. 2005; 377-386.
231. VanRaden PM. Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of Dairy Science*. 2008; 91: 4414–4423. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>.
232. Venables WN, Ripley BD. Random and Mixed Effects. En: *Modern Applied Statistics with S. Statistics and Computing*. Springer, New York, NY. 2002.  
[https://doi.org/10.1007/978-0-387-21706-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-0-387-21706-2_10).
233. Veríssimo CJ, D'Agostino SM, Pessoa FF, de Toledo LM, de Miranda Santos IKF. Length and density of filiform tongue papillae: differences between tick-susceptible and resistant cattle may affect tick loads. *Parasitology Vectors*. 2015; 8:594.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-1196-4>.
234. Veríssimo CJ, Nicolau CVJ, Cardoso VL, Pinheiro MG. Haircoat characteristics and tick infestation on Gyr (Zebu) and crossbred (Holstein × Gyr) cattle. *Arch. Zootech*. 2002; 51:389–392  
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.514.7304&rep=rep1&type=pdf>.
235. Villares JB. Climatologia zootécnica III. Contribuição ao estudo da resistência e suscetibilidade genética dos bovinos ao *Boophilus microplus*. *Boletim da Industria Animal*. 1941; 4: 60-79.

236. Viñas, RC. Comportamiento de razas europeas, Criollo y sus cruizas con Nelore en Tucumán. Rev.Cebú y derivados, N.º 355, 1976, Buenos Aires, Argentina.
237. Visscher PM, Woolliams JA, Smith D, Williams JL. Estimation of Pedigree Errors in the UK Dairy Population using Microsatellite Markers and the Impact on Selection. Journal of Dairy Science. 2002; 85 (9): 2368-2375. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74317-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74317-8).
238. Walker AR, Bouattour A, Camicas JL, Estrada-Peña A, Horak I, Latif A, Pegram RG, Preston PM. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Bioscience Reports, Edinburgh, UK. 2003; p.221.
239. Wambura PN, Gwakisa PS, Silayo RS, Rugaimukamu EA. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos Taurus*. Veterinary Parasitology.1998; 77 (1): 63-70. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00229-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00229-X).
240. Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Muir W. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. Genetics Research. 2012; 94 (2): 73-83. <https://doi.org/10.1017/S0016672312000274>.
241. Wang M, Guerrero FD, Perteza G.y col. Global comparative analysis of ESTs from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. BMC Genomics. 2007; 8: 368. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-368>.
242. Wharton RH, Roulston WJ. Resistance of Ticks to Chemicals. Annual Review of Entomology 1970 15:1, 381-404.
243. Wharton RH, Utech KBW, Turner HG. Resistance to the cattle tick, *Boophilus microplus* in a herd of Australian Illawarra Shorthorn cattle: Its assessment and heritability. Australian Journal of Agricultural Research 1970; 21: 163-181. <https://doi.org/10.1071/AR9700163>.

244. Whitehead GG, Makino S, Lien CL, Keating MT. fgf20 is essential for initiating zebrafish fin regeneration. *Science*. 2005; 310 (5756): 1957-1960. <https://doi.org/10.1126/science.1117637>.
245. Wiggans GR, Sonstegard TS, VanRaden PM, Matukumalli LK, Schnabel RD, Taylor JF, Van Tassell CP. Selection of single-nucleotide polymorphisms and quality of genotypes used in genomic evaluation of dairy cattle in the United States and Canada. *Journal of Dairy Science*. 2009; 92 (7): 3431–3436. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1758>.
246. Wilkins JV, Martinez L, Rojas F. El Ganado Vacuno Criollo Documento 31. 1982; Santa Cruz, Bolivia-CIAT.
247. Wilkinson PR. Observations on infestations of undipped cattle of British breeds with the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research*. 1955; 6: 655-665. <https://doi.org/10.1071/AR9550655>.
248. Zhang X, Lourenco D, Aguilar I, Legarra A and Misztal I. Weighting Strategies for Single-Step Genomic BLUP: An Iterative Approach for Accurate Calculation of GEBV and GWAS. *Frontiers in Genetics*. 2016; 7:151. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00151>.
249. Zimerman M, Bottegal D, Oliverio ML, Ferrario J, Ortega MF, Martínez S, Royo V, Molina A, Holgado F, Fernandez Salom MJ, Taboada N, Nasca JA. Desempeño productivo y calidad de carne de novillos Braford, Criollo Argentino y F1 terminados a corral. *Revista Argentina de Producción Animal*. 2019; 39 (1): 81.
250. Zuccardi RB, Fadda GS. Bosquejo Agroecológico de la Provincia de Tucumán. Miscelánea 86. 1985. Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.

## 8. ANEXO

**Tabla 7.** Resumen de las características diferenciales de los bovinos susceptibles a las garrapatas frente a los resistentes (Tabor y col., 2017 y actualización elaboración propia).

Metodología (raza)	Susceptible	Resistente	Conclusión ppal y referencia
Isotipado de IgG celular; ganado naturalmente infestado sobre pasturas, susceptibles tratados con acaricidas con conteos >500. Vacunados con GAVAC (Holstein y Aberdeen <i>B. t. taurus</i> vs Nelore <i>B. t. indicus</i> )	Disminución de IgG1 e IgG2 (anticuerpos anti-glándulas salivales solamente)	IgG1 e IgG2 sin cambios	Supresión de IgG por la infestación con garrapatas en ganado susceptible. Kashino y col., 2005.
Estudio genético; ganado naturalmente infestado en pasturas y a los 10-14 meses infestados con 10.000 larvas de garrapatas, PCR para determinar frecuencia alélica (población F2 compuesta por <i>B. t. indicus</i> Gyr 1/2 x <i>B. t. taurus</i> Holstein 1/2)		BoLA Clase II DRB3.2	Clase II DRB 3.2 del MHC asociado a resistencia a garrapatas. Martínez y col., 2006.
Expresión de genes por microarrays; infestaciones naturales por ~6 meses (muestra "naive" tomada luego de la infestación), seguido por 5 infestaciones artificiales en período de 17 meses con 20.000 a 25.000 larvas de garrapatas (Hereford/Shorthorn y ganado adaptado a ambiente tropical <i>B. t. taurus</i> )	Células B CLL/linfoma 10 Colágeno, pro $\alpha$ Apolipoproteína Keratina Inmunoglobulinas Receptor IL13, precursor $\alpha$ 1	Catepsina B Colágeno (tipo I $\alpha$ 2, tipo III pro, tipo VI $\alpha$ 3) Componente de complemento I, q subcomplemento $\alpha$	Ganado susceptible regulación en alza de genes de respuesta inmune y aquellos envueltos en la síntesis de proteínas. BDA 20, proteínas de unión al olor y proteína de células dendríticas B5 reguladas en alza en ambos grupos. Wang y col., 2007.

Marcadores genéticos microsatélites y qPCR citoquinas, 17 meses infestación natural con garrapatas ( <i>B. t. indicus</i> Nelore, 5/8 <i>B.t taurus</i> 3/8 <i>B.t. indicus</i> Canchim x Nelore, <i>B.t taurus</i> Aberdeen Angus x Nelore, <i>B.t taurus</i> Simmental x Nelore)	IL 4	IL8 e IL2, regulación en baja	Los conteos de garrapatas se asociaron con IL4. IL2 con regulación en baja en 3 grupos genéticos diferentes de bovinos comparados con la pre-infestación y la IL8 con regulación en baja en los bovinos resistentes comparados con los susceptibles. Regitano y col., 2008.
Expresión de genes RT-PCR, glóbulos blancos periféricos, exposición natural previa a garrapatas, 7 infestaciones artificiales semanales con 10.000 larvas mientras se mantuvieron en pasturas infestadas (Holstein Friesian <i>B. t. taurus</i> vs Brahman <i>B.t. indicus</i> )	Ruta de receptores tipo Toll (TLR5, TLR7, TLR9, NFKBp50, MyD88, Traf-6, CD14, IL-1 $\beta$ ) Ligantes y receptores de quimioquinas (CCL2, CCL26; CCL-1) IL10 BDA20		15 transcritos incrementados significativamente en el ganado susceptible lo que sugieren procesos inflamatorios innatos. Piper y col., 2008.
Expresión de genes RT-PCR y microarray en leucocitos, infestación descrita en Piper et al., 2008 (Holstein Friesian <i>B. t. taurus</i> vs Brahman <i>B.t. indicus</i> )	Mayores conteos de glóbulos blancos (WBC) Menor hemoglobina CD14+ MHC clase II (macrófagos) Elevadas inmunoglobulinas específicas de garrapata (larvas, glándula salivar e intestino de adultos) - Alta IgG1 CXCL10	CD4, CD25, células T $\gamma\delta$ IL2, IL2R $\alpha$ , IL4R $\alpha$ , TNF $\alpha$ , CCR-1, CCR-7, CXCL4, CD28, CD3E, ligando CD40	El ganado susceptible presenta un tipo de respuesta innata inflamatoria con altos título de IgG1, sugiriendo además una respuesta de célula T. El ganado resistente produce una respuesta estable mediada por células T. Piper y col., 2009.
Expresión de genes RT-PCR genes de señalización de calcio en biopsias de piel. Exposición natural a garrapatas seguido por tratamiento y a los 8 meses infestación artificial con 10.000 larvas. Biopsias de piel a las horas 0, 3 y 24 post infestación (raza compuesta Belmont Red ~ 1/2 <i>B. t. taurus</i> , 1/2 <i>B.t. indicus</i> , adaptado a ambiente tropical)		Genes de señalización de calcio (significativos 24 hs post-exposición) Nucleoproteína <i>AHNAK</i> (desmoyokin) <i>CASQ</i> (calsequestrin) IL2 NFAT2CIP PLCG1	La elevación significativa en la expresión de genes dependientes de calcio luego de la exposición a garrapatas sugiere la ruta del calcio puede ser sensible a la exposición parasitaria y podría contribuir a la respuesta inmune del huésped. Bagnall y col., 2009.
Expresión de proteínas y RNAm. Infestación descrita en Bagnall et al., 2009. Biopsias de piel a las 0,3 y 24 hs post infestación (raza compuesta Belmont Red ~ 1/2 <i>B. t. taurus</i> , 1/2 <i>B.t. indicus</i> , adaptado a ambiente tropical)		Keratina Lipocalina 9 Catalizador de barrera epidérmica Enzima transglutaminasa 1 Regulador transcripcional B Proteína de maduración inducida por linfocitos Proteínas de procesamiento de lípidos	El ganado resistente posee capas epidérmicas de la piel físicamente más fuertes. Kongsuwan y col., 2010.

<p>Expresión de genes (microarrays) en piel. Infestación descrita en Piper et al., 2008 (Holstein Friesian <i>B. t. taurus</i> vs Brahman <i>B.t. indicus</i>)</p>	<p>Ligandos de quimiocinas (CXC) 2 y 5; (CC) 2 y 8, CXCL2, CXCL5, CCL2, CCL8 Componente de complemento 1 y 3; factor D del complemento (adipsina) IL8 MHC Clase II DRB3 Quimiocina regakina Inhibidor de tripsina del bazo Activador del plasminógeno Inhibidor peptidasa serpina clado F Proteína proapoptótica adaptador capazo Proteína 1 de reconocimiento de peptiglicano Apolipoproteína D Lisozima Prostaglandina D2 sintasa</p>	<p>Queratocano, osteoglicina, lumican, colágeno (tipo I y III); Lisil oxidasa Regulación descendente citocromo P450 (CYP4F3 CYP11A1) Inhibidor peptidasa serpina clado A Fosfolipasa A2, grupo VII Fosfoproteína secretada 2 Potenciador procolágeno C-endopeptidasa Metabolismo de lípidos Metabolismo de aminoácidos Oxidoreductasas</p>	<p>Los genes involucrados en procesos inflamatorios y respuestas inmunes regulan en alza en el ganado susceptible. Los genes que regulan la constitución de la matriz extracelular regulan en alza en los animales resistentes. Piper y col., 2010.</p>
<p>Análisis qPCR luego de infestación artificial. Biopsias de piel de zona lesionada (<i>Gyr B. t. indicus</i> x Holstein <i>B. t. taurus</i>)</p>	<p>Transducción de señales dependientes de calcio (S100A7) Proteína de liberación de histamina (TPT1) Canal epitelial de calcio (TRPV6) Inhibidor cisteína proteinasa (CST6)</p>		<p>El ganado susceptible desarrolla una reacción de hipersensibilidad no protectora. Nascimento y col., 2010.</p>
<p>Análisis EST, infestación natural con garrapatas seguido de tratamiento acaricida e infestación artificial con 10.000 larvas, biopsias de piel colectadas día 5 y 12 post infestación de la base de la cola (Población F2 <i>Gyr B.t. indicus</i> x Holstein <i>B. t. taurus</i>)</p>	<p>Antígeno CD44 Antígeno CD63 ADAM metalopeptidasa OBP Proteína de unión polyA Proteínas ribosomales</p>	<p>MHC Clase I Precursor L2 catepsina Colágeno Keratina Proteínas ribosomales</p>	<p>Ganado resistente asociado a proteínas estructurales y MHC Clase I; ganado susceptible transcripción de respuesta inmune. Nascimento y col. 2011.</p>
<p>Inmunohistoquímica, infestación descrita en Piper <i>et al.</i>, 2008. (Holstein Friesian y Brahman). Infestaciones artificiales semanales (Santa Gertrudis) con 10.000 larvas, durante 13 semanas seguido por infestación natural en pasturas (Holstein Friesian <i>B.t. taurus</i> x Brahman <i>B.t. indicus</i>; Santa Gertrudis 5/8 <i>B.t. taurus</i> 3/8 <i>B.t. indicus</i>)</p>	<p>CD45, CD45RO (Holstein Friesian) Reacciones mezcladas CD45, CD45RO (Santa Gertrudis)</p>	<p>CD4+, CD8+, CD25+ y células T γδ MHC Clase II Reacciones mezcladas CD45, CD45RO (Santa Gertrudis)</p>	<p>Mayor número de células T γδ en ganado resistente "naive". Epitopes reconocidos por algunos anticuerpos pueden no estar presentes en la población celular de todas las razas o pueden expresarse en diferentes niveles. La resistencia en Santa Gertrudis está asociada con una reacción celular menor en los sitios de ataque de las larvas. Constantinoiu y col, 2010, 2013;Jonsson y col, 2014.</p>

<p>Expresión de genes con microarray, infestación natural sobre pasturas (10 meses) tratamiento acaricida, infestación artificial con 10.000 larvas. Biopsia de piel a las 0, 24 y 48 hs post infestacion (Población F2 Gyr <i>B.t. indicus</i> x Holstein <i>B. t. taurus</i>)</p>	<p>Genes de control de iones Calcio Citocromo P450 Leucotrieno (CYP4F3)</p>	<p>Factores del complemento 1,2 y 3 (C1, C2, C3); factor de complemento 4, factor B de complemento, properdin, galactin, factor de coagulación XIIIa Metabolismo de lípidos</p>	<p>Ganado resistente metabolismo de lípidos en el control de inflamación. ganado susceptible respuesta en fase aguda deteriorada. Carvalho y col., 2014.</p>
<p>Expresión de genes RT-PCR de glóbulos blancos periféricos, infestación natural sobre pasturas, tratamiento acaricida, infestación artificial con 20.000 larvas. Muestras de sangre a las 0, 24 y 48 hs post infestacion (Población F2 Gyr <i>B.t. indicus</i> x Holstein <i>B. t. taurus</i>)</p>	<p>CXCL10 y CXCL8 regulación en baja</p>	<p>CD4+, CD25+ y células T <math>\gamma\delta</math> IL10 FoxP3 CXCL10 CD25</p>	<p>Correlación entre la actividad de células T <math>\gamma\delta</math> y mecanismos inmunitarios en ganado resistente. Dominguez y col., 2014.</p>
<p>Respuesta celular y humoral (sangre), infestaciones artificiales semanales con 10.000 larvas durante 13 semanas, seguido de infestación natural en pasturas, sangre colectada 21 días luego de la 1° infestación y luego semanalmente (Santa Gertrudis 5/8 <i>B.t. taurus</i> 3/8 <i>B.t. indicus</i>)</p>	<p>Elevados títulos IgG1; respuesta variable IgG2 Hemoglobina y conteo de glóbulos rojos disminuídos Incremento de CD25+, CD4+, WC1+</p>	<p>No IgG2 Células CD4+ incrementado (previo infestación) Disminuidos CD3+, CD4+, CD8+ Incremento de MHC Clase II, WC3+ y CD14+</p>	<p>Ganado susceptible con altos niveles de IgG1 no protector. Piper y col., 2017.</p>
<p>Expresión de genes microarrays (piel) e histología. Tratamiento acaricida de los terneros antes de la 1° infestación artificial con 10.000 larvas, biopsias de piel con y sin garrapatas alimentándose a los 0, 2 (larvas) y 9 (ninfas) días. Selección de genes de respuesta inmune diferencial en infestación con larvas comparado con base y no estresado (sin garrapatas) en ganado susceptible y resistente (Holstein <i>B.t. taurus</i> vs Nelore <i>B. t. indicus</i>)</p>	<p>CD209 (guía en la producción de IL10) Fibroleucina (fibrinógeno tipo 2) Secretogranin-2- secretoneurin CXC6 regulado en baja, CCL3, CCL4 Alta afinidad precursor alfa subunidad receptor epsilon de inmunoglobulina (NF-kB, activación MAPK) Factor de complemento D Complemento C1q CD3</p>	<p>CD3+, células T <math>\gamma\delta</math>, WC1+ Activación de basófilos IL3 Precursor D catepsina</p>	<p>El ganado susceptible produce más volátiles atractivos. El ganado resistente expone a las garrapatas a una respuesta inflamatoria más temprana. Franzin y col., 2017</p>

Dinámica celular a través de histología, inmunohistoquímica y citometría de flujo. Infestación artificial, muestras de piel y ganglios linfáticos. (Brahman <i>B.t indicus</i> , Bonsmara 5/8 <i>B. t. indicus</i> x 3/8 <i>B. t. Taurus</i> , Holstein-Friesian <i>B. t. Taurus</i> ). Modelo ratón	linfocitos B CD20 + Infiltración de eosinófilos Mayor variabilidad de los linfocitos T $\gamma\delta$	linfocitos B CD20 + Aumento de linfocitos T CD3+ Infiltración de eosinófilos Aumento de macrófagos	Asociación de la susceptibilidad a las garrapatas con regulación diferencial de linfocitos B en tejidos de ganglios linfáticos, mayor variabilidad de WC1+ $\gamma\delta$ en el ganglio linfático, así como una disminución de los linfocitos T auxiliares. Robbertse y col, 2018.
Inmunofluorescencia en muestras de piel con larvas de garrapatas adheridas de ganado al final de un período de 25 infestaciones semanales (Santa Gertrudis 3/8 <i>B.t indicus</i> y 5/8 de <i>B.t. taurus</i> )	Concentración de CD4+ y células T $\gamma\delta$ en los sitios de ataque	Tendencia a mayor cantidad de eosinófilos en los sitios de ataque	Los anticuerpos monoclonales específicos para CD45 y CD45 RO directamente, o una prueba para el genotipo CD45 podrían desarrollarse como marcadores de susceptibilidad o resistencia a las garrapatas. Constantinoiu y col., 2018
Secuenciación RNA. Biopsias de piel. Infestación natural previa. 4 infestaciones artificiales, muestras tomadas antes de la 1° y 24 hs luego de la 4°. (Braford 3/8 <i>B. t. indicus</i> 5/8 <i>B. t. taurus</i> )		Activación y quimiotaxis de células inmunes: leucocitos, fagocitos y granulocitos; representado por citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y genes inflamatorios. Vía de señalización WNT	Genes relacionados con factores de transcripción, estructurales de la piel y de cicatrización de heridas. Los hospedadores resistentes presentaron una respuesta inflamatoria a la infestación basada en citocinas y la vía de señalización de WNT. Los susceptibles parecían incapaces de reunir una inmunidad eficaz contra las garrapatas, aunque la infestación también provocó sus respuestas. Moré y col., 2019.
Expresión de genes PCR (qPCR) muestras de biopias de piel y muestras de sangre tomadas previo a la infestación y 12 hs post 6 animales por raza infestaciones artificiales. (Angus <i>B. t. taurus</i> , Brahman <i>B. t. indicus</i> , Nguni <i>B. t. taurus</i> )		Mayor capacidad para prevenir la alimentación continua de las garrapatas a través de la reparación continua de tejidos	El gen LUM (BT5) es un potencial biomarcador para resistencia a garrapata. Genes con variación, los asociados a disminuir el suministro de sangre para alimentación del parásito y los asociados con respuestas inmunes. Marima y col., 2020.