



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Análisis molecular de un polipéptido derivado del gen RmS17 de la garrapata
Rhipicephalus (Boophilus) microplus en aislados mexicanos.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

P R E S E N T A

MVZ NAYELY TERESA MARTÍNEZ MAZA

TUTOR PRINCIPAL

DR. RODOLFO ESTEBAN LAGUNES QUINTANILLA

**Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad
(CENID-SAI) – INIFAP**

COMITÉ TUTOR

DR. HÉCTOR QUIROZ ROMERO

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Nacional Autónoma de
México (FMVZ-UNAM).**

DR. RUBÉN HERNÁNDEZ ORTIZ

**Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad
(CENID-SAI) - INIFAP**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Febrero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar mi tesis de maestría a aquellos que estuvieron conmigo para culminar este logro...

Los primeros son mis padres, ustedes me han apoyado para completar cada meta académica que me propongo, nunca limitaron mis sueños, y aunque este a varios kilómetros de distancia siempre los sentí muy cerca de mí, los amo.

José Freddy Martínez Morales

Rosbi Maza Pérez

A mi hermana, posiblemente siempre me pelee contigo, pero también sé que siempre estarás conmigo cuando lo necesite. Te amo too.

Brenda Yazmín Martínez Maza

A mis abuelos, quienes desde pequeña vieron lo inquieta que era, sé que desde el cielo me apoyan y ven todo lo que he logrado.

Elda Morales, Amada Pérez y Jacobo Maza

A mis amigas (mi familia de la CDMX) siempre estuvieron conmigo en los momentos más difíciles y también en los más bonitos.

Ada, Ana Gaby, Elisa, Erika y Narda

Por último, dedico este trabajo al mejor perro, aguantaste no salir a pasear en días de estudio y escribir la tesis.

Chema

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de investigación fue financiado a través del proyecto titulado: “Expresión de un polipéptido recombinante derivado de la proteína RmS17 de *Rhipicephalus microplus* con potencial inmunogénico”, con N° SIGI: 10533234452.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del convenio 718460 por el financiamiento de beca otorgado durante el transcurso de la maestría.

Agradezco también las facilidades prestadas por el Laboratorio de Artropodología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI, INIFAP), en especial a mi tutor el Dr. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla, gracias por su confianza, sus enseñanzas, apoyo y paciencia aportadas para la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a los integrantes de mi comité tutor el Dr. Héctor Quiroz Romero y el Dr. Rubén Hernández Ortiz, gracias por sus comentarios, consejos y aportaciones, que fueron de gran importancia para el desarrollo de esta investigación

Agradezco infinitamente a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar este mi posgrado en esta *alma mater*.

Hago un extenso agradecimiento a la M en C Ninnet Gómez y al M en C Uriel Valdez, gracias por sus enseñanzas y apoyo incondicional en momentos de crisis.

Por último, pero no menos importante, mi más sincero agradecimiento a Citlalli Condado por esa amistad que se formó en menos de un mes, además, agradezco su apoyo para la obtención de algunos aislados de garrapatas necesarios para proyecto.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar un polipéptido derivado de la proteína RmS-17 en 3 cepas y 8 aislados de garrapatas *Rhipicephalus (boophilus) microplus* de México. Se realizó un análisis *in silico* de la proteína completa con el fin de identificar una región de interés que constó de 145 aminoácidos. Se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para la amplificación del polipéptido de interés en cada una de las cepas y aislados, con un amplicón esperado de 435 bp. Los 11 productos obtenidos fueron clonados con el vector de clonación optimizado para secuenciación pCR[®]4-TOPO[®] y los plásmidos transformados en células competente de *E. coli* TOP10[®]. Posteriormente, se seleccionaron al menos 5 clonas positivas para extracción y purificación de plásmidos con fines de secuenciación. Se obtuvo una secuencia consenso para cada una de las 3 cepas y 8 aislados, con las cuales se llevó a cabo una matriz de sustitución con resultados de 99.08 % de identidad para la cepa de referencia “Media Joya” y la reportada en el GenBank (KC990116.1). Las secuencias de las cepas “Vargas”, “Híbrido” y “Huastecas”, además de los aislados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Morelos y Guerrero evidenciaron un 100% de identidad con respecto a la previamente reportada. En cuanto al porcentaje de similitud, en todas las cepas y aislados fue del 100% con respecto a la reportada en el GenBank. En los análisis filogenéticos se observó que todas las cepas y aislados mexicanos analizados se agruparon en el mismo clado que la previamente reportada en Brasil. Estos resultados demuestran un alto grado de conservación en la secuencia que codifica para el polipéptido derivado de la proteína RmS-17 previamente caracterizado.

Palabras clave: garrapatas, Serpina, RmS-17, *Rhipicephalus microplus*, filogenia

ABSTRACT

The aim of this work was to analyze a polypeptide derived from the RmS-17 protein in 3 strains and 8 isolates of *R. microplus* ticks from Mexico. *In silico* analysis of the complete protein was performed in order to identify a region of interest consisting of 145 amino acids. We designed specific oligonucleotides for amplification of polypeptide of interest in each of the strains and isolates, with an expected amplicon of 435 bp. The 11 products obtained were cloned with the cloning vector optimized for sequencing pCR[®]4-TOPO[®] and plasmids transformed into competent *E. coli* TOP10[®] cells. Subsequently, at least 5 positive clones could be selected for plasmid extraction and purification in order to sequence them. Consensus sequence was obtained for each of the 3 strains and 8 isolates, a replacement matrix was carried out with results of 99.08% identity with reference to strain "Media Joya" and the one reported in the GenBank (KC990116.1). The sequences of the strains "Vargas", "Híbrido" and "Huastecas", in addition to the isolates from Campeche, Chiapas, Hidalgo, Morelos and Guerrero showed 100% identity with respect to the sequence previously reported., In all strains and isolates the percentage of similarity was 100% with respect to the information in the GenBank. Phylogenetic analyzes showed that all the Mexican strains and isolates were grouped in the same clade as previously reported isolate from Brazil. These results demonstrate a high degree of conservation in the sequence coding for the polypeptide derived from the RmS-17 protein previously characterized.

Key Word: Serpin, RmS-17, *Rhipicephalus microplus*, conserved regions, phylogenetic relationships.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Generalidades de las garrapatas.....	3
2.2. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
2.3. Importancia económica.....	5
2.4. Ciclo biológico	6
2.5. Distribución geográfica de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	7
2.6. Métodos de control.....	8
2.7. Resistencia de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	10
2.8. Control inmunológico	11
2.9. Desarrollo de vacunas contra garrapatas.....	11
2.10. Serpinas (inhibidores de serina proteasas).....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	16
IV. HIPÓTESIS	17
V. OBJETIVO GENERAL.....	17
5.1. Objetivos específicos.....	17
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1. Análisis <i>in silico</i> de la proteína RmS-17.....	18
6.2. Material biológico.....	20
6.3. Extracción de RNA total	20
6.4. Síntesis de cDNA por RT-PCR	21
6.5. Amplificación de la región de interés y su visualización.....	21
6.6. Clonación.....	22
6.7. Extracción y purificación de plásmidos	23
6.8. Digestión enzimática.....	23
VII. RESULTADOS.....	25
VIII. DISCUSIÓN.....	39
IX. CONCLUSIONES.....	41
X. REFERENCIAS	42
XI. ANEXOS	54
11.1. Índice de cuadros y figuras	54

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies importantes en la ganadería mexicana, la garrapata *Rhipicephalus microplus* genera pérdidas económicas importantes (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017), tanto por sus efectos asociados a depreciación de pieles, pérdidas de peso, disminución en la producción láctea, anemia severa y muerte, así como por la transmisión de patógenos causantes de Babesiosis y Anaplasmosis (De La Fuente y Kocan, 2006).

Derivado de esto se han implementado diversas estrategias de control; siendo el control químico basado en la aplicación de ixodicidas el más utilizado por su alto porcentaje de letalidad y efectividad para reducir el número de garrapatas sobre los animales (Ostfeld *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayor desventaja de este control radica en la generación de cepas multirresistentes a las familias químicas disponibles a la fecha (George *et al.*, 2004), por lo que es necesario la búsqueda de nuevas alternativas de control como las vacunas contra garrapatas (de la Fuente y Kocan, 2003). En la actualidad existe una vacuna comercial (Bovimune Ixovac®) para el control de la garrapata *R. microplus*, con base en la proteína recombinante Bm86. Sin embargo, García-García y colaboradores (1999), observaron que existía una disminución en la eficacia de esta vacuna frente a cepas de garrapatas de *R. microplus* de distintas regiones geográficas, asociado a variaciones en la secuencia de aminoácidos (de la Fuente *et al.*, 2000).

En la búsqueda de nuevos candidatos a vacunas se han estudiado diversas proteínas secretadas y/o localizadas en glándula salival, cemento, intestino y ovarios de las garrapatas (de la Fuente *et al.*, 1996; de La Fuente *et al.*, 1998; Pal *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2009; de la Fuente *et al.*, 2006; Canales *et al.*, 2009; Labuda *et al.*, 2006; Narasimhan *et al.*, 2007; Mulenga *et al.*, 2007; Almazan *et al.*, 2010; Shuijit *et al.* 2011; Tirloni *et al.*, 2016). Dentro de las proteínas candidatas se encuentran las serpinas, proteínas que cuentan con sitios conservados y presentan funciones importantes en el sistema inmune, respuesta inflamatoria, fibrinólisis y coagulación sanguínea (Ye *et al.*, 2001). En otras especies de garrapatas se han desarrollado inmunógenos basados en serpinas como RaS-1 y RaS-2 de

Rhipicephalus appendiculatus (Immamura *et al.*, 2006), así como, la serpina 1 de *Haemophysalis longicornis* (HLS1) (Immamura *et al.*, 2005). En la especie *R. microplus* se han identificado 22 serpinas (Rodríguez-Valle *et al.*, 2015; Tirloni *et al.*, 2014), dentro de las cuales la serpina RmS-17 presenta características que sugieren podría ser un candidato vacunal, como su expresión en varios órganos de la garrapata y funciones importantes en la coagulación sanguínea y respuesta inmune del hospedador. Así mismo, en experimentos realizados con suero policlonal, obtenido de la aplicación de una proteína recombinante de RmS-17 en conejos el cual fue incubado junto a la proteasa diana y la serpina, se observó una disminución de la función inhibitoria de la serpina (Tirloni *et al.*, 2016). Lo anterior, sugiere que los anticuerpos funcionales producidos durante la inmunización podrían bloquear la función inhibitoria de la serpina durante la alimentación de la garrapata, interfiriendo en la modulación de las funciones de esta serpina como la alimentación y el desarrollo. Por consiguiente, al estudiar la diversidad genética de la proteína RmS-17 en cepas y aislados locales y/o nacionales de garrapatas *R. microplus* permitirá desarrollar un inmunógeno potencial con base en regiones conservadas con mínima variabilidad.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de las garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados debido a que necesitan del consumo de sangre para poder completar su ciclo. Pertenecen al orden *Ixodida* que se compone por tres familias: A) *Ixodidae*: también llamadas “garrapatas duras” debido a la presencia de un escudo quitinizado que cubre parcialmente el dorso en las hembras y completamente en los machos, el gnatosoma se encuentra en la posición anterior en todos los estados evolutivos y presentan dimorfismo sexual (Fig.1A); B) *Argasidae*: no presenta escudo dorsal por lo que son llamadas “garrapatas blandas”, el dimorfismo sexual no es evidente y el gnatosoma se encuentra ventralmente en ninfas y adultos (Quiróz, 1990); C) *Nuttalliellidae*: familia de garrapatas que comparte ciertas características morfológicas con las otras dos familias, descrita a partir de una sola hembra repleta descubierta en el sur de África (Bedford, 1931).

Al inicio de la alimentación se unen al hospedador cortando la piel con los quelíceros y se anclan al tejido mediante el hipostoma dentado, ambos localizados en el gnatosoma o *capitulum* de la garrapata (Fig. 1B y 1C). A diferencia de las garrapatas blandas, las hembras de las garrapatas duras llegan a alimentarse hasta por 7 a 12 días y multiplican hasta 100 veces su tamaño, mientras que la alimentación de los machos es intermitente durando de semanas hasta meses; las larvas y ninfas se alimentan por periodos cortos hasta la muda (Polanco-Echeverry, 2016).

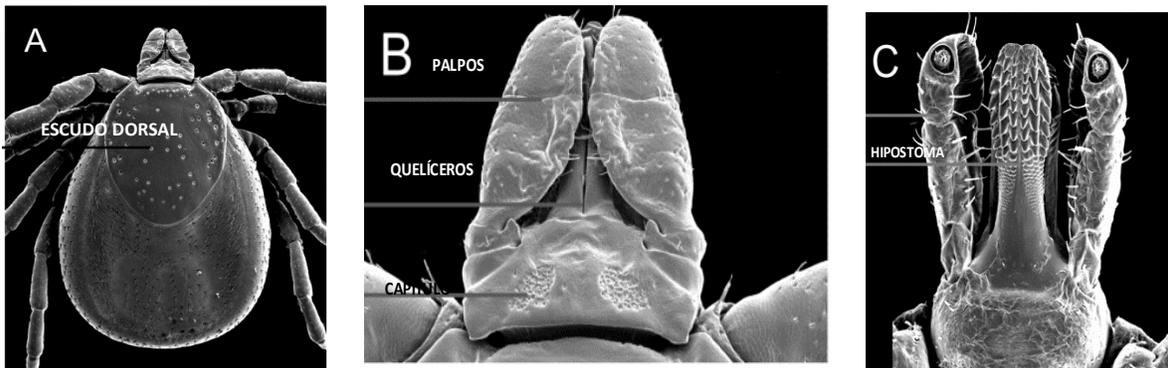


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de garrapata hembra de la familia *Ixodidae*. A: vista dorsal, donde se aprecia el escudo o protección dorsal característico de las garrapatas duras (*Ixodidae*). B: acercamiento del capítulo, quelíceros y palpos en una vista dorsal. C: acercamiento del hipostoma dentado de la familia *Ixodidae* visto de manera ventral. (Estrada-Peña, 2015).

2.2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Esta especie de garrapata fue descrita por primera vez por Canestrini en 1887 como *Boophilus microplus*, sin embargo, para 2004, Barker y Murrell utilizando secuencias de DNA mitocondrial (12s rRNA, 16s rRNA y Citocromo-C Oxidasa I) para evaluar la filogenia y evolución de las especies *Boophilus* spp y *Rhipicephalus* spp, encontraron que las garrapatas del género *Boophilus* spp. estaban estrechamente relacionadas con la especie *Rhipicephalus bursa*, introduciendo a *Boophilus* spp como subgénero de *Rhipicephalus* spp. (Cuadro 1). Beati y Keirans en 2001, estudiaron la relación sistemática entre las garrapatas de ambos géneros usando RNA ribosomal 12S y las características morfológicas de las garrapatas, concluyendo que, si bien el análisis morfológico demuestra una diferencia morfológica entre los géneros, en el análisis molecular se observó una estrecha relación

Cuadro. 1. Clasificación taxonómica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Datos obtenidos de Genome Assembly and Annotation report, National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Phylum	<i>Arthropoda</i>
Subphylum	<i>Chelicerata</i>
Clase	<i>Arachnida</i>
Subclase	<i>Acari</i>
Super orden	<i>Parasitiformes</i>
Orden	<i>Ixodida</i>
Super familia	<i>Ixodoidea</i>
Familia	<i>Ixodidae</i>
Subfamilia	<i>Rhipicephalinae</i>
Género	<i>Rhipicephalus</i>
Subgénero	<i>Boophilus</i>
Especie	<i>microplus</i>

2.3. Importancia económica

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten han sido consideradas como limitantes de la industria del ganado bovino en el mundo (Cortés-Vecino, 2011). Los efectos causados por las infestaciones representan uno de los principales problemas que repercuten en la salud y productividad del ganado bovino en las regiones donde se distribuye este ectoparásito (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018). Estos efectos negativos se encuentran divididos en dos, los directos como la falta de apetito, anemia severa, depreciación de las pieles afectadas, disminución de la producción láctea y la consecuente muerte; y los efectos indirectos donde al momento de que la piel es lesionada, puede ser posible la transmisión de patógenos causantes de enfermedades como Babesiosis y Anaplasmosis, los cuales pueden conducir a cuadros agudos, crónicos o incluso a la muerte de los animales (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005).

En consideración con la población en riesgo de infestación con la garrapata *R. microplus*, se realizó un estimado de las pérdidas económicas potenciales en ganado lechero con \$ 68 millones de dólares, tomando en cuenta las pérdidas de leche aproximadas evaluadas en litros, en correlación con el costo estimado en

dólares, para la producción de un litro de leche. En lo que corresponde al ganado de carne se estimaron cerca de \$ 573 millones de dólares en pérdidas económicas potenciales, con respecto a la pérdida de peso en gramos, por garrapata por bovino asociado con el costo en dólares, para la producción de un kilogramo de carne (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

2.4. Ciclo biológico

Las garrapatas presentan cuatro estados evolutivos en su ciclo vital: huevo, larva, ninfa y adulto. La transformación entre un estado y otro requiere de una o más mudas, además de condiciones de temperatura y humedad adecuadas. En general el desarrollo las garrapatas requiere de uno hasta tres hospedadores (Anderson & Magnarelli, 2008); aunque *R. microplus* necesita a un solo hospedador para poder llevar a cabo su ciclo biológico, el cual se encuentra dividido en 2 etapas: fase de vida libre o fase no parasítica y fase parasítica (Fig. 2) (Quiroz, 1990).

La fase parasitaria puede completarse en 3 a 4 semanas, sin embargo, la duración del ciclo puede extenderse durante la fase libre, en donde las larvas sin alimentar pueden llegar a vivir más de 240 días hasta encontrar un hospedador adecuado (Quiroz, 1990). La fase parasitaria es relativamente constante, teniendo un promedio entre 23 a 25 días desde el momento en el que la larva infestante encuentra al hospedador hasta que la hembra adulta repleta cae al suelo y busca un lugar adecuado (28°C de temperatura y un 90% de humedad relativa aproximadamente) para ovopositar una sola masa de huevos (2000 – 3000 huevos), que darán lugar a una nueva generación de larvas (Jonsson, 1997).

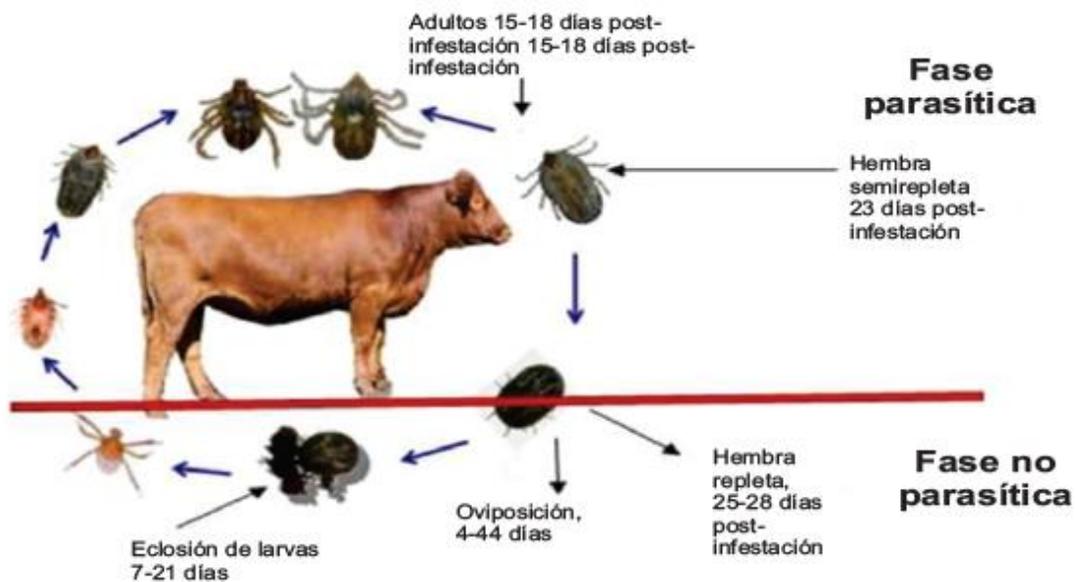


Figura 2. Ciclo de vida de la garrapata *R. microplus* (Cantú-Covarrubias y García-Vázquez, 2013).

2.5. Distribución geográfica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, debido al hecho de ser transmisoras de enfermedades como Babesiosis y Anaplasmosis es considerada como la garrapata de mayor importancia económica para el ganado bovino en México, Centro y Sudamérica y Australia (Quiroz, 1990).

En México, los Estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California, Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur están reconocidos oficialmente como libres del ectoparásito. La superficie libre comprende 599,367.84 km cuadrados, es decir, el 30.60% del territorio nacional. En fase de erradicación se encuentran los Municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; así como los municipios de la zona Desierto del Estado de Coahuila: Cuatro ciénegas, Ocampo y Sierra Mojada. Estos municipios abarcan una superficie en erradicación de 67,472.76 km cuadrados, que corresponde al 3.44% del territorio

nacional. El resto del país comparte regiones en control y zonas libres naturales de garrapata *R. microplus*, donde la superficie en control comprende 1, 292, 407.02 km cuadrados, con el 65.96% del territorio nacional (Fig. 3) (SENASICA-SADER, 2020).

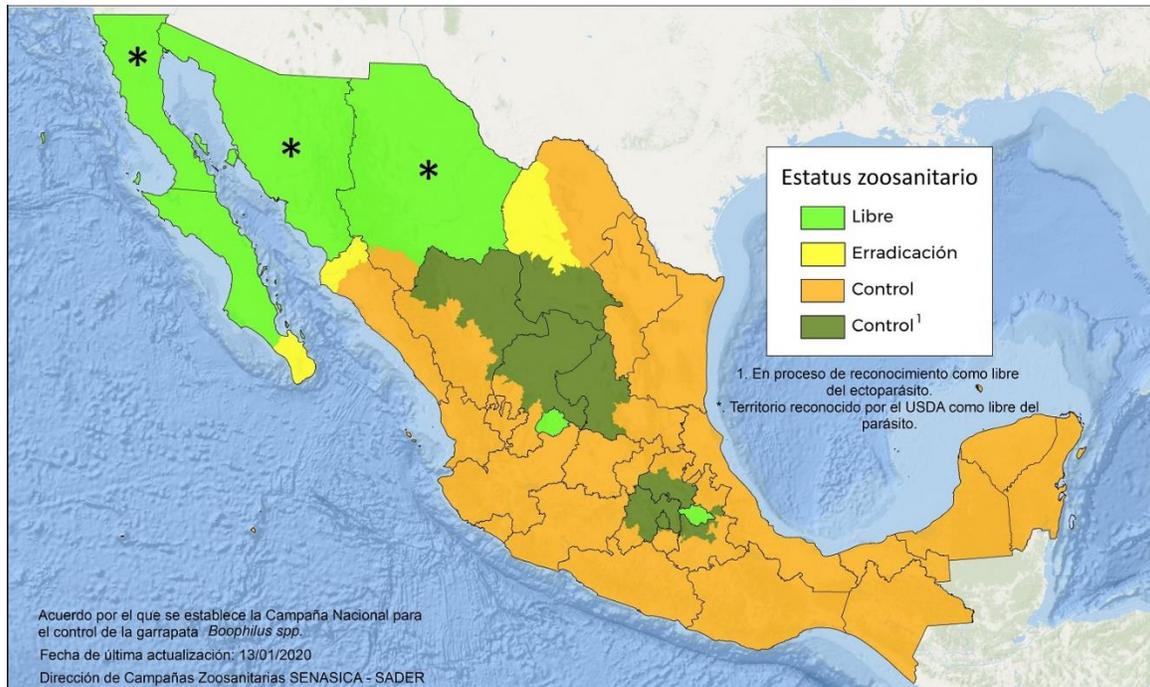


Figura 3. Situación actual del estatus zoonosario de la garrapata *R. microplus* a nivel nacional (SENASICA-SADER, 2020).

2.6. Métodos de control

Con el fin de disminuir los efectos que causan la infestación de garrapatas se han implementado varios métodos de control: el cultural, la selección de razas resistentes, el control biológico y el control químico.

El control cultural, basado en las buenas prácticas de manejo. Este método puede combinarse con rotación de potreros y la elección de especies forrajeras que interfieren con la etapa del encuentro entre garrapata y hospedador (Muro *et al.*, 2003; Fernández, *et al.*, 2004).

La selección de razas resistentes se asocia a una mayor resistencia a la infestación frente a garrapatas en la raza *Bos indicus*; estudios anteriores se ha evidenciado que las razas pertenecientes a la estirpe *Bos indicus* pueden tener entre un 10 a 20% menos garrapatas en comparación con aquellas pertenecientes a la estirpe *Bos taurus* (Urquhart, *et al.*, 2001; Jonsson, 2006). Algunos autores asocian esta resistencia con una reacción de hipersensibilidad, consistente con la infiltración de eosinófilos, degranulación de basófilos, además de la liberación y concentración de histamina en el sitio de fijación de la garrapata (Pipper, 2008).

El control biológico se enfoca en el reconocimiento y la evaluación de predadores como enemigos naturales de las garrapatas, entre ellos las aves insectívoras, las avispa parasitoides, los nematodos, la bacteria *Bacillus thuringiensis* y los hongos deuteromicetos (Samish, *et al.*, 2004; Ostfeld, *et al.*, 2006).

El control químico es el principal método para reducir las poblaciones de garrapatas; típicamente son muy letales para las garrapatas, donde las aplicaciones en el campo generalmente son bastante efectivas para reducir el número de garrapatas (Stafford y Kitron 2002). En México, con el objetivo de disminuir la presencia de lotes de ganado con garrapata *R. microplus* en las estaciones cuarentenarias de exportación, se estableció un protocolo específico de preparación en ganado para la exportación a los Estados Unidos (Sáenz-Pardo y Hernández-Ortiz, 2012). Este protocolo de tratamiento garrapaticida se basa en la aplicación de tres de las 6 familias de ixodicidas existentes en el mercado (organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazolonas e inhibidores del desarrollo) en el día uno, día 28 y un día antes del desembarque (DOF, 1995).

Los ixodicidas cuentan con un sitio diana en el sistema nervioso de la garrapata provocando en su mayoría excitación y temores hasta causar la muerte (la enzima acetil colinesterasa en el caso de los organofosforados, los canales de sodio para los piretroides, la octopamina para las amidinas, los receptores de glutamato para las lactonas macrocíclicas y los canales de cloro para las fenilpirazolonas) (Aguilar, *et al.*, 2018). Por otro lado, los inhibidores del desarrollo interfieren en la formación de quitina impidiendo la muda entre las fases de desarrollo (Benavides, 2017).

El control enfocado en los ixodicidas químicos cuenta con varias desventajas entre las que se encuentran la contaminación de productos y subproductos de origen animal (bovino), además de alteraciones al medio ambiente (George, *et al.*, 2004). Aunque la principal desventaja que enfrenta el control químico es que su uso indiscriminado ha provocado la selección de poblaciones de garrapatas resistentes (George, 2008).

2.7. Resistencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

La resistencia se define como la detección de un aumento significativo de individuos dentro de una misma especie y población de parásitos capaces de tolerar dosis de químicos que han probado ser letales para la mayoría de los individuos de la misma especie (Nari y Hansen, 1999).

El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo que aparece por selección genética (Lee, *et al.*, 1999). Cuando un ixodicida es utilizado de forma intensiva, ocasiona una fuerte presión de selección que elimina los individuos susceptibles y el ixodicida se convierte así en el agente de selección más importante (Alonso-Díaz, 2006).

El desarrollo de la resistencia se divide en tres fases: establecimiento (surge el alelo resistente en una población, este proceso se produce por mutaciones naturales e independiente de la presión genética), fase de desarrollo (es el aumento de número de individuos resistentes, ocurre por la tasa de sobrevivencia preferencial sobre los individuos susceptibles después del uso de productos químicos), y por último la fase de emergencia (ocurre por una elevada tasa de presión de selección, es una fase corta y el alelo resistente es lo suficientemente común para manifestar una reducción en la efectividad del ixodicida) (Fragoso y Soberanes, 2001).

En el año de 1981 se reportó el primer caso de resistencia a ixodicidas en México, observándose una resistencia a organofosforados en garrapatas de la especie *R. microplus* en el Estado de Tuxpan, Veracruz (Ortiz, *et al.*, 1995). De esta manera,

con el transcurso de los años, la implementación de nuevos ixodídeos químicos y su mal uso desencadenaron el surgimiento de cepas multirresistentes.

2.8. Control inmunológico

El control inmunológico se basa en la utilización de vacunas que contienen antígenos específicos, siendo posible y factible ya que producen una protección inmunológica en los animales que se ve reflejada en la reducción de las funciones vitales de los ectoparásitos (Willadsen, *et al.*, 1988; Merino, *et al.*, 2011).

En el desarrollo de vacunas para el control de garrapatas, se han utilizado dos tipos de antígenos. Los primeros son antígenos convencionales, secretados a través de la saliva de las garrapatas durante su fijación y alimentación en el hospedador, estos son llamados antígenos “expuestos”, Por lo general, son proteínas o péptidos sintetizados en las glándulas salivales. Estos antígenos son recogidos por las células dendríticas del hospedador, que los procesan y los presentan a los linfocitos T, cebando una respuesta inmune mediada por anticuerpos o células (Nuttall, *et al.*, 2006).

En contraste, los antígenos “ocultos” generalmente no tienen contacto con los mecanismos inmunitarios del hospedador (Willadsen, *et al.*, 1988). Los antígenos ocultos típicos son aquellos que se encuentran en la pared intestinal de la garrapata e interactúan con inmunoglobulinas específicas absorbidas durante la alimentación de la garrapata. Sin embargo, cualquier antígeno que normalmente no se presenta al hospedador es un antígeno oculto, y es un candidato potencial a vacuna sí: a) interacciona con inmunoglobulinas que ingresan en la hemolinfa y b) se asocia con alguna función biológica para la garrapata (Nuttall, *et al.*, 2006).

2.9. Desarrollo de vacunas contra garrapatas

En la búsqueda de nuevos candidatos a antígenos vacunales que confieran protección inmune y presenten regiones conservadas con mínima variabilidad y potencial antigénico se han desarrollado investigaciones en la identificación de proteínas de garrapata que desempeñan un papel clave en la biología del

ectoparásito, como la adquisición y digestión de sangre y la modulación de la respuesta inmune del hospedador (Mulenga *et al.*, 2001).

El desarrollo de vacunas como método de control, se enfoca en antígenos específicos, debido a que producen protección inmunológica en los animales, afectando las funciones vitales de los artrópodos (Willadsen, 2001). Hoy en día, las vacunas disponibles comercialmente están dirigidas hacia los antígenos ocultos (Almazán *et al.*, 2012). Algunos antígenos ocultos han sido aislados como posibles candidatos vacunales, entre ellos están los que han sido extraídos de la garrapata *R. microplus* como Bm95, Bm91, Vitelogenina, ATAQ y el más conocido Bm86 (Willadsen *et al.*, 1996; García- García *et al.*, 2000; Almazan *et al.*, 2006; Rangel-Aguirre *et al.*, 2016).

En 1989 fue desarrollado el primer antígeno vacunal contra la garrapata *R. microplus*, aislado de la membrana plasmática de células epiteliales del intestino, clonado mediante tecnología recombinante y expresado en *E. coli* en Australia (Willadsen, *et al.*, 1989), siendo comercializado como Tick-Gard® (Willadsen, *et al.*, 1995). Posteriormente, esta proteína fue expresada utilizando el sistema de *Pichia pastoris* teniendo altos niveles de expresión y pureza con resultados alentadores, a la cual se le nombró Gavac® (Rodríguez, *et al.*, 1994). En México existe una vacuna comercializada como el nombre de Bovimune Ixovac®; también basada en la proteína recombinante Bm86 tomada del germoplasma de una cepa mexicana de *R. microplus*, y clonada en el vector de expresión *Pichia pastoris* (Lapisa, 2019). Esta proteína es capaz de reducir el peso, la capacidad reproductiva y la oviposición de las garrapatas de la especie *R. microplus* (Suárez-Pedroso, *et al.*, 2007). Sin embargo, la eficacia de estas vacunas se ve limitada ante el polimorfismo del gen codificador según la zona donde se localiza la cepa de garrapata teniendo en algunos casos un efecto nulo, de forma que se ha estimado que una diferencia mayor o igual a 2.8% de la secuencia que codifica para Bm86 podría ser suficiente para causar una respuesta inmune ineficaz (García-García *et al.*, 1999).

2.10. Serpinas (inhibidores de serina proteasas)

Las serpinas son una superfamilia de proteínas de entre 350 y 500 residuos de aminoácidos con pesos moleculares que varían de 40 a 60 kDa y poseen estructuras similares que fueron identificadas en un principio por su inhibición de serina proteasa (Gettins, 2002).

Presentan características que sugieren podrían ser un candidato vacunal, debido a que son conocidas por regular procesos celulares como la coagulación sanguínea, inflamación y activación del complemento, desempeñando un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis (Tirloni *et al.*, 2016).

Se caracterizan por tener residuos que se pliegan en un solo dominio compuesto por tres hojas β , y 8 o más hélices α ; dentro de las hojas β se localizan dos regiones funcionalmente importantes para el mecanismo de la serpina, la brecha y el shutter. Para funcionar como un inhibidor de la proteasa, es crítico un bucle expuesto, denominado el sitio central reactivo (RCL) (Ye *et al.*, 2001; Law *et al.*, 2006; Gettin and Olson, 2016) (Fig. 4). El RCL también hace interacciones temporales con el resto de la estructura y por lo tanto es sumamente flexible (Stein *et al.*, 1990).

En artrópodos la primera serpina caracterizada fue en el gusano de seda (*Bombix mori*), la cual inhibe la tripsina y quimotripsina (Sasaki, *et al.*, 1990). En garrapatas se han caracterizado diversas serpinas como IRIS e Irs2 en *Ixodes ricinus*, RaS1, RaS2 y RaS4 en *Rhipicephalus appendiculatus*, AAS27 en *Amblyoma americanum*, entre muchas otras, cuya función en la mayoría de estas serpinas se enfoca en la coagulación sanguínea y la respuesta inmune del hospedador (Meekins, *et al.*, 2016; Tirloni, *et al.*, 2019).

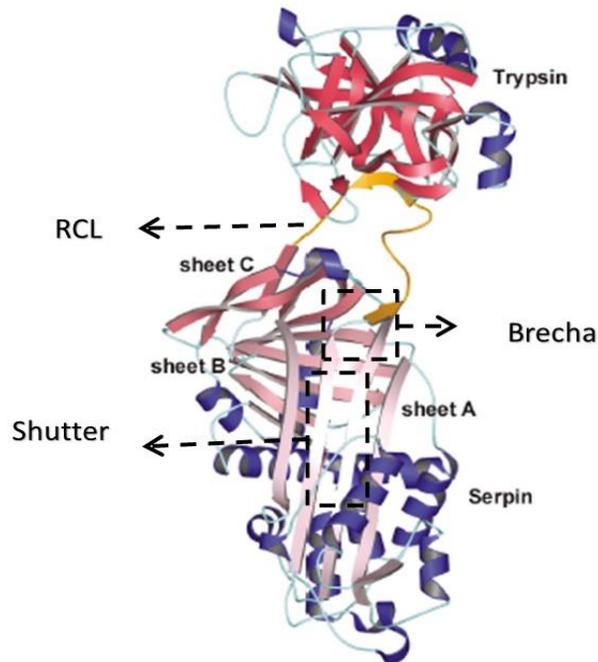


Figura 4. Ejemplo de la estructura de una serpina de la especie *Lepidoptera* y la unión con tripsina mediante el RCL para su inhibición (Ye *et al.*,2001).

Consensus	VNEEGTEAAAXTXXX	-----	XXXXXXXXXX	-X-XXXFXVDHPFX
RmS-1	VNEEGTEAAAATAVM	----	MAACCLSSAP	-PQTYKFIVDRPFM
RmS-2	VNEEGTEAAAATAVT	----	LMFYCAR	----IDDTRFVVDHPFL
RmS-3	VNEEGTIATAVTGLG	----	FVPLSAHYN	-PPPIIEFTVDHPFI
RmS-4	VNEEGTIAAAVTGLF	----	VMSSSLYE	-PPPIFFTVDHPFL
RmS-5	VSEQGTVAAAVTAIR	----	VSVKSGKSAGL	PPISFRVEHPFA
RmS-6	VNEEGTEAAAVTGV	----	GVNRIGIEP	----FLFTADHPFL
RmS-7	VDEKGTAAVALSSGI	----	VRHKTTPGGE	----VEFKADHPFL
RmS-8	VNEEGTEAAAATAVV	----	MGGCSANM	--VIEKKEFVVDHPFM
RmS-9	LDEEGSEADSATLLR	----	ISGKAEEGE	----SVVADHPFI
RmS-10	VNEEGTVAAAVTGLF	----	VRETAPLPE	-PPPILEFVVDHPFL
RmS-11	VNEEGTEAAAATAVM	----	MVACCMSSLP	-PRTYKFIVDRPFM
RmS-12	VDEDGVEG--LFLTP	----	LIMCYAGVS	----FNYNVNRPFM
RmS-13	VDEVGTRAVAAATQAO	----	FVSKSLVHFK	----QFTVDRPFEL
RmS-14	VDEEGTEAAAATAVA	----	GAGSAAPAA	--TQTTEFLVDHPFM
RmS-15	VNEEGSEAAAVTGFV	----	IQRTAAAFVT	PPPLPKVYVDHPFI
RmS-16	VNEEGSEAAAVTGV	----	INTRTTTGP	----SEIHVDRPFEL
RmS-17	VNEEGSEAAAGATAVI	----	FYTKBAAVG	----IPFVVDHPFL
RmS-18	VNEEGTEAAAATGMV	----	AMRCASMG	----IPFSVDHPFM
RmS-19	VDEEGTEAAAATVDI	----	GVGAATPPRE	-VLRTHFVVDHPFM
RmS-20	VNEEGTEAASATALD	----	MCQCAALD	----QTVFIVNRPFM
RmS-21	LTTKGGPSPPGFSTLLS	--	VCSTIPPNEP	----VRFVVDRPFV
RmS-22	TSEEGVGEATKPEP	----	LDASVIT	-----FRANRPFEL

Figura 5. Homología del sitio central reactivo (RCL) en diferentes serpinas de la garrapata *R. microplus*. (Rodríguez-Valle *et al.*, 2015). La región señalada con líneas punteadas se refiere al enlace escindible, el cual le brinda especificidad a las serpinas frente a la proteasa blanco para realizar su función inhibitoria (Gettins, 2002).

En la garrapata *R. microplus* se expresan 22 serpinas (Fig. 5) (Rodríguez-Valle, *et al.*, 2015). Dentro de éstas, la serpina 17 (RmS-17) se logró identificar en distintos órganos de la garrapata *R. microplus* como: glándulas salivales, intestino medio, ovarios y la carcasa (remanente de tejido después de la disección de órganos). Esta proteína cuenta con funciones importantes en la inhibición de la coagulación sanguínea y la modulación de la inhibición de la respuesta inflamatoria del hospedador. Por otra parte, en un estudio donde se realizó la incubación de la proteasa diana, la serpina RmS-17 y suero policlonal anti-RmS-17 obtenido mediante la aplicación de una proteína recombinante de RmS-17 en conejos, resultó en el bloqueo de la función inhibitoria de la serpina (Tirloni, *et al.*, 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de ixodicidas en México para control de la garrapata *Rhipicephalus microplus* repercute en la toxicidad hacia los mamíferos, residuos en productos y subproductos derivados de los bovinos, además de la selección de garrapatas resistentes. Se han implementado diversos métodos alternativos de control, como la utilización de antígenos recombinantes. En el mercado existe una vacuna comercial (Bovimune Ixovac[®]) basada en la proteína recombinante Bm86, sin embargo, su eficacia se ve limitada por la presencia de polimorfismos en el gen codificador de la proteína entre cepas de garrapatas geográficamente distantes (García-García, *et al.*, 1999); cabe recalcar que en un estudio realizado en México se observó una variación en la secuencia de aminoácidos de hasta 7.4% (Martínez-Arzate, *et al.*, 2019). Como consecuencia, se ha propuesto la búsqueda de nuevas proteínas candidatas a antígenos vacunales, que además de tener un papel clave en la supervivencia del artrópodo y conferir una respuesta inmune adecuada, este basado en regiones conservadas.

La serpinas son proteínas altamente conservadas en esta especie, involucradas en la alimentación, reproducción y respuesta inmune (Ye, *et al.*, 2001). En la garrapata *R. microplus* la serpina RmS-17, presenta características que sugieren podría ser un candidato vacunal (Tirloni, *et al.*, 2016). Hoy en día con la utilización de la vacunología inversa, bioinformática y proteómica se ha logrado la identificación y caracterización de proteínas y péptidos como posibles candidatos a antígenos vacunales. Por lo cual, el estudio de la diversidad genética a partir de aislados locales y/o nacionales de un fragmento de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus* con base en regiones conservadas permitiría el desarrollo de un inmunógeno con mínima variabilidad y potencial antigénico.

IV. HIPÓTESIS

Las secuencias codificantes de un polipéptido derivado del gen RmS-17 de diversos aislados mexicanos de garrapatas *R. microplus*, presentan una identidad y similitud mayor o igual al 97%, con respecto a la proteína RmS-17 disponible en el GenBank (ID: KC990116.1).

V. OBJETIVO GENERAL

Analizar un polipéptido derivado de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus*, en diferentes cepas y aislados de México, con el fin de comparar las secuencias codificantes obtenidas y estudiar las relaciones filogenéticas que existen con respecto a la cepa previamente caracterizada.

5.1. Objetivos específicos

1. Analizar *in silico* la secuencia de aminoácidos de la proteína RmS-17 y seleccionar una región de interés con características antigénicas (ID: KC990116.1).
2. Amplificar la región de interés del gen RmS-17 a partir de 8 aislados y 3 cepas mexicanas de la garrapata *R. microplus* mediante la técnica de PCR punto final y clonar con fines de secuenciación.
3. Determinar el grado de homología que existe entre las secuencias codificantes obtenidas, con respecto a la proteína RmS-17 previamente reportada.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Análisis *in silico* de la proteína RmS-17

Previamente el grupo de investigación del laboratorio de Artropodología del CENID-SAI, INIFAP, realizó un análisis *in silico* de la proteína RmS.17, en el cual se utilizaron distintos programas bioinformáticos para este análisis (Cuadro 2). Se llevó a cabo la búsqueda de las secuencias reportadas para la proteína de RmS-17 en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), con ella se realizó la selección de una región de interés localizada entre los aminoácidos 215 y 359 de la proteína completa, fragmento donde se localiza el sitio central reactivo, sitio de importancia funcional que confiere la propiedad inhibitoria a las serpinas. Se utilizó el fragmento seleccionado con el fin de predecir características antigénicas mediante diferentes algoritmos bioinformáticos. Para realizar los análisis de la estructura secundaria, se buscaron regiones hidrofóbicas utilizando la herramienta Protscale, regiones transmembranales con la herramienta TMHMM, presencia del péptido señal utilizando SignalP 4.1 y búsqueda de dominios funcionales haciendo uso de las herramientas Pfam y SMART. La predicción de epítomos de células B se analizó con diferentes algoritmos bioinformáticos, buscando dentro de la secuencia de aminoácidos características de un epítomo B como: Hidrofilicidad (Antigenic Plot), Antigenicidad (EMBOSS Antigenic) y epítomos lineales de células B (Bepipred 2.0 y BCELL/IEDB Analysis Resource). La predicción de la estructura secundaria y terciaria de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo utilizando los programas Psipred y I-Tasser, SWISS-MODEL y Phyre2 respectivamente haciendo modelaje por homología. Los modelos se obtuvieron del RCSB: *Protein Data Bank* (RCSB PDB) y fueron analizados con el programa Chimera para predecir la mejor estructura. Una vez localizada la secuencia de interés se diseñaron oligonucleótidos específicos mediante el programa

Oligoanalyzer para su síntesis. La representación personalizada del polipéptido derivado de la proteína RmS-17 se llevó a cabo mediante el servidor Protter.

Con las secuencias consenso obtenidas de cada una de las cepas y aislados se realizó un análisis de alineamiento múltiple con los programas CLUSTAL W, UGENE, MUSCLE y T-Coffe utilizando métodos progresivos e iterativos con la finalidad de comparar los resultados y evaluarlos para tener el mejor alineamiento. Finalmente se identificó el grado de identidad/similitud y la localización de zonas conservadas.

Cuadro 2. Sitios web empleados para el análisis <i>in silico</i>.		
Principales funciones	Nombre del programa	Sitio web
Péptido señal	SignalP- 4.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Análisis de alineamiento múltiple	CLUSTAL W	http://www.Genome.jp/tools/clustalw/
	UGENE	http://ugene.net/
	MUSCLE	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle
	T-Coffe	http://tcoffe.crg.cat/
Región transmembranal	TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
Hidrofobicidad	ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/
	P-fam	https://pfam.xfam.org/
Dominios funcionales	SMART	http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?DOMAIN=MIT
	EMBOSS	http://www.bioinformatics.nl/cgi-in/emboss/antigenic
Análisis de epítotos	Bepipred 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/
	Antigenic plot	http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl
	BCELL/IEDB	http://tools.iedb.org/main/bcell/
Estructura secundaria	Psipred	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
Estructura terciaria	I-Tasser	https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/
	SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/
	Chimera	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html
Diseño de primers	OligoAnalyzer	https://www.idtdna.com/calc/analyzer
Representación de la proteína	Protter	http://wlab.ethz.ch/protter/#
Simulación de amplificación y electroforesis	SnapGene®	https://www.snapgene.com/
Construcción filogenética	Mega 7	https://www.megasoftware.net/

6.2. Material biológico

Se utilizaron garrapatas hembras adultas repletas de la cepa de referencia denominada “Media Joya” proveniente de Tapalpa, Jalisco, México, la cual fue establecida en el CENID-SAI desde 2001; cepa “Vargas” proveniente de Aldama, Tamaulipas; cepa “Híbrido” (hibrido de la cepa “Media Joya” y “Canoas”) y “Huastecas” (cepa con antecedentes de resistencia a ivermectina) proveniente de Aldama, Tamaulipas, las dos últimas son parte del germoplasma establecido en el CENID-SAI. Además, se utilizaron aislados de garrapatas *R. microplus* colectadas en los municipios de Candelaria, Campeche; Pijijiapan, Chiapas; Xochicoatlán, Hidalgo; Lolotla, Hidalgo; Jonacatepec, Morelos; Tepalcingo, Morelos y Juan Ranulfo Escudero, Guerrero.

6.3. Extracción de RNA total

Se llevó a cabo una disección de hembras adultas repletas (glándula salival, túbulos de Malpighi e intestino), realizando un corte de forma longitudinal dorsal con la ayuda de un bisturí y un microscopio estereoscópico. Se realizaron lavados con PBS 1X frío estéril, con el fin de tener una mejor visibilidad de los órganos. El aislamiento de RNA total se realizó mediante el método Trizol[®]. Los órganos diseccionados se colocaron en 1 ml de Trizol[®]; posteriormente se centrifugó la muestra para recuperar el sobrenadante, se adicionó cloroformo con el fin de obtener tres fases (acuosa, interfase y orgánica); la fase acuosa fue recuperada, agregando 1 ml de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Una vez homogenizado, se centrifugó la muestra para obtener así el pellet de RNA total. Con el fin de limpiar los restos de alcoholes restantes se hicieron dos lavados con etanol al 75% tratado con H₂O DEPC. Finalmente, el pellet de RNA total se resuspendió en 18 µL de H₂O DEPC y se determinó la concentración mediante la técnica de espectrofotometría con un Nanophotometer[®].

6.4. Síntesis de cDNA por RT-PCR

La síntesis del DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo a partir del RNA total de los órganos diseccionados, utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific™), mediante la técnica denominada RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*; Reacción en Cadena de la Polimerasa -Transcripción Reversa). Cada reacción contenía: 5 µg de RNA total, 5 µM de Oligo dT, agua libre de DNAsas, 1X Buffer de reacción, 1 U/µl de RiboLock RNase inhibitor, 1 mM dNTP Mix, 10 U/µl de RevertAid M-MuLV RT en un volumen final de 20 µL. La concentración de cDNA obtenido se llevó a cabo mediante la técnica de espectrofotometría con Nanophotometer®.

6.5. Amplificación de la región de interés y su visualización

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos de microcentrífuga de pared delgada usando: 1X PCR buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.6 mM de dNTPs, 2 U/µl de platinum Taq polimerasa (*Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase*), 2 µM de oligonucleótidos y 100 ng de cDNA, en un volumen final de 25 µl. La amplificación del fragmento de interés se llevó a cabo mediante la técnica de PCR punto final con protocolos ya establecidos en la Unidad de Artropodología del CENID-SAI, INIFAP (Fig. 6). Posteriormente, los amplicones obtenidos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris, Borato, EDTA) para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados por comparación con un marcador molecular de 1 Kb, y ser visualizados por exposición en un transiluminador Gel Logic 1500 (Imaging System).

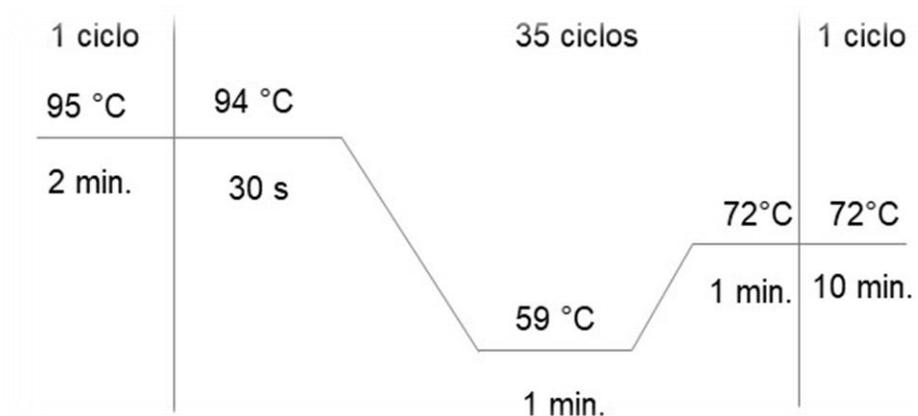


Figura 6. Protocolo de PCR para la amplificación del fragmento de interés derivado de la proteína RmS-17 donde se observan las temperaturas de desnaturalización, hibridación y elongación.

6.6. Clonación.

La clonación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando el vector de expresión pCR[®]4- TOPO[®] optimizado para secuenciación (TA *cloning*) (Invitrogen, Carlsbad, CA); este vector cuenta con un peso molecular de 3956 bp, un origen de replicación pUC ori, un promotor *Lac*, un gen fusión *LacZα-ccdB*, dos marcadores de selección que le confieren resistencia a ampicilina y kanamicina, y un sitio múltiple de clonación (Fig. 7). La metodología utilizada se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos siguiendo las indicaciones del fabricante. La técnica de clonación se realizó preparando una reacción de ligación, utilizando el producto de PCR previamente amplificado con el vector seguido del proceso de transformación en células competentes TOP10[®] de *E. coli* mediante choque térmico. Una vez obtenidas las colonias recombinantes, se seleccionaron 5 de ellas con el fin de verificar que éstas incorporaran el inserto mediante ensayos de PCR de colonia. Finalmente, los productos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con TBE 1X.

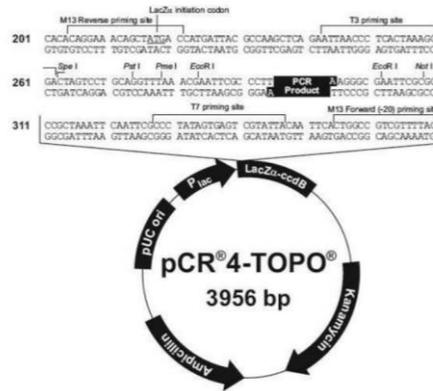


Figura 7. Mapa del vector de secuenciación pCR®4-TOPO®

6.7. Extracción y purificación de plásmidos

Las clonas positivas obtenidas se sembraron en medio líquido LB con ampicilina (100 ng/ml) y se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación (200 rpm). Una vez obtenida una adecuada proliferación celular se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Para obtener un pellet celular y utilizarlo para la extracción y purificación del DNA plasmídico, mediante el método de lisis alcalina utilizando el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Finalmente, los plásmidos se almacenaron a -20°C hasta su secuenciación. La concentración del DNA plasmídico fue determinada con Nanophotometer®.

6.8. Digestión enzimática.

Se realizó una digestión enzimática a partir de DNA plasmídico con la enzima de restricción EcoRI, esto con el fin de corroborar que el fragmento del gen de interés se encontraba insertado. Posteriormente, utilizando el servidor SnapGene® se realizó una predicción, la cual mostró dos amplicones; uno de 3418 bp y otro de 519 bp. La metodología experimental constó de una reacción de digestión que contenía enzima EcoRI, 1X de Buffer, agua DEPC y DNA plasmídico en un volumen final de 25µl.

6.9. Secuenciación y análisis de secuencias

Los plásmidos purificados fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), mediante el método Sanger. Con los resultados obtenidos se realizaron secuencias consenso para cada una de las cepas y aislados a evaluar.

Se realizó un análisis bioinformático de las secuencias consenso y una construcción filogenética usando el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016). En el análisis filogenético se consideraron diferentes secuencias del polipéptido bajo los siguientes parámetros: como modelo de sustitución se utilizó el modelo Tamura de 3 parámetros sin distribución gamma ni sitios invariantes, con base en el valor obtenido por el criterio de información bayesiana. Como método de reconstrucción filogenética se utilizó el de máxima verosimilitud, como método de soporte estadístico se utilizaron 1000 réplicas de Bootstrap y como grupo externo se consideraron proteínas de la familia de las serpinas de diferentes especies: La serpina RmS-6 (KC990105.1) y RmS-9 (KC990108.1), que al igual de la RmS-17 se expresan en todos los órganos de la garrapata *R. microplus*.

Por otro lado, se generó una matriz de sustitución para determinar el grado de identidad/similitud entre las secuencias de aminoácidos que codifican para el polipéptido RmS-17 de las diferentes cepas y aislados de garrapatas, a través del servidor SIAS diseñado por la Universidad Complutense de Madrid.

VII. RESULTADOS

7.1. Selección de la región de interés a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus*

Se seleccionó un polipéptido a partir de la proteína de RmS-17. La región de interés está compuesta por 145 aminoácidos equivalente a 435 bp, localizada entre los aminoácidos 215 y 359 de la proteína completa de RmS-17 (391 aminoácidos), dentro de la región de interés se localiza el RCL, una de las secuencias de aminoácidos descritas como conservadas en la familia de las serpinas (Rodríguez-Valle, *et al.*, 2015) (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Secuencia de nucleótidos del polipéptido de RmS-17 la cepa "Porto Alegre".

ATGTACGAACAGATCTCAGCGGGGTACGCCCCGAGACGACGAGACGAACGCCGATGTTCTGGACCTGC
CTTACGCCGGGCTCGACTACAGCCTGACGATCATTCTCCTAGAGAGAGGACTGGTGTGGACGCGCTG
AGGCAGAATCTATCGTGGCCCATCTTCCAACGCCTTCTGTCCAAGCTCAACATGAATTCTCCCATGGAG
GTGTGCGTGCCCAAGTTCAAGATCGAGGGCTCGTACAACTGAAGGCGCCCCTGTGCGGCGCTAGGAG
CCTCGAAGGCCTTCGACGAGCGATATGCCGACTTCTCCGGCATCAGCGGCGCCCCTGACCTGACCAT
ATACGACGTCGTTACAAGGCCGTGGTTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACT
GCAGTCATCTTCTACACGAAGAGTGCAGCT

Cuadro 4. Secuencia de aminoácidos del polipéptido de Rms-17 la cepa "Porto Alegre". Los aminoácidos sombreados corresponden al RCL.

MYEQISGYARDETNADVLDLPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWPIFQRLLSKLNMNSPMEVSLPK
FKIEGSYKLPKAPLSALGASKAFDERYADFSGISGARDLTIYDVVHKAVVEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAAV

7.2. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron un par de oligonucleótidos con el programa OligoAnalyzer obteniendo como resultado un primer Sentido con una longitud de 24 bp y un primer Antisentido con 19 bp de longitud. Ambos oligonucleótidos cuentan con una temperatura de hibridación de 59°C (cuadro 5).

Cuadro 5. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del polipéptido RmS-17 de *R. microplus*.

Oligonucleótido	Tm °C	Secuencia
Forward	59.0	CAC AAT GTA CGA ACA GAT CTC AGC
Reverse	59.0	CTA CAC GAA GAG TGC AGC T

7.3. Análisis *in silico* del polipéptido derivado de RmS-17

El análisis *in silico* del polipéptido RmS-17 se llevó a cabo a partir de la secuencia de aminoácidos reportada en la base de datos del NCBI de la garrapata *R. microplus* de Porto Alegre, Brasil. Posteriormente, se emplearon programas bioinformáticos con el fin de predecir propiedades fisicoquímicas, aspectos estructurales y regiones potencialmente antigénicas.

7.3.1. Predicción del péptido señal

La predicción del péptido señal en la región transmembranal del polipéptido de RmS-17 indicó la ausencia de éste, así como se observa en la figura 8.

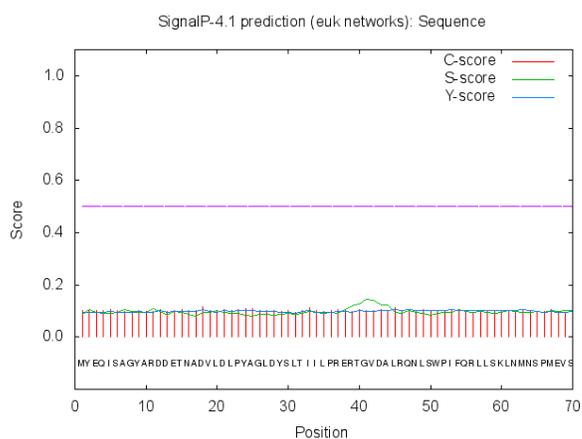


Figura 8. Sitio de corte de la predicción del péptido señal del polipéptido de RmS-17 de la cepa "Porto Alegre".

7.3.2. Dominios funcionales

Con el programa TMHMM se observó que se trata de un polipéptido intracelular (Fig. 9).

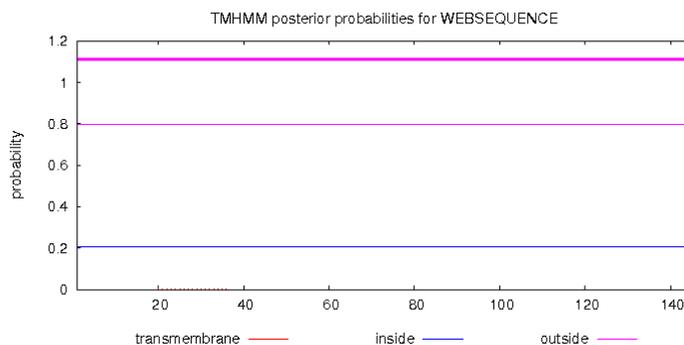


Figura 9. Predicción de la región transmembranal del polipéptido derivado de la proteína de RmS-17 de la cepa "Porto Alegre"

7.3.3. Análisis de hidrofobicidad

En el programa ProtScale con el algoritmo Kyte & Doolittle se predijo dentro del polipéptido una región hidrofóbica con una puntuación superior a 1.6 (Fig. 10).

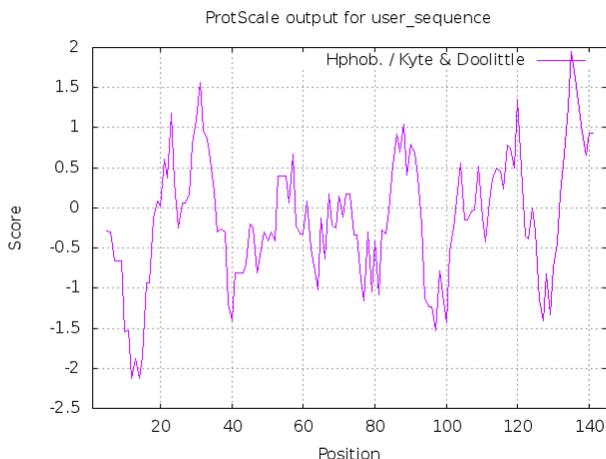


Figura 10. Predicción de hidrofobicidad del polipéptido de interés.

7.3.4. Sitios de N-glicosilación

Se localizó un solo sitio de glicosilación en el residuo 48 mediante el programa NetNGlyc 1.0, con un punto de corte de 0.5 (Fig. 11).

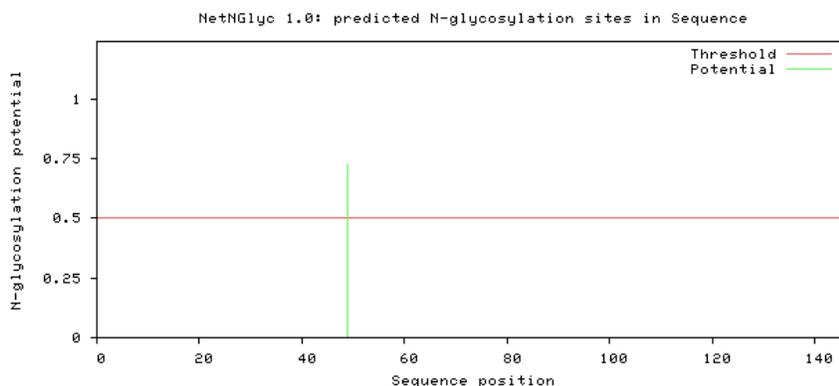


Figura 11. Predicción de los sitios de N-glicosilación en el polipéptido derivado de RmS-17 “Porto Alegre”.

7.3.5. Análisis de epítomos lineales

El análisis de epítomos se realizó mediante los programas EMBOSS, Bepipred 2.0, Antigenic plot y BCELL/IEDB obteniendo dos péptidos predichos como posibles epítomos localizados en el polipéptido RmS-17 de la cepa “Porto Alegre”. Los criterios de selección para predecir los epítomos se basaron en su identificación en 3 de 4 programas y una longitud entre 10 a 16 aminoácidos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Epítomos localizados en el polipéptido Rms-17.

n.	Secuencia	Aminoácidos	Longitud
1	SWPIFQRLLSK	50-60	11
2	SYKLKAPLSALGAS	79-92	14

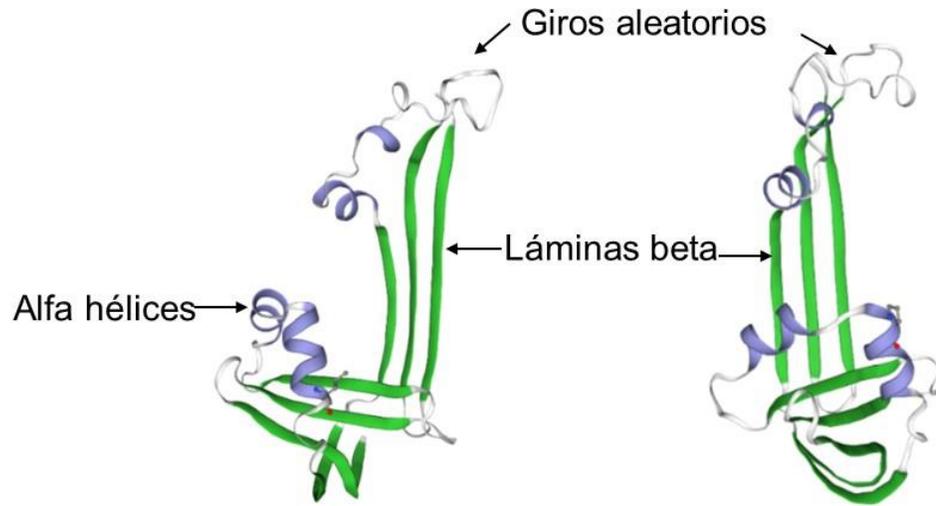


Figura 13. Predicción de la estructura terciaria del polipéptido derivado de la proteína de RmS-17 "Porto Alegre". Verde: láminas beta, Azul: alfa hélices, Blanco: giros aleatorios.

7.3.7. Representación personalizada del polipéptido de RmS-17

De acuerdo con las características que fueron predichas por los programas y descritas anteriormente, se generó la topología personalizada del polipéptido RmS-17 mediante el programa Protter, en el cual se observa la secuencia de aminoácidos y sus anotaciones a la derecha (Fig. 14). Es posible apreciar los principales epítomos B (color azul), el sitio N-glicosilación predicho (color verde) y el RCL (color amarillo).

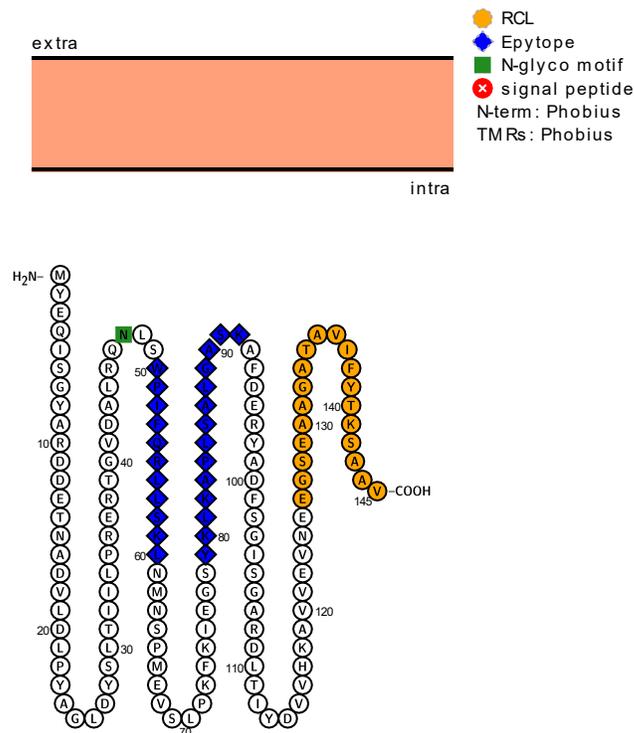


Figura 14. Representación personalizada del polipéptido derivado de la proteína RmS-17, cepa “Porto Alegre”.

7.4. Resultados experimentales

7.4.1. Amplificación del polipéptido de RmS-17

En la estandarización de la amplificación del fragmento de interés se obtuvo un amplicón de 435 bp para las 4 cepas y 6 aislados de *R. microplus*. En la figura 15 se observa la comparación de un gel de agarosa mostrando el amplicón 435 bp con respecto a la simulación realizada en el programa SnapGene®.

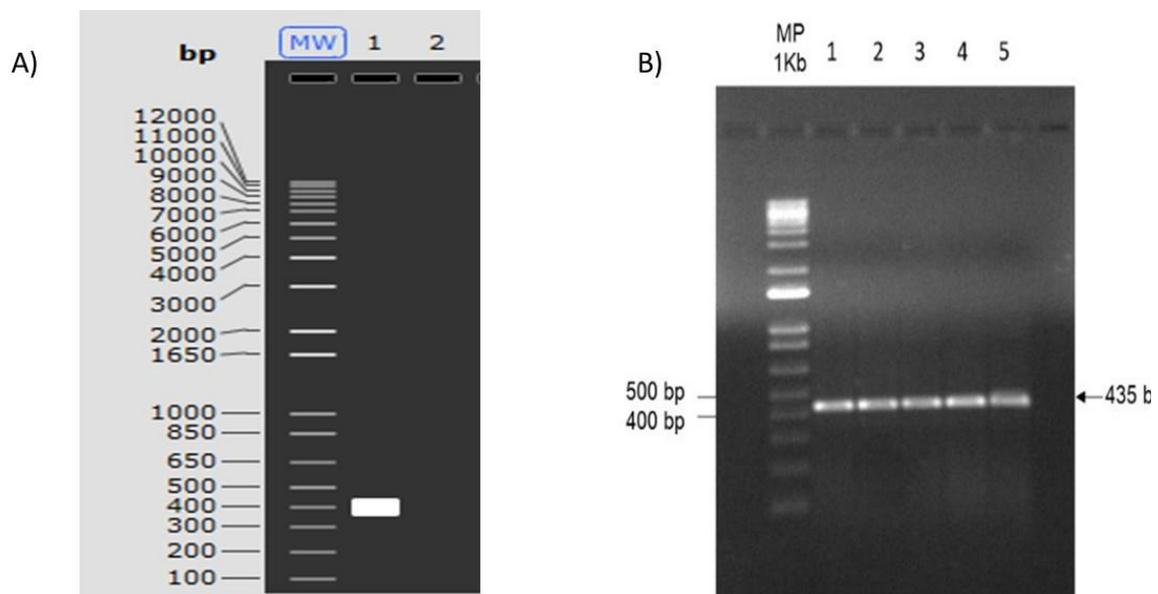


Figura 15. Amplificación del fragmento de interés de RmS-17 de la garrapata *R. microplus*. A) Simulación de la amplificación del fragmento de interés RmS-17 equivalente a 435 bp en el programa SnapGene®. B) Amplificación del fragmento de interés en las cepas “Media Joya”, “Vargas”, “Huastecas” e “Híbrido” y el aislado de La Candelaria, Campeche. Gel de agarosa al 1% con Buffer TBE 1X, MP: marcador de peso molecular 1 Kb.

7.4.2. Obtención de clonas positivas

Se obtuvieron clonas positivas al realizar la verificación de las colonias recombinantes mediante los ensayos de PCR de colonia. (Fig. 16).

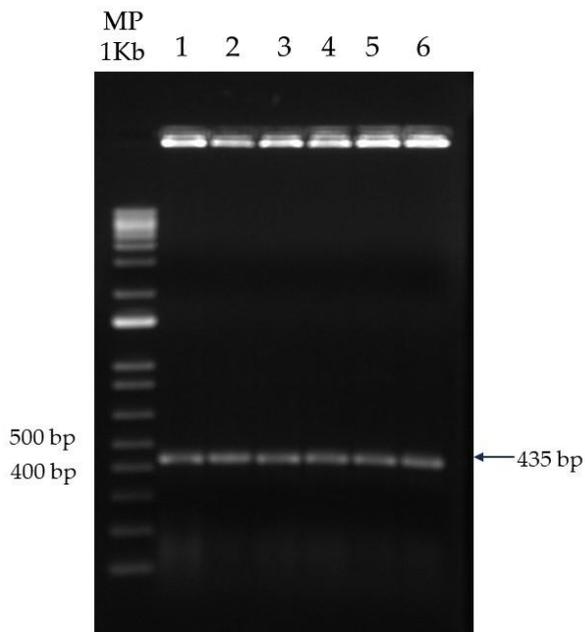


Figura 16. Clonas positivas obtenidas a partir de la técnica de PCR punto final. Gel de agarosa al 1% con Buffer TBE 1X, MP: marcador de peso molecular 1 Kb.

7.1.1. Alineamiento múltiple y matriz de sustitución

Al realizar el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas, se observaron 4 (0.4%) mutaciones a nivel de nucleótidos en la cepa “Media Joya” con respecto a la cepa “Porto Alegre” previamente reportada (encerradas en azul en la fig. 17a) en elGenBank. Las cepas “Vargas”, “Híbrido” y “Huastecas”, así como los aislados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Morelos y Guerrero no presentaron mutaciones a nivel de nucleótidos (Fig.17 a y b). Con respecto a las secuencias de aminoácidos de todas las cepas y aislados evaluadas no se observó ninguna sustitución (Fig. 19).

<p>"Huastecas", Aldama, Tamaulipas Jonacatepec, Morelos Tepalcingo, Morelos Xochicoatlán, Hidalgo Lolotla, Hidalgo "Vargas", Aldama, Tamaulipas "Híbrido", Tapalpa, Jalisco La Candelaria, Campeche Pijijiapan, Chiapas "Porto Alegre", Brasil "Media Joya", Tapalpa, Jalisco</p>	<pre> ATGTACGAACAGATCTCAGCGGGGTACGCCSAGACGACGAGACGAACGCCGATGTTCTG ***** </pre>
<p>"Huastecas", Aldama, Tamaulipas Jonacatepec, Morelos Tepalcingo, Morelos Xochicoatlán, Hidalgo Lolotla, Hidalgo "Vargas", Aldama, Tamaulipas "Híbrido", Tapalpa, Jalisco La Candelaria, Campeche Pijijiapan, Chiapas "Porto Alegre", Brasil "Media Joya", Tapalpa, Jalisco</p>	<pre> GACCTGCCTTACGCCGGGCTCGACTCAGCCTGACGATCATTCTTCTAGAGAGAGGACT ***** </pre>
<p>"Huastecas", Aldama, Tamaulipas Jonacatepec, Morelos Tepalcingo, Morelos Xochicoatlán, Hidalgo Lolotla, Hidalgo "Vargas", Aldama, Tamaulipas "Híbrido", Tapalpa, Jalisco La Candelaria, Campeche Pijijiapan, Chiapas "Porto Alegre", Brasil "Media Joya", Tapalpa, Jalisco</p>	<pre> GGTGTGGACGCGCTGAGGCAGAATCTATCGTGGCCCATCTTCCAACGCCCTTGTCCAAG ***** </pre>
<p>"Huastecas", Aldama, Tamaulipas Jonacatepec, Morelos Tepalcingo, Morelos Xochicoatlán, Hidalgo Lolotla, Hidalgo "Vargas", Aldama, Tamaulipas "Híbrido", Tapalpa, Jalisco La Candelaria, Campeche Pijijiapan, Chiapas "Porto Alegre", Brasil "Media Joya", Tapalpa, Jalisco</p>	<pre> CTCAACATGAATTCTCCCATGGAGGTGTCGCTGCCAAGTTCAAGATCGAGGGCTCGTAC ***** </pre>
<p>"Huastecas", Aldama, Tamaulipas Jonacatepec, Morelos Tepalcingo, Morelos Xochicoatlán, Hidalgo Lolotla, Hidalgo "Vargas", Aldama, Tamaulipas "Híbrido", Tapalpa, Jalisco La Candelaria, Campeche Pijijiapan, Chiapas "Porto Alegre", Brasil "Media Joya", Tapalpa, Jalisco</p>	<pre> AAACTGAAGGCGCCCTGTCGGCGCTAGGAGCCTCGAAGGCCTTCGACGAGCGATATGCC ***** </pre>

Figura 17a. Alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos del polipéptido derivado de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus* con el programa Clustal W. Mutaciones encerradas en el cuadro rojo.

"Huastecas", Aldama, Tamaulipas	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
Jonacatepec, Morelos	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
Tepalcingo, Morelos	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
Xochicoatlán, Hidalgo	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
Lolotla, Hidalgo	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
"Vargas", Aldama, Tamaulipas	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
"Híbrido", Tapalpa, Jalisco	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
La Candelaria, Campeche	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
Pijijiapan, Chiapas	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
"Porto Alegre", Brasil	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC
"Media Joya", Tapalpa, Jalisco	GACTTCTCCGGCATCAGCGGGCCCCGTGACCTGACCATATACGACGTCGTTTACAAGGCC

"Huastecas", Aldama, Tamaulipas	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
Jonacatepec, Morelos	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
Tepalcingo, Morelos	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
Xochicoatlán, Hidalgo	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
Lolotla, Hidalgo	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
"Vargas", Aldama, Tamaulipas	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
"Híbrido", Tapalpa, Jalisco	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
La Candelaria, Campeche	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
Pijijiapan, Chiapas	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
"Porto Alegre", Brasil	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC
"Media Joya", Tapalpa, Jalisco	GTGGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGCAGTCATCTTCTAC

"Huastecas", Aldama, Tamaulipas	ACGAAGAGTGCAGCT
Jonacatepec, Morelos	ACGAAGAGTGCAGCT
Tepalcingo, Morelos	ACGAAGAGTGCAGCT
Xochicoatlán, Hidalgo	ACGAAGAGTGCAGCT
Lolotla, Hidalgo	ACGAAGAGTGCAGCT
"Vargas", Aldama, Tamaulipas	ACGAAGAGTGCAGCT
"Híbrido", Tapalpa, Jalisco	ACGAAGAGTGCAGCT
La Candelaria, Campeche	ACGAAGAGTGCAGCT
Pijijiapan, Chiapas	ACGAAGAGTGCAGCT
"Porto Alegre", Brasil	ACGAAGAGTGCAGCT
"Media Joya", Tapalpa, Jalisco	ACGAAGAGTGCAGCT

Figura 17b. Continuación. Alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos del polipéptido derivado de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus* con el programa Clustal W.

Cuadro 7. Matriz de identidad/similitud para la secuencia del polipéptido derivado de la proteína de RmS-17. El número por encima de la diagonal representa el porcentaje de identidad y por debajo de la diagonal representan el porcentaje de similitud. Mx: México.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12
1. "Porto Alegre" (Brasil) (KC990116.1)		99.08	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2. "Media Joya", Tapalpa, Jalisco (Mx)	100		99.08	99.08	99.08	99.08	99.08	99.08	99.08	99.08	99.08	99.08
3. "Vargas", Aldama, Tamaulipas (Mx)	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100	100
4. Xochicoatlan, Hidalgo (Mx)	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100	100
5. Lolotla, Hidalgo (Mx)	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100	100
6. Pijijiapan, Chiapas (Mx)	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100
7. Candelaria, Campeche (Mx)	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100
8. Jonacatepec, Morelos (Mx)	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100
9. Tepalcingo, Morelos (Mx)	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100
10. "Huastecas" Aldama, Tamaulipas (Mx)	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100	100
11. "Híbrido" Tapalpa, Jalisco (Mx)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		100
12. Juan R. Escudero, Guerrero (Mx)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

7.1.2. Análisis filogenético

La reconstrucción filogenética evidenció que la secuencia de la cepa “Media Joya” aparece en una rama adicional del clado o grupo en donde se encuentran todas las secuencias del polipéptido de RmS-17 de cepas y aislados mexicanos. Por otra parte, todas las secuencias de los aislados y cepas mexicanas se encuentran dentro del mismo grupo que la previamente reportada en Brasil (Fig. 19).

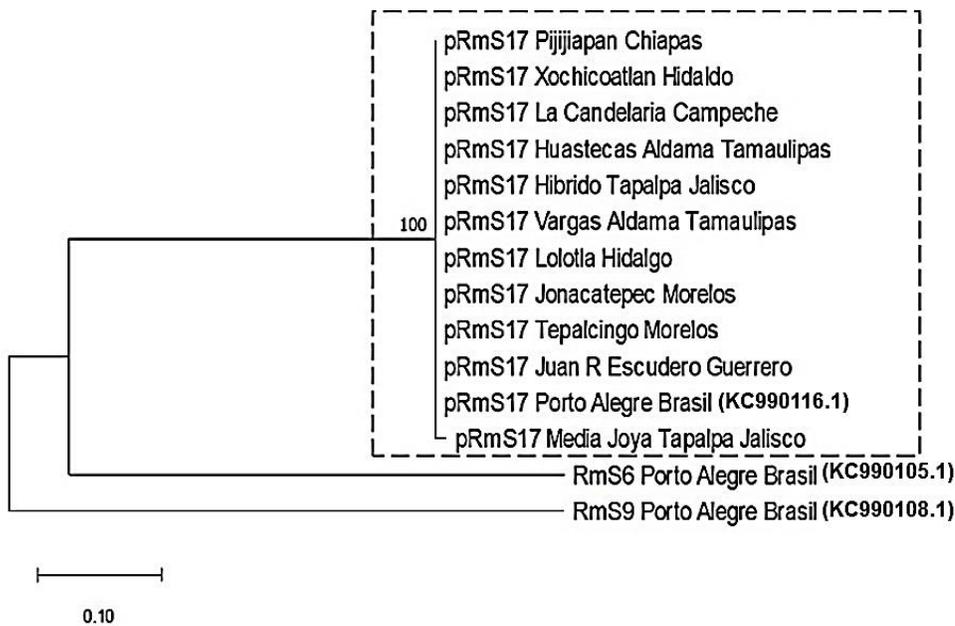


Figura 19. Análisis filogenético del polipéptido de RmS-17 (pRmS17). Cada secuencia está identificada con el lugar de origen. Las especies mostradas en el cuadro con línea punteada pertenecen al clado de las secuencias de RmS-17 de garrapatas *R. microplus* analizados en este estudio.

VIII. DISCUSIÓN

Actualmente, las vacunas comerciales disponibles en el mercado se basan en la proteína recombinante Bm86, no obstante, se ha observado ciertas limitaciones en cuanto a la eficacia de la vacunación debido principalmente a la presencia de polimorfismos en el gen codificador. En el presente estudio se diseñó un polipéptido derivado de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus* localizado entre los aminoácidos 215 y 359, dentro del cual, se localiza el sitio central reactivo (RCL) el cual le permite a las serpinas llevar a cabo su función inhibitoria (Gettins, 2002). De manera general, las serpinas son una familia de proteínas que se expresan en distintos organismos como artrópodos, hongos, virus, insectos e inclusive humanos (Ye *et al*, 2001). Recientemente, se han propuesto distintas metodologías para el diseño de antígenos vacunales, en el análisis *in silico* del polipéptido diseñado, se localizaron dos epítomos lineales de células B, los cuales podrían generar una respuesta inmune específica protectora; este tipo de estrategia se ha llevado a cabo en otros modelos de investigación como *Babesia* spp. y *Plasmodium falciparum*, estimulando una respuesta inmune innata y adaptativa efectora frente a los parásitos (Mahajan *et al.*, 2010; Mosqueda *et al.*, 2012). Adicionalmente, se presume un sitio de N-glicosilación localizado en el residuo 48 el cual podría incrementar la activación de las células T, así como se ha reportado en proteínas de la membrana del virus de influenza (Hütter *et al.*, 2013).

Para la generación de una respuesta inmune frente a microorganismos es necesaria la interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), interacción que se genera en la membrana celular (Bautista y Mosqueda, 2005). Un hallazgo en el análisis *in silico* fue que el polipéptido evaluado se localiza intracelularmente, sugiriendo que este no podría tener una interacción con los PRRs localizados en la membrana, sin embargo, en estudios anteriores se han detectado anticuerpos en la hemolinfa de ciertos insectos posteriormente a la inmunización (Eisemann, *et al.*, 1993); asociado a que las garrapatas cuentan con la característica de llevar a cabo la digestión de

manera intracelular lenta, por la presencia de una membrana semipermeable denominada membrana peritrófica localizada en el intestino (Willadsen, 2001). Esto sugiere que los anticuerpos producidos por el polipéptido en estudio podrían atravesar la membrana e inhibir funciones importantes en el desarrollo y alimentación de la garrapata.

Para la generación de un candidato vacunal que a diferencia de Bm86 (Martínez-Arzate, *et al.*, 2019) tenga una eficacia en varias regiones geográficas, es necesario que la secuencia aminoacídica contenga regiones conservadas y presente menos del 2.8% de polimorfismos a nivel de aminoácidos (García-García, *et al.*, 1999). En el alineamiento múltiple de las secuencias de la cepa “Media Joya” se identificaron 4 mutaciones a nivel de nucleótidos y cero sustituciones de aminoácidos, además se observó un 99.08% de identidad y 100% de similitud comparado con la secuencia previamente reportada en Porto Alegre, Brasil. Así mismo, en las cepas de *R. microplus* de “Híbrido”, “Vargas” y “Huastecas”; y en los aislados de Chiapas, Morelos, Hidalgo, Guerrero y Morelos, no se observó ninguna mutación a nivel de nucleótidos ni aminoácidos con un 100% de identidad y similitud, infiriendo que la secuencia del polipéptido derivado de la proteína RmS-17 es altamente conservada entre las secuencias de México y Brasil; adicionalmente, podría tener una alta eficacia en cepas del suroeste, occidente, centro y sureste del país al utilizarse como antígeno vacunal, aunque es necesario realizar pruebas *in vivo* para confirmar esta hipótesis.

De acuerdo con Lemey y colaboradores en 2009, dos secuencias son homologas cuando cuentan con un ancestro común suficientemente cercano como para retener suficiente similitud en el transcurso del tiempo. La construcción del árbol filogenético mostró un clado o grupo estadísticamente definido, que integra todas las secuencias del polipéptido de RmS-17 mexicanas evaluadas, al igual que la reportada en Brasil, con una identidad entre 98 al 100%, infiriendo un nivel de homología alto.

IX. CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo en el cual se caracteriza un polipéptido derivado de la proteína de RmS-17 de la garrapata *R. microplus* en diferentes poblaciones separadas geográficamente de México.

Los hallazgos encontrados mostraron un alto porcentaje de identidad y similitud en el polipéptido derivado de la proteína RmS-17 entre las cepas y aislados mexicanos con respecto a la reportada en Brasil, demostrando un alto grado de conservación.

Las secuencias del polipéptido derivado de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus* sugieren estar conservadas en garrapatas de ciertas regiones de México. Así mismo, se observó que estas secuencias son homologas entre México y Brasil.

X. REFERENCIAS

1. Aguilar, G., Olvera, A., Carvajal, B. & Mosqueda, J. (2018). SNPs and other polymorphisms associated with acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Frontiers in Bioscience*; 23: 65-82.
2. Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, C., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F. & De la Fuente, J. (2010). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research*; 106: 471–479.
3. Almazán, C., Moreno-Cantú O., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Canales, M., Villar, M., de la Fuente, J. (2012). Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*; 30: 265-272.
4. Alonso-Díaz, M. A, Rodríguez-Vivas, R., Fragoso-Sánchez, F., Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de Medicina Veterinaria*; 38: 105-113.
5. Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*; 22: 195–215.
6. Barker, S. & Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*; 129: S15–S36.
7. Bautista, C. y Mosqueda, J. (2005). Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su aplicación en medicina veterinaria. *Veterinaria México*; 36: 453-468.
8. Beati, L. & Keirans, J.E. (2001) Analysis of the systematic relationships among ticks of the genes genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (*Acari: Ixodidae*) based on mitochondrial 12S ribosomal ADN gene and sequences end morphological characters. *Journal of Parasitology*; 87: 32-48.

9. Bedford, G (1931). *Nuttalliella namaqua*, a new genus and species of tick. *Parasitology*; 23: 230–232.
10. Benavides, O. E. & Romero, N. A (2002). Consideraciones para el control integrado de parásitos externos del Ganado. Carta FEDEGAN, Edición No. 7, p. 1-7.
11. Benavides, O. E., Jiménez, C. P., Betancur H. O., Vélez, C. G., Polanco, P. N., & Morales, P. J (2017). Efecto del uso de fluazurón para control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos. *Revista MVZ Córdoba*; 22: 6050-606.
12. Canales, M., Almazán, C., Naranjo, V., Jongejan, F. and De la Fuente, J. (2009). Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *Biotechnology*; 9: 1-8.
13. Cantú-Covarrubias, A. y García-Vázquez, Z. (2013). Estrategias para el control integrado de garrapata (*Boophilus* spp.) en la producción de bovinos de carne en pastoreo en Tamaulipas. Folleto Técnico No. MX-0-310402-43-03-14-09-36. INIFAP-CIRNE- Campo experimental las Huastecas. Villa Cuauhtémoc, Tamaulipas. 1-37 p.
14. CNOG. (Confederación Nacional de Organizaciones Ganaderas). Información Económica Pecuaria, BOLETÍN No. 18. junio 2009.
15. Contreras, M. y De la Fuente, J. (2016). Brief report: Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. *Vaccine*; 34: 3010-3013.
16. Cortés-Vecino, J. (2011). Garrapatas: estado actual y perspectivas. *Biomédica*.

17. D.O.F. (Diario Oficial de la Federación) SAGARPA. NOM-019-ZOO-1994 “Campaña Nacional contra la garrapata *Boophilus* spp.” 19 mayo 1995. México.
18. Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C.J., Narasimhan, S., Anguita, J., and Fikrig, E. (2009). Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host & Microbe*; 6: 482–492.
19. De la Fuente, J. and Kocan K. (2003). Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Review of Vaccines*; 2: 583-503.
20. De la Fuente, J., & Kocan, K. M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*; 28: 275–283
21. De la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venza, J. M., Kocan K. M. and Sonenshine, D.E. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals, *Frontiers in Bioscience*; 13: 6938-6946.
22. De la Fuente, J., Rodríguez, M. and Garcia-Garcia, J. C. (2000). Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 916: 617–621.
23. Eisemann, C.H., Pearson, R.D., Donaldson, R.A., Cadogan, L.C., Vuocolo, T., 1993. Uptake and fate of specific antibody in feeding larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Medicine Veterinary Entomology*; 7: 177–185.
24. Estrada-Peña, A. (2015). Orden *Ixodida*: Las garrapatas. *Revista Idea Diversidad Entomológica- Sociedad de Entomología Aragonesa (IDE@ - SEA)*. 30: 1–15.

25. Fernández, R. M., Preciado, T. F., Cruz, V. C., García, V. Z. (2004). Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. *Experimental and Applied Acarology*; 32: 293–299.
26. Fragoso, S. H. y Soberanes, C. N. (2001). Control de la resistencia a los ixodicidas a la luz de los conocimientos actuales. Memorias de XXV Congreso Nacional de Buiatria. Veracruz, Veracruz, México. Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, A.C. 40-48.
27. García- García, J. Montero, C. Redondo, M. Vargas, M. Canales, M. Boue, O. Rodríguez, M y col. (2000). Isolation of Bm95 from the cattle tick *Boophilus microplus* a more universal antigen for the control of the infestations. *Vaccine*; 18: 2275-2287.
28. García-García, J., González, I., González, D., Valdés, M. Méndez, L., Lamberti, J., D'agostino, B., Citroni, D., Fragoso, F., Ortiz, M., Rodríguez M. and Dee la Fuente, J. (1999). Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Experimental and Applied Acarology*; 23: 883–895.
29. García-García, J., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Bouè, O., Rodríguez, M., Joglar, M., Machado, H., González, I.L., Valdés, M., Méndez, M. and de la Fuente, J. (2000). Control of tick resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*; 18: 2275-2287.
30. Gettins, P. (2002). Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chemical Reviews*;102: 4751-4803.

31. Gettins, P., & Olson, S. (2016). Inhibitory Serpins. New insights into their folding, polymerization, regulation and clearance. *Biochemical Journal*; 473: 2273-2293.
32. George, J. E. (2008). The Effects of Global Change on the Threat of Exotic Arthropods and Arthropod-borne Pathogens to Livestock in the United States. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1149: 249–254.
33. George, J. E., Pound, J. M. and Davey, R. B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides, *Parasitology*; 129: S353–S366.
34. Gettins, P. and Olson, S. (2016). Inhibitory Serpins. New Insights into their Folding, Polymerization, Regulation and Clearance. *Biochemical Journal*; 473: 2273–2293.
35. González-Sáenz Pardo, J. y Hernández-Ortiz, R. (2012). *Boophilus microplus*: estado actual de la resistencia a los acaricidas en la frontera México Estados Unidos y su impacto en la relación comercial. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*; 3: 1-8.
36. Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., & Barker, S. C. (2010). The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (*Acarí: Ixodida*) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*; 9: 1-28
37. Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I., Winzerling, J. and Grubhoffer, L. (2009). Knock down of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proceedings of the National Academy of Science*; 106: 1033–1038.

38. Hill, C. and Wikel, S. (2005). The *Ixodes scapularis* Genome Project: an opportunity for advancing tick research, *TRENDS in Parasitology*; 21: 151-153.
39. Hütter, J., Rödiger, J., Höper, D., Seeberger, P., Reichl, U., Rapp, E. and Lepenies, B. (2013). Toward animal cell culture-based influenza vaccine design: viral hemagglutinin N-glycosylation markedly impacts immunogenicity. *The Journal of Immunology*; 190: 220-230.
40. Imamura, S., da Silva Vaz Junior, T., Sugino, M., Ohashi, K., Onuma, K. (2005). A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*; 23: 301–1311.
41. Imamura, S., Namangala, B., Tajima, T., Temboba, M. E., Yasuda, J., Ohashi, K. and Onuma, M. (2006). Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine*; 24: 2230–2237.
42. Jonsson, N. (1997). Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. *Australian Veterinary Journal*; 75: 802-807.
43. Labuda, M., Tirmnell, A. R., Lickova, M., Kazimiroma, M., Davies G. M., Lissina, O., Hails R. S. and Nuttal, P.A (2006). An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen; 2: 251-259.
44. Manual Bovimune Ixovac[®]. Laboratorios Lapisa. 16 de diciembre de 2019. Sitio web: http://www.lapisa.com/assets/recursos/Manual_Ixovac.pdf
45. Lee, D., Park, Y., Brown, M. T. Adams, E. M. (1999). Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Molecular Pharmacology*; 55: 581-593.
46. Lemey, P., Salemi, M. and Vandamme, A., (2009). *The Phylogenetic Handbook*. (pp 17) Second Edition. Cambridge University.

47. Mahajan, B, Berzofsky, J.A., Boykins, R.A., Majam, V., Zheng H., Chattopadhyay, R., de la Vega, P., Moch, K., Haynes, J.D., Belyakov, I. M., Nakhasi, H.L. and Kumar, S. (2010). Multiple antigen peptide vaccines against *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and Immunity*; 78: 4613-4624.
48. Martínez-Arzate, S., Sánchez-Bermúdez, J., Sotelo-Gómez, S., Díaz-Albiter, H.M., Hegazy-Hassan, W., Tenorio-Borroto, E., Barbabosa-Pliego A. and Vázquez-Chagoyán, J.C. (2019). Genetic diversity of Bm86 sequences in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from Mexico: analysis of haplotype distribution patterns *BMC Genetics*; 20: 1-12.
49. Meekins, D., Kanost, M., Michel, K. (2017). Serpins in arthropod biology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*; 62: 105-119.
50. Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno-Cid, J. A., Estrada-Peña, A., Kocan, K., De la Fuente, J. (2011). Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks xpres cattle. *Vaccine*; 29: 2248–2254.
51. Miller, R. J., Almazán, C., Ortiz-Estrada. M., Daveya, R.B., George, J. E., Pérez De León, A. (2013) First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. *Veterinary Parasitology*; 191: 97– 101.
52. Mosqueda, J.J., Camacho-Nuez, M., Falcón, A., Ramos, J.A., Canto, G., Aguilar, G., Olvera, A. (2012). Estrategias inmunológicas y bioinformáticas para el control de la babesiosis bovina. *Revista México Ciencia Pecuaria*; 3: 51-59
53. Mulenga, A., Khumthong, A. and Blandon, M. (2007). Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *The Journal of Experimental Biology*; 210: 3188-3198.

54. Mulenga, A., Sugino, M., Nakajima, M., Sugimoto, C., and Onuma, M. (2001). Tick-Encoded Serine Proteinase Inhibitors (Serpins); Potencial target antigens for tick vaccine development. *Immunology. The Journal of Veterinary Medical Science*; 63: 1063-1069.
55. Mulenga, A., Tsuda, A., Onuma, M. and Sugimoto, C. (2003). Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 33: 267–276.
56. Muro, C. M., Cruz, V. C., Fernández, R. M., Soria, C. J., Ramos, M. P. (2003). Repelencia de larvas de *Boophilus microplus* en plantas *Stylosanthes humilis* y *Stylosanthes hamata*. *Revista Parasitología latinoamericana*; 58: 3-4.
57. Narasimhan, S., Sukumaran, B., Bozdogan, U., Thomas, V., Liang, X., De Ponte, K., Marcantonio, N., Koski, R. A., Anderson, J. F., Kantor, F., Fikrig, E. (2007). A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host & Microbe*; 12: 7–18.
58. Nari, A. y Hansen, J. W. (1999). Resistencia de los ecto y endoparásitos: soluciones actuales y futuras. División de Producción y Sanidad Animal, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Confederación OIE; 23-33.
59. Nuttall, A. R. Trimnell, M. Kazimírová, M. & Labuda, M. (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*; 28: 155–163.
60. Ortiz, E. M., Santamaría, V. M., Ortiz, N. A., Soberanes, C. N., Osorio, M. J., Franco, B. R., Martínez, I. F., Quezada, D. R. y Frago, S. H. (1995). Caracterización de la resistencia de *Boophilus microplus* a ixodicidas en

- México. Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal, Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria. Acapulco, Guerrero, México. pp 58-66.
61. Ostfeld, R. S., Price, A., Hornbostel, V. Benjamin, M. and Keesing, F (2006). Controlling Ticks and Tick-borne Zoonoses with Biological and Chemical Agents. *BioScience*; 56: 383 -394.
62. Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva Vaz Jr. (2012). The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Veterinary Journal*; 192: 158–16
63. Polanco-Echeverry, D., & Ríos-Osorio, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*; 17: 81–95.
64. Quiroz, H (1990). Cap.31: Ixodidos. En *Parasitología Veterinaria y enfermedades parasitarias de animales domésticos* (pp. 767-802). México DF: Editorial Limusa.
65. Rangel-Aguirre, A., Pereira-Lobo, F., Casquero-Cunha, R., Valério-García, M., Andreott, R. (2016). Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine André de Abreu, e, *, Francisco, Andreottic *Veterinary Parasitology*; 221: 30–38
66. Rodríguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., Falcón V., Sánchez, G., Bringas, R., Cordovés, C., Valdés, M., Leonart, R., Herrera, R., & de la Fuente, J. (1994). High level expression of the B. microplus Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology*; 33: 135-146.
67. Rodríguez-Valle, M., Xu, T., Kurscheid, S., & Lew-Tabor, A. E. (2015). *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation,

- expresión and functional characterisation assessment. *Parasites and Vectors*; 7:1-9.
68. Rodríguez-Vivas, R., *et al.*, (2017). Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos de ganado bovino en México. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria*; 8: 61-74.
69. Rodríguez-Vivas, R., *et al.*, 2018. Cap. 7: Epidemiología y control de garrapatas, moscas y nemátodos gastrointestinales que afectan a los bovinos en México. En *Estado del Arte Sobre Investigación e Innovación Tecnológica en Ganadería Bovina Tropical*. México.
70. Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F., Fragoso, S.H. (2005). Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: *Enfermedades de importancia económica en producción animal*. (pp. 571-592). Rodríguez-Vivas, R.I. Editor. México D.F. McGraw-Hill-UADY.
71. Samish, M., Ginsberg, H. and Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*; 129: S389–S403.
72. Sasaki, T., Kohara, A., Shimidzu, T. and Kobayashi., K (1990). Single site proteolysis in silkworm antitrypsin causes structural changes in behavior against denaturing reagents. *Agricultural and Biological Chemistry*; 54: 139-45.
73. Schuijt, T.J., Coumou, J., Narasimhan, S., Dai, J., Deponte, K., Wouters, D., Brouwer, M., Oei, A., J.T.H., J., Roelofs, van Dam, A.P, van der Poll, van't Veer, C., Hovius, J. W. & Fikrig, E. (2011). A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmisión of the Lyme disease agent. *Cell Host & Microbe*; 10: 136–46.
74. Secretaria Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) – Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) (2020). Situación actual del control de la garrapata *Boophilus* spp. 04 de noviembre

de 2019, de Secretaria Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) Sitio web: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>.

75. Seixas, A., Oliveir, P., Termignonia, C., Logullo, C., Itabajaraa, M., Da Silva Vaz, I. (2012). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 148: 149-156.
76. Stafford, K. C. and Kitron, U. (2002). Cap.12: Environmental management for Lyme borreliosis control. In *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control* (Pages 301–334). Editorial Wallingford. (United Kingdom): CABI.
77. Stein, P. E., Leslie, A. G., Finch, J. T., Turnell, W. G., McLaughlin, P. J., and Carrell, R. W. (1990). Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature*; 347: 99-102.
78. Suárez-Pedroso, M., Méndez-Mellor, L., Valdéz, M., de Moura-Souza, R., Reis-Camargo, A. J., Vargas, N. C. (2007). Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería cubana y en regiones de latino américa con la aplicación del inmunógeno Gavac® dentro de un programa de lucha integral. *América Latina: CORPOICA-FAO*.
79. Tirloni, L., Kwon, K.T., Loner, C.M., Ali, A., Seixas, A., Termignoni, C., Mulenga, A., Da Silva Vaz Jr, I. (2016). The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Molecular Biology*; 71: 12-28.
80. Tirloni, L., Seixas, A., Mulenga, A., Da Silva Vaz Jr., I., Termignoni, C. (2014). A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Experimental Parasitology*; 137: 25–34.

81. Ullmann, A. J., Lima, C. M., Guerrero, F. D., Piesman, J. and Black, W. C. (2005). Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* and the Southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Molecular Biology*; 14: 217-22.
82. Urquhart, J, Armour, J, Duncan, A, Dunn & F Jennings (2001). *Parasitología veterinaria*. 2ª edición. Acribia S.A.
83. Whisstock, J.C., Silverman, G., Bird, P., Bottomley S., Kaiserman, D., Luke, C., Pak, S., Reichhart, J and Huntington, J. (2010). Serpins Flex Their Muscle: structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *The Journal of Biological Chemistry*; 285: 24307–24312.
84. Willadsen, P. & Kemp, D. H. (1988). Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitology Today*; 4:196–198.
85. Willadsen, P. (2001). The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*; 10: 353–368.
86. Willadsen, P., McKenna, R. V., Riding, G. A. (1988). Isolation from the cattle ticks *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *International Journal Parasitology*; 18: 183-189.
87. Ye, S., Cech, A., Belmares, R., Bergstrom, R., Tong, T., Corey, D., Kanost, M. and Goldsmith, H. (2001). The structure of a Michaelis serpin–protease complex. *Nature Structural Biology*; 8: 979-983.

XI. ANEXOS

11.1. Índice de cuadros y figuras

Figura 1.....	4
Figura 2.....	7
Figura 3.....	8
Figura 4.....	14
Figura 5.....	14
Figura 6.....	22
Figura 7.....	23
Figura 8.....	26
Figura 9.....	27
Figura 10.....	27
Figura 11.....	28
Figura 12.....	29
Figura 13.....	30
Figura 14.....	31
Figura 15.....	32
Figura 16.....	33
Figura 17a.....	34
Figura 17b.....	35
Figura 18.....	36
Figura 19.....	38
Cuadro 1.....	5
Cuadro 2.....	19
Cuadro 3.....	25
Cuadro 4.....	25
Cuadro 5.....	26
Cuadro 6.....	28
Cuadro 7.....	37