

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA**

**DETERMINACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO DE CÉLULAS NK Y EL PERfil DE  
CITOCINAS EN PACIENTES CON RICKETTSIOSIS**

**POR:**

**CAROLINA MAYNEZ PRIETO**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**MAYO DE 2021**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Ildebrando Pérez Reyes  
Secretario de Investigación y Posgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Chihuahua  
Presente:

Chihuahua, Chih., a 7 de junio de 2021.  
Oficio: 64/CA/SIP/21

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: "Determinación del inmunofenotipo de células NK y el perfil de citocinas en pacientes con rickettsiosis", presentada por la M.V.Z. Carolina Maynez Prieto, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

Atentamente  
"Por la ciencia para bien del hombre"

Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón  
Asesora de tesis

L.CARMEN MYRIAM DE LA O CONTRERAS  
M.C. Carmen Myriam de la O Contreras  
Asesora de tesis

Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos  
Co-Director de tesis

DR. GERARDO PÁVEL ESPINO SOLÍS  
Co-Director de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes  
Secretario de Investigación y Posgrado



FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS  
SECRETARÍA  
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

\*\*\*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Círculo Universitario  
Campus Universitario #2 C.P. 31125  
Tel. +52 (614) 236 6000  
Chihuahua, Chihuahua, México  
<http://www.fcq.uach.mx>



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación Traslacional y Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo – sede Chihuahua, bajo la codirección del Dr. Gerardo Pável Espino Solís, en la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. El desarrollo del mismo fue financiado por proyectos otorgados al Dr. Gerardo Pável Espino Solís por CONACYT Ciencia Básica: A1-S-53789 y Consolidación de Laboratorios Nacionales – Citometría De Flujo 299024.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Chihuahua, Chihuahua a 19 de mayo de 2021.

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes  
Secretario de Investigación y Posgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Chihuahua  
P R E S E N T E**

Por este conducto le comunicamos que la tesis presentada por la alumna **M.V.Z. Carolina Méndez Prieto**, número de matrícula **281390**, para la obtención de grado de **Maestría en Ciencias en Biotecnología** y titulada: "**Determinación del inmunofenotipo de células NK y el perfil de citocinas en pacientes infectados con rickettsiosis**", ha sido revisada por nosotros y liberada para su presentación y revisión por el Comité de Tesis.

Quedamos de Ud.,

**Dr. Gerardo Pável Espino Solís**  
Co-Director  
Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo  
UACH-FM

**Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos**  
Co-Director  
UACH-FCQ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 7 de junio de 2021.  
Oficio: 64/CA/SIP/21

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
Secretario de Investigación y Posgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Chihuahua  
**P r e s e n t e:**

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: "Determinación del inmunofenotipo de células NK y el perfil de citocinas en pacientes con rickettsiosis", presentada por la M.V.Z. Carolina Maynez Prieto, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

**A t e n t a m e n t e**  
"Por la ciencia para bien del hombre"

Dra. Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón  
Asesora de tesis

Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos  
Co-Director de tesis

M.C. Carmen Myriam de la O Contreras  
Asesora de tesis

Dr. Gerardo Pável Espino Solís  
Co-Director de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes  
Secretario de Investigación y Posgrado



\*\*\*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Círculo Universitario  
Campus Universitario #2 C.P. 31125  
Tel. +52 (614) 236 6000  
Chihuahua, Chihuahua, México  
<http://www.fcq.uach.mx>



## AGRADECIMIENTOS

A Dios por seguir acompañándome a lo largo de este trayecto de la maestría, y sostenerme en los momentos de dificultad, y ser siempre mi motivo de alegría.

A mi familia y amigos, por su motivación y apoyo a continuar con mi proyecto de vida.

A mis asesores y maestros por guiarme a lo largo de la maestría, compartiendo todos sus conocimientos y experiencia.

A los médicos del Hospital Infantil de Especialidades del Estado de Chihuahua por su gran disposición e interés en el proyecto.

A los voluntarios por su disposición en participar en el proyecto.

A la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por esta oportunidad de desarrollo profesional y personal.



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios y mi familia por ser lo más valioso en mi vida.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>vi</b>
<b>1.1 ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>2. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>3. ANTECEDENTES TÉCNICOS Y REFERENCIAS .....</b>	<b>2</b>
<b>3.1 Garrapatas .....</b>	<b>2</b>
<b>3.1.1 Familia <i>Ixodidae</i>.....</b>	<b>2</b>
<b>3.1.2 Familia <i>Argasidae</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.5 Biodiversidad de garrapatas en México .....</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Enfermedades transmitidas por vectores.....</b>	<b>5</b>
<b>3.3 Rickettsiosis .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3.1 Fiebre de las montañas rocosas .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3.2 Vectores.....</b>	<b>7</b>
<b>3.3.3 Patofisiología .....</b>	<b>7</b>
<b>3.3.4 Patogénesis.....</b>	<b>7</b>
<b>3.5 Incidencia de rickettsiosis y otras enfermedades transmitidas por garrapatas en México .....</b>	<b>9</b>
<b>3.6 Células natural killer .....</b>	<b>10</b>
<b>3.6.1 Receptor NKG2D.....</b>	<b>11</b>
<b>3.6.2 Receptor NKG2A.....</b>	<b>11</b>
<b>3.6.3 Receptor CD57 .....</b>	<b>12</b>
<b>3.7 Citocinas .....</b>	<b>12</b>
<b>3.7.1 Interleucinas.....</b>	<b>13</b>
<b>3.7.2 Interferones .....</b>	<b>15</b>

<b>3.7.3 Factores de Necrosis Tumoral (TNF) .....</b>	<b>16</b>
<b>3.7.4 Quimiocinas .....</b>	<b>17</b>
<b>3.8 Respuesta inmune (células NK) ante rickettsiosis .....</b>	<b>18</b>
<b>3.9 Respuesta inmune (citocinas) ante rickettsiosis .....</b>	<b>19</b>
<b>4. HIPOTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>5. JUSTIFICACION .....</b>	<b>20</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>20</b>
<b>7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>8.1 Sujetos de estudio y criterios de inclusión .....</b>	<b>21</b>
<b>8.2 Declaración de ética .....</b>	<b>21</b>
<b>8.3 Toma de la muestra .....</b>	<b>22</b>
<b>8.4 Extracción del ADN en sangre .....</b>	<b>22</b>
<b>8.5 Cuantificación de ADN .....</b>	<b>23</b>
<b>8.6 Amplificación de los genes OmpA1 y gltA para el diagnóstico de FMMR .....</b>	<b>23</b>
<b>.....</b>	<b>24</b>
<b>8.7 Análisis electroforético .....</b>	<b>24</b>
<b>8.8 Análisis del perfil de citocinas proinflamatorias.....</b>	<b>25</b>
<b>8.9 Análisis del perfil de quimiocinas .....</b>	<b>25</b>
<b>8.10 Análisis del perfil de citocinas Th1 / Th2 / Th17.....</b>	<b>25</b>
<b>8.11 Determinación del inmunofenotipo de células NK.....</b>	<b>26</b>
<b>8.12 Análisis estadístico.....</b>	<b>28</b>
<b>9. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>10. DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>11. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>12. APÉNDICE.....</b>	<b>46</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Representación de estrategia de paneles para identificar subpoblaciones de células NK (%).....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 2. Producto de la amplificación de PCR para identificar genes gltA y OmpA1 .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3. Diagrama de selección de sujetos con rickettsiosis y controles.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 4. Niveles de citocinas proinflamatorias en sueros de niños con rickettsiosis durante la fase aguda.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5. Niveles de quimiocinas en sueros de niños con rickettsiosis durante la fase aguda.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 6. Niveles de citocinas involucradas en las respuestas Th1/Th2/Th17 en sueros de niños con rickettsiosis durante la fase aguda.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7. Porcentaje de células NK (CD3-CD56 +).....</b>	<b>33</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Oligonucleótidos para el diagnóstico molecular de FMMR.</b> .....	<b>24</b>
<b>Tabla 2. Anticuerpos monoclonales y reactivos empleados para la tinción de las muestras sanguíneas.....</b>	<b>27</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

DNAM1 – Molécula accesoria 1 de DNAX.

EE. UU. – Estados Unidos de América

FMMR – Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas.

h – Hora

IFA – Inmunofluorescencia.

IFN - Interferón.

IL - Interlucina.

IP-10 – Proteína inducida por interferón gamma.

KAR – Receptores de tipo inmunoglobulina de células NK.

KIR - Familia de receptores de células NK tipo inmunoglobulina.

MCP-1 – Proteína quimiotáctica de monocitos-1.

MIG – Monocina inducida por IFN- $\gamma$ .

MIP-1 – Proteínas inflamatorias de macrófagos.

NCR – Familia de receptores citotóxicos naturales.

NK – Natural Killer.

NKG2D – Grupo natural killer 2D

PBS – Solución salina tamponada con fosfato

PCR – Prueba de reacción en cadena polimerasa.

RANTES – Quimiocina regulada tras activación, expresada y secretada en linfocitos T normales.

RMSF – Rocky Mountain spotted fever.

Sca – Antígeno de superficie celular.

TNF – Factor de necrosis tumoral.

VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular.



## 1. RESUMEN

*Rickettsia rickettsii* es un patógeno intracelular que causa fiebre manchada transmitida por garrapatas, conocida como Fiebre de las Montañas Rocosas (FMMR), y se reconoce cada vez más como una causa emergente de enfermedad febril en México. Sin embargo, se sabe poco sobre las primeras respuestas inmunitarias a la infección. Se reclutó a cuatro pacientes pediátricos con FMMR en fase aguda y ocho controles sanos de Chihuahua, México. Se caracterizó el inmunofenotipo de células natural killer (NK) y el perfil de citocinas en sangre periférica. La población de células NK efectoras con expresión de NKG2D disminuyó significativamente en los pacientes con rickettsiosis al 3er día de hospitalización en comparación con la primer toma de muestra a su ingreso al hospital. Los niveles de citocinas: IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, MCP-1 y MIG aumentaron significativamente en los pacientes con rickettsiosis a su ingreso al hospital en comparación con los controles. Este estudio muestra que el aumento inicial de citocinas proinflamatorias junto con la disminución de NK efectoras circulantes con expresión de NKG2D sugieren un cuadro de choque séptico en pacientes pediátricos.

Keywords: Células natural killer, citocinas, rickettsiosis.



## 1.1 ABSTRACT

The intracellular pathogen *Rickettsia rickettsii* causes tick-borne spotted fever (also called Rocky Mountain spotted fever (RMSF) and is increasingly recognized as an emerging cause of febrile illness in Mexico. However, little is known about the early immune responses to infection. Four RMSF pediatric patients on acute phase and eight healthy controls from Chihuahua, Mexico were recruited. The natural killer cell (NK) immunophenotype and the cytokine profile in peripheral blood were characterized by flow cytometry. The population of cytotoxic NK cells expressing NKG2D was significantly decreased in patients on 3rd day of hospitalization compared to the first sampling on admission. IL-6, IL-8, and IL-10 levels were significantly increased in patients upon admission compared to controls. This study shows that circulating NK cells are numerically decreased, while cytokines induce a pro-inflammatory process in patients.

**Keywords:** Rickettsiosis, cytokine profiles, Natural killer cells subsets

## 2. INTRODUCCION

La Fiebre de las Montañas Rocosas (FMMR) es una enfermedad transmitida por garrapatas, causada por *Rickettsia rickettsii*, un patógeno intracelular obligado perteneciente a  $\alpha$ -protobacteria (Blanc et al., 2005; Dantas, 2007). En el Norte de América es considerada como una enfermedad infecciosa re-emergente que afecta principalmente a los niños en situación de pobreza. Tan solo en México en los estados de Baja California y Sonora se registraron 2300 casos y 380 muertes en 2016, y se estima que las tasas de letalidad son mayores en niños menores de 10 años (Álvarez et al., 2017).

*Rickettsia* invade las células endoteliales promoviendo su diseminación y causando vasculitis que estimula las cascadas de señalización celular, lo que conduce a la secreción de citocinas, que inicia la infiltración en la pared celular vascular y espacio perivascular de macrófagos, linfocitos T CD4+, CD8+ y células NK (Sahni, et al., 2019). En modelos humanos *in vitro*, las células endoteliales incrementan la expresión y secreción de citocinas IL-1 (interleucina-1), IL-6 (interleucina-6), y TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ); quimiocinas como CXCL8/IL-8 (interleucina-8), CXCL10/IP-10 (proteína 10 inducida por interferón gamma), CCL2/MCP-1 (proteína quimioatractante de monocitos- 1), CXCL9/MIG (monocina inducida por interferón gamma) y CCL5/RANTES que conducen a la activación y el reclutamiento de monocitos, células natural killer (NK) y linfocitos T al sitio de infección que conducen a la potenciación de la respuesta inflamatoria y su eliminación (Groom & Luster, 2011; Osterloh, 2017; Rauch et al., 2018; Rydkina et al., 2010; Sahni & Rydkina, 2009). Mientras que las células NK, principal población de linfocitos innatos que coordinan las respuestas tempranas a las infecciones bacterianas, participan en la regulación de la respuesta inmune ante *Rickettsia*, particularmente mediante la prevención de lesión endotelial temprana que resulta en daño tisular (Fang et al., 2012; Guo et al., 2017). En modelos murinos, está bien establecido que las células NK están implicadas en la defensa innata temprana contra la infección por *Rickettsia* (Billings et al., 2001; La

Manna et al., 2013). Sin embargo, en seres humanos, las primeras respuestas inmunitarias del huésped han sido escasamente caracterizadas. En este estudio, investigamos las respuestas de citocinas séricas y NK en niños febriles con infección aguda por *R. rickettsii*.

### 3. ANTECEDENTES TÉCNICOS Y REFERENCIAS

#### 3.1 Garrapatas

Las garrapatas pertenecen a la subclase *Acarí* de la clase *Arachnida*, son ectoparásitos obligados, artrópodos hematófagos que parasitan a toda clase de vertebrados y se encuentran en todo el mundo (Anderson & Magnarelli, 2008). Aparecieron durante el período Cretácico, predominando dos géneros (*Compluriscutula* y *Cornupalpatum*) antecesores de la familia *Ixodidae* (Poinar & Buckley, 2008), mientras que los argásidos aparecieron hace 89 millones de años aproximadamente (Klompen & Grimaldi, 2001). Se han reconocido 896 especies de garrapatas clasificadas en 3 familias (Guglielmone et al., 2010): *Ixodidae*, o "garrapatas duras", nombradas así por su placa dorsal esclerotizada, siendo estas las principales transmisoras de enfermedades tanto a los animales como a las personas; las *Argasidae*, o "garrapatas blandas", llamadas así por su cutícula flexible; y *Nuttalliellidae*, representada solo por una especie endémica del suroeste de África. Las garrapatas difieren en gran medida tanto anatómicamente como en su ciclo de vida dependiendo de la familia a la que pertenecen (Anderson & Magnarelli, 2008).

##### 3.1.1 Familia *Ixodidae*

###### 3.1.2.1 Anatomía

La garrapata se divide anatómicamente en dos regiones, el capitulum (gnathosoma) y el cuerpo (idiosoma), al que se unen las patas. Las larvas tienen seis patas, mientras que las ninfas y los adultos tienen ocho patas. Una cabeza distintiva está ausente. Las garrapatas adultas no alimentadas varían en longitud de 2 mm a 20 mm. Las hembras alimentadas pueden tener de 25 a 30 mm de longitud y pesar hasta 100 veces su peso previo a la congestión. Las piezas bucales se encuentran en el capítulo que incluyen los dos palpos de cuatro segmentos, que en las garrapatas

ixódidas tiene numerosas sensillas quimiosensoriales ubicadas en el cuarto segmento del palpo. Los palpos penetran en la herida, ejerciendo presión contra la piel durante la alimentación. El par de quelíceros tubulares esclerotizados, de dos segmentos se extiende desde la base de los capítulos y se encuentra medialmente a los palpos. Son dos dígitos de corte móviles y afilados en las extremidades de los ejes quelicerales. Los dígitos están situados lateralmente y se usan para cortar la piel durante la alimentación. El hipóstomo está posicionado medialmente, posee dentículos ventrales en su superficie externa; mientras que la superficie interna está cubierta dorsalmente por los quelíceros y se usa como órgano de retención y canal de alimentos. La región anterior está conformada por las patas y la apertura genital, y la parte posterior posee los espiráculos y el ano. Un escudo endurecido cubre la porción dorsal anterior del cuerpo de las hembras. En los machos, el escudo cubre todo el cuerpo. Durante la alimentación, la cutícula, con la excepción del escudo, se expande para dar entrada a la sangre ingerida (Anderson & Magnarelli, 2008).

### 3.1.2.2 Ciclo de vida

Por lo general, las garrapatas ixódidas tienen un ciclo de vida de tres hospederos, y cada etapa de alimentación de la garrapata (larva, ninfa y adulto) corresponde a un hospedero (Anderson & Magnarelli, 2008), siendo el tipo más común de ciclo de vida (Walker et al., 2014). Las larvas se desarrollan en los huevos hasta que están listas para salir del cascarón, generalmente de cuatro a seis semanas (Anderson & Magnarelli, 2008). Las larvas una vez alimentadas del huésped, se separan y se esconden en el suelo o vegetación donde mudan a ninfas. De igual manera, las ninfas se alimentan una vez y mudan a fase adulta (Walker et al., 2014). La hembra se alimenta solo una vez y deposita entre 2,000 y 20,000 huevos, al poco tiempo muere, mientras que el macho se alimenta varias veces y una vez que se aparea, muere (Walker et al., 2014). Puede suceder que entren en la diapausa, un estado caracterizado por metabolismo reducido y un desarrollo retrasado (Anderson & Magnarelli, 2008). Este tipo de ciclo generalmente se completa en seis meses; pero, puede extenderse hasta años dependiendo de las condiciones ambientales, incluida la temperatura y la humedad relativa (Randolph, 2004; Walker et al., 2014).

El ciclo de uno o dos huéspedes es el menos común pero ocurre en todos los subgéneros *Boophilus* del género *Rhipicephalus*. Los huevos se ponen en el suelo y las larvas eclosionan después de varias semanas de desarrollo y se arrastran hacia la vegetación para buscar un huésped. Cuando han completado la alimentación, permanecen unidos al huésped y allí se produce la muda. Las ninfas se alimentan del mismo huésped y también permanecen unidas. Después de otra muda, los adultos eclosionan y luego se alimentan del mismo huésped. Los adultos cambiarán de posición en el mismo huésped para el apareamiento. Por lo tanto, las tres alimentaciones de cualquier marca individual ocurren en el mismo huésped individual. El ciclo de vida de las garrapatas de un huésped suele ser rápido, para *Rhipicephalus* (*Boophilus*) se necesitan tres semanas para la alimentación de un huésped y dos meses para la puesta de huevos y el desarrollo de larvas. El ciclo de vida de dos huéspedes es similar, pero solo las larvas y las ninfas se alimentan del mismo huésped individual, y los adultos se alimentan de otro huésped (Walker et al., 2014).

### **3.1.2 Familia Argasidae**

#### **3.1.2.1 Anatomía**

Las garrapatas argásidas no poseen escudo y, por lo tanto, no exhiben una marca sexual de dimorfismo. La forma del cuerpo tiene un contorno ovalado. Su cutícula, el capítulo y las piezas bucales están situadas anteriormente en la cara ventral y no se ven desde el aspecto dorsal (Cupp, 1991). Excepto en las larvas, que tienen el capítulo en una posición anterior, un tegumento coriáceo altamente esculpido y no tienen un escudo dorsal (Anderson & Magnarelli, 2008). Los adultos tienen la apertura genital casi entre la coxal, un par de espiráculos están situadas posterolaterales a la coxa III, los ojos suelen estar ausentes, los pulvilos están ausentes o poco desarrollados (excepto en algunas larvas) y hay un margen posterior sin festones (Cupp, 1991).

### 3.1.2.2 Ciclo de vida

La mayoría de los argásidos son de múltiples huéspedes, excepto *Otobius megnini* que tiene un ciclo de vida de un huésped. Las larvas se alimentan rápidamente, o durante varios días; luego se separan de su huésped y mudan. En algunos argásidos, las larvas no se alimentan, mudan directamente a la primera etapa de la ninfa. La primera etapa de la ninfa se alimenta rápidamente y luego se muda a otra etapa de ninfa. Se alimentarán en diferentes huéspedes y a menudo, cursaran por un número variable de etapas ninfales. Cuando desarrollan a adultos, las hembras se alimentan rápidamente de un huésped y luego producen pequeños lotes de huevos más grandes que los huevos ixódidos (Walker et al., 2014).

### 3.1.5 Biodiversidad de garrapatas en México

En México se han registrado 100 especies, lo que corresponde a un 11.3% de la diversidad mundial conocida que consta de 894 especies, 20 géneros y 3 familias. Esta diversidad está constituida por 2 familias: *Argasidae* (garrapatas blandas) e *Ixodidae* (garrapatas duras). Los argásidos están representados por 32 especies en 5 géneros: *Argas* (6 especies), *Antricola* (3), *Ornithodoros* (20), *Otobius* (2) y *Nothoaspis* (1), mientras que *Ixodidae* por 68 especies en 5 géneros: *Ixodes* (26 especies), *Amblyomma* (26), *Dermacentor* (10), *Haemaphysalis* (3) y *Rhipicephalus* (3) (Guglielmone et al., 2010; Pérez et al., 2014)

## 3.2 Enfermedades transmitidas por vectores

Los patógenos transmitidos por artrópodos hematófagos se clasifican en 4 grupos: nemátodos, protozoarios, bacterias (incluyendo Rickettsia y Borrelia) y virus, la mayoría de carácter zoonótico. Por lo que los animales domésticos y los seres humanos pueden llegar a ser huéspedes incidentales, es decir, que no participan directamente en el ciclo de transmisión de los patógenos. A lo largo de la historia, las enfermedades transmitidas por vectores como malaria, dengue, fiebre amarilla, filariasis, tifus epidémico, tripanosomiasis, leishmaniasis, entre otras, fueron responsables de altas tasas de mortalidad en seres humanos entre los siglos XVII y

XX (Gubler, 2009). En los últimos 30 años, se ha dado un aumento global de enfermedades infecciosas reemergentes transmitidas por vectores asociado al transporte aéreo, el comercio (Gubler, 2009) y el cambio climático (Harvell et al., 2002).

Entre los vectores más comunes, están las garrapatas, mundialmente reconocidas como uno de los principales vectores de patógenos; transmiten una gran variedad de microorganismos patógenos como protozoarios, rickettsias, espiroquetas y virus que afectan al ganado, humanos y animales de compañía (Jongejan & Uilenberg, 2004). Esta sección se enfocará en su mayor parte al aspecto fisiopatológico de la rickettsiosis, enfermedad que compete a este trabajo de investigación.

### 3.3 Rickettsiosis

Las rickettsias son bacterias intracelulares pertenecientes a  $\alpha$ -protobacteria, cuyo principal vector es la garrapata. Los miembros del género *Rickettsia* incluyen agentes etiológicos como tifus murina (*Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*), fiebre de las montañas rocosas (*Rickettsia rickettsii*) y fiebre del mediterráneo (*Rickettsia conorii*) (Blanc et al., 2005). Clínicamente, el común denominador en todas las rickettsiosis es el incremento en la permeabilidad microvascular, que desencadena en edema no cardiogénico pulmonar y cerebral (Olano, 2005). Sin embargo, son pobemente diagnosticadas dado la amplia variedad de síntomas que presenta, desde una fiebre leve hasta una sepsis fatal (Biswal et al., 2020).

#### 3.3.1 Fiebre de las montañas rocosas

La fiebre manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) es una enfermedad potencialmente mortal causada por *Rickettsia rickettsii*, una bacteria intracelular obligatoria que se transmite a los seres humanos por medio de garrapatas infectadas. La FMMR se encuentra entre las infecciones más virulentas identificadas en seres humanos, y su diagnóstico a menudo representa un dilema para los médicos (Dumler & Walker, 2005).

### 3.3.2 Vectores

Entre los reservorios naturales de *Rickettsia rickettsii* se incluye a diferentes géneros y especies de garrapatas duras (familia *Ixodida*). La garrapata americana de perro (*Dermacentor variabilis*) es el vector principal de *R. rickettsii* en la mayoría de los EE. UU. Mientras que *Dermacentor andersoni* es el más importante en Canadá (Azad & Beardt, 1998). La garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*), se considera que es el vector principal de *R. rickettsii* en México (Tinoco et al., 2009). Mientras que en América Central y del Sur es, *Amblyomma cajennense* (Chapman, 2006).

### 3.3.3 Patofisiología

La secuencia de eventos patógenos que ocurre en la infección por Rickettsia comienza con la inoculación de microorganismos de la garrapata al alimentarse. Después se diseminan de manera hematogena por todo el cuerpo e infectan principalmente células endoteliales; y en menor medida, macrófagos en la piel, pulmones, cerebro, hígado, tracto gastrointestinal, riñones, corazón y otros órganos (Sahni et al., 2019). Sin embargo, se considera que las células diana iniciales de la infección son los macrófagos (Radulovic et al., 2002).

La lesión característica de las enfermedades rickettsiales es la vasculitis (Walker et al., 1989). En el endotelio estimula las cascadas de señalización celular, lo que conduce a la secreción de citocinas, que inicia la infiltración en la pared celular vascular y espacio perivascular de linfocitos T CD8+, CD4+, NK y macrófagos (Valbuena et al., 2003).

### 3.3.4 Patogénesis

Para las bacterias intracelulares obligadas, la patogénesis es un concepto que involucra múltiples pasos: (1) transmisión, (2) entrada, (3) diseminación inicial desde el punto de entrada a otros órganos, (4) contacto con la célula diana (adherencia e invasión), (5) supervivencia dentro del huésped (evasión de las defensas del huésped

y adaptación al entorno del huésped), y (6) extensión del nicho (modulación de la biología del huésped, multiplicación y supervivencia) (Olano, 2005).

Conforme a este mecanismo, *Rickettsia* se adhiere e invade células diana para obtener nutrientes del citoplasma, lo que promueve su proliferación, replicación y diseminación (Walker et al., 2003). Se ha identificado múltiples antígenos de superficie celular (Sca) pertenecientes a la familia de autotransportadores de rickettsia involucrados en la adhesión a los receptores de la célula huésped, estas proteínas se localizan dentro de la capa superficial de la membrana rickettsial y ayudan a la adhesión a la célula huésped. De las 17 proteínas que se han identificado, cinco que son Sca0 (OmpA), Sca1, Sca2, Sca4 y Sca5 (OmpB) participan en proceso de infección. Tanto OmpA y OmpB se encuentran en el grupo de fiebre manchada y se considera que son fundamentales para la patogénesis, mientras que OmpB forma parte de todas las especies de *Rickettsia* (Blanc et al., 2005), excepto de *R. canadensis* (Sears et al., 2012), y juega un papel importante en las especies de fiebre tifus (Blanc et al., 2005).

En *R. rickettsii*, OmpA (Sca0) es expresada como un proteína inmunodominante de 247 kDa, mientras que la de *R. conorii* es de aproximadamente 224 kDa, pero las longitudes de los alelos rOmpA pueden variar de una especie a otra (Chan et al., 2010). Inicialmente, se demostró que OmpA era necesaria para la adhesión de *R. rickettsii* a las células huésped (Li & Walker, 1998), y luego se sugirió que OmpA rickettsial interactúa con la integrina  $\alpha 2\beta 1$  para promover la invasión de la bacteria en las células huésped (Hillman, Baktash, & Martinez, 2013). Trabajos recientes han demostrado que OmpA desempeña un papel en la supervivencia de *R. rickettsii* o la transmisión del vector de la garrapata (Noriea et al., 2015).

La proteína OmpB es un proteína inmunodominante de 168 kDa compuesta por un péptido de señalización de 3 dominios, y un dominio barril  $\beta$  transmembranal. rOmpB se expresa como un preproteína que al ser cortada libera el péptido de señalización (120 kDa) del dominio barril  $\beta$  (32 kDa) (Hackstadt et al., 1992). El péptido

de señalización transloca la proteína a través de la membrana interna y la deposita en el espacio periplásmico, mientras permanece unido a la membrana externa. Después de este evento, el dominio barril  $\beta$  se implanta en la membrana externa bacteriana para formar un poro, cuyo mecanismo no se conoce aún. El péptido de señalización se alimenta a través del poro del barril  $\beta$  y finalmente es cortado (Chan et al., 2010).

Para que las rickettsias ingresen en las células huésped, OmpB debe reconocer el receptor Ku70 (subunidad de una proteína quinasa dependiente de ADN nuclear localizada en citoplasma y membrana plasmática) estimulando la ubiquitinación de los microdominios de colesterol, mediado por ubiquitina ligasa cCbl. Estas interacciones entre Ku70 y OmpB más la de clatrina y caveolina-2 contribuyen a la endocitosis y la internalización rickettsial (Martinez et al., 2005).

Una vez que las rickettsias ingresan en las células huésped, escapan de los fagosomas antes de su fusión con los lisosomas para liberarse en el citosol. Esto se logra a través de una serie de actividades membranolíticas, incluida la liberación de fosfolipasa A2, fosfolipasa D y hemolisina C (Sahni et al., 2016). Debido a su dependencia absoluta de la maquinaria intracelular del huésped para su replicación y propagación, no es sorprendente que las especies de Rickettsia exploten mecanismos redundantes para la adhesión e invasión de la célula huésped, como es el caso receptor 1 de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1) que también se ha visto implicado en la internalización de rickettsias al interactuar con OmpA en una caveolina 1 (A. Sahni et al., 2017).

### **3.5 Incidencia de rickettsiosis y otras enfermedades transmitidas por garrapatas en México**

La FMMR es de importancia pública desde el punto de vista clínico y veterinario. Durante la última década, los casos se han incrementado a lo largo de México, junto con otras enfermedades transmitidas por garrapatas. De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología, en el año 2019 se reportaron 77 casos de tifo murino principalmente en Sinaloa y Yucatán; 302 casos de fiebre manchada y 135 de otras

rickettsiosis, siendo el estado de Chihuahua el que presentó una mayor incidencia de ambas enfermedades. Mientras que en el año 2020 disminuyó a 29 casos de tifo murino, 99 casos de fiebre manchada y 59 casos de otras rickettsiosis, pero Chihuahua continuó acumulando la mayor parte de los casos.

De los seis estados fronterizos, Baja California (Tijuana-San Diego y Mexicali-Calexico), Sonora (Hermosillo) y Chihuahua (Ciudad Juárez-El Paso), son los estados que han recabado mayor información sobre datos epidemiológicos en personas, animales y garrapatas. Las pruebas diagnósticas de inmunofluorescencia (IFA) y prueba de reacción en cadena polimerasa (PCR) para el gen gltA de *R. rickettsii* las más utilizadas en los últimos años (Maynez et al., 2021) (Ap. 1).

A pesar de los esfuerzos multiinstitucionales para prevenir la FMMR y otras enfermedades transmitidas por garrapatas en diferentes municipios del estado, poco se sabe de la prevalencia actual de garrapatas o identificación de otros patógenos como *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* y *Rickettsia spp.*

### 3.6 Células natural killer

Las células natural killer (NK) son los subconjuntos de linfocitos innatos predominantes que median las respuestas antitumorales y antivirales y, por tanto, poseen una utilización clínica prometedora (Abel et al., 2018). Representan del 5% al 20% de las células mononucleares de sangre periférica, generalmente definidas como células CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> y también se encuentran en muchos tejidos como hígado, cavidad peritoneal, placenta o mucosa uterina (Langers et al., 2012). Las células NK humanas se pueden dividir en dos subpoblaciones según la densidad de expresión de CD16 y CD56 en su superficie. La mayoría de las células NK en sangre (90% -95%) o en sitios de inflamación tienen una expresión moderada de CD56 (CD56<sup>dim</sup>) y una expresión fuerte de CD16 (CD16<sup>bright</sup>), estas células poseen un alto potencial citotóxico. Mientras que, la subpoblación CD56<sup>bright</sup> predomina en ganglios linfáticos, expresa niveles bajos o nulos de CD16 (CD16<sup>dim</sup>), muestra poca citotoxicidad y produce principalmente citocinas al activarse (Cooper et al., 2000; Taborda et al., 2014).

Además, existen varias familias de receptores de activación, inhibición y senescencia en células NK. Los receptores de activación más importantes son NKp46, NKp30 y NKp44 que pertenecen a la familia de receptores citotóxicos naturales (NCR), el grupo natural killer 2D (NKG2D) que pertenece a la familia de receptores tipo C, molécula accesoria 1 de DNAX (DNAM1) que pertenece a la familia de moléculas de adhesión a nectina y que activan los receptores de tipo inmunoglobulina de células NK (KAR). Por el contrario, la familia más importante de receptores de inhibición pertenece a la familia de receptores de células NK tipo inmunoglobulina (KIR), mientras que la familia de receptores lectina tipo C NKG2 también incluye receptores inhibidores de células NK como NKG2A (Konjević et al., 2016). En cuanto a la senescencia, esta se caracteriza por la pérdida progresiva de la función de los linfocitos T debido a una carga de antígeno elevada, y normalmente es expresada por el receptor CD57 (Kared, Martelli, Ng, Pender, & Larbi, 2016)

### **3.6.1 Receptor NKG2D**

El receptor NKG2D es un receptor de activación (Wensveen, Jelenčić, & Polić, 2018) que pertenece a la familia de lectinas tipo C y pertenece al grupo NK 2 (NKG2) de receptores como miembro D (Zafirova et al., 2011). Consta de un homodímero de dos proteínas transmembranales unidas por puentes disulfuro, con dominios intracelulares muy cortos que no tienen propiedades de señalización (Houchins et al., 1991). La transducción de señales opera a través de dos proteínas adaptadoras, DAP10 y DAP12, que se asocian con el receptor como homodímeros (Gillfillan et al., 2002). El receptor NKG2D es expresado al inicio del desarrollo de las células NK (Carotta et al., 2011). Este receptor juega un papel importante en el reconocimiento y eliminación de células potencialmente peligrosas, educación de células NK en la médula ósea y tolerancia periférica a la exposición crónica al ligando (Wensveen et al., 2018).

### **3.6.2 Receptor NKG2A**

El receptor NKG2A es un receptor de inhibición en células NK (Braud et al., 1998) perteneciente a la familia de receptores lectina tipo C (Valiante et al., 1997),

conformado por heterodímeros unidos por puentes disulfuro expresados como proteínas de membrana tipo II (Natarajan et al., 2002). Su función es reconocer al antígeno E del complejo mayor de histocompatibilidad (MCH) clase I en humanos (Lee et al., 1998). Esta interacción contribuye en la activación de los mecanismos de auto-tolerancia de las células NK para reconocer células normales (Raulet, 2006).

### 3.6.3 Receptor CD57

El antígeno CD57 es un epítopo de carbohidratos sulfatados de 100-115 kD. En células NK es considerado como un marcador de maduración (Kared et al., 2016) dado que las NK CD57<sup>+</sup> se caracterizan por tener un fenotipo maduro, una capacidad citotóxica elevada, menor capacidad proliferativa, mayor sensibilidad a la estimulación a través de CD16 y menor capacidad de respuesta a las citocinas (López et al., 2010).

## 3.7 Citocinas

Las citocinas son moléculas de señalización que participan en las respuestas inmunes al permitir la comunicación de célula a célula y el reclutamiento de células inmunes a sitios de infección (Otagiri, Giam, Murphy, & Weaver, 2017). Estas se clasifican en cuatro grupos:

- Interleucinas, cuya función es mediar la señalización entre linfocitos y otros leucocitos.
- Interferones, se producen en respuesta a infección por virus y existen tres tipos de interferón: tipo I, interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) y el IFN- $\beta$ ; tipo II, conformado por IFN- $\gamma$ ; y tipo III, IFN –  $\lambda$  (Tizard, 2013). Comparten funciones antivirales, tienen capacidad antiproliferativa, efectos inmunomoduladores y actividad antitumoral (Mata & Hernández, 2008).
- Factor de necrosis tumoral (TNF), son secretadas por macrófagos y células T. Principalmente reconocidas por su actividad antitumoral, y pertenecen a la superfamilia TNF, que participa en la regulación inmunitaria e inflamación. TNF- $\alpha$  es el mediador clave de la inflamación aguda (Tizard, 2013).
- Quimiocinas. Desempeñan un papel importante en la quimiotaxis, la circulación, la migración y la activación de los leucocitos, especialmente en

la inflamación. Un ejemplo típico de quimiocina es CXCL8 (también conocido como IL-8) (Tizard, 2013).

### 3.7.1 Interleucinas

Las interleucinas, son citocinas que median señalización entre linfocitos y otros leucocitos. Están numerados secuencialmente en el orden de su descubrimiento. Debido a que su definición es tan amplia, las interleucinas son una mezcla heterogénea de proteínas con poco en común excepto su nombre (Tizard, 2013).

#### 3.7.1.1 Interleucina-1 (IL-1)

Son péptidos activos de 17-kDa mediadores de la inflamación producidos por macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, células NK, endotelio vascular, fibroblastos y queratinocitos. Entre sus funciones es inducción de fiebre, activación de linfocitos T y macrófagos. IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  pertenecen a esta familia, siendo las formas más conocidas. IL-1 $\beta$  es una citocina inducible producida principalmente por monocitos y macrófagos pero también por neutrófilos. Mientras que IL-1 $\alpha$  también es inducible en células mieloides, el precursor de IL-1 $\alpha$  está presente en todas las células mesenquimales (Abbate et al., 2020; Otagiri et al., 2017; Tizard, 2013).

#### 3.7.1.2 Interleucina-2 (IL-2)

Es una proteína globular glucosilada de 15 kDa producida por linfocitos Th1 y NK. IL-2 activa los linfocitos T reguladores, linfocitos T citotóxicos y células NK. IL-2 estimula la proliferación y la citotoxicidad de los linfocitos T. IL-2 es esencial para el mantenimiento de linfocitos T reguladores (Treg) al promover la generación, supervivencia y actividad funcional de linfocitos Treg, además también participa en la inducción de respuestas inmunes estimulando la proliferación y diferenciación de células T "convencionales" (Abbas, Trotta, Simeonov, Marson, & Bluestone, 2018; Otagiri et al., 2017; Tizard, 2013).

### 3.7.1.3 Interleucina-4 (IL-4)

Una proteína de 15 kDa producida por linfocitos Th2 activados, mastocitos y basófilos activados. Actúa sobre linfocitos B, células T, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y mastocitos. IL-4 estimula el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos B. En los linfocitos T, IL-4 induce la diferenciación de linfocitos T CD4 vírgenes en linfocitos Th2, en linfocitos B, IL-4 dirige el cambio de clase de inmunoglobulinas (Ig) a IgG1 e IgE, y en macrófagos, junto con IL-13 participan en su activación (Junttila, 2018; Otagiri et al., 2017; Tizard, 2013).

### 3.7.1.4 Interleucina-6 (IL-6)

Es una glicoproteína de 25 kDa producida principalmente por monocitos y macrófagos activados, linfocitos T y B, hepatocitos, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, células mesangiales y adipocitos. IL-6 es una citocina pleiotrópica y puede influir en varios procesos inmunes y fisiológicos, se caracteriza por ser inductor de fiebre, estimular el crecimiento y diferenciación de linfocitos T y B, y participar en la producción de proteínas en fase aguda (ej., Proteína C reactiva, hepcidina, etc.) (Otagiri et al., 2017; Uciechowski & Dempke, 2020).

### 3.7.1.5 Interleucina-8 (IL-8)

IL-8 (o también denominada CXCL8) es una proteína relativamente pequeña (8,4 kDa) producida por macrófagos y células endoteliales. Su principal función es la atracción y activación de los neutrófilos (Tizard, 2013).

### 3.7.1.6 Interleucina-10 (IL-10)

Es una proteína homodimérica no glucosilada de 19 kDa que actúa como citocina inmunosupresora y antiinflamatoria, inhibe la función de los linfocitos T, células NK y macrófagos. Es producida principalmente por linfocitos Th2, pero también por macrófagos tipo M2, células NK y algunas células dendríticas. Sus objetivos son los linfocitos Th1, linfocitos B, macrófagos, células NK y mastocitos (Otagiri et al., 2017; Saraiva, Vieira, & O'Garra, 2020; Tizard, 2013).

### 3.7.1.7 Interleucina-12p70 (IL-12p70)

Un heterodímero de 75 kDa que consta de subunidades de 35 y 40 kDa unidas por puentes disulfuro (p35 y p40), que juntos conforman IL-12p70 en su forma activa. IL-12p70 es producido por monocitos y macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y queratinocitos. Es el principal activador de los linfocitos Th1 y las células NK(Otagiri et al., 2017; Thompson & Orr, 2018; Tizard, 2013).

### 3.7.1.8 Interleucina-17A

IL-17A pertenece a la familia de IL-17 de seis proteínas (IL17A a F) producidas por linfocitos Th17 y otras células inmunitarias innatas. Son homodímeros unidos por disulfuro de 35 kDa. IL-17A se produce a partir de células hematopoyéticas, incluyendo Th17, linfocitos T citotóxicos CD8 + (Tc17), linfocito T γδ, células NK y linfocitos Th17. Las moléculas de IL-17 estimulan a los macrófagos y las células endoteliales para que secretan citocinas y quimiocinas proinflamatorias, lo que conduce al reclutamiento y activación de neutrófilos contra patógenos extracelulares. Los miembros de la familia IL-17 juegan un papel clave en el desarrollo de la inflamación aguda, en las enfermedades autoinmunes e infección por hongos (Cua & Tato, 2010; Furue et al., 2020; Tizard, 2013).

### 3.7.2 Interferones

Los interferones son citocinas producidas en respuesta a infección por virus o estimulación inmunológica. Existen tres tipos de interferón: tipo I, interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) y el IFN- $\beta$ ; tipo II, conformado por IFN- $\gamma$ ; y tipo III, IFN –  $\lambda$  (Tizard, 2013). Los interferones de tipo I son principalmente antivirales con una función inmunorreguladora secundaria. En el caso de los interferones de tipo II y III, como IFN- $\gamma$  e IFN- $\lambda$ , activan los programas antimicrobianos intracelulares e influyen en el desarrollo de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Ivashkiv & Donlin, 2014; Tizard, 2013).

### 3.7.2.1 Interferon- $\gamma$

IFN- $\gamma$  es de tipo II de interferones, es una glicoproteína de 17 kDa producida principalmente por células CD4 + Th1, por algunas células T CD8 + y por células NK; y actuando sobre los linfocitos T y B, células NK y macrófagos. IFN- $\gamma$  activa los macrófagos hacia el fenotipo M1, que se caracteriza por la expresión de altos niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-12, IL-23 y TNF- $\alpha$ ; alta producción de nitrógeno reactivo e intermedios de oxígeno; mayor expresión de moléculas MHC y componentes de procesamiento de antígenos en linfocitos T y B, cambio de clase de Ig en linfocitos B; y supresión de respuestas TH17 y TH2 (Green et al., 2017; Otagiri et al., 2017; Tizard, 2013).

### 3.7.3 Factores de Necrosis Tumoral (TNF)

Los TNF pertenecen a una gran familia de citocinas relacionadas, la superfamilia TNF, entre los que se incluye a TNF alfa (TNF $\alpha$ ) y TNF beta (TNF $\beta$ ). Son producidos principalmente por monocitos / macrófagos, pero también es secretado por linfocitos T y B, mastocitos, células NK, neutrófilos, fibroblastos y osteoclastos. TNF participa en la regulación de una serie de vías que abarcan una reacción inflamatoria inmediata de la respuesta inmune innata, así como la activación y proliferación celular, y la muerte celular programada o necrosis (Holbrook et al., 2019; Tizard, 2013; Wen, 2013)

#### 3.7.3.1 Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Es una proteína soluble de 17 kDa producida por macrófagos, mastocitos, linfocitos T y B, células endoteliales, adipocitos y fibroblastos. TNF- $\alpha$  es el inductor central de inflamación, provocando un espectro amplio de respuestas celulares, como la activación y migración de leucocitos, fiebre, respuesta de fase aguda, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Otagiri et al., 2017; Tizard, 2013; Zelová & Hosek, 2013).

### 3.7.4 Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de proteínas pequeñas secretadas que se clasifican según la presencia de cuatro residuos de cisteína conservados: CC, CXC, CX3C y C (Suffee et al., 2011). Las quimiocinas juegan un papel importante en el reclutamiento selectivo de monocitos, neutrófilos y linfocitos, así como en la inducción de quimiotaxis mediante la activación de receptores acoplados a proteína G (Deshmane et al., 2009).

#### 3.7.4.1 Proteína inducida por interferón y (CXCL10/IP-10)

La quimiocina 10 del motivo C–X–C (CXCL10) también conocida como proteína inducida por interferón y de 10 kDa (IP-10) es una citocina que pertenece a la familia de quimiocinas CXC. Se expresa en linfocitos y monocitos. Participa en el tráfico de monocitos y linfocitos Th1 activados hacia sitios de inflamación a través de la interacción con el receptor de quimiocinas CXCR3. CXCL10 es una molécula pleiotrópica capaz de ejercer potentes funciones biológicas, incluida la actividad quimiotáctica de las células CXCR3+, inducción de apoptosis, regulación del crecimiento y proliferación celular, así como la angiogénesis en enfermedades infecciosas e inflamatorias y cáncer (Liu et al., 2011; Ruhwald et al., 2007).

#### 3.7.4.2 Proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1)

La proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 / CCL2) es un miembro de la familia de quimiocinas C-C y un potente factor quimiotáctico para los monocitos. Es producido por diferentes tipos de células, incluidos monocitos, macrófagos, células endoteliales, células del músculo liso, fibroblastos, células epiteliales, células mesangiales, células astrocíticas y células microgliales. MCP-1 regula la migración e infiltración de monocitos, linfocitos T de memoria y células NK. Además, participa en la inmunidad adaptativa, controlando la diferenciación preferencial de los linfocitos T helper (Th) hacia un fenotipo Th1 o Th2 (Bianconi, Sahebkar, Atkin, & Pirro, 2018; Deshmane et al., 2009).

### 3.7.4.3 MIG/CXCL9

La monocina inducida por interferón gamma (IFN)- $\gamma$  (MIG) es un citocina quimioatravente de linfocitos T también llamada ligando 9 de quimiocina (CXCL9), y es inducida por IFN- $\gamma$ . Los producen CXCL9 en respuesta a IFN- $\gamma$ . Una alta concentración de CXCL9 en sangre periférica se considera como un marcador de una respuesta Th1, donde los linfocitos Th1 reclutados al sitio de inflamación aumentan el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  estimulando la secreción de CXCL9 en monocitos/macrófagos, neutrófilos, queratinocitos, células endoteliales, células epiteliales; conduciendo a un bucle de retroalimentación positivo. Este aumento de CXCL9 sérico se ha visto en glomerulonefritis, autoinmunidad, artritis reumatoide, aterosclerosis, psoriasis y dermatitis alérgica de contacto (Antonelli et al., 2011; Elia & Guglielmi, 2018).

### 3.7.4.4 RANTES/CCL5

La quimiocina regulada tras activación, expresada y secretada en linfocitos T normales (RANTES), conocida también como CCL5, es miembro de la familia de quimiocinas CC y es una proteína de 7.8kDa, que participa en la inflamación crónica al inducir la migración de Th1 linfocitos, monocitos / macrófagos y células asesinas naturales en sitios inflamatorios. Es secretada por células endoteliales, células de músculo liso, macrófagos, plaquetas y linfocitos T (Koya et al., 2006; Suffee et al., 2011). Media la quimiotaxis de monocitos/macrófagos, linfocitos T de memoria y TH2/TH1, células NK, basófilos, eosinófilos y células dendríticas inmaduras a través de la unión a los receptores de quimiocinas CCR1, CCR3 y CCR5 (Appay & Rowland-Jones, 2001). Se ha demostrado que RANTES modula la producción de citocinas tipo Th2 a citocinas de tipo Th1. También induce la regulación positiva de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-5) (Koya et al., 2006).

## 3.8 Respuesta inmune (células NK) ante rickettsiosis

Poco es lo que se conoce del inmunofenotipo de células NK durante el curso de la fase aguda por rickettsiosis. En adultos mayores infectados con *Orienta tsutsugamushi* (n=62) cursando la fase aguda de la enfermedad se encontró un

aumento significativo de células NK con alta expresión de CD69 en comparación con los controles ( $n=62$ ), este resultado se interpretó como un reflejo de la severidad de la infección (Kang et al., 2017) dado que durante los períodos de infección grave, se produce una activación irregular de las células NK que amplifica la inflamación sistémica y acelera el desarrollo de la sepsis y lesión de órganos. Durante este periodo las células NK pueden secretar grandes cantidades de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que induce una tormenta desenfrenada de citocinas proinflamatorias y una mayor secreción de citocinas inductoras de IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  por las células dendríticas y los macrófagos que establecen un circuito de retroalimentación positivo que sirve para aumentar la activación de las células NK. Además, las células NK citotóxicas aceleran el proceso de necrosis tisular, agravando la inflamación sistémica (Guo et al., 2017).

### 3.9 Respuesta inmune (citocinas) ante rickettsiosis

A lo largo de las últimas dos décadas diversos autores han determinado el perfil de citocinas (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF $\alpha$  y VEGF) durante la fase aguda de rickettsiosis en niños, jóvenes y/o adultos.

En niños infectados con *Rickettsia felis* ( $n=23$ ) hubo un aumento significativo de IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y VEGF cuya principal función es atraer a las células inmunitarias a los sitios de infección y probablemente reflejan las respuestas iniciales del huésped a *R. felis* (Rauch et al., 2018a). En adultos infectados con *R. africae* ( $n=15$ ) donde se evaluó únicamente IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  y RANTES, presentaron un aumento significativo de IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  y RANTES en comparación con los controles sanos ( $n=14$ ), esta respuesta inflamatoria se atribuye a la activación de las células endoteliales acompañada de una regulación positiva de varias citocinas y quimiocinas inflamatorias (Jensenius et al., 2003).

Otro estudio realizado en un adulto mayor infectado con *R. slovaca* se encontró un aumento aparente de IFN $\gamma$ , IP-10 y MIP-1 $\alpha$  en comparación con los controles sanos ( $n=20$ ), lo que refleja la activación de células inmunitarias y células endoteliales

infectadas por *Rickettsia*, y la atracción de linfocitos T (Tappe et al., 2018). En el estudio más reciente realizado en individuos desde 4 hasta 80 años infectados con *R. typhi* (n=17) presentaron un aumento significativo de IFN $\gamma$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IP-10, VEGF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  en comparación con el grupo control (Rauch et al., 2018b), demostrando así un patrón inflamatorio similar independientemente de la edad del individuo.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los pacientes con rickettsiosis en fase aguda presentan un aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias, una disminución significativa de NK efectoras y NK con expresión de NKG2D en comparación con controles sanos.

#### **5. JUSTIFICACIÓN**

El aumento de la incidencia de rickettsiosis en la población del país (principalmente en Chihuahua, Sonora y Baja California) y la falta de herramientas para generar su diagnóstico certero, ha propiciado un incremento en las defunciones de acuerdo a la Dirección General de Epidemiología. Por tanto es importante la determinación del inmunofenotipo de células NK y perfiles de citocinas asociados a esta enfermedad, sobre todo durante la fase aguda dado que es la etapa clave en la recuperación del paciente. Además, proporcionará información a los médicos sobre el estado inmunológico del paciente que les permita tomar decisiones acertadas sobre el cuidado paliativo y tratamiento del paciente.

#### **6. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el perfil de citocinas e inmunofenotipo de células NK obtenidas de pacientes con diagnóstico de rickettsiosis en fase aguda.

## 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analizar el inmunofenotipo de NK (células natural killer) de pacientes con rickettsiosis y donadores sanos.
- b) Determinar el perfil de citocinas en suero de pacientes humanos con rickettsiosis y donadores sanos.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Sujetos de estudio y criterios de inclusión

La cohorte del estudio comprendió 4 pacientes con rickettsiosis (2 niñas y 2 niños; media edad  $\pm$  DE, 5-10 años) y 8 controles sanos emparejados por edad y sexo (4 niños y 4 niñas; edad media  $\pm$  DE, 5-10 años). Los diagnósticos de los pacientes requirieron la detección del gen *OmpA<sub>1</sub>* de *rickettsia spp.* mediante PCR, y no tener antecedentes de trastornos de tipo autoinmune, cardiovascular, cerebral y/o osteoarticular; procesos infecciosos agudos secundarios, e ingesta de medicamentos previo a la primer toma de muestra. Todos los controles sanos se reclutaron en el estado de Chihuahua, México, que era la misma área donde se habían infectado los pacientes. Los controles no tenían antecedentes de mordedura de garrapata previo a la toma de muestra; trastornos de tipo autoinmune, cardiovascular, cerebral y/o osteoarticular; procesos infecciosos agudos, e ingesta de medicamentos previo a la toma de muestra.

### 8.2 Declaración de ética

El protocolo del estudio cumplió con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, la Declaración de Helsinki y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética. También fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua con el número de registro CI-056-19.

### 8.3 Toma de la muestra

A cada individuo se le extrajo muestra sanguínea por punción venosa y se recolectaron en tubos con anticoagulante EDTA. Para análisis en citometría de flujo, después del momento de la extracción las muestras se mantuvieron a una temperatura de 2°C y fueron llevadas inmediatamente al laboratorio para su análisis.

### 8.4 Extracción del ADN en sangre

Una vez que las muestras fueron descongeladas y homogenizadas por inversión, fueron tomados 250 µL de sangre total, la cual fue depositada en un microtubo de 1.7 mL, posteriormente se añadió 500 µL de solución buffer lisis (Tris HCl 0.2 M, EDTA 10 mM, NaCl 0.5 M y SDS 1mg/mL). Después de mezclar por inversión, le fueron resuspendidos 2.5 µL de proteinasa K (25 mg/mL), la muestra fue mezclada por vortex durante 2 s, para posteriormente incubar a 56 °C por 15 min, este paso se repitió nuevamente. Una vez realizada la segunda incubación la muestra se enfrió a temperatura ambiente por 30 s, y mezclada en vortex durante 2 s, para posteriormente volverse a incubar en el termoblock a 100 °C por 10 min. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar por 3 min a temperatura ambiente. Despues se procedió a realizar el primero de los tres lavados, donde le fueron adicionados a la muestra 400 µL de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:24:1), se continuó con la homogenización utilizando el vortex por 2 s. Una vez homogenizada la muestra fue centrifugada a 12 000 rpm durante 3 min. Despues de realizar el segundo lavado, fue recuperada la fase acuosa en un nuevo microtubo, repitiéndose este procedimiento nuevamente. Al finalizar el tercer lavado, fue recuperada y contabilizada la fase acuosa en un nuevo microtubo, donde se le añadió  $\frac{1}{10}$  de los µL obtenidos, de acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2$  a 3M, pH 5.4) y 2 volúmenes de etanol 100 % frío. Luego, se mezcló por inversión y fue almacenada a -20 °C durante 24 horas. Despues de transcurrido ese tiempo se realizó una centrifugación a 12 000 rpm durante 15 min, para luego decantarse el sobrenadante cuidadosamente, para no desechar el pellet y añadírselle 500 µL de etanol frío al 75 %. Despues se realizó otra centrifugación a 7 500 rpm durante 5 min,

repetiéndose este paso nuevamente. Al culminar el último lavado, se procedió a la decantación cuidadosa del sobrenadante, dejándose secar el pellet durante 15 min con el microtubo boca abajo, sobre un papel adsorbente. La resuspensión para la dilución del pellet fue realizada en 30 o 40  $\mu\text{L}$  de agua estéril. Las muestras de ADN fueron almacenadas posteriormente a -20 °C hasta su cuantificación y utilización para realizar el diagnóstico molecular por la técnica de PCR punto final.

### 8.5 Cuantificación de ADN

La cuantificación y la pureza del ADN extraído de sangre se calcularon mediante la espectrofotometría con ayuda del NanoDrop 2000. Este procedimiento fue realizado calibrando a cero el NanoDrop 2000 con 2  $\mu\text{L}$  de agua estéril (diluyente del ADN), depositándose posteriormente 2  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras para estimar la pureza del ADN según la relación de absorbancia  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  considerándose un ADN de pureza estable, a una relación < A2.00 y >A1.50 por cada 2  $\mu\text{L}$ . La concentración de ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) se calculó usando el nivel de absorbancia a 260 nm (A260) para alcanzar una templado de 200 ng/25  $\mu\text{L}$ . Entre cada cuantificación fueron realizados de tres a cinco lavados con agua estéril.

### 8.6 Amplificación de los genes OmpA1 y gltA para el diagnóstico de FMMR

Para la amplificación de PCR fue utilizado un templado de 200 ng de ADN, adicionándosele 1  $\mu\text{L}$  de cebador Rr190.70p o sentido (20 mM) y 1  $\mu\text{L}$  de cebador Rr190.602n o antisentido (20 mM), 12.50  $\mu\text{L}$  de Master mix (dNTPs 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y Taq Polimerasa 50 U/ $\mu\text{L}$ ) (Promega, Madison, WI) y la cantidad necesaria de agua destilada para obtener una reacción con un volumen total de 25  $\mu\text{L}$ . El control negativo contó solamente con los cebadores, el Master mix y agua; y el control positivo estuvo compuesto de los cebadores, el Master mix, el agua estéril y 5  $\mu\text{L}$  de muestra positiva a *R. rickettsii* confirmada por secuenciación y donada por el Laboratorio de Salud Pública de la Universidad Autónoma de Baja California.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos para el diagnóstico molecular de FMMR.

Fragmento (Tamaño del amplicón)	Oligonucleótidos 5'-3'	Condiciones PCR (T°/Tiempo/Nº ciclo)	Referencia
<i>OmpA<sub>1</sub></i> (532 pb)		95 °C 5 min. 1 Ciclo	
	Rr190.70p: ATGGCGAACATTTCTCCAAAA	95 °C 40 seg.	(Regnery et al., 1991)
	Rr190.602n: AGTGCAGCATTGCTCCCCCT	58 °C 30 seg. 35 Ciclos	
		72 °C 1 min.	
		72 °C 8 min. 1 Ciclo	
<i>gltA</i> (401 pb)		95 °C 5 min. 1 Ciclo	
	Rr190.70p: ATGGCGAACATTTCTCCAAAA	95 °C 40 seg.	(Regnery et al., 1991)
	Rr190.602n: AGTGCAGCATTGCTCCCCCT	58 °C 30 seg. 35 Ciclos	
		72 °C 1 min.	
		72 °C 8 min. 1 Ciclo	

## 8.7 Análisis electroforético

Los productos de amplificación fueron corridos a 100 V durante 45 min mediante una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2.2 %. Los geles fueron preparados con 20 o 40 mL de buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetate y 1 mM EDTA, pH 8.3), 0.44 o 0.88 gr de agarosa y 10 o 20  $\mu$ L de Bromuro de Etilio al 0.1 % para geles de 8 y 16 pozos respectivamente. En cada pozo del gel se cargó un volumen de 10  $\mu$ L de producto de PCR y fue utilizado un marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder Promega. Los geles electroforéticos fueron visualizados en el transiluminador, y fotodocumentados utilizando el sistema EDAS 290 Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

### 8.8 Análisis del perfil de citocinas proinflamatorias

Las muestras de sangre total se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos para separar el suero del componente celular, y se preparó el tubo de master mix del kit Human Inflammatory cytokine de BD science 551811 conformado por IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNFa. Posteriormente se añadieron en tubos eppendorf de 1.5mL: 50  $\mu$ L de suero, 50  $\mu$ L de master mix y 25  $\mu$ L de ficoeritrina (PE). Se incubaron durante 1.5 horas en oscuridad a temperatura ambiente, después se agregaron 1 mL de tampón de lavado a cada tubo para luego centrifugarlos a 200 g durante 5 minutos. Se añadieron 300  $\mu$ L de tampón de lavado en cada tubo para resuspender el granulo. Finalmente las muestras resuspendidas fueron adquiridas en el citómetro BD Accuri™ C6 Plus Flow y analizadas en Flow Jo software (versión 10; BD Science, San Diego, CA).

### 8.9 Análisis del perfil de quimiocinas

Las muestras de sangre total se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos para separar el suero del componente celular, y se preparó el tubo de master mix del kit Human Chemokine de BD science 552990 conformado por IP-10, MCP-1, MIG, RANTES e IL-8. Posteriormente se añadieron en tubos eppendorf de 1.5ml: 50  $\mu$ L de suero, 50  $\mu$ L de master mix y 25  $\mu$ L de ficoeritrina (PE). Se incubaron durante 3 horas en oscuridad a temperatura ambiente, después se agregaron 1 mL de tampón de lavado a cada tubo para luego centrifugarlos a 200 g durante 5 minutos. Se añadieron 300  $\mu$ L de tampón de lavado en cada tubo para resuspender el granulo. Finalmente las muestras resuspendidas fueron adquiridas en el citómetro BD Accuri™ C6 Plus Flow y analizadas en Flow Jo software (versión 10; BD Science, San Diego, CA).

### 8.10 Análisis del perfil de citocinas Th1 / Th2 / Th17

Las muestras de sangre total se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos para separar el suero del componente celular, y se preparó el tubo de master mix del kit

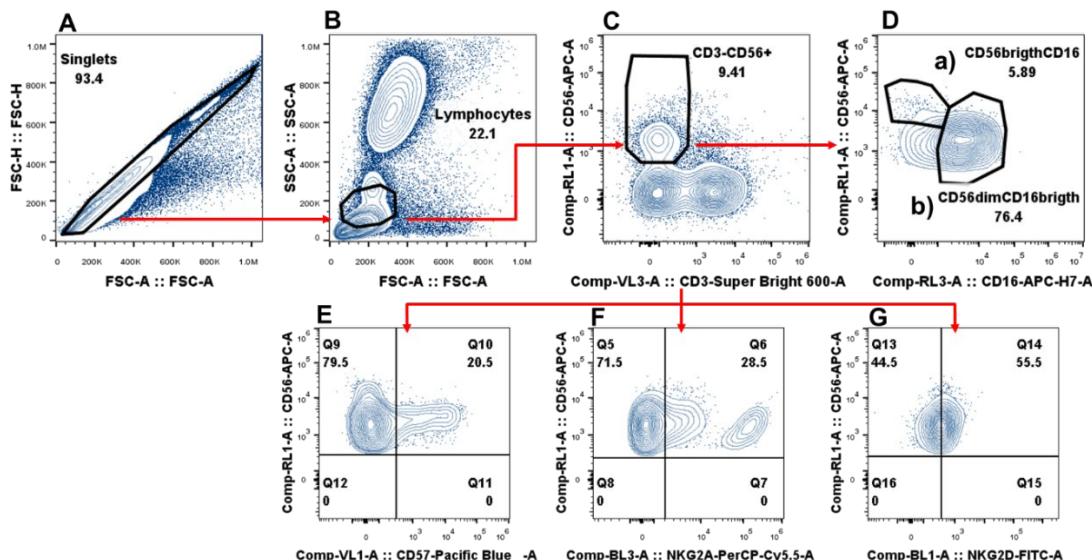
Human Th1/Th2/Th17 de BD science 560484 conformado por IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Posteriormente se añadieron en tubos eppendorf de 1.5mL: 50  $\mu$ L de suero, 50  $\mu$ L de master mix y 25  $\mu$ L de ficoeritrina (PE). Se incubaron durante 3 horas en oscuridad a temperatura ambiente, después se agregaron 1 mL de tampón de lavado a cada tubo para luego centrifugarlos a 200 g durante 5 minutos. Se añadieron 300  $\mu$ L de tampón de lavado en cada tubo para resuspender el granulo. Finalmente las muestras resuspendidas fueron adquiridas en el citómetro BD Accuri™ C6 Plus Flow y analizadas en Flow Jo software (versión 10; BD Science, San Diego, CA).

### 8.11 Determinación del inmunofenotipo de células NK

Se extrajeron 100  $\mu$ L sangre total de cada muestra y se tiñeron con los siguientes anticuerpos monoclonales y reactivos: 1.5  $\mu$ L de anti-CD3 conjugado con Super Bright 600 (Clona: OKT3, Nº 63-0037-42), 1  $\mu$ L de anti-CD16 conjugado con aloficocianina-H7 (Clona: 3G8, Nº 560195), 1.5  $\mu$ L de anti-CD56 conjugado con aloficocianina (Clona: CMSSB, Nº 17-0567-42), 5.0  $\mu$ L de anti-CD57 conjugado con Pacific Blue (Clona: TB01, Nº 12-0577-42), 2.5  $\mu$ L de anti-NKG2D conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (Clona: 1D11, Nº 11-5878-42), y 7.5  $\mu$ L de anti-NKG2A conjugado con Brilliant™ Blue 700 (Clona: 131411, Nº 747926) (todos los anticuerpos Thermo Fisher, Waltham, MA) (Tabla 1). Las muestras se incubaron en oscuridad por 15 min, después se les añadió 2 mL de buffer de lisis (BD Solución BD FACS™ de lisado concentrada 10X, San Diego, CA), y se incubaron en oscuridad por 10 min. Posteriormente, se agregaron 2 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugaron a 1'800 rpm por 5 min para retirar sobrenadante, se les añadió nuevamente 2 mL de PBS y se volvieron a centrifugar a 1'800 rpm por 5 min. Luego de retirarles el sobrenadante, se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS. Finalmente las muestras resuspendidas fueron adquiridas en el citómetro Attune NxT y analizadas en Flow Jo software con el cual se determinó la estrategia de gates a utilizar para identificar las poblaciones celulares (Fig. 1) (Versión 10; BD science, San Diego, CA).

**Tabla 2.** Anticuerpos monoclonales y reactivos empleados para la tinción de las muestras sanguíneas.

Blanco	Fluorocromo	Clona	Nº catálogo	Marca
CD3	Super Bright 600 (SB 600)	OKT3	63-0037-42	Thermo Fisher
CD16	Aloficianina-H7 (APC-H7)	3G8	560195	Thermo Fisher
CD56	Aloficianina (APC)	CMSSB	17-0567-42	Thermo Fisher
CD57	Pacific Blue (PB)	TB01 (TB01)	12-0577-42	Thermo Fisher
NKG2D	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	1D11	11-5878-42	Thermo Fisher
NKG2A	Brilliant™ Blue 700 (BB700)	131411 (RUO)	747926	Thermo Fisher



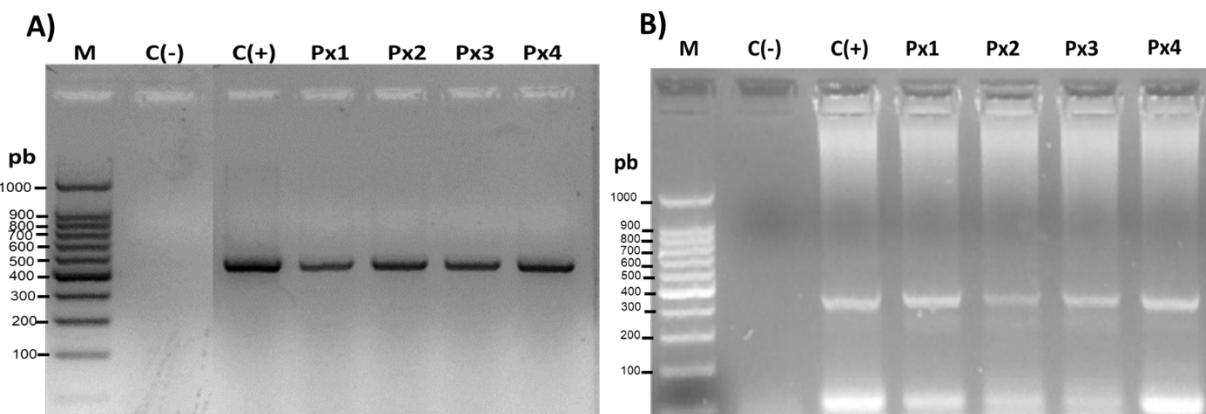
**Figura 1.** Representación de estrategia de paneles para identificar subpoblaciones de células NK (%). Panel A: Células. Panel B: Linfocitos. Panel C: Células NK. Panel D: a) células NK efectoras y b) células NK citotóxicas. Panel E: Células NK con expresión de CD57. Panel F: Células NK con expresión de NKG2A. Panel G: Células NK con expresión de NKG2D.

## 8.12 Análisis estadístico

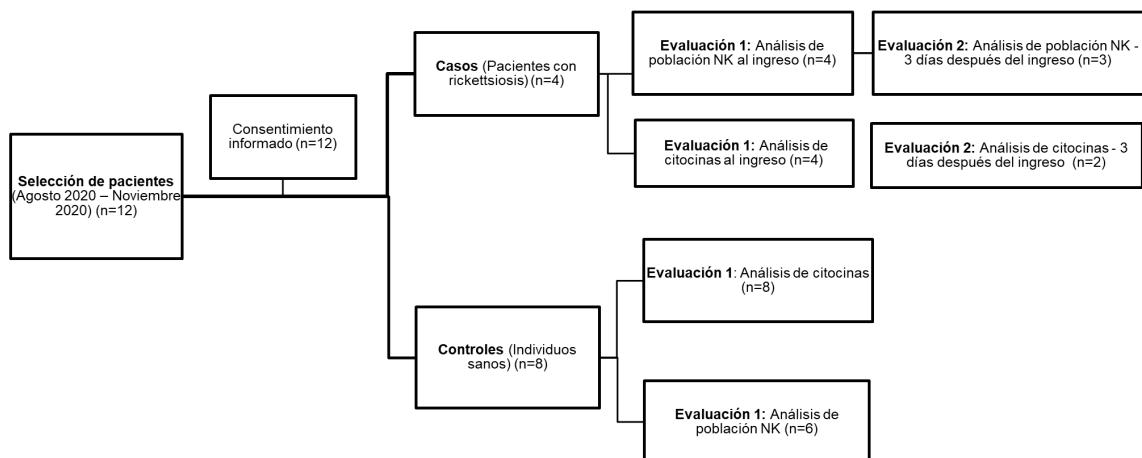
Los datos de porcentajes de células NK totales, NK efectoras y NK citotóxicas, y sus niveles de expresión de CD57, NKG2D y NKG2A entre el grupo con rickettsiosis y el grupo control no presentaron una distribución normal, por tanto se sometieron con prueba de Kruskall-Wallis y prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Se empleó el software GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) para el análisis estadístico y trabajos gráficos.

## 9. RESULTADOS

Se implementó un estudio de casos y controles donde se realizó una selección de pacientes con diagnóstico de rickettsiosis (Fig. 2) y controles provenientes del Estado de Chihuahua. Al grupo de pacientes se les realizó un análisis de NK y citocinas al ingreso al hospital, y al 3er día posterior a su ingreso (Fig. 3).

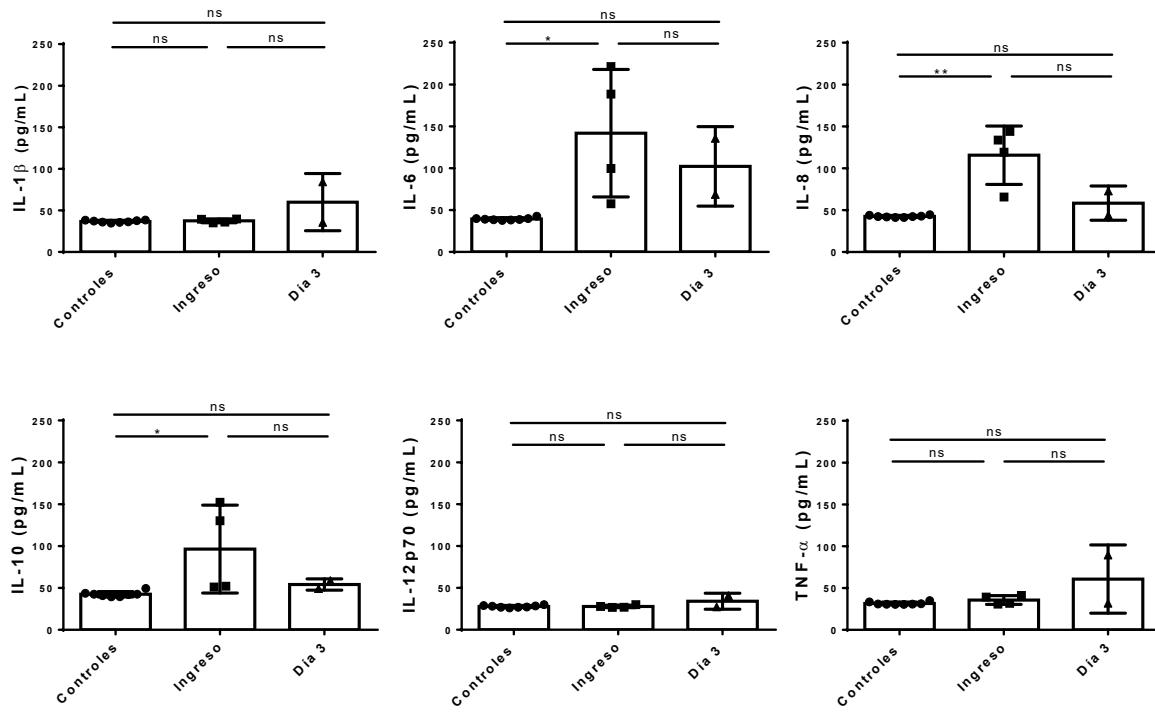


**Figura 2.** Gel de agarosa al 2.2 % corridos a 100 V durante 45 min. A) Carril 1, Marcador de peso molecular (M); carril 2, Control negativo C(-); Carril 3, Control positivo (532 pb OmpA1); Carriles Px1 a Px4, se observan amplicones de 401 pb correspondientes al gen OmpA1. B) Carril 1, Marcador de peso molecular (M); carril 2, Control negativo C(-); Carril 3, Control positivo (gltA 401 pb); Carriles Px1 a Px4, se observan amplicones de 401 pb correspondientes al gen gltA.



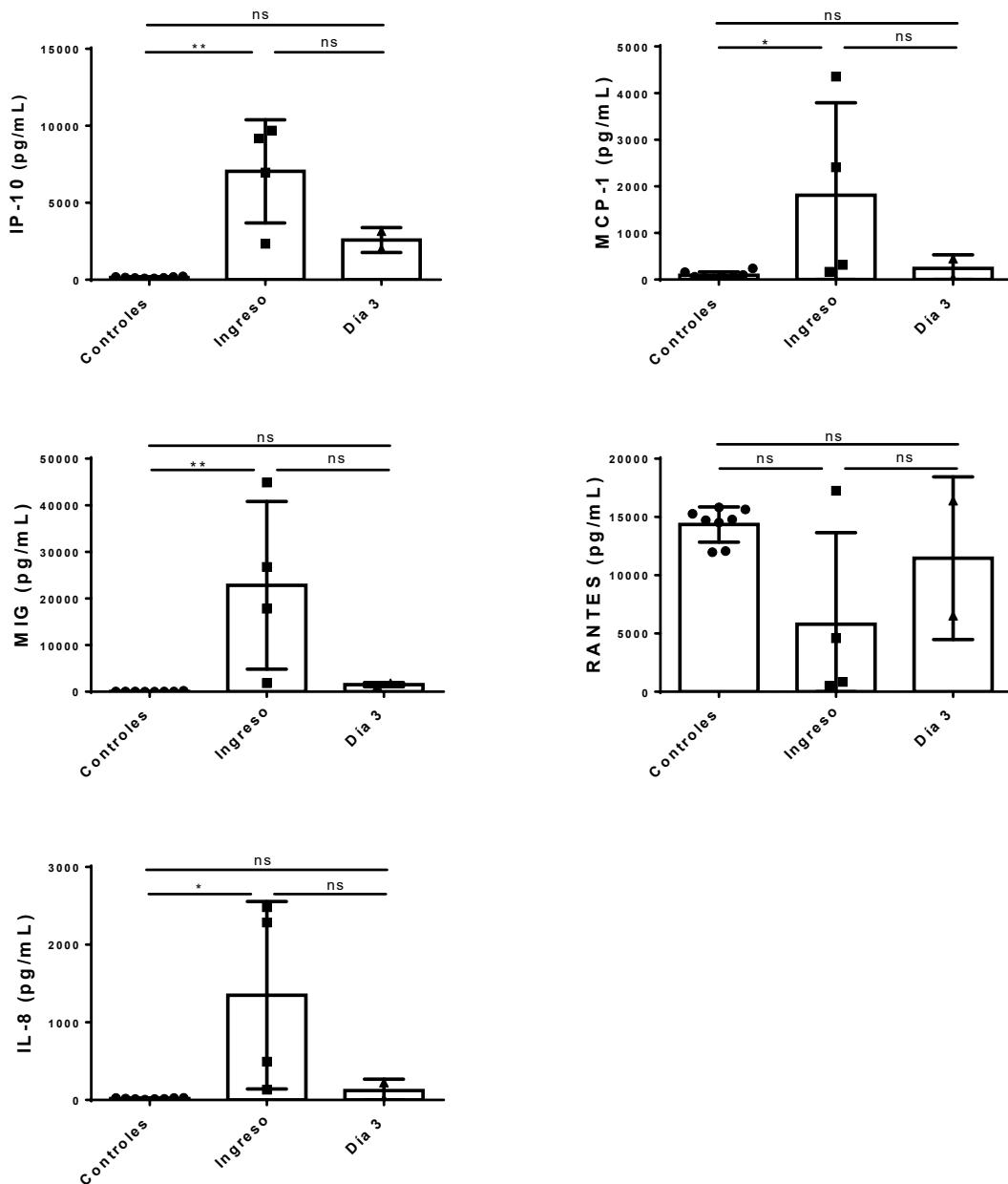
**Figura 3.** Diagrama de selección de sujetos con rickettsiosis y controles. Este diagrama de flujo detalla el proceso de selección de pacientes y controles con las evaluaciones que se realizaron en ambos grupos.

En los niveles de citocinas proinflamatorias en sueros de niños con rickettsiosis cursando la fase aguda de la enfermedad y en controles sanos, se encontró un aumento significativo de IL-6, IL-8 e IL-10 en los pacientes a su ingreso al hospital en comparación con los controles. Mientras que no se encontraron variaciones en las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-12p70 y TNF $\alpha$  entre los pacientes y los controles (Fig. 4). Al determinar los niveles séricos de quimiocinas (IP-10, MCP-1, MIG, RANTES e IL-8), se encontró un aumento significativo de IP-10, MCP-1, MIG e IL-8 en los pacientes a su ingreso al hospital en comparación con los controles. No se encontró variación en la concentración de RANTES entre los pacientes y los controles (Fig. 5).

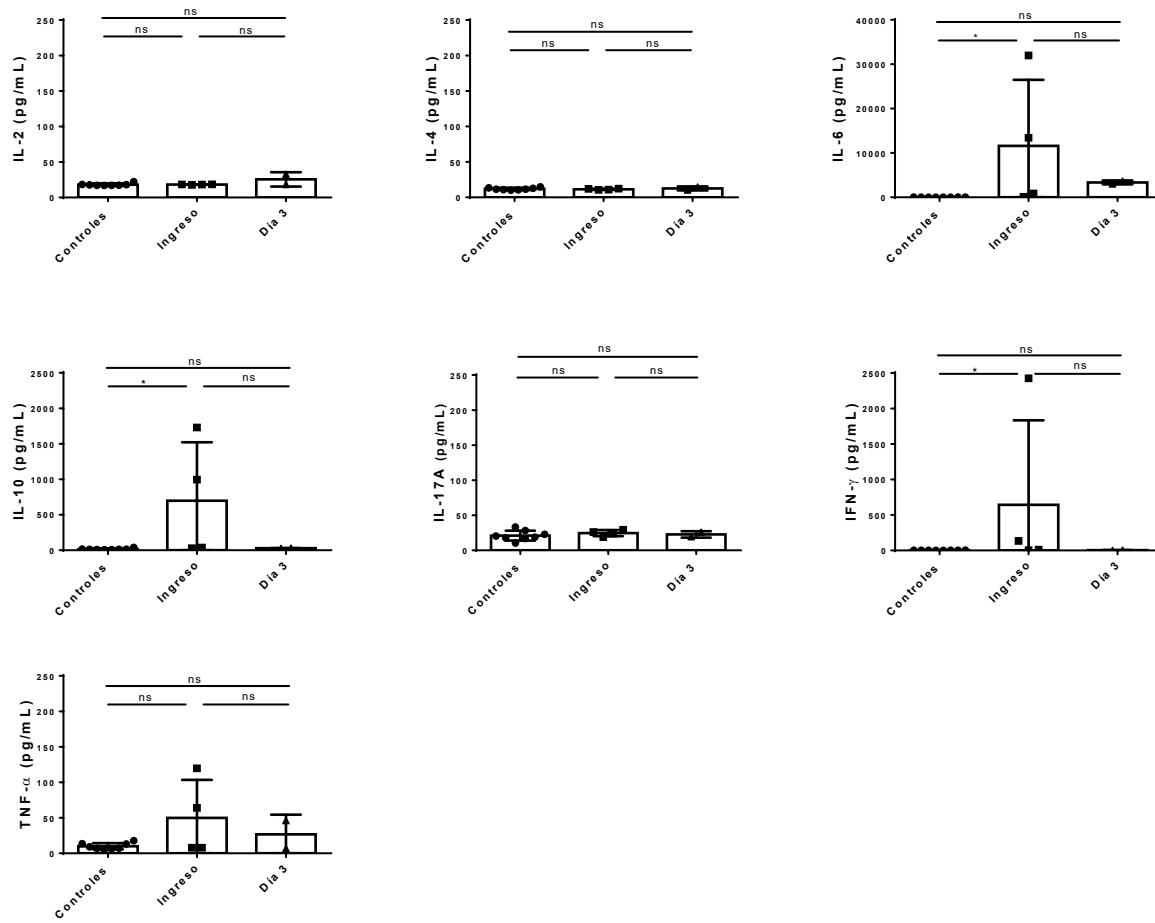


**Figura 4.** Niveles de citocinas proinflamatorias en sueros de niños con rickettsiosis durante la fase aguda. Cuatro sueros de niños infectados con *Rickettsia rickettsii* y ocho sueros de niños sanos se analizaron en paralelo mediante el ensayo del kit de citocinas inflamatorias humanas basado en perlas. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y la posterior prueba de comparación múltiple de Dunn. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

Estas citocinas a su vez están involucradas en las respuestas de linfocitos colaboradores Th1, Th2 y Th17. Dentro de la respuesta Th1 se encontró un aumento significativo de IFN- $\gamma$  en los pacientes a su ingreso al hospital en comparación con los controles. No se encontró variación de TNF $\alpha$  e IL-2. En la respuesta Th2, se encontró un aumento significativo de IL-6 e IL-10 en los pacientes a su ingreso al hospital en comparación con los controles, pero no con IL-4, donde no se presentó variación significativa. En la respuesta Th17, no hubo variación significativa de IL-17A entre los pacientes y controles (Fig. 6).

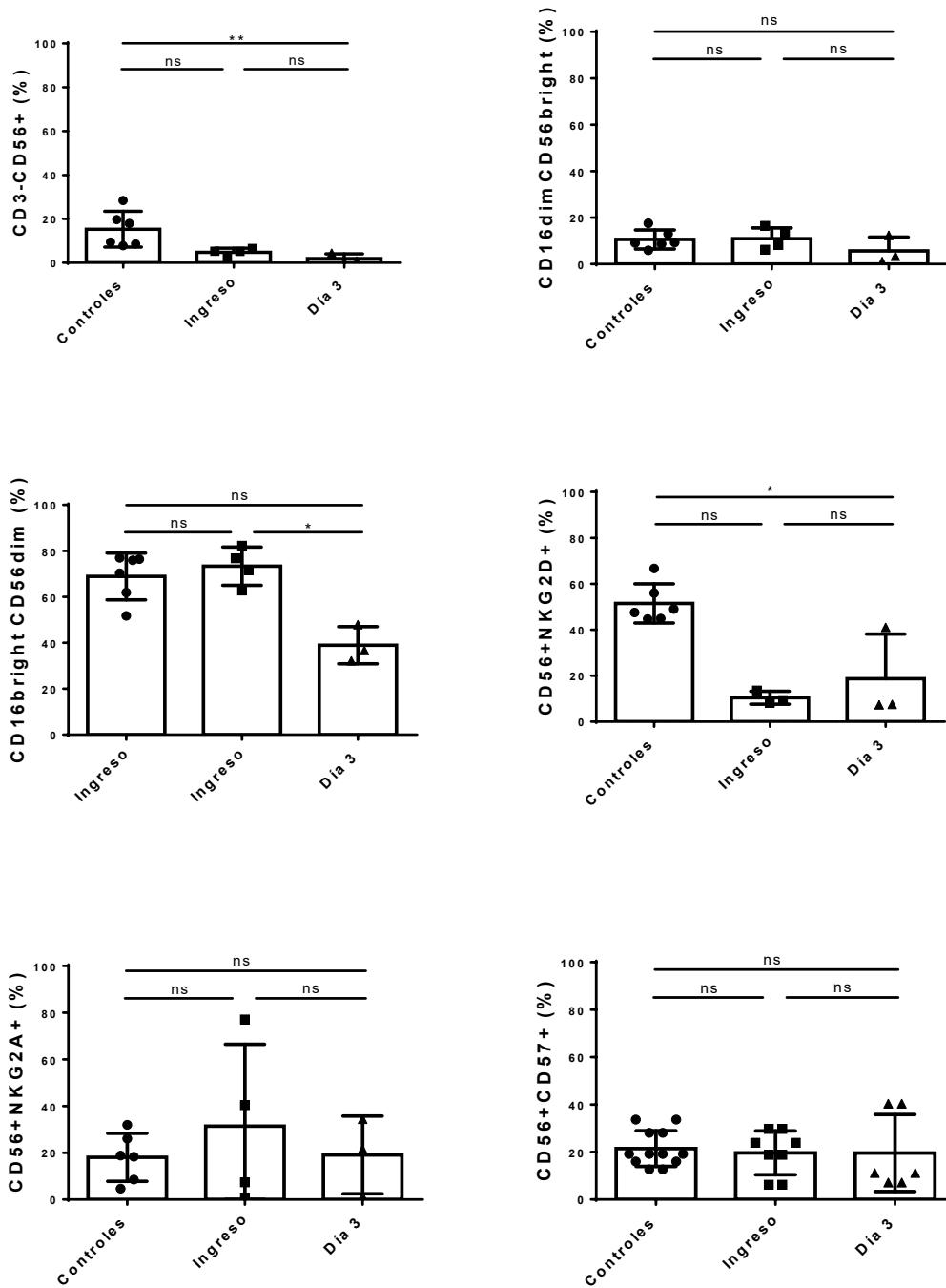


**Figura 5.** Niveles de quimiocinas en sueros de niños con rickettsiosis durante la fase aguda.



**Figura 6.** Niveles de citocinas involucradas en las respuestas Th1/Th2/Th17 en sueros de niños con rickettsiosis durante la fase aguda.

Al evaluar los niveles de NK totales, NK citotóxicas, NK efectoras, y NK con expresión de CD57 NKG2D, NKG2A. Se encontró una disminución significativa de NK totales y NK con expresión de NKG2D en los pacientes al ingreso en comparación a los controles. Así mismo, se presentó una disminución significativa de NK efectoras en los pacientes al ingreso en comparación al 3er día (Fig. 7).



**Figura 7.** Porcentaje de células NK (CD3-CD56 +), células NK efectoras (CD16dim CD56bright), células NK citotóxicas (CD16bright CD56dim), células NK que expresan CD57 (CD56 + CD57 +), células NK que expresan NKG2D (CD56 + NKG2D +) y células NK que expresan NKG2A (CD56 + NKG2A +) en sueros de niños con rickettsiosis durante la fase aguda y controles sanos. Se realizaron dos análisis en paralelo en cuatro sueros de niños con rickettsiosis. El primer análisis al ingreso al hospital y un segundo análisis 3 días después del tratamiento, y el segundo suero de niños sanos donantes de sangre. Los datos se expresan como media ± DE. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de Kruskal-Wallis y la posterior prueba de comparación múltiple de Dunn. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

## 10. DISCUSIÓN

Los estudios de FMRR *in vivo* en humanos evaluando niveles circulantes de mediadores inflamatorios y NK son escasos probablemente debido a la poca disponibilidad de muestras de pacientes. En el presente estudio, se observó que en pacientes pediátricos con FMMR se caracterizó por un aumento sistémico de varias citocinas proinflamatorias como de IL-6 e IL-8. Este incremento también se ha reportado en otros estudios de pacientes con FMMR (Jensenius et al., 2003; Rauch et al., 2018a; Rauch et al., 2018b), reflejando la activación de monocitos/macrófagos y células endoteliales infectadas por rickettsia, y atracción de linfocitos T y NK (Sahni & Rydkina, 2009; Tappe et al., 2018). A su vez, los niveles de IL-8, IP-10, MCP-1 y MIG presentaron un aumento significativamente elevado en los pacientes a su ingreso en comparación con los controles. Estos niveles de quimiocinas son consistentes con lo reportado en pacientes pediátricos infectados con *R. felis* durante la fase aguda. Donde IL-8, IP-10 y MCP-1 atraen a las células inmunitarias a los sitios de infección y probablemente reflejen las respuestas iniciales del huésped a *R. rickettsii* (Rauch et al., 2018b). Se observó que los niveles plasmáticos de IL-10, un potente inhibidor de TNF- $\alpha$  e IL-6, aumentaron significativamente en los pacientes a su ingreso al hospital. Este resultado es consistente con estudios previos en pacientes con otras rickettsiosis (*Rickettsia africae* y *Rickettsia conorii*) donde se observó un aumento significativo de IL-10 alrededor del día 12 después del inicio de los síntomas posiblemente asociado a la prevención de una respuesta inflamatoria desproporcionada (Jensenius et al., 2003; Vitale et al., 2001).

Por otro lado, el decremento de NK circulantes (CD3 $^+$ CD56 $^+$ ) observado en los pacientes pediátricos de este estudio, también se ha visto en pacientes con choque séptico (de Pablo et al., 2012; Venet et al., 2010); y sepsis por bacterias Gram negativas como *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, y bacterias Gram positivas del género *Enterobacteria* y *Neisseria meningitidis*. Siendo la sepsis por bacterias grampositivas la que produjo una mayor disminución de células NK

circulantes a comparación de la sepsis por bacterias gramnegativas. Esto podría indicar una activación persistente de las células NK durante una infección grave por bacterias grampositivas, cuya eliminación normalmente requiere respuestas del hospedero muy organizadas, mientras que muchos patógenos gramnegativos, como es el caso de este estudio, pueden ser destruidos eficazmente por el complemento y los anticuerpos (Holub et al., 2003). Además, la reducción observada en el número de células NK podría reflejar la activación y desplazamiento de estas células a otros tejidos (Guo et al., 2017). Adicionalmente, estudios previos en infecciones virales agudas humanas como la influenza e infección por hepatitis B también encontraron un decremento de células NK circulantes, también relacionado con la activación y desplazamiento de estas células a otros tejidos (Jost et al., 2011; Zheng et al., 2015). Sin embargo, otros autores han informado de un aumento de las células NK en sepsis severa por bacterias gramnegativas e infección aguda por fiebre de los matorrales, causada por *Orienta tsutsugamushi*, que podría estar relacionado con el aumento de la hematopoyesis, reclutamiento y autoproliferación de células NK en respuesta a citocinas y la estimulación microbiana (Giamarellos et al., 2006; Guo et al., 2017; Kang et al., 2017).

Al analizar el inmunofenotipo, se observó una disminución de las células NK efectoras ( $CD56^{\text{bright}} CD16^{\text{dim}}$ ) en los pacientes al 3<sup>er</sup> día posterior a su ingreso. No así con las células NK citotóxicas ( $CD56^{\text{dim}} CD16^{\text{bright}}$ ), al mostrar variación entre pacientes y controles. A su vez, se presentó una disminución significativa en la expresión de NKG2D de las células NK en los pacientes a su ingreso en comparación al 3<sup>er</sup> día de su hospitalización. Este resultado podría estar relacionado con el comportamiento observado durante la infección por *Orienta tsutsugamushi* donde, aunque no se observaron diferencias significativas en la proporción de subconjuntos de células NK  $CD56^{\text{bright}} / CD56^{\text{dim}}$  entre pacientes y controles, exhibieron un fenotipo activado con niveles más altos de expresión de CD69 (Kang et al., 2017). Con base a esa información posiblemente los pacientes de este estudio también estén presentando un nivel alto de expresión de CD69 debido a la disminución en la expresión de NKG2D, receptor activador de NK, que participa en la inducción de la secreción de IFN-γ y la regulación positiva de CD69 (Stojanovic, Correia, & Cerwenka, 2018). Este evento a

su vez podría ser una de las causas principales del aumento significativo en los niveles plásmaticos de IFN- $\gamma$ , también descrito en pacientes con tifus murina (*R. typhi*) y en un paciente con infección por *R. slovaca*. La respuesta temprana al IFN- $\gamma$  activa mecanismos bactericidas intracelulares para controlar aún más la propagación de la infección (Rauch et al., 2018a; Tappe et al., 2018).

## 11. CONCLUSIÓN

En conclusión, el aumento de citocinas proinflamatorias junto con la disminución de NK circulantes con expresión de NKG2D durante la infección por *R. rickettsii* sugieren un cuadro de sepsis severa o choque séptico. Estos datos podrían proporcionar información sobre el estado de salud del paciente pediátrico y dado que los niños representan un grupo vulnerable en particular, es aún más importante poder hacer un diagnóstico temprano para tratarlos adecuadamente. Sin embargo, se requieren estudios adicionales de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, linfocitos T y B, para elucidar las respuestas inmunitarias durante la infección por *R. rickettsii*.

## 12. REFERENCIAS

- Abbas, A., Trotta, E., Simeonov, D., Marson, A., & Bluestone, J. (2018). Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Science Immunology*, 3(25), 1–8. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat1482>
- Abbate, A., Toldo, S., Marchetti, C., Kron, J., Van Tassell, B., & Dinarello, C. (2020). Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 126, 1260–1280. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.315937>
- Abel, A., Yang, C., Thakar, M., & Malarkannan, S. (2018). Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology*, 9(1869), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
- Álvarez, G., Roldán, J. F. G., Milan, N. S. H., Lash, R. R., Behravesh, C. B., & Paddock, C. D. (2017, junio 1). Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 17, pp. e189–e196. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Anderson, J., & Magnarelli, L. (2008, junio). Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, Vol. 22, pp. 195–215. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>
- Antonelli, A., Ferrari, S. M., Frascerra, S., Galetta, F., Franzoni, F., Corrado, A., ... Fallahi, P. (2011). Circulating chemokine (CXC motif) ligand (CXCL)9 is increased in aggressive chronic autoimmune thyroiditis, in association with CXCL10. *Cytokine*, 55(2), 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.04.022>
- Appay, V., & Rowland-Jones, S. L. (2001). RANTES: A versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology*, 22(2), 83–87. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(00\)01812-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(00)01812-3)
- Azad, A., & Beardt, C. (1998). Rickettsial Pathogens and their Arthropod Vectors. *Emerging Infectious Diseases*, 4(2), 179–186.
- Bianconi, V., Sahebkar, A., Atkin, S., & Pirro, M. (2018). The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Current Opinion in Hematology*, 25(1), 44–51. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000389>
- Billings, A., Feng, H., Olano, J., & Walker, D. (2001). Rickettsial infection in murine models activates an early anti-rickettsial effect mediated by NK cells and associated with production of gamma interferon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(1), 52–56. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.52>
- Biswal, M., Krishnamoorthi, S., Bisht, K., Sehgal, A., Kaur, J., Sharma, N., ... Sethi, S. (2020). Rickettsial diseases: Not uncommon causes of acute febrile illness in India. *Tropical*

- Medicine and Infectious Disease*, 5(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020059>
- Blanc, G., Ngwamidiba, M., Ogata, H., Fournier, P. E., Claverie, J. M., & Raoult, D. (2005). Molecular evolution of Rickettsia surface antigens: Evidence of positive selection. *Molecular Biology and Evolution*, 22(10), 2073–2083. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi199>
- Braud, V., Allan, D., O'Callaghan, C., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G., ... McMichael, A. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 391(6669), 795–799. <https://doi.org/10.1038/35869>
- Carotta, S., Pang, S., Nutt, S., & Belz, G. (2011). Identification of the earliest NK-cell precursor in the mouse BM. *Blood*, 117(20), 5449–5452. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-318956>
- Chan, Y., Riley, S. P., & Martinez, J. (2010). Adherence to and invasion of host cells by spotted fever group Rickettsia species. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 1, pp. 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00139>
- Chapman, A. (2006). Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses, and Anaplasmosis --- United States. En *Morbidity and Mortality Weekly report* (Vol. 55). <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6502a1>
- Cooper, M., Fehniger, T., Turner, S., Chen, K., Ghaheri, B., Carson, W., & Caligiuri, M. (2000). Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56BRIGHT SUBSET. *Blood*, 96(10), 3146–3151.
- Cua, D., & Tato, C. (2010). Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 479–489. <https://doi.org/10.1038/nri2800>
- Cupp, E. (1991). Biology of Ticks. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21(1), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50001-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50001-2)
- Dantas, F. (2007, noviembre). Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infectious Diseases*, Vol. 7, pp. 724–732. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70261-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70261-X)
- de Pablo, R., Monserrat, J., Torrijos, C., Martín, M., Prieto, A., & Alvarez, M. (2012). The predictive role of early activation of natural killer cells in septic shock. *Critical Care*, 16(2), 2–4. <https://doi.org/10.1186/cc11204>
- Deshmane, S., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(6), 313–325. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Dumler, S., & Walker, D. (2005, agosto 11). Rocky Mountain spotted fever - Changing ecology and persisting virulence. *New England Journal of Medicine*, Vol. 353, pp. 551–553.

<https://doi.org/10.1056/NEJMp058138>

- Elia, G., & Guglielmi, G. (2018). CXCL9 chemokine in ulcerative colitis. *Clinica Terapeutica*, 169(5), E235–E241. <https://doi.org/10.7417/CT.2018.2085>
- Fang, R., Ismail, N., & Walker, D. (2012). Contribution of NK cells to the innate phase of host protection against an intracellular bacterium targeting systemic endothelium. *American Journal of Pathology*, 181(1), 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.020>
- Furue, M., Furue, K., Tsuji, G., & Nakahara, T. (2020). Interleukin-17A and keratinocytes in psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21041275>
- Giamarellos, E., Tsaganos, T., Spyridaki, E., Mouktaroudi, M., Plachouras, D., Vaki, I., ... Giamarellou, H. (2006). Early changes of CD4-positive lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis. *Critical Care*, 10(6), 1–7. <https://doi.org/10.1186/cc5111>
- Gilfillan, S., Ho, E., Cella, M., Yokohama, W., & Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nature Immunology*, 3(12), 1150–1155. <https://doi.org/10.1038/ni857>
- Green, D., Young, H., & Valencia, J. (2017). Current prospects of type II interferon γ signaling & autoimmunity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(34), 13925–13933. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.774745>
- Groom, J. R., & Luster, A. D. (2011). CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Inmunology and Cell Biology*, 89(2). <https://doi.org/10.1038/icb.2010.158.CXCR3>
- Gubler, D. (2009). Vector-borne diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 28(2), 583–588.
- Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T., Estrada, A., Horak, I., ... Barker, S. (2010). Article The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acarina: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528, 1–28. Recuperado de [www.mapress.com/zootaxa/](http://www.mapress.com/zootaxa/)
- Guo, Y., Patil, N., Luan, L., Bohannon, J., & Sherwood, E. (2017). The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology*, 153(2), 190–202. <https://doi.org/10.1111/imm.12854>
- Hackstadt, T., Messer, R., Cieplak, W., & Peacock, M. (1992). Evidence for Proteolytic Cleavage of the 120-Kilodalton Outer Membrane Protein of Rickettsiae: Identification of an Avirulent Mutant Deficient in Processing. En *Infection and Immunity* (Vol. 60).
- Harvell, D., Mitchell, C., Ward, J., Altizer, S., Dobson, A., Ostfeld, R., & Samuel, M. (2002, junio)

- 21). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, Vol. 296, pp. 2158–2162. <https://doi.org/10.1126/science.1063699>
- Hillman, R., Baktash, Y., & Martinez, J. (2013). OmpA-mediated rickettsial adherence to and invasion of human endothelial cells is dependent upon interaction with  $\alpha 2\beta 1$  integrin. *Cellular Microbiology*, 15(5), 727–741. <https://doi.org/10.1111/cmi.12068>
- Holbrook, J., Lara, S., Jarosz, H., & McDermott, M. (2019). Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research*, 8, 111. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1>
- Holub, M., Klučková, Z., Helcl, M., Přihodov, J., Rokyta, R., & Beran, O. (2003). Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(3), 202–211. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00518.x>
- Houchins, J., Yabe, T., McSherry, C., & Bach, F. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*, 173(4), 1017–1020. <https://doi.org/10.1084/jem.173.4.1017>
- Ivashkiv, L., & Donlin, L. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581.Regulation>
- Jensenius, M., Ueland, T., Fournier, P., Brosstad, F., Stylianou, E., Vene, S., ... Aukrust, P. (2003). Systemic inflammatory responses in African tick-bite fever. *Journal of Infectious Diseases*, 187(8), 1332–1336. <https://doi.org/10.1086/368415>
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, Vol. 129, pp. S3–S14. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Jost, S., Quillay, H., Reardon, J., Peterson, E., Simmons, R., Parry, B. A., ... Altfeld, M. (2011). Changes in cytokine levels and NK cell activation associated with influenza. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025060>
- Junttila, I. S. (2018). Tuning the cytokine responses: An update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Frontiers in Immunology*, 9(888), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00888>
- Kang, S., Jin, H., Cho, Y., Kim, S., Kim, U., Park, K., ... Park, Y. (2017). Increased level and interferon- $\gamma$  production of circulating natural killer cells in patients with scrub typhus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005815>
- Kared, H., Martelli, S., Ng, T. P., Pender, S., & Larbi, A. (2016). CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(4), 441–452. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1803-z>

- Klompen, H., & Grimaldi, D. (2001). First Mesozoic Record of a Parasitiform Mite: a Larval Argasid Tick in Cretaceous Amber (Acari: Ixodida: Argasidae). En *Annals of the Entomological Society of America* (Vol. 94). Recuperado de <https://academic.oup.com/aesa/article-abstract/94/1/10/120956>
- Konjević, G., Vuletić, A., Martinović, K., & Džodić, R. (2016). The Role of Activating and Inhibitory NK Cell Receptors in Antitumor Immune Response. En *Natural Killer Cells* (pp. 49–65). Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- Koya, T., Takeda, K., Kodama, T., Miyahara, N., Matsubara, S., Balhorn, A., ... Gelfand, E. (2006). RANTES (CCL5) regulates airway responsiveness after repeated allergen challenge. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35(2), 147–154. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0394OC>
- La Manna, M. P., Torina, A., Agnone, A., Blanda, V., Caracappa, S., Alongi, A., ... Sireci, G. (2013). Detection of Natural Killer T Cells in Mice Infected with Rickettsia conorii. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(SUPPL.2), 80–85. <https://doi.org/10.1111/tbed.12143>
- Langers, I., Renoux, V., Thiry, M., Delvenne, P., & Jacobs, N. (2012). Natural killer cells: Role in local tumor growth and metastasis. *Biologics: Targets and Therapy*, 6, 73–82.
- Lee, N., Llano, M., Carretano, M., Akiko, I., Navarro, F., López, M., & Geraghty, D. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), 5199–5204. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5199>
- Li, H., & Walker, D. (1998). rOmpA is a critical protein for the adhesion of Rickettsia rickettsii to host cells. *Microbial Pathogenesis*, 24(5), 289–298. <https://doi.org/10.1006/mpat.1997.0197>
- Liu, M., Guo, S., Hibbert, J., Jain, V., Singh, N., Wilson, N., & Stiles, J. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(3), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>
- López, S., Milush, J., Pandey, S., York, V., Arakawa, J., Pircher, H., ... Lanier, L. (2010). CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*, 116(19), 3865–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-282301>
- Martinez, J., Seveau, S., Veiga, E., Matsuyama, S., & Cossart, P. (2005). Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for Rickettsia conorii. *Cell*,

- 123(6), 1013–1023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.046>
- Mata, D., & Hernández, R. (2008). Interferón gamma: Aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Revista de Investigacion Clinica*, 60(5), 421–431.
- Maynez, C., Rodríguez, C., Garza, J., Laredo, S., Espino, G., & Adame, J. (2021). Rickettsioses and other Tick-borne Diseases across the Border: Regional Focus in Chihuahua. *Southwestern Entomologist*, 46(1), 167–178.
- Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R., & Margulies, D. (2002). Structure and function of natural killer cell receptors: Multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annual Review of Immunology*, 20, 853–885. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064812>
- Noriea, N., Clark, T., Hackstadt, T., & Shuman, H. (2015). Targeted Knockout of the Rickettsia rickettsii OmpA Surface Antigen Does Not Diminish Virulence in a Mammalian Model System. *mBio*, 6(2), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00323-15>
- Olano, J. (2005). Rickettsial Infections. En *Annals of New York Academy of Sciences* (Vol. 1063, pp. 48–52). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00363-8>
- Osterloh, A. (2017). Immune response against rickettsiae: lessons from murine infection models. *Medical Microbiology and Immunology*, Vol. 206, pp. 403–417. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0514-1>
- Otagiri, M., Giam, V. T., Murphy, K., & Weaver, C. (2017). Janeway's Inmunobiology 9Th Edition. En *Garland Science*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9>
- Pérez, T., Guzmán, C., Montiel, G., Paredes, R., & Rivas, G. (2014). Biodiversidad de ácaros en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, S399–S407. <https://doi.org/10.7550/rmb.36160>
- Poinar, G., & Buckley, R. (2008). Compluriscutula vetulum (Acari: Ixodida: Ixodidae), A New Genus And Species of Hard Tick from Lower Cretaceous Burmese Amber. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 110(2), 445–450. <https://doi.org/10.4289/07-014.1>
- Radulovic, S., Price, P., Beier, M., Gaywee, J., Macaluso, J., & Azad, A. (2002). Rickettsia-Macrophage Interactions: Host Cell Responses to Rickettsia akari and Rickettsia typhi. *Infection and Immunity*, 70(5), 2576–2582. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2576-2582.2002>
- Randolph, S. (2004). Tick ecology: Processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*, Vol. 129, pp. 37–65. <https://doi.org/10.1017/S0031182004004925>

- Rauch, J., Eisermann, P., Noack, B., Mehlhoop, U., Muntau, B., Schäfer, J., & Tappe, D. (2018b). Typhus group rickettsiosis, Germany, 2010–2017. *Emerging Infectious Diseases*, 24(7), 1213–1220. <https://doi.org/10.3201/eid2407.180093>
- Rauch, J., Sothmann, P., Aldrich, C., Hogan, B., Owusu, E., May, J., ... Tappe, D. (2018a). Serum cytokine responses in Rickettsia felis infected febrile children, Ghana. *Medical Microbiology and Immunology*, 207(3–4), 243–248. <https://doi.org/10.1007/s00430-018-0544-3>
- Raulet, D. (2006). Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Seminars in Immunology*, 18(3), 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.03.003>
- Regnery, R. L., Spruill, C. L., & Plikaytis, B. D. (1991). Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence. *Analysis*, 173(5), 1576–1589.
- Ruhwald, M., Bjerregaard, M., Rabna, P., Kofoed, K., Eugen, J., & Ravn, P. (2007). CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7. *Microbes and Infection*, 9(7), 806–812. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.021>
- Rydkina, E., Turpin, L., & Sahni, S. (2010). Rickettsia rickettsii infection of human macrovascular and microvascular endothelial cells reveals activation of both common and cell type-specific host response mechanisms. *Infection and Immunity*, 78(6), 2599–2606. <https://doi.org/10.1128/IAI.01335-09>
- Sahni, A., Fang, R., Sahni, S., & Walker, D. (2019). Pathogenesis of Rickettsial Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14(1), 127–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800>
- Sahni, A., Narra, H., Walker, D., & Sahni, S. (2016). Endothelial Activation and Injury: The Mechanisms of Rickettsial Vasculitis. En *Vascular responses to pathogens*. Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=rutDBAAAQBAJ&pg=PA114&lpg=PA114&dq=Endothelial+activation+and+injury:+the+mechanisms+of+rickettsial+vasculitis&source=bl&ots=M6PHI96qGy&sig=ACfU3U22k99GSTXjX3WWFDasG8wzICZwZA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiloKbL\\_4XIAhUMKKw](https://books.google.com.mx/books?id=rutDBAAAQBAJ&pg=PA114&lpg=PA114&dq=Endothelial+activation+and+injury:+the+mechanisms+of+rickettsial+vasculitis&source=bl&ots=M6PHI96qGy&sig=ACfU3U22k99GSTXjX3WWFDasG8wzICZwZA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiloKbL_4XIAhUMKKw)
- Sahni, A., Patel, J., Narra, H., Schroeder, C., Walker, D., & Sahni, S. (2017). Fibroblast growth factor receptor-1 mediates internalization of pathogenic spotted fever rickettsiae into host endothelium. *PLoS ONE*, 12(8), e0183181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183181>
- Sahni, S., & Rydkina, E. (2009). Host-cell interactions with pathogenic Rickettsia species.

*Future Microbiology*, 4(3), 323–339. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.6>

Saraiva, M., Vieira, P., & O'Garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1), 1–19. [https://doi.org/10.1084/jem\\_20190418](https://doi.org/10.1084/jem_20190418)

Sears, K., Ceraul, S., Gillespie, J., Allen, E., Popov, V., Ammerman, N., ... Azad, A. (2012). Surface Proteome Analysis and Characterization of Surface Cell Antigen (Sca) or Autotransporter Family of Rickettsia typhi. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002856. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002856>

Stojanovic, A., Correia, M., & Cerwenka, A. (2018). The NKG2D/NKG2DL axis in the crosstalk between lymphoid and myeloid cells in health and disease. *Frontiers in Immunology*, 9(827), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00827>

Suffee, N., Richard, B., Hlawaty, H., Oudar, O., Charnaux, N., & Sutton, A. (2011). Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1649–1653. <https://doi.org/10.1042/BST20110651>

Taborda, N. A., & Montoya, C. J. (2014). *Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1*. 3(1), 11–20.

Tappe, D., Booken, N., Boer, A., Rauch, J., Schmiedel, S., & Reich, K. (2018). Histology and serum cytokine responses in an imported rickettsia slovaca Infection, Germany. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(1), 248–251. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0392>

Thompson, A., & Orr, S. (2018). Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections. *Cytokine*, 111, 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.05.019>

Tinoco, L., Quiroz, H., Quintero, M., Rentería, T., González, Y., Barreras, A., ... Vinasco, J. (2009). Prevalence of Rhipicephalus sanguineus ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Veterinary Record*, 164(2), 59–61. <https://doi.org/10.1136/vr.164.2.59>

Tizard, I. (2013). Veterinary immunology. En *Veterinary Inmunology*. Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=yc3sAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&d q=immunology+tizard&ots=g\\_LI7iPgVg&sig=17QvuMvCqFCIf08FrzkRbjCaJLA&redir\\_esc=y#v=onepage&q=immunology tizard&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=yc3sAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=immunology+tizard&ots=g_LI7iPgVg&sig=17QvuMvCqFCIf08FrzkRbjCaJLA&redir_esc=y#v=onepage&q=immunology tizard&f=false)

Uciechowski, P., & Dempke, W. (2020). Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*, 98(3), 131–137. <https://doi.org/10.1159/000505099>

Valbuena, G., Bradford, W., & Walker, D. (2003). Expression analysis of the T-cell-targeting chemokines CXCL9 and CXCL10 in mice and humans with endothelial infections caused

- by rickettsiae of the spotted fever group. *American Journal of Pathology*, 163(4), 1357–1369. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63494-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63494-3)
- Valiante, N., Uhrberg, M., Shilling, H., Lienert, K., Arnett, K., D'Andrea, A., ... Parham, P. (1997). Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, 7(6), 739–751. Recuperado de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9430220](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9430220)
- Venet, F., Davin, F., Guignant, C., Larue, A., Cazalis, M., Darbon, R., ... Monneret, G. (2010). Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock*, 34(4), 358–363. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181dc0977>
- Vitale, G., Mansueto, S., Gambino, G., Mocciano, C., Spinelli, A., Rini, G. B., ... Cillari, E. (2001). The acute phase response in Sicilian patients with boutonneuse fever admitted to hospitals in Palermo, 1992-1997. *Journal of Infection*, 42(1), 33–39. <https://doi.org/10.1053/jinf.2000.0758>
- Walker, A., Bouattour, A., Horak, I., & Latif, A. (2014). *Ticks of Domestic Animals in Africa: a guide to identification of species*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/265412942>
- Walker, D. H., Valbuena, G. A., & Olano, J. P. (2003). Pathogenic mechanisms of diseases caused by Rickettsia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 1–11. New York Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07331.x>
- Walker, D., Parks, F., Betz, T., Taylor, J., & Muehlberger, J. (1989). Histopathology and immunohistologic demonstration of the distribution of Rickettsia typhi in fatal murine typhus. *American Journal of Clinical Pathology*, 91(6), 720–724. <https://doi.org/10.1093/ajcp/91.6.720>
- Wen, C. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer letters*, 28(2), 222–225. <https://doi.org/10.1201/9781351071291>
- Wensveen, F., Jelenčić, V., & Polić, B. (2018). NKG2D: A master regulator of immune cell responsiveness. *Frontiers in Immunology*, 9(441), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00441>
- Zafirova, B., Wensveen, F., Gulin, M., & Polić, B. (2011). Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(21), 3519–3529. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0797-0>
- Zelová, H., & Hosek, J. (2013). TNF- a signalling and inflammation : interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62, 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0937-0>

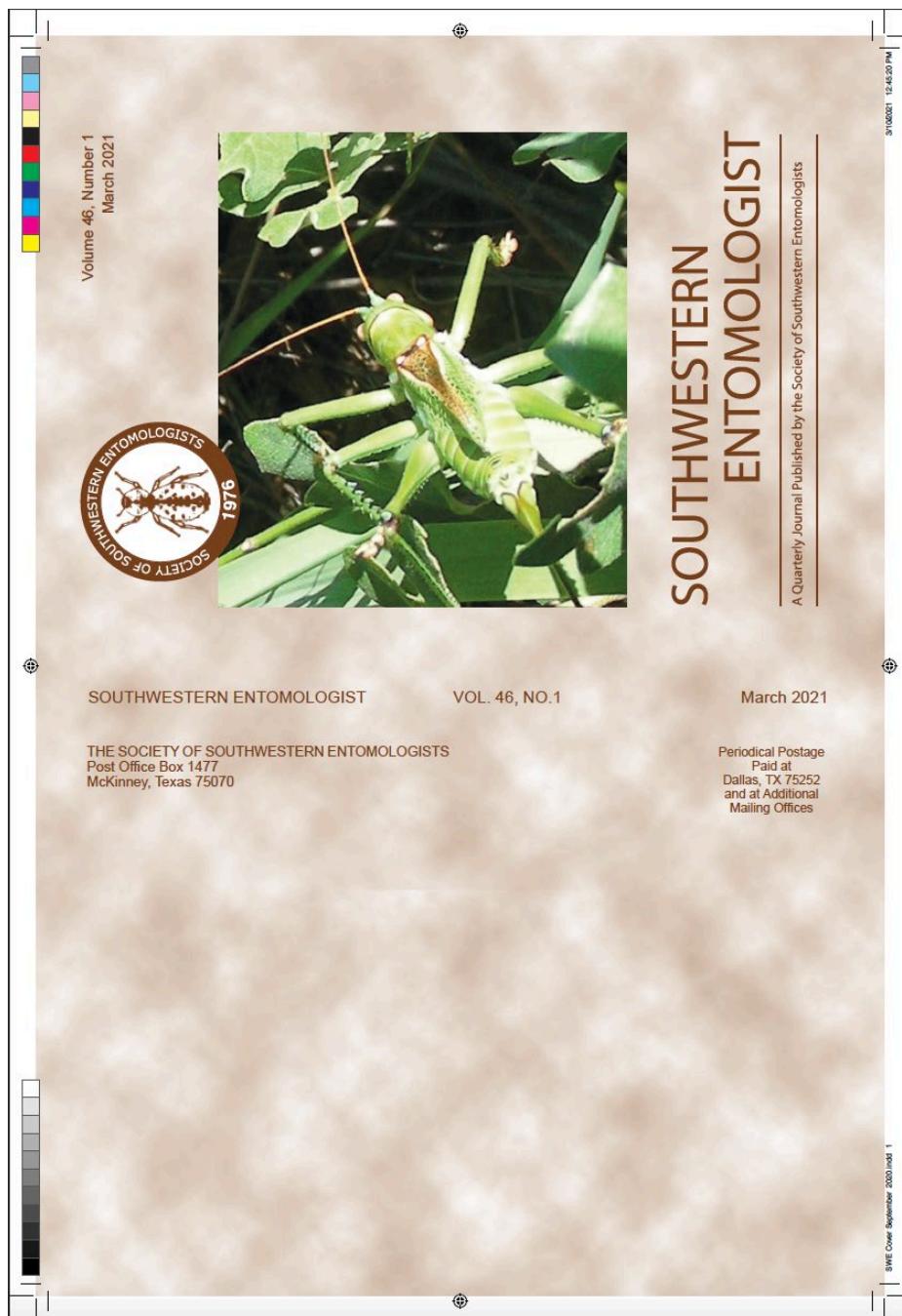


013-0633-0

Zheng, Q., Zhu, Y., Chen, J., Ye, Y., Li, J., Liu, Y., ... Jiang, J. (2015). Activated natural killer cells accelerate liver damage in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 180(3), 499–508. <https://doi.org/10.1111/cei.12597>

## 12. APÉNDICE

### Apéndice I



## Rickettsioses and other Tick-borne Diseases across the Border: Regional Focus in Chihuahua

Carolina Maynez-Prieto<sup>1,2</sup>, Carlos Arturo Rodríguez-Alarcón<sup>3</sup>, Javier Alfonso Garza-Hernández<sup>4</sup>, Stephanie Viridiana Laredo-Tiscareño<sup>5</sup>, Gerardo Pavel Espino-Solís<sup>1</sup>, and Jaime Raúl Adame-Gallegos<sup>2\*</sup>

**Abstract.** Rocky Mountain spotted fever is of public importance from clinical and veterinary perspectives. During the last decade, cases have increased throughout Mexico, along with other tick-borne diseases. The number of cases reported has increased in northern states of the country that border the United States of America. Studies to understand the current state of affairs with the tick vector and identification of etiological agents also have increased. From the six border states, two in the northwest and central region are of special interest because of the close proximity of the populations from both regions -- Baja California (Tijuana-San Diego and Mexicali-Calexico) and Chihuahua (Ciudad Juárez-El Paso). However, not much information is available on the current situation of Rocky Mountain spotted fever and other rickettsiosis in the State of Chihuahua. Because of increased clinical cases reported, where Chihuahua was the State with the second most number of cases nationwide in 2020, the purpose of this study was to identify methods of detection and vector-collection strategies in the region.

### Introduction

Tick-borne diseases are of clinical and veterinary importance in Mexico, especially Rocky Mountain spotted fever caused by *Rickettsia rickettsii*, a neglected disease important to public health. Despite Rocky Mountain spotted fever being a disease requiring immediate follow-up by the National Directorate of Epidemiology, with a total of 449 cases reported nationwide in 2019, the State of Chihuahua reported most cases, with 98 confirmed, of which 39 were caused by Rocky Mountain spotted fever and 59 by other rickettsiosis (Direccion General de Epidemiología 2019). In 2018, Chihuahua was second in the number of cases of rickettsiosis nationwide, behind the western neighboring State of Sonora with 77 cases, according to the state laboratory of Public Health. Despite multi-institutional efforts to prevent tick-borne diseases, emergence of Rocky Mountain spotted fever and other tick-borne diseases in different municipalities across the State has been a challenge since the first two

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas, Circuito Universitario 8, Campus UACH. II, 31125 Chihuahua, Chih., México. Tel: +52 614 236 6000.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, Circuito Universitario II, 31125 Chihuahua, Chih., México. Tel: +52 614 236 6000. \*Corresponding author: jadame@uach.mx.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Departamento de Ciencias Veterinarias, Av. Benjamin Franklin No. 4650, Zona PRONAF, 32315, Ciudad Juárez, Chih., México. Tel: +52 656 688 1800.

<sup>4</sup>Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Departamento de Ciencias Químico Biológico, Av. Benjamin Franklin No. 4650, PRONAF, 32315, Ciudad Juárez, Chih., México. Tel: +52 656 688 1800.

<sup>5</sup>Iowa State University, College of Veterinary Medicine, Ames, IA, USA. Tel +1 515 294 9861.

confirmed cases were reported in 2013. Little is known of the current prevalence of ticks or identification of other pathogens related to vector-borne diseases such as *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie), other *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* (Johnson). Literature on diagnostic tests approved by the World Health Organization (WHO) and Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for tick-borne pathogens worldwide will not be reviewed here, but is available from Luce-Fedrow et al. (2015), Portillo et al. (2017), and Yazid et al. (2018).

The geographical location of the State that borders New Mexico and Texas in the US, and is the second largest binational metropolitan area at the US-Mexico border called el “Paso del Norte”, emphasizes the importance of research on ticks and identification of etiological agents of clinical and veterinary importance in the region. Proper detection is highlighted by the overwhelming amount of work at the centralized National Institute of Epidemiological Reference (INDRE, in Spanish) and state-run laboratories. According to the National Center for Disease Prevention and Control (CENAPRECE, in Spanish) through the Program of Prevention and Control of Rickettsiosis, by November 2019 only 16% of probable cases of rickettsiosis were confirmed by a laboratory, of a total of 1,804 or 64% of 2,786 probable cases. Chihuahua was the State with most deaths, a total of 21. It is important to consider no official acknowledgment or updated knowledge of prevalence of other diseases similar to rickettsiosis with relevance in public health, such as Lyme disease, ehrlichiosis, and anaplasmosis. We reviewed current information on tick-borne disease in the State of Chihuahua in northern Mexico, specifically geographical distribution, and reported infections by ticks and diagnostic methods used.

## Materials and Methods

For current information on Rocky Mountain spotted fever and other tick-borne diseases, we referred to PubMed and SciELO (for articles in Spanish) and searched “Chihuahua Rocky Mountain spotted fever”, “Chihuahua ticks”, “Chihuahua rickettsiosis”, “Chihuahua tick-borne diseases”, “Rocky mountain spotted fever in Chihuahua”, “tick-borne disease(s) Mexico”, “ticks in Chihuahua”, and “rickettsiosis Mexico”. The search of literature focused on tick-borne diseases in Mexico (Fig. 1), with a total of 373 articles from PubMed. We excluded 353 publications not related to the topic, leaving 20 full-text publications. Another publication from SciELO, two publications from bibliographies, three review papers from PubMed, one website, and seven historical papers not in PubMed also were included.

## Results

**Taxonomic Identification.** Since the early 20th Century, researchers like Hoffman (1925), Bustamante and Varela (1943), and Tovar (1944, 1945) began to report tick-borne diseases in Mexico where all effort was focused on rickettsiosis. One of most significant works for identification of ticks from North America was by Bishopp and Trembley (1945). Ticks identified in northern Mexico were *Amblyomma americanum* (Linnaeus), *A. cajennense* (Fabricius), *A. dissimile* (Koch), and *A. maculatum* (Koch), especially abundant in states bordering the Gulf of Mexico. *Dermacentor albipictus* (Packard) was found in northern Mexico and *D. andersoni* (Stiles) was identified in Arizona and New Mexico. *D. nitens* was abundant on the east coast of Mexico.

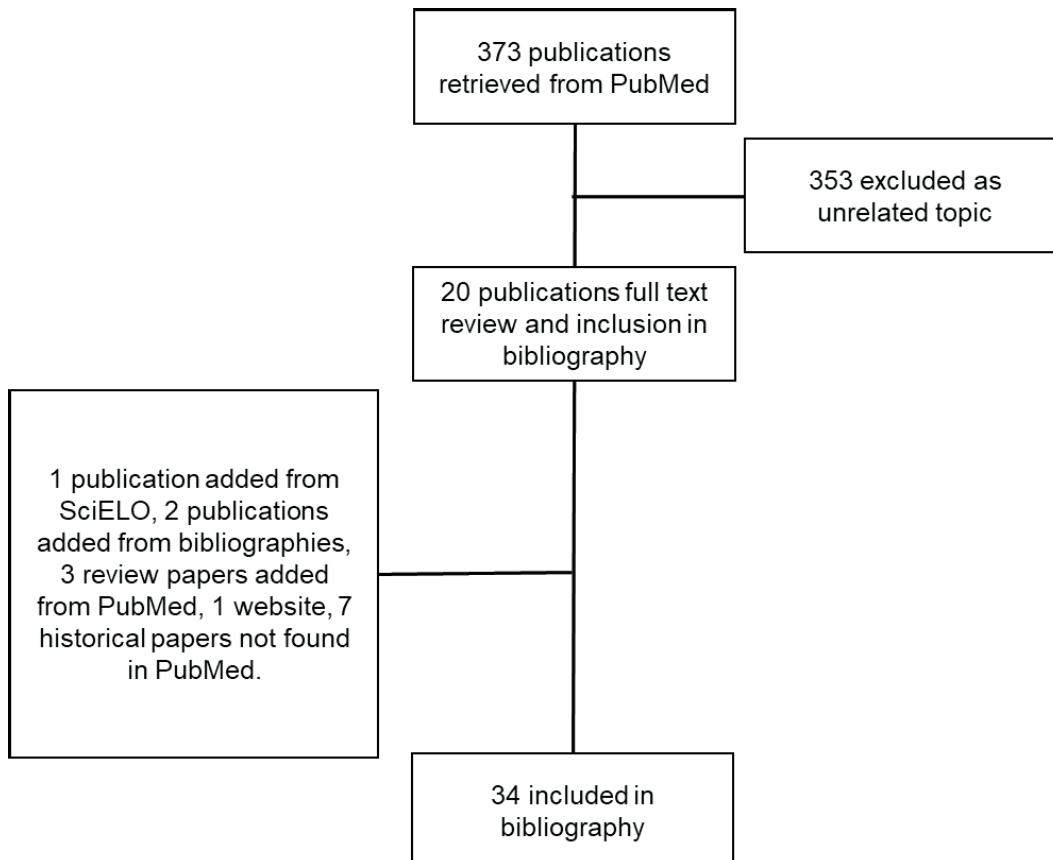


Fig. 1. Selection process for literature on “tick-borne disease(s) Mexico, Rocky Mountain spotted fever, rickettsiosis Mexico, Chihuahua Rocky Mountain spotted fever, Chihuahua ticks, Chihuahua rickettsiosis, Chihuahua tick-borne diseases” focused on Rocky Mountain spotted fever and other rickettsiosis in the State of Chihuahua, North Mexico.

The presence of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) in South Texas also was highlighted. In the State of Chihuahua, reports by Chavarria (1941) identified *D. andersoni*, but the information still is not certain. Entomological surveys to collect ticks and report prevalence in Chihuahua are becoming more important. Recently, *D. parumapertus* (Neumann), *Ixodes hearlei* (Gregson), *I. kingi* (Bishopp), *Ornithodoros* sp., and *R. sanguineus* s.l. were reported (López-Pérez et al. 2019).

**Rocky Mountain Spotted Fever in North Mexico.** Refer to Table 1 and Figs. 2-3 for a summary. Rocky Mountain spotted fever is a potentially fatal disease caused by *Rickettsia rickettsii* (Brumpt), an intracellular obligate bacterium transmitted to humans by ticks (Harrell 1949). In the past decade, studies on the prevalence of *R. rickettsii* in dogs, *Canis lupus familiaris* (Linnaeus), and ticks were reported for Baja California (Tinoco-Gracia et al. 2009). In 2009, there was an outbreak of Rocky Mountain spotted fever among residents who reported *R. sanguineus* and tick bites at a community in Mexicali, Baja California, Mexico.

Table 1. Rocky Mountain Spotted Fever and Other Rickettsiosis Analysis by Sample and Diagnostic Test. Colors and numbers indicate location in Fig. 2.

Sample	Geographic area	Diagnostic test	(Author), color/number, Fig. 2
Tick	Janos Biosphere, Chihuahua, Mexico	Samples analyzed using PCR amplification gltA gene for <i>R. rickettsii</i> and flaB for <i>Borrelia</i> spp.	(López-Pérez et al. 2019) (Green, 1)
Dog	Cochise, Santa Cruz, Yuma, Arizona, USA	Serum samples tested by IFA.	(Yaglom et al. 2018) (Red, 1)
Dog	Imperial County, California, USA	Blood samples tested using IFA to detect <i>R. rickettsii</i> , <i>E. canis</i> , and <i>A. phagocytophilum</i> .	(Estrada et al. 2019) (Red. 2)
Dog and tick	Baja California, Coahuila, Sonora, Mexico	IFA in serum samples from dogs and RT-PCR targeting ompA in ticks.	(Pieracci et al. 2019) (Red, 3)
Human adult	Ensenada, Baia California, Mexico	Blood samples to detect antibodies against <i>R. rickettsii</i> measured with <i>R. rickettsii</i> ELISA in dogs, adapted to humans with anti-human IgG conjugate.	(Field-Cortazares et al. 2015) (Blue, 1)
Human adult (veterinary worker)	Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico	Blood samples evaluated using IFA and PCR targeting 16S rRNA to detect <i>R. rickettsii</i> , <i>Ehrlichia</i> spp., and <i>A. phagocytophilum</i> .	(Escárcega-Ávila et al. 2019) (Blue, 2)
Tick	South of Coahuila, Mexico	PCR using 23S-5S rRNA intergenic spacer and ompA <i>R. rickettsii</i> .	(Ortega-Morales et al. 2019) (Green, 2)
Pregnant woman	Hermosillo, Sonora	Confirmatory diagnoses made by PCR targeting gltA for <i>R. rickettsii</i> or serological reactivity by IFA.	(Licona-Enriquez et al. 2017) (Blue, 4)
Human adult	Hermosillo, Sonora	Blood samples analyzed by PCR targeting gltA gene or IFA to detect <i>R. rickettsia</i>	la Mora et al. Sonora 2018) (Blue, 5)
Child	Hermosillo, Sonora, Mexico	Diagnosis of RMSF by IFA.	(Alvarez-Hernandez et al. 2015) (Blue, 3)
Tick	Calexico and El Centro, California, USA	RT-PCR targeting rOmpA gene from <i>R. rickettsii</i> .	(Fritz et al. 2012) (Red, 2)
Tick	Mexicali, Mexico	Sequencing 12S mitochondrial rRNA on DNA from ticks. <i>R. rickettsii</i> genetic typing of intergenic fragments RR0155-rpmB, cspA- ksgA, and RR1240-tlc5.	(Eremeeva et al. 2011) (Green, 3)
Tick and dog	Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico	Blood samples tested by PCR aimed at 16S rRNA gene for <i>Ehrlichia</i> spp. and <i>A. phagocytophilum</i> .	(Escárcega Ávila et al. 2018) (Red, 4)

Tick	Chihuahua City, Mexico	Samples tested using PCR.	(Prado et al. 2018) (Green, 6)
Horse and tick	Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico	Blood samples from horses and soft ticks analyzed by endpoint or nested PCR.	(Medrano-Bugarini et al. 2019) (Black, 1)
Human adult	Coahuila, Nuevo Leon, Tamaulipas, Mexico	Serum samples analyzed by ELISA to detect antibodies against <i>B. burgdorferi</i> Pérez et al. and Western Blot to confirm.	(Gordillo- 2003) (Blue, 6)
Tick	Texas, USA; Tamaulipas, Nuevo Leon, and Coahuila, Mexico	Samples tested using PCR amplification of 16SrRNA-23SrRNA to detect <i>B. burgdorferi</i> .	(Feria-Arroyo et al. 2014) (Green, 7)
White-tailed deer and coyote	South Texas	TickPath Layerplex qPCR targeting 23S/5S rRNA gene for <i>Borrelia</i> ; 16SrRNA for <i>Rickettsia</i> and <i>Ehrlichia</i> ; rrs gene for <i>Anaplasma</i> , 18SrRNA for <i>Babesia</i> , and 18SrRNA for <i>Theileria</i> .	(Yu et al. 2020) (Black, 2)
Human adult and tick	Allende and Linares. Nuevo Leon. and Mexico	Serum samples from humans tested using IFA for IgG antibodies against <i>Rickettsia prowazekii</i> , <i>R. typhi</i> , and <i>R. parkeri</i> . Ticks analyzed by PCR amplification of 17-kDa gene.	(Medina-Sanchez et al. 2005) (Blue, 7)

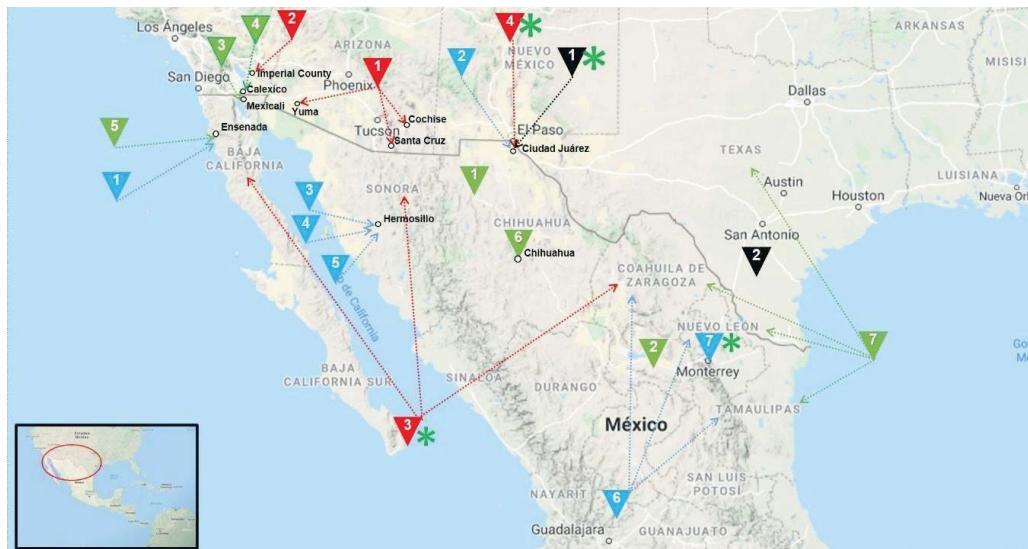


Fig. 2. Geographic representation of study areas with tick-borne pathogens at the Mexico-US border between 2003 and 2019. Legend: Color code by type of study. Green triangles and asterisk (\*) indicate studies of ticks. Blue triangles, studies with blood human samples. Red triangles indicate studies with dog blood samples. Black triangles indicate studies of wild animals and horses. Maps were from Google Maps.

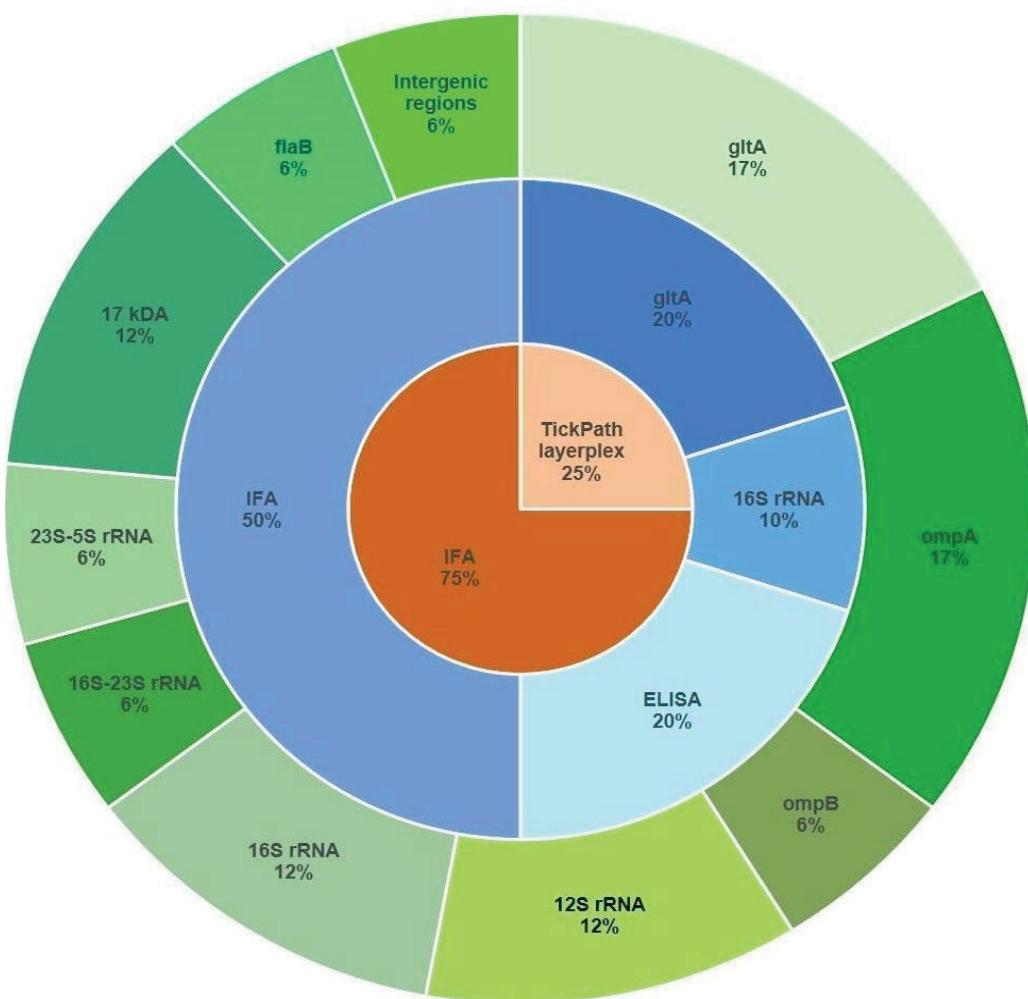


Fig. 3. Most common diagnostic tests used on blood samples from dogs/wild animals (orange circle), humans (blue circle), and ticks (green circle). All genes are used to detect *R. rickettsia* except flab and 16SrRNA-23SrRNA used for *Borrelia burgdorferi*.

A later study determined the prevalence of vector ticks as a possible cause of outbreak on 45 dogs at the Calexico shelter and 71 dogs at El Centro, CA. In total, 200 ticks were collected among the dogs. All the ticks were morphologically identified as *R. sanguineus*. All were tested by real-time PCR targeting the 154-bp fragment of the *ompA* gene from *R. rickettsii*, but none was detected (Fritz et al. 2012).

In contrast, a previous study at Mexicali collected 96 adult ticks on 11 stray dogs in a neighborhood where one patient was diagnosed with Rocky Mountain spotted fever. The 12S mitochondrial rRNA was sequenced from DNA from ticks, and *R. rickettsii* was detected by genetic typing of intergenic fragments RR0155- rpmB, cspA-ksgA, and RR1240-tlc5. Thirty of 96 ticks (31%) were positive for *R. rickettsii* (Eremeeva et al. 2011). This was one of the first studies to show *R. rickettsii* in ticks where Rocky Mountain spotted fever had been reported. Between 2016 and 2017, seroprevalence was surveyed in 752 dogs from Imperial County, a US county

that borders Mexicali, Mexico. Blood samples were collected and tested using immunofluorescence antibody assay (IFA) to detect *R. rickettsii*, *Ehrlichia canis* (Moshkovski), and *A. phagocytophilum*. Total prevalence was 12% for *R. rickettsia* in dogs (Estrada et al. 2019). To the west during the same period, animals in shelters and rabies clinics in three southern Arizona counties (Cochise, Santa Cruz, and Yuma) were studied near the Mexican border with the State of Sonora. In total, serum from 217 owned and stray dogs was tested by IFA and showed total prevalence of 5% for spotted fever group rickettsia (SFGR) IgG antibodies, with seropositivity ranging from 3 to 12% across the counties (Yaglom et al. 2018). Later studies found similar prevalence among dogs from Arizona and Baja California. In Mexico, one study of ticks from five municipalities in the State of Coahuila confirmed *R. rickettsii* in engorged female ticks from 253 free-roaming dogs. In total, 1,238 ticks were morphologically identified as *R. sanguineus*, of which 86% were engorged females and 14% engorged nymphs. The ticks were put into 30 groups, their DNA was purified, and conventional PCR assays were done using 23S-5S rRNA intergenic spacer and the outer membrane protein (ompA) gene of *R. rickettsii*. The six groups (each with six females) were positive for *R. rickettsii* DNA, with minimum infection of 3% (Ortega-Morales et al. 2019). In another study at Baja California, Coahuila, and Sonora, seroprevalence of *R. rickettsii* was evaluated in 1,136 serum samples from dogs and 942 ticks (413 adult females, 313 adult males, 215 nymphs, and one larva morphologically identified as *R. sanguineus* s.l.) using IFA antibody assays in dogs and real-time PCR assays targeting the first ompA gene in ticks. In total, 6% (69 dogs) had antibodies to *R. rickettsii*, with most in Baja California (12%), followed by Coahuila (4%), and then by Sonora (4%). Positive samples on ticks were sequenced using assays for genus-specific *Rickettsia*, showing evidence of *R. massiliae* (Beati and Raoult), *R. parkeri* (Lackman), and *R. rickettsii* by ompA PCR with further sequencing (Pieracci et al. 2019).

Most studies (three of six) of rickettsiosis in humans were from the State of Sonora (Table 1). Analysis of 104 children diagnosed with Rocky Mountain spotted fever by IFA at a hospital at Sonora, indicated 20% died (Alvarez-Hernandez et al. 2015). During 2015 and 2016, four pregnant women were infected by Rocky Mountain spotted fever. Diagnoses were confirmed by PCR targeting a conserved fragment of 805 bp of the citrate synthase (gltA) gene for *R. rickettsii* or by serological reactivity to *R. rickettsii* antigens by IFA (Licona-Enriquez et al. 2017). Blood samples analyzed by PCR targeting the gltA gene or IFA in 47 human deaths from 2013 to 2016 showed all were by *R. rickettsii* (Delgado-De la Mora et al. 2018). At Ensenada, Baja California, a cross-sectional study between 2009 and 2011 collected 384 human blood samples from patients older than 1 year. Antibodies against *R. rickettsii* were measured in samples using *R. rickettsia* ELISA in dogs but adapted to humans with an anti-human IgG conjugate. Sensitivity and specificity were determined using IFA in 32 samples. Results showed adjusted seroprevalence of 4% of rickettsiosis for *R. rickettsii* not associated with the sex, age, or occupation of humans or mobility of dogs between the exterior and interior of houses according to seropositivity (Field- Cortazares et al. 2015). Four years later, two more studies were published: one at Ciudad Juarez, Chihuahua, that evaluated blood samples from 106 veterinarians, 36 veterinary assistants, 19 pet groomers, and six veterinary administrative workers by IFA and PCR targeting 16S rRNA to detect *R. rickettsii*, *Ehrlichia* spp., and *A. phagocytophilum*. Results showed 54% of the participants were seropositive for at least one of the pathogens. The percentage of coinfection with two or three pathogens was remarkable. In total, 3% had co-exposure to *R. rickettsii* and *A.*

*phagocytophilum*, 9% to *Ehrlichia* spp. and *A. phagocytophilum*, 2% to *Ehrlichia* spp. and *R. rickettsii*, and 2% were positive for all three pathogens. Veterinarians and pet groomers were at great risk of being infected with *R. rickettsii* (Escárcega-Ávila et al. 2019).

**Other Tick-borne Diseases.** Other tick-borne diseases were reported recently in the region. Etiological agents were reported for Lyme disease, anaplasmosis, ehrlichiosis, and other rickettsiosis detected in humans, ticks, dogs, or wild animals. Most findings were reported from northeastern states, in contrast to the few publications from the northwestern region.

Researchers of a cross-sectional descriptive study at Mexico City, Coahuila, Nuevo León, and Tamaulipas between 1987 and 1988 used ELISA to test 2,346 human serum samples to detect antibodies against *B. burgdorferi*, and Western Blot to confirm positive samples. Twelve percent of the samples were positive by ELISA, and 122 of the samples were confirmed by Western Blot. Seroprevalence by region was 3% for Mexico City and 6% for the northeastern area of the country (Gordillo-Pérez et al. 2003). A decade later, analysis focused on Texas and partly the states of Tamaulipas, Nuevo León, and Coahuila where 1,235 samples of ticks were collected from vertebrate hosts. In total, 109 (9%) of ticks were identified as *Ixodes scapularis* (Say). *B. burgdorferi* was detected by PCR targeting 16S rRNA-23S rRNA and was in 45% of the ticks (Feria-Arroyo et al. 2014). In counties from South Texas near the Mexican border where the purpose was to know molecular prevalence of tick-borne pathogens, 245 white-tailed deer, *Odocoileus virginianus* (Zimmermann), and 122 coyotes, *Canis latrans* (Say), were analyzed. Whole-blood samples were evaluated by TickPath Layerplex qPCR test, targeting multiple genes for *Borrelia*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, and *Theileria* genera. Coyotes had total prevalence of 9% for *Babesia vogeli* (Reichenow) and 0.8% for *Borrelia turicatae* (Brumpt), while white-tailed deer had total prevalence of 0.4% for *Anaplasma platys* (Dumler), 1.6% for *Ehrlichia chaffeensis* (Anderson), and 7% for *Theileria cervi* (Denier). The study indicated wild animals could be sentinels for a number of zoonotic tick-borne pathogens (Yu et al. 2020).

The approach has been used in other regions of Mexico, in the Yucatan Peninsula where overall prevalence of tick-borne rickettsial agents was 20% in white-tailed deer and 50% in *Mazama* sp. (Ojeda-Chi et al. 2019). Some tick-borne diseases can be confused with each other. In the State of Nuevo Leon in 2001, the Public Health Department collected sera from 345 human febrile patients at Allende and Linares that were suspected to have dengue fever. IFAs were used for IgG antibodies against *Rickettsia prowazekii* (da Rocha-Lima), *R. typhi* (Wolbach and Todd), and *R. parkeri* (Lackman). In total, 25% had antibodies reactive with typhus group rickettsiae and 16% against *R. parkeri*. Also, 190 ticks (*A. cajennense* and *A. imitator* (Kohls)) from livestock and tested in groups showed 50% were positive for *R. prowazekii* (Medina-Sánchez et al. 2005). One of the most ambitious analyses of tick-borne pathogens in Mexico to date was of samples collected between 1997 and 2013. About 1,107 ticks were collected from a range of mammalian hosts in forests and ecotourism parks in 22 of 32 states of the Republic of Mexico. *R. sanguineus* was collected most frequently (43%). PCR was used on the 16S rRNA gene for *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*, and *E. canis*; gltA and 17 kDa protein-encoding genes for *Rickettsia* spp. were used to assay 477 groups of ticks. *A. phagocytophilum* was the most common pathogen followed by *E. canis* in 45 and 42 groups evaluated.

*R. rickettsii*, *E. chaffeensis*, and *Ca. R. amblyommii* also were found in 4.2% of the total evaluated (Sosa-Gutierrez et al. 2016).

**Tick-borne Diseases and Ticks at Chihuahua.** At Chihuahua, in the “Paso del Norte” region, *Ehrlichia* spp. and *A. phagocytophilum* were reported in 30 dogs from Ciudad Juarez, Chihuahua infested by at least five female engorged *R. sanguineus*. In the study, blood samples from dogs and ticks were tested using PCR by amplification of the 16S rRNA gene for *Ehrlichia* spp. and *A. phagocytophilum*. *Ehrlichia* spp. was found in 40% of dogs and 66% of ticks. *Anaplasma* spp. was detected in 27% of dogs and 66% of ticks (Escárcega Ávila et al. 2018). Results might suggest more prevalence of bacteria in the ticks collected. However, follow-up studies need to clarify this contrast with reports from other regions.

At the city of Chihuahua (capital of the State) between August and November 2015, 664 ticks were extracted from 99 dogs in neighborhoods with reported clinical cases of Rocky Mountain spotted fever. Results showed 99.5% of the ticks were *R. sanguineus*. Ticks were grouped and evaluated by PCR. All were negative for *R. rickettsii* ompA, but two were positive for *A. phagocytophilum*, for total prevalence of 7% of the grouped samples tested (Prado et al. 2018). To date, this has been the only report of another tick-borne disease bacteria related to Rocky Mountain spotted fever from endemic neighborhoods in the State of Chihuahua. Recently, a study at Janos Biosphere Reserve in northwest Chihuahua collected 45 hard and soft ticks from wild animals. All were tested using PCR amplification of the gltA gene for *R. rickettsii* and a fragment of 470 bp of the flagellin (flaB) gene for *Borrelia* spp. Results showed *B. burgdorferi* s.s. in an *I. kingi* collected from a kit fox, *Vulpes macrotis* (Merriam), and *R. massiliae* was in 6.5% of 31 *R. sanguineus* from free-roaming dogs (López-Pérez et al. 2019). At Ciudad Juarez, a study with 144 blood samples from horses and soft ticks on them were analyzed by endpoint or nested PCR. Total prevalence of *Babesia caballi* was 2.8% in horse blood and 6% in soft ticks (Nuttall and Strickland). One sample tested positive for *A. phagocytophilum*, indicating prevalence of 0.8% in horse blood (Medrano-Bugarini et al. 2019).

In conclusion, despite efforts focused on molecular diagnosis of tick-borne disease in the State of Chihuahua, it is fundamental to develop strategies according to tools available by human and financial resources that could impact the prevalence and mortality of the exposed population in endemic counties. For example, in the neighboring State of Sonora, it was possible to decrease the prevalence of tick-infested dogs from 32.5 to 8.8% by using long-acting acaricidal collars, applying acaricides, and educating people about Rocky Mountain spotted fever (Alvarez-Hernandez et al. 2019). It is important to maintain ongoing collection and taxonomic identification of ticks throughout the State, which will aid in understanding current cases of Rocky Mountain spotted fever. To date (47<sup>th</sup> week of epidemiological surveillance in 2020), 34 cases of FMMR and other rickettsiosis have been reported, and Chihuahua is the second state with the most cases nationwide. Intersectoral participation of Public Health Departments at national and state levels and participation of the two public Autonomous Universities in the State are encouraged to address the diseases.

### Acknowledgment

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for providing scholarship No. 755772 to CM-P. This work was partially supported by grant CONACyT-Ciencia Basica (CB2017-2018 A1-S-53789) awarded to GPES.

## References Cited

- Alvarez-Hernandez, G., C. Murillo-Benitez, M. del Carmen Candia-Plata, and M. Moro. 2015. Clinical profile and predictors of fatal Rocky Mountain spotted fever in children from Sonora, Mexico. *J. Pediatr. Infect. Dis.* 34: 125-130.
- Alvarez-Hernandez, G., N. Drexler, C. D. Paddock, J. D. Licona-Enriquez, J. D. la Mora, A. Straily, M. del Carmen Candia-Plata, D. I. Cruz-Loustaunau, and V. A. Arteaga-Cardenas. 2019. Community-based prevention of epidemic Rocky Mountain spotted fever among minority populations in Sonora, Mexico, using a One Health approach. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 00: 1-8.
- Bishopp, F. C., and H. L. Trembley. 1945. Distribution and hosts of certain North American ticks. *J. Parasitol.* 31: 1.
- Bustamante, M., y G. Varela. 1943. Una nueva rickettsiosis en México. Existencia de la fiebre manchada americana en los Estados de Sinaloa y Sonora. *Rev. del Inst. de Salubridad y Enf. Tropicales.* 4: 189-210.
- Chavarría, M. 1941. Garrapatas determinadas en México. Caracteres genéricos de las más comunes. *Revista del Instituto Pecuario* 1: 18-24.
- Delgado-De la Mora, J., J. D. Licona-Enríquez, M. Leyva-Gastélum, D. Delgado-De la Mora, A. Rascón-Alcantar, y G. Álvarez-Hernández. 2018. Una serie de casos fatales de fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora, México. *Biomedica* 38: 69-76.
- Dirección General de Epidemiología. 2019. Boletín Epidemiológico: Semana 52. 36: 28-32. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/522437/BSEMANAL\\_52.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/522437/BSEMANAL_52.pdf).
- Eremeeva, M. E., M. L. Zambrano, L. Anaya, L. Beati, S. E. Karpathy, M. M. Santos-Silva, B. Salceda, D. Macbeth, H. Olguin, G. A. Dasch, et al. 2011. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. *J. Med. Entomol.* 48: 418-421.
- Escárcega Ávila, A. M., B. S. Luna Flores, A. De la Mora Covarrubias, y F. Jiménez. 2018. Análisis exploratorio de enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas en perros de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Acta Univ.* 28: 72-78.
- Escárcega-Ávila, A. M., A. de la Mora-Covarrubia, A. Quezada-Casasola, and F. Jiménez-Vega. 2019. Occupational risk for personnel working in veterinary clinics through exposure to vectors of rickettsial pathogens. *Ticks Tick Borne*
- Estrada, I., C. Balagot, M. Fierro, P. Kriner, E. Iniguez-Stevens, A. Kjemtrup, and J. Foley. 2019. Spotted fever group rickettsiae canine serosurveillance near the US-Mexico border in California. *Zoonoses Public Health* 00: 1-8.
- Feria-Arroyo, T. P., I. Castro-Arellano, G. Gordillo-Perez, A. L. Cavazos, M. Vargas-Sandoval, A. Grover, J. Torres, R. F. Medina, A. A. Pérez de León, and M. D. Esteve-Gassent. 2014. Implications of climate change on the distribution of the tick vector *Ixodes scapularis* and risk for Lyme disease in the Texas- Mexico transboundary region. <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/199>.
- Field-Cortazar, J., A. Escárcega-Avila, G. López-Valenci, A. Barreras-Serrano, and L. Tinoco-Gracia. 2015. Seroprevalence and risk factors associated with rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) in humans from Ensenada, Baja California, Mexico. *Gac. Med. Mex.* 151: 38-42.

- Fritz, C. L., P. Kriner, D. Garcia, K. A. Padgett, A. Espinosa, R. Chase, R. Hu, and S. L. Messenger. 2012. Tick infestation and spotted-fever group rickettsia in shelter dogs, California, 2009. *Zoonoses Public Health* 59: 4-7.
- Gordillo-Pérez, G., J. Torres, F. Solórzano-Santos, V. Garduño-Bautista, R. Tapia-Conyer, e O. Muñoz. 2003. Estudio seroepidemiológico de borreliosis de Lyme en la Ciudad de México y el noreste de la República Mexicana. *Salud Pública Mex.* 45: 351-355.
- Harrell, G. 1949. Rocky Mountain spotted fever. *Medicine (Baltimore)* 28: 333-368.
- Hoffman, C. 1925. La fiebre manchada de Choix. *Boletín del Departamento de Salubridad Pública de México* 1925 1: 35-37.
- Licona-Enriquez, J. D., J. Delgado-De La Mora, C. D. Paddock, C. A. Ramirez-Rodriguez, M. Del Carmen Candia-Plata, and G. Á. Hernández. 2017. Case report: Rocky Mountain spotted fever and pregnancy: four cases from Sonora, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97: 795-798.
- López-Pérez, A. M., S. Sánchez-Montes, J. Foley, C. Guzmán-Cornejo, P. Colunga-Salas, E. Pascoe, I. Becker, J. Delgado-de la Mora, J. D. Licona-Enriquez, and G. Suzan. 2019. Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Rickettsia massiliae* in ticks collected from a domestic-wild carnivore interface in Chihuahua, Mexico. *Ticks Tick Borne Dis.* 10: 1118-1123. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.05.018>.
- Luce-Fedrow, A., K. Mullins, A. P. Kostik, H. K. St. John, J. Jiang, and A. L. Richards. 2015. Strategies for detecting rickettsiae and diagnosing rickettsial diseases. *Future Microbiol.* 10: 537-564.
- Medina-Sánchez, A., D. H. Bouyer, V. Alcantara-Rodríguez, C. Mafra, J. Zavala-Castro, T. Whitworth, V. L. Popov, I. Fernandez-Salas, and D. H. Walker. 2005. Detection of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* ticks in the State of Nuevo Leon, Mexico. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1063: 327-332.
- Medrano-Bugarini, R. A., J. V. Figueroa-Millán, B. E. Rivera-Chavira, J. J. Lira-Amaya, C. A. Rodríguez-Alarcón, D. M. Beristain-Ruiz, and J. R. Adame-Gallegos. 2019. Detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in soft ticks and horses at Ciudad Juarez, Mexico. *Southwest Entomol.* 44: 647-657.
- Ojeda-Chi, M. M., R. I. Rodriguez-Vivas, M. D. Esteve-Gasent, A. Pérez de León, J. J. Modarelli, and S. Villegas-Perez. 2019. Molecular detection of rickettsial tick-borne agents in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus yucatanensis*), mazama deer (*Mazama temama*), and the ticks they host in Yucatan, Mexico. *Ticks Tick Borne Dis.* 10: 365-370.
- Ortega-Morales, A. I., E. Nava-Reyna, V. Ávila-Rodríguez, V. H. González-Álvarez, A. Castillo-Martínez, Q. K. Siller-Rodríguez, A. Cabezas-Cruz, F. Dantas-Torres, and C. Almazán. 2019. Detection of *Rickettsia* spp. in *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) collected from free-roaming dogs in Coahuila state, northern Mexico. *Parasites and Vectors* 12: 1-7.
- Pieracci, E. G., J. D. P. De La Rosa, D. L. Rubio, M. E. S. Perales, M. V. Contreras, N. A. Drexler, W. L. Nicholson, J. J. P. De La Rosa, I. H. Chung, C. Kato, et al. 2019. Seroprevalence of spotted fever group rickettsiae in canines along the United States-Mexico border. *Zoonoses Public Health* 66: 918-926. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zph.12642>
- Portillo, A., R. De Sousa, S. Santibáñez, A. Duarte, S. Edouard, I. P. Fonseca, C. Marques, M. Novakova, A. M. Palomar, M. Santos, et al. 2017. Guidelines for the detection of *Rickettsia* spp. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 17: 23-32.

- Prado, R., Q. Rascon, D. Beristain, y J. Adame. 2018. Agente etiológico de la anaplasmosis granulocítica humana en la garrapata café de perro en Chihuahua, México. Salud Publica Mex. 60: 377-378.
- Sosa-Gutierrez, C. G., M. Vargas-Sandoval, J. Torres, and G. Gordillo-Pérez. 2016. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico. J. Vet. Sci. 17: 353-360.
- Tinoco-Gracia, L., H. Quiroz-Romero, M. T. Quintero-Martínez, T. B. Rentería-Evangelista, Y. González-Medina, A. Barreras-Serrano, S. Hori-Oshima, M. H. Moro, and J. Vinasco. 2009. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. Vet. Rec. 164: 59-61.
- Tovar, R. 1944. Clasificación de ectoparásitos encontrados en liebres en el Estado de Nuevo León y Tamaulipas. An. del Inst. de Inv. Científicas.
- Tovar, R. 1945. Rickettsiosis exantemáticas transmitidas por garrapata en América. Revista Medicina México 3: 65-92.
- Yaglom, H. D., W. L. Nicholson, M. Casal, N. C. Nieto, R. Z. Branch, C. Epidemiology, and F. Officer. 2018. Serologic assessment for exposure to spotted fever group rickettsiae in dogs in the Arizona-Sonora border region. Zoonoses Public Health 65: 984-992.
- Yazid, M., R. Abou, P. Fournier, J. Stenos, and S. Vasoo. 2018. A concise review of the epidemiology and diagnostics of rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. J. Clin. Microbiol. 56: 1-10.
- Yu, S., J. Modarelli, J. M. Tomeček, J. T. French, C. Hilton, and M. D. Esteve-Gasent. 2020. Prevalence of common tick-borne pathogens in white-tailed deer and coyotes in South Texas. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 11: 129-135.