



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

“SÍNTESIS RECOMBINANTE DE UN POLIPÉPTIDO DE RmS-17 EN UN
SISTEMA DE EXPRESIÓN EUCARIONTE COMO PROPUESTA PARA EL
CONTROL DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus microplus*”

TESIS

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

PRESENTA

DANIELA LARA GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. RODOLFO ESTEBAN LAGUNES QUINTANILLA

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

COMITÉ TUTOR

JOSÉ LUIS CERRITEÑO SÁNCHEZ

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

MIGUEL ÁNGEL ALONSO DÍAZ

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

Ciudad Universitaria, CD. MX.

Mayo, 2022



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS INSTITUCIONALES

Este proyecto de investigación fue financiado por fondos fiscales del INIFAP 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. Así como del proyecto SEP-CONACYT 288942.

Mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de realizar mi posgrado en esta *alma mater* para seguir creciendo como persona y como profesional, gracias al modelo de educación integral que nos propone y aplica en cada uno de los procesos formativos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del convenio 761262 por el financiamiento otorgado a través de la beca que durante el transcurso de la Maestría me ha permitido realizar mis estudios.

Agradezco también toda la ayuda brindada por el equipo de trabajo del Laboratorio de Virología II del departamento de Epizootiología 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 al Dr. José Luis Cerriteño Sánchez por su paciencia, apoyo, entrega y enseñanzas aportadas para la realización de este trabajo. Así como a la Dra. Sandra Cuevas por abrirme las puertas de su grupo de investigación.

Extiendo el agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla por su apoyo que fue indispensable para la realización de este trabajo. Así como al Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz por sus aportaciones al proyecto que fueron de gran utilidad e importancia.

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi tesis de Maestría con todo mi amor...

A mi abuela, mi Matu, por darme salud, fortaleza y sabiduría para enfrentar la adversidad que trae cada día. Por su amor todo lo he podido.

A mi abuelo, Tabaco, por enseñarme que la vida es como un tango, aunque se sienta más como una milonga. Te extraño mucho viejo querido.

A mi mamá, que es la luz en mi camino, quien me da fuerza para continuar y está para mí cada vez que la necesito. Le agradezco por su incansable apoyo a lo largo de mi vida, por las horas de sueño perdidas, por los sacrificios hechos, por las enseñanzas y por su amor incondicional. Te amo mami.

A mi papi, por su inagotable esfuerzo por hacerme feliz, por ser la alegría en mis días, por siempre pensar en mí y estar tan presente en mis días, aún en la distancia. Gracias por elegir disfrutar la vida conmigo.

A mi familia, GUMA, a cada uno de ustedes por enseñarme que aún en la distancia siempre serán lo primero y que su amor es el regalo más preciado que tengo. Los he extrañado cada día fuera de casa.

A Dani, por todo su apoyo, comprensión y escucha. Por toda su ayuda durante estos años, por enseñarme a confiar en mi fortaleza, por cuidar de mí cada día. Por enseñarme que el amor se construye de a poco. Estaré siempre agradecida.

A mi mejor amiga, mi hermana, Luzlady, sin ella y sin su confianza en mí, nada de esto habría sido posible.

A mi grupo de laboratorio por su inagotable paciencia en cada experimento, por hacerme reír aún en los momentos más angustiantes y hacer de este reto, algo muy divertido.

A mi familia mexicana, los que vieron por mí, los que me hicieron de comer cada noche, los que compartieron su cultura y costumbres conmigo, los que animaron mis días difíciles por estar lejos de casa, los que bailaron, rieron y lloraron a mi lado. Esto es para cada uno de ustedes, gracias.

PONENCIAS Y CURSOS PRESENTADOS EN CONGRESOS E INSTITUCIONES ACADÉMICAS

- ✧ Daniela Lara Gutiérrez. **Expresión de proteínas en el vector de *Pichia pastoris***. Curso teórico-Virtual Estrategias para el diseño y producción de Proteínas recombinantes de agentes virales de interés pecuario. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Ciudad de México. 3 al 5 de agosto del 2021. (Anexo 1)
- ✧ Daniela Lara Gutiérrez. **Expresión de proteínas en *Pichia pastoris***. Simposium XXVII Jornada de Ingeniería Bioquímica. Celaya, Guanajuato. 22 de octubre de 2021. (Anexo 2)
- ✧ Daniela Lara Gutiérrez, Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla, José Luis Cerriteño Sánchez, Julieta Sandra Cuevas Romero, Miguel Ángel Alonso Díaz. **Síntesis de un polipéptido recombinante de RmS-17 de *Rhipicephalus microplus* en el sistema de expresión *Pichia pastoris***. XVI Congreso Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán. 22 de octubre del 2021. (Anexo 3)
- ✧ Daniela Lara Gutiérrez, Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla, José Luis Cerriteño Sánchez, Julieta Sandra Cuevas Romero, Miguel Ángel Alonso Díaz. **Construcción de un sistema de expresión para la proteína RmS-17 de *Rhipicephalus microplus* en *Pichia pastoris***. Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuícola-Pesquera. Ciudad de México. 10 al 12 de noviembre del 2021. (Anexo 4)
- ✧ Daniela Lara Gutiérrez, Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla, José Luis Cerriteño Sánchez, Julieta Sandra Cuevas Romero, Miguel Ángel Alonso Díaz. ***Pichia pastoris* como sistema de expresión de un polipéptido glicosilado y antigénico derivado de la proteína RmS-17 de *Rhipicephalus microplus***. XXVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET). Ciudad de México. 24 al 26 de noviembre del 2021. (Anexo 5)

ABSTRACT

Currently, cattle farming faces economic losses due to infestations with *R. microplus* ticks. The use of ixodicides, which has been the main control method for decades, has many disadvantages, so it is necessary to look for alternatives such as the development of immunogens through the expression of recombinant proteins. The objective of this work was to synthesize a recombinant polypeptide from the inferred sequence of Serpin RmS-17 in the *P. pastoris* expression system as a control proposal for *R. microplus*. A region of interest was selected from the nucleotide sequence of the tick *R. microplus* strain "Media Joya", which is composed of 435 bp equivalent to 145 amino acids. To amplify said region of interest, specific oligonucleotides were designed that also had restriction sites for the enzymes Xba I and Pml I. The product obtained was cloned in the pJET1.2/Blunt safeguard vector and used to transform competent cells of *E. coli* Top 10. Subsequently, the extraction and purification of the plasmid DNA was carried out and it was digested with the enzymes to identify the orientation in the which was cloned. This insert was subcloned in the expression vector pPICZ α B, which was confirmed by restriction patterns. Plasmids were purified from competent *E. coli* Top 10 cells and confirmed by sequencing. A consensus sequence was obtained and compared with that reported in GenBank for the same protein, with results of 99.7% identity. Subsequently, competent *P. pastoris* X33 cells were transformed with the plasmid pPICZ α B/RmS-17 to integrate the vector by homologous recombination into the yeast chromosome. The resulting strain was characterized and named X33/RmS-17 and its cell growth was then compared to non-transformed cells. Finally, expression assays were performed by inducing with methanol for 96 hours. Expressed RmS-17 polypeptide was recovered from cell lysis by mechanical disruption and identified by reducing electrophoresis (SDS-PAGE), stained with Coomassie blue, and immunodetected by Western Blot using Anti-His and Anti-His antibodies. This study demonstrates the production of an RmS-17 polypeptide expressed in a eukaryotic system, obtaining characteristics similar to the reported sequence.

Keywords: Serpins, RmS-17, expression systems, *P. pastoris*.

RESUMEN

Actualmente la ganadería bovina enfrenta pérdidas económicas por las infestaciones con garrapatas *R. microplus*. El uso de ixodicidas que ha sido el principal método de control durante décadas presenta muchas desventajas, por lo que es necesario buscar alternativas como el desarrollo de inmunógenos a través de la expresión de proteínas recombinantes. El objetivo de este trabajo fue sintetizar un polipéptido recombinante a partir de la secuencia inferida de la Serpina RmS-17 en el sistema de expresión de *P. pastoris* como propuesta de control de *R. microplus*. Se seleccionó una región de interés de la secuencia nucleotídica de la garrapata *R. microplus* cepa "Media Joya", la cual está compuesta por 435 pb equivalente a 145 aminoácidos. Para amplificar dicha región de interés se diseñaron oligonucleótidos específicos que además tenían sitios de restricción para las enzimas *Xba* I y *Pml* I. El producto obtenido fue clonado en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt y usado para transformar células competentes de *E. coli* Top 10. Posteriormente se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico y se digirió con las enzimas para identificar la orientación en la cual se clonó. Dicho inserto se subclonó en el vector de expresión pPICZ α B y fue corroborado por patrones de restricción. Los plásmidos se purificaron a partir de células competentes de *E. coli* Top 10 y se confirmaron por secuenciación. Se obtuvo una secuencia consenso y se comparó con la reportada en el GenBank para la misma proteína, con resultados de 99.7% de identidad. Posteriormente, se transformaron células competentes de *P. pastoris* X33 con el plásmido pPICZ α B/RmS-17 para integrar el vector por recombinación homóloga en el cromosoma de la levadura. La cepa resultante se caracterizó y denominó X33/RmS-17 y luego se comparó su crecimiento con las células no transformadas. Por último, se realizaron ensayos de expresión induciendo con metanol por 96 horas. El polipéptido RmS-17 expresado se recuperó de la lisis celular por rompimiento mecánico y se identificó mediante electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) se tiñó con azul de Coomassie y se realizó la inmunodetección mediante Western Blot utilizando anticuerpos Anti-His y Anti-Myc. Este estudio demuestra la obtención de un polipéptido de RmS-17 expresado en un sistema eucarionte obteniendo características similares a la secuencia reportada.

Palabras clave: Serpinas, RmS-17, sistemas de expresión, *P. pastoris*.

ABREVIATURAS

<i>R. microplus</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
D.O.	Densidad óptica
OF	Organofosforados
PS	Piretroides sintéticos
Am	Amidinas
LM	Lactonas macrocíclicas
CIG	Control integrado de garrapatas
RCL	Sitio central reactivo
AOX	Enzimas alcohol oxidasa

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. Generalidades de las garrapatas	3
2.2. Importancia económica en la ganadería bovina	3
2.3. Clasificación	4
2.4. Alimentación	5
2.5. Garrapata <i>R. (Boophilus) microplus</i>	5
2.6. Distribución geográfica	6
2.7. Ciclo biológico	7
2.8. Respuesta inmune del bovino contra garrapatas	8
2.9. Métodos de control	9
2.10. Resistencia a los ixodicidas	10
2.11. Vacunas contra garrapatas	11
2.12. Desarrollo de inmunógenos contra garrapatas	12
2.13. Serpinas	12
2.14. Serpina RmS-17	13
2.15. <i>Komagataella (Pichia) pastoris</i>	14
2.16. Proteínas de <i>R. microplus</i> producidas en <i>P. pastoris</i>	16
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. OBJETIVO GENERAL	19
V. OBJETIVOS PARTICULARES	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1. Selección de la región de interés de la proteína RmS-17	20
6.2. Amplificación y purificación de la región de interés	20
6.3. Ligación de la región de interés al vector de resguardo pJET1.2/Blunt	21
6.4. Preparación de células competentes <i>E. coli</i> One Shot Top 10	22
6.5. Extracción de plásmidos	22
6.6. Digestión y liberación de la región de interés de RmS-17 a partir del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17	23
6.7. Subclonación en el vector de expresión pPICZαB	24
6.8. Preparación de células competentes de <i>P. pastoris</i> X33	25
6.9. Extracción de ADN genómico de las transformantes <i>P. pastoris</i> X33	26
6.10. Determinación del fenotipo Mut de las células <i>P. pastoris</i> X33	27

6.11. Expresión de la proteína RmS-17 en X33/RmS-17	27
6.12. Caracterización del crecimiento celular de X33/RmS-17	28
6.13. Electroforesis desnaturizante e inmunodetección	28
VII. RESULTADOS	30
7.1. Selección de la región de interés de la secuencia de RmS-17 de la garrapata <i>R. microplus</i>	30
7.2. Diseño de oligonucleótidos	30
7.3. Amplificación y purificación de la región de interés	31
7.4. Ligación de la región de interés al vector de resguardo pJET1.2/Blunt	32
7.5. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> con el plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17	32
7.6. Extracción del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17 y amplificación de la región de interés	33
7.7. Digestión y liberación de la región de interés de RmS-17 a partir del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17	33
7.8. Doble digestión enzimática con <i>Pml</i> I y <i>Xba</i> I	34
7.9. Subclonación de la región de interés de Rms-17 en el vector de expresión pPICZαB	35
7.10. Extracción del plásmido pPICZαB/RmS-17 de las células competentes y amplificación de la región de interés	36
7.11. Caracterización por patrones de restricción de pPICZαB/RmS-17	37
7.12. Secuenciación del plásmido pPICZαB/RmS-17	38
7.13. Digestión enzimática del plásmido pPICZαB/RmS-17 con <i>Pme</i> I	38
7.14. Transformación de células competentes de <i>P. pastoris</i> X33 con el plásmido pPICZαB/RmS-17	39
7.15. Extracción del ADN genómico de las transformantes de <i>P. pastoris</i> X33 y amplificación de la región de interés	40
7.16. Determinación del fenotipo Mut de <i>P. pastoris</i> X33	41
7.17. Expresión del plásmido pPICZαB/RmS-17 en <i>P. pastoris</i> X33	41
7.18. Caracterización del crecimiento celular de X33/RmS-17	42
7.19. Expresión intracelular de RmS-17 en <i>P. pastoris</i> X33	44
7.20. Expresión de X33/RmS-17 en medios de inducción	45
7.21. Expresión extracelular de X33/RmS-17	46
VIII. DISCUSIÓN	47
IX. CONCLUSIONES	51

X. REFERENCIAS	52
XI. ANEXOS	61
11.1. Anexo 1	61
11.2. Anexo 2	61
11.3. Anexo 3	62
11.4. Anexo 4	62
11.5. Anexo 5	63

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Microscopía de estructuras de las garrapatas	4
Figura 2. Microscopía de garrapatas de la familia <i>Ixodidae</i>	5
Figura 3. Campaña Nacional para el control de <i>Boophilus</i> spp	6
Figura 4. Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	7
Figura 5. Relación huésped-hospedador	8
Figura 6. Ciclo térmico de PCR para la amplificación de RmS17	21
Figura 7. Mapa del vector de clonación pJET1.2/Blunt	22
Figura 8. Mapa del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17	24
Figura 9. Mapa del vector de expresión pPICZαB	25
Figura 10. Secuencias del polipéptido de RmS-17	30
Figura 11. Amplificación del polipéptido de RmS-17	31
Figura 12. Mapa de la ligación en el vector pJET1.2/Blunt	32
Figura 13. Transformación de células Top 10 con pJET1.2/Blunt/RmS-17	33
Figura 14. Extracción y amplificación del polipéptido de RmS-17	33
Figura 15. Digestión de pJET1.2/Blunt/RmS-17 con <i>Xba</i> I	34
Figura 16. Digestión con <i>Pml</i> I y <i>Xba</i> I	35
Figura 17. Mapa de la ligación en el vector de expresión pPICZαB	35
Figura 18. Transformación de <i>E. coli</i> One Shot Top 10 con pPICZαB/RmS-17	36
Figura 19. Extracción y amplificación de la región de interés de RmS-17	37
Figura 20. Digestión de pPICZαB/RmS-17 con <i>Pml</i> I y <i>Xba</i> I	37
Figura 21. Secuenciación de pPICZαB/RmS-17	38
Figura 22. Digestión de pPICZαB/RmS-17 con la enzima <i>Pml</i> I	39
Figura 23. Transformación de <i>P. pastoris</i> X33 con pPICZαB/RmS-17	40
Figura 24. Amplificación de la región de interés de RmS-17	40
Figura 25. Prueba de identificación de fenotipo	41
Figura 26. Cinética de crecimiento de las clonas X33/RmS-17	42
Figura 27. Curva de crecimiento celular de <i>P. pastoris</i> X33 y X33/RmS-17	43
Figura 28. Expresión intracelular de RmS-17 en <i>P. pastoris</i> X33	44
Figura 29. Concentración total de proteína en medio extracelular	46
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	6
Cuadro 2. Oligonucleótidos amplificación del polipéptido RmS-17	31
Cuadro 3. Expresión intracelular de RmS-17 en <i>P. pastoris</i> X33	45

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias en animales, en especial las ocasionadas de manera directa e indirecta por ectoparásitos son un problema global que aminora la salud y el rendimiento productivo del ganado. Dentro de este grupo de ectoparásitos se encuentran las garrapatas, las cuales ocasionan enfermedades en animales domésticos y salvajes, además de transmitir diversos patógenos. La especie *R. microplus* es la más importante en el sector pecuario, en parte por las grandes pérdidas económicas que produce en la industria y en parte por su amplia distribución geográfica la cual abarca regiones tropicales y subtropicales del mundo (Domínguez *et al.*, 2016). Aproximadamente mil millones de cabezas de ganado bovino se encuentran expuestos a los efectos causados por las infestaciones, las cuales representan uno de los principales problemas en la productividad de los bovinos, sin olvidar el papel que juegan en la transmisión de enfermedades como babesiosis (*Babesia bovis* y *Babesia bigemina*) y anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) (Pegram *et al.*, 1993; Almazán *et al.*, 2010). Se estima que el costo global ocasionado por las garrapatas y las enfermedades que transmiten oscila entre los 2.5 billones de dólares anuales, y para el caso de México se estiman pérdidas aproximadas de 573.61 millones de dólares anuales (Lew-Tabor *et al.*, 2014; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

El método de control más utilizado para combatir este ectoparásito ha sido por mucho tiempo el uso de sustancias químicas. Estas, además de ser costosas, acarrearán problemáticas como la presencia de residuos químicos en los productos obtenidos de los animales, lo que a su vez genera problemas de salud pública. Ellas también producen una contaminación ambiental y el desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes a diversos ixodídeos, lo que dificulta su control y aumenta los costos de tratamiento. A raíz de estos inconvenientes, se han buscado distintas alternativas de control entre ellas las vacunas que, podrían formar parte de programas de control integral (Robbertse *et al.*, 2016; Domínguez *et al.*, 2016). Si bien en la actualidad en México se comercializa la vacuna Bovimune Ixovac® para el control de la garrapata *R. microplus*, se ha evidenciado la disminución de la eficacia de esta vacuna entre las cepas de distintas regiones geográficas, asociadas al polimorfismo en el gen codificador de la proteína Bm86 de la garrapata (García-García *et al.*, 1999; de la Fuente *et al.*, 2000).

En el proceso de encontrar candidatos vacunales nuevos, se han analizado una amplia variedad de proteínas localizadas y/o secretadas en glándulas salivales,

intestino y ovarios de las garrapatas (Labuda *et al.*, 2006; de la Fuente y Kocan, 2006; Mulenga *et al.*, 2007; Narasimhan *et al.*, 2007; Dai *et al.*, 2009; Almazán *et al.*, 2010; Schuijt *et al.*, 2011; Tirloni *et al.*, 2016; Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias, 2020). Entre estas proteínas se encuentran las Serpinas, una superfamilia de proteínas que poseen estructuras similares y que fueron identificadas primero por su inhibición de proteasa serina. Son conocidas por regular procesos celulares como la coagulación sanguínea, agregación plaquetaria, inflamación e inmunidad del hospedero que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis (Meekins *et al.*, 2017). Además, se han desarrollado inmunógenos en otras especies de garrapatas utilizando diversas Serpinas dentro de las cuales se encuentran: HLS1 y HLS2 de *Haemophysalis longicornis* (Sugino *et al.*, 2003; Imamura *et al.*, 2005), así como RaS-1 y RaS-2 en *R. appendiculatus* (Imamura *et al.*, 2006) y la proteína Iris de *Ixodes ricinus* (Prevot *et al.*, 2007).

De acuerdo con los antecedentes mencionados en esta investigación se pretende obtener un polipéptido de la Serpina RmS-17 utilizando un sistema de expresión eucarionte. Esta proteína se encuentra en varios órganos de la garrapata y cumple importantes funciones en la coagulación sanguínea (Tirloni *et al.*, 2015), también está involucrada en la respuesta inmune y en el proceso de alimentación de la garrapata (Rodríguez-Valle *et al.*, 2015; Tirloni *et al.*, 2016; Da Cruz, 2016). Recientemente, se demostró que la proteína RmS-17 presenta una región de interés con elevado grado de conservación entre cepas de *R. microplus* en distintas zonas geográficas de México (Martínez-Masa *et al.*, 2020), lo que resulta prometedor para el desarrollo de un antígeno vacunal para el control de garrapatas *R. microplus* en distintas zonas geográficas de México.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de las garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados debido a que la sangre es fundamental para llevar a cabo su ciclo de vida. Se consideran artrópodos ubicados taxonómicamente en la clase *Arachnida*, la principal característica de esta clase es que en su vida adulta su cuerpo estará dividido en dos regiones: gnatosoma e idiosoma y poseerá cuatro pares de patas (Faccioli, 2011; Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016). Es importante mencionar que el periodo de vida de las garrapatas va a depender de la especie y la temporada climática en la que se encuentre, sin embargo, raramente viven más de dos años. Esto se debe a múltiples factores como la humedad, pues en ausencia total es destructiva y en exceso permite la proliferación de hongos patógenos sobre ellas (CFSPH, 2007).

Por otra parte, es importante mencionar que son uno de los ectoparásitos más importantes a nivel pecuario, limitando la ganadería y afectando el 80% de la población bovina del mundo. Entre los problemas causados por garrapatas a los bovinos, se encuentra la falta de apetito, anemias por pérdida de sangre, irritación por picaduras, depreciación de pieles y transmisión de agentes patógenos (bacterias, virus y protozoos) que pueden generar enfermedades agudas, crónicas, e incluso la muerte (Cortés-Vecino, 2011). Asimismo, cabe mencionar que la especie de mayor importancia es *R. microplus*, más conocida como “garrapata común del ganado” (CFSPH, 2007).

2.2. Importancia económica en la ganadería bovina

Dentro del sector primario de la economía se incluye la actividad ganadera, la cual se define como la domesticación de animales enfocada en la generación de alimentos y productos para consumo humano (FIRCO, 2017). La ganadería bovina en México constituye un sector muy importante de la economía, generando en el 2018 un total de 34.820.271 cabezas de ganado a nivel nacional (SIAP, 2018), aportando ganancias de exportación que oscilan entre 500 y 700 millones de dólares al año (González-Sáenz, 2007).

Los tratados comerciales con Estados Unidos de Norte América (EUA) son muy importantes para México, ya que es su principal socio comercial. La exportación de cabezas de ganado desde México hacia Estados Unidos se ve limitada por la

infestación de garrapatas y las enfermedades que pueden transmitir en el ganado bovino (Skaggs *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2010). El gobierno norteamericano plantea constantemente el cierre de fronteras, debido a que la exportación representa un factor de riesgo para su propia ganadería. Esto tendría consecuencias económicas irreparables, y por ello, esta problemática se considera perjudicial para la producción pecuaria en México (Lew-Tabor *et al.*, 2014).

2.3. Clasificación

Actualmente se han identificado 896 especies de garrapatas divididas en tres familias: *Ixodidae* (garrapatas duras), las cuales poseen una lámina dorsal quitinizada (Fig. 1), el gnatosoma ubicado en la posición anterior y con dimorfismo sexual evidente; *Argasidae* (garrapatas blandas) que carecen de lámina dorsal, el gnatosoma se encuentra ventralmente y el dimorfismo sexual no es evidente; y por último, *Nuttalliellidae* que es monotípica porque solo contiene la especie *Nuttalliella namaqua*, de la cual se han podido registrar solo ninfas y hembras, comparte sus características morfológicas con las otras dos familias (Guglielmone *et al.*, 2010). En la actualidad se han podido determinar 650 especies de garrapatas divididas en trece géneros que están implicadas en la transmisión de hemoparásitos causantes de anaplasmosis y babesiosis (Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016).

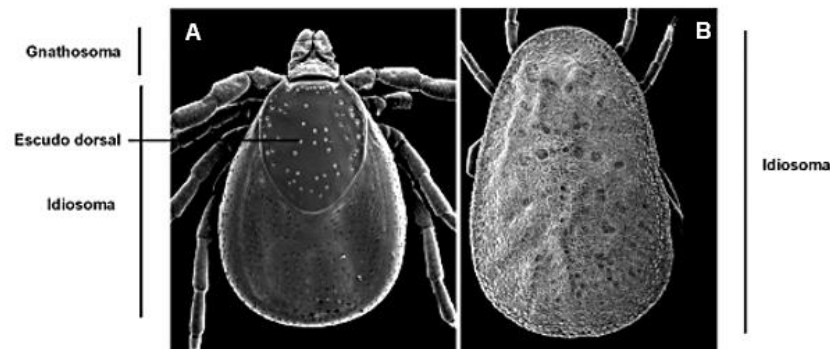


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de estructuras morfológicas de las garrapatas adultas de la familia *Ixodidae* (A) y *Argasidae* (B) en vista dorsal. (Estrada-Peña, 2015).

La familia *Ixodidae* está comprendida por 14 géneros que incluyen 702 especies: *Ixodes* con 243 especies, *Haemaphysalis* 166, *Amblyoma* 130, *Rhipicephalus* 82, *Dermacentor* 34, *Hyalomma* 27, *Bothriocroton* 7, *Anomalohimalaya* 3, *Margaropus* 3, *Nosomma* 2, *Rhipicentor* 2, *Cosmiomma* 1, *Cornupalpatum* 1, *Compluriscutula* 1 (Guglielmone *et al.*, 2010).

2.4. Alimentación

Las garrapatas son ectoparásitos obligados porque necesitan alimentarse de fluidos tisulares y sanguíneos de forma exclusiva para desarrollarse durante sus diferentes estadios. En el caso de la familia *Ixodidae* estos artrópodos hemimetábolos tienen un gnatosoma que contiene un par de palpos con cuatro artejos, un par de quelíceros (estructura especializada de desgarrar) con varias filas de dientes y un hipostoma (órgano succionador) que se usa como órgano de anclaje al hospedador. Al momento de alimentarse la garrapata se une al hospedador lacerando la piel con los quelíceros y se ancla al tejido con el hipostoma (Fig. 2) (Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016).

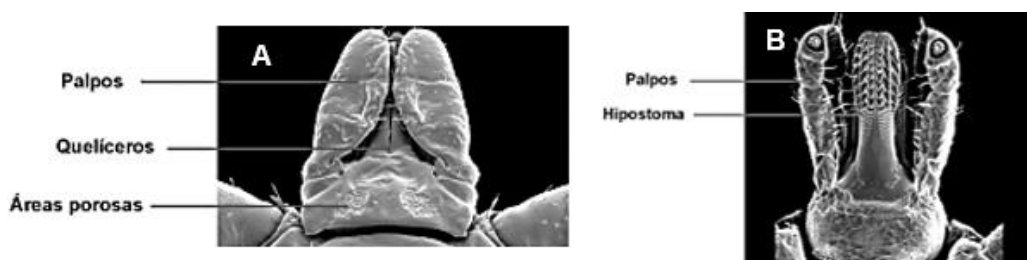


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido de garrapata hembra de la familia *Ixodidae*. Vista ampliada dorsal (A) y ventral (B) del gnatosoma. (Estrada-Peña y Fragosó, 2006).

Las hembras adultas de la familia *Ixodidae* aumentan aproximadamente 100 veces su peso original al alimentarse, periodo que tarda aproximadamente de siete a doce días. Los machos se alimentan intermitentemente y pueden permanecer en su hospedador hasta meses, a diferencia de las larvas y ninfas que lo hacen por periodos cortos, es por esto que, dependiendo del estado de desarrollo de la garrapata, será el tiempo que tarde en alimentarse (Cortés-Vecino, 2011; Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016).

2.5. Garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La garrapata *R. microplus* se considera la más importante de la ganadería bovina a nivel mundial debido a su amplia propagación, su capacidad vectorial, sus hábitos hematófagos y la cantidad de bovinos que afectan anualmente. Se encuentra en diversos hospedadores como bovinos, búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, perros, y algunos animales silvestres (Temeyer *et al.*, 2012). Antes era conocida como *Boophilus microplus*, pero fue reclasificada en el género *Rhipicephalus* spp. Mediante un estudio molecular del genoma, en el que se utilizaron secuencias de 16S rRNA (RNA ribosomal), se encontró estrechamente relacionado con la especie *Rhipicephalus bursa*, introduciendo a *Boophilus* como subgénero de *Rhipicephalus* spp. (Cuadro 1) (Barker y Murrell, 2008; Domínguez-García *et al.*, 2010).

Phylum	<i>Artropoda</i>
Clase	<i>Arachnida</i>
Orden	<i>Acarina</i>
Suborden	<i>Ixodoidea</i>
Familia	<i>Ixodidae</i>
Género	<i>Rhipicephalus</i>
Subgénero	<i>Boophilus</i>
Especie	<i>microplus</i>

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

2.6. Distribución geográfica

A nivel mundial *R. microplus* es endémica en África, Asia, Australia, el Caribe, India, Madagascar y México; se puede encontrar tanto en regiones tropicales como subtropicales, también tienden a predominar en pastos desbrozados con poco arbusto y maleza (Estrada-Peña y Fragoso, 2006).



Figura 3. Situación actual de la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp. (SENASICA-SADER, 2021).

La mayor diversidad de géneros y especies de garrapatas están distribuidas en áreas tropicales, subtropicales y templadas (Rosario *et al.*, 2009). En la ganadería bovina mexicana las especies de mayor relevancia son *Amblyomma mixtum*, la cual está presente en el 31% del territorio nacional y *R. microplus* que comprende un área de distribución del 65.96% de todo el territorio mexicano. El SENASICA por medio de la campaña nacional para el control de la garrapata *R. microplus* (Fig. 3) informó que en

el 2021 el 3.44% del territorio nacional se encontraba en fase de erradicación, además las zonas endémicas mantienen un estricto control integral para evitar infestación en las zonas ya libres de este ectoparásito.

2.7. Ciclo biológico

El ciclo de vida de *R. microplus* se completa en tres o cuatro semanas y está comprendido por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto (Fig. 4). Las infestaciones se producen al tener una gran carga de garrapatas en los animales en ese periodo de tiempo (Environmental Science, 2018).

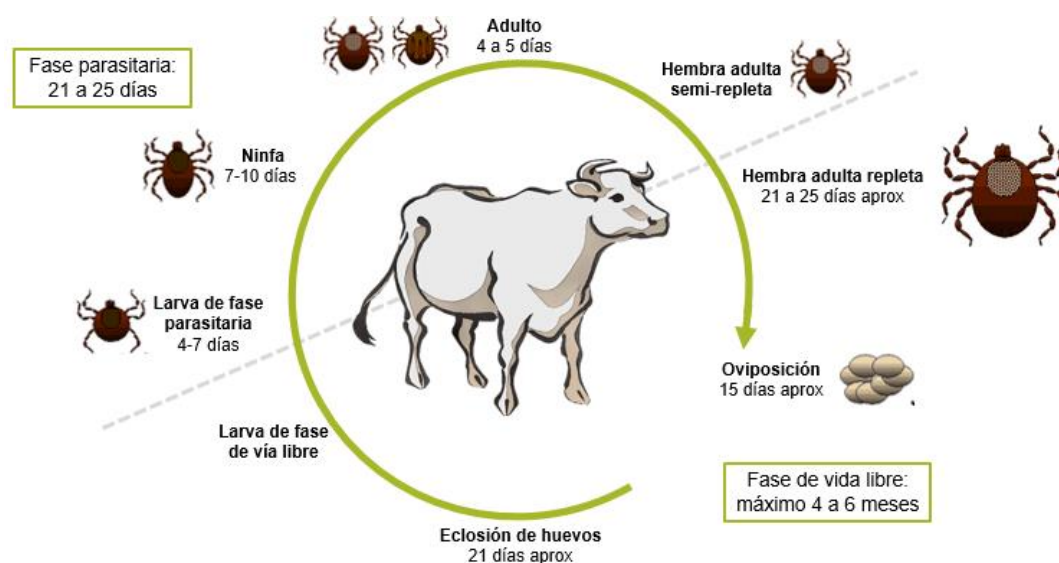


Figura 4. Ciclo de vida de *R. microplus* y sus estadios sobre el hospedador y fuera del mismo. Esquema construido con base en (Rosario *et al.*, 2009).

El primer paso del ciclo de vida es la eclosión de los huevos en el medio ambiente, esto genera la expulsión de muchas larvas que se mantienen a salvo en el suelo hasta que se encuentren con un hospedador, al subir se adhieren a las partes más delgadas de la piel como el pecho, abdomen, patas y la cara interna del muslo. El siguiente paso es alimentarse para que ocurra la primera muda y se convierten en ninfas, después en adultos, donde se lleva a cabo la diferenciación sexual entre machos y hembras (Sonenshine y Roe, 2013). En cada etapa de desarrollo la garrapata se alimenta una sola vez, pero este proceso toma varios días. Al culminar esta alimentación, los machos maduran y se aparean con hembras que pueden seguir alimentándose. Una vez que la hembra se ha apareado y alimentado se separa del hospedero y lleva a cabo la oviposición en el ambiente, culminado este proceso muere (Rosario *et al.*, 2009).

2.8. Respuesta inmune del bovino contra garrapatas

Para prolongar su alimentación durante la infestación en un bovino, la garrapata utiliza sustancias presentes en la saliva que le facilitan este proceso. Estas sustancias son reconocidas como extrañas al ingresar al bovino y estimulan herramientas inmunitarias, las cuales empiezan a sintetizar biomoléculas y células que actuarán sobre la garrapata (León-Clavijo y Hernández-Rojas, 2012). En este proceso intervienen la cascada del complemento, células NK, interferón gamma, macrófagos (interferón gamma y óxido nítrico), células cebadas, neutrófilos, células dendríticas (IL-6, TNF- α , IL-12p70) y células no inmunitarias como fibroblastos y queratinocitos (Fig. 5) (Hovious, 2009; Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias, 2020).

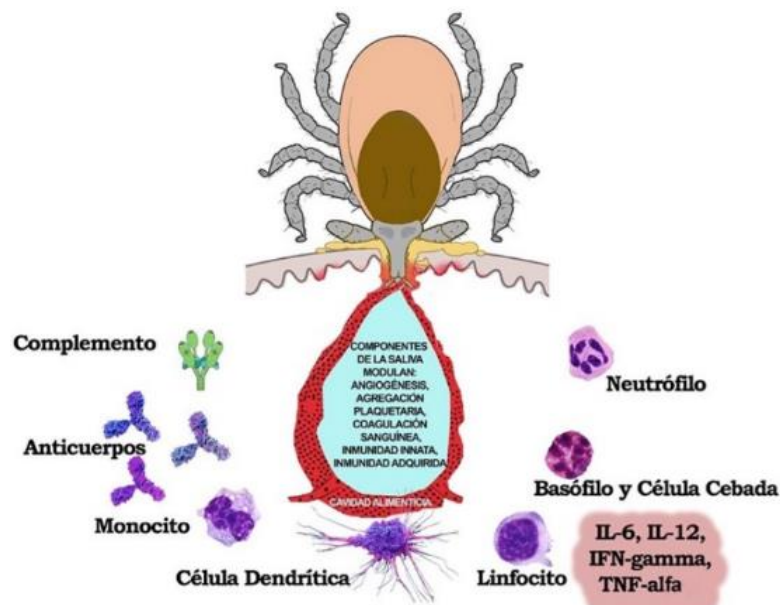


Figura 5. Relación garrapata-hospedador. Principales elementos del sistema inmunitario del bovino y los componentes de la saliva de la garrapata que modulan la respuesta inmune protectora del hospedador (Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias, 2020).

La saliva de la garrapata posee al menos 81 moléculas diferentes para bloquear y evadir la respuesta inmune del hospedador (Simo *et al.*, 2017). Esto se debe a procesos evolutivos altamente conservados, pero la respuesta inmunológica puede variar dependiendo de la especie de la garrapata y de su hospedador. Por ejemplo, se ha observado una variación en la resistencia a la infestación con garrapatas entre ganado *Bos taurus* y *Bos indicus*, sugiriendo que se debe a una mejora en la respuesta de las células T, lo que haría a las razas cebuínas mucho más resistentes. Otros estudios han demostrado que bovinos resistentes son capaces de producir anticuerpos específicos contra proteínas de la saliva de la garrapata (Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias, 2020).

2.9. Métodos de control

El control de este ectoparásito en los hatos se lleva a cabo mediante diferentes métodos, los cuales se pueden clasificar en químicos (ixodicidas o garrapaticidas) y no químicos (vacunas, tipo de vegetación, control biológico, selección de praderas, depredadores naturales, hospedadores resistentes, entre otros). Para llevar a cabo un control efectivo se deben aplicar sistemáticamente dos o más métodos de control de garrapatas, que afecten negativamente a los ectoparásitos sin generar riesgos sobre la salud humana y el ambiente. Por lo cual es indispensable generar programas de control integrado de garrapatas (CIG) mucho más robustos (Willadsen, 2006; Environmental Science, 2018).

- **Control químico**

Este tipo de control se basa en productos químicos sintéticos conocidos como ixodicidas, que buscan romper el ciclo de vida de la garrapata. Actualmente en México se utilizan más de 50 productos clasificados en seis familias en función de sus distintos mecanismos de acción: Organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS), Amidinas (Am), Lactonas macrocíclicas (LM), Fenilpirazolonas e inhibidores de desarrollo. Esta clasificación se debe a los distintos mecanismos de acción.

Todos estos productos pueden ser aplicados, ya sea por inmersión, aspersion, derrame dorsal y vía epicutánea (pour-on) o parental (inyectables). Este tipo de productos actúan de manera inmediata, son de larga duración y su aplicación es sencilla. No obstante, tienen un elevado costo, su uso indiscriminado puede generar contaminación en el ambiente, residuos de pesticidas en los productos animales (carne y leche), problemas de salud pública, además, de que su utilización continua ha generado garrapatas resistentes a múltiples ixodicidas, debido a la plasticidad del genoma de las garrapatas, provocando grandes pérdidas económicas (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

- **Control no químico**

Dentro de los principales métodos de control no químico de *R. microplus* se encuentran: la selección de hospedadores resistentes (sexo, edad, estado de gestación y lactación, temporada del año), la introducción de depredadores naturales (garzas y pájaros, hormigas), la rotación, descanso y quema de praderas (descansos obligados), la composición y tipo de vegetación (leguminosas), el control biológico (hongos entomopatógenos y plantas) y las vacunas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

En México, el uso de los ixodicidas es la estrategia más utilizada para el control de *R. microplus* que se aplican sobre el cuerpo de los animales infestados a intervalos específicos de acuerdo a la región ecológica, especies a las que se va a combatir y eficacia residual del producto empleado. No obstante, han ocasionado la selección de poblaciones resistentes de garrapatas *R. microplus*, por lo cual el método más promisorio para reducir las poblaciones de garrapatas es el uso de vacunas acopladas a un control integrado de garrapatas (CIG) (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006, 2007; Perez-Cogollo *et al.*, 2010; Fernandez-Salas *et al.*, 2012).

2.10. Resistencia a los ixodicidas

La importancia de la resistencia de las garrapatas a los ixodicidas radica en los problemas económicos que representa para los productores bovinos en el subtrópico y trópico, donde tienen un efecto costo-beneficio en la producción. El factor más importante en la aparición de esta resistencia es la dependencia a los tratamientos químicos para combatir las infestaciones por garrapatas (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). Este fenómeno de resistencia obliga a los ganaderos a modificar esquemas previos mediante el incremento de la concentración del producto químico, el cambio de producto con distinto compuesto activo, aumento del número de tratamientos simultáneos. Cualquiera de las acciones que tomen los ganaderos van a generar gastos adicionales en mano de obra y manejo de ganado (Céspedes *et al.*, 2002).

En México, se han reportado casos de resistencia múltiple a ixodicidas en los ranchos mexicanos y estos fenómenos se presentan en mayor proporción (66 - 95%) cuando se usan deltametrina, flumetrina y cipermetrina. En la actualidad, diversos estudios demuestran resistencia de *R. microplus* a ivermectina, fipronil, organofosforados, amidinas y lactonas macrocíclicas. El Estado de Veracruz fue el primero en reportar estos casos de multirresistencia, sin embargo, en los Estados de Tabasco y Tamaulipas también se encuentran diversas cepas caracterizadas con un comportamiento de multirresistencia (Rosario-Cruz *et al.*, 2005; Perez-Cogollo *et al.*, 2010; Fernandez-Salas *et al.*, 2012). Por lo anterior, se hace necesario buscar alternativas para el control de garrapatas, para reducir el uso de ixodicidas, los cuales representan un problema importante en la producción bovina.

2.11. Vacunas contra garrapatas

La hipótesis de que usar vacunas para el control de *R. microplus* sería eficaz, nace de una investigación realizada en 1918 en la cual se evidenció que el constante contacto entre el bovino y el ectoparásito hacía que el número de garrapatas se redujera gradualmente en las posteriores infestaciones (Akhtar *et al.*, 2011), pero no fue sino hasta décadas después que esta idea se materializó.

A partir de todas las investigaciones que se han realizado desde los años 80's para controlar las garrapatas, se han diseñado vacunas parcialmente efectivas (Willadsen *et al.*, 1988). Los primeros descubrimientos se basaron en clasificar a los antígenos en: expuestos, aquellos que se relacionan con la resistencia natural a la infestación y con cierta desventaja debido a que no co-evolucionan con las garrapatas produciendo una protección parcial (Rajput *et al.*, 2006); y los antígenos ocultos que permanecen ocultos para el sistema inmune del hospedador, y por lo cual, en la actualidad son de mayor importancia para el desarrollo de vacunas comerciales (Almazán *et al.*, 2012; González-Romo y Picazo, 2015).

A lo largo de los años se han utilizado diferentes antígenos ocultos de *R. microplus* como candidatos vacunales, entre los que se encuentran: Bm86 (el más conocido), Bm91, Bm95, Vitelogenina, ATAQ, Ferritin 2, Subolesina, Acuaporinas, entre otras (Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias, 2020). Entre los años 1993 y 1997 se usaron las primeras vacunas comerciales para el control de garrapatas en ganado bovino TickGard® (Australia) y Gavac® (América latina), posteriormente en el 2005 se comercializó Go Tick (Colombia) (Bentancourt *et al.*, 2005; de la Fuente *et al.*, 2007). Estas vacunas se hicieron a partir de la glicoproteína de membrana Bm86, la cual produce efectos negativos en el intestino de la garrapata, disminución del número de garrapatas y deficiencia de oviposición; sin embargo, es importante mencionar que debido a la presencia de polimorfismos en el gen codificador de la proteína, existen variaciones en la eficacia de acuerdo a la localización geográfica de la cepa de la garrapata (García-García *et al.*, 2000; Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias, 2020).

En México, se desarrolló recientemente la vacuna Bovimune Ixovac® a partir de la proteína Bm86 de una cepa mexicana "Media Joya" la cual fue expresada en *P. pastoris* y ha obtenido resultados prometedores en regiones donde se presentan garrapatas multirresistentes (Suárez-Pedroso *et al.*, 2007; Cunha *et al.*, 2012). No obstante, los polimorfismos genéticos y variantes antigénicas de las proteínas hacen

que su eficacia se vea afectada e incluso en algunos casos que el efecto de esta proteína sea nulo. Esto se debe tener en cuenta para el desarrollo de sistemas de control regionales, así como la elaboración de vacunas a partir de la combinación entre antígenos sintéticos y adyuvantes idóneos que permitan el establecimiento de una respuesta inmune por parte de los bovinos (García-García *et al.*, 1999; Olds *et al.*, 2016).

2.12. Desarrollo de inmunógenos contra garrapatas

Debido a todos los problemas que provocan los métodos químicos y a las limitaciones que tienen las vacunas para controlar las infestaciones de garrapatas, se ha enfatizado en el desarrollo de nuevas opciones en el control inmunológico. Lo ideal en este tipo de control es generar una respuesta inmune que sea capaz de disminuir paulatinamente la carga de ectoparásitos en el animal, reduciendo los problemas ambientales que generan los productos químicos y mejorando la inocuidad de los productos derivados de los bovinos (de la Fuente y Kocan, 2003).

Dentro de los métodos empleados para seleccionar antígenos contra garrapatas, las más utilizadas son técnicas de genómica funcional como silenciamiento génico, microarreglos de ADN, entre otras; así como las técnicas de proteómica como microarreglos de proteínas que permiten estudiar varias moléculas parasitarias al mismo tiempo (Criado *et al.*, 2008; Manzano-Román *et al.*, 2012).

Otra técnica que se ha utilizado es la búsqueda de proteínas y dominios extracelulares es la vacunología inversa. Lo novedoso de esta técnica es que usa herramientas bioinformáticas para encontrar antígenos potenciales antes de realizar las inmunizaciones en animales. Estas herramientas pueden procesar una amplia cantidad de datos genómicos, lo que podría ser útil para diseñar una vacuna sintética constituida por epítopos de alto interés antigénico (Aguirre *et al.*, 2016).

2.13. Serpinas

Las Serpinas son una superfamilia de proteínas que están conformadas entre 350 y 500 residuos de aminoácidos con pesos moleculares que varían de 40 a 60 kDa, que fueron identificadas primero por su inhibición de serina proteasa y se encuentran entre las moléculas más frecuentes presentes en la saliva de las garrapatas (Tirloni *et al.*, 2016). Estas proteínas son variables en su secuencia (17 - 95%), no obstante, poseen regiones en común que permiten la generación de una estructura estable compuesta

por tres láminas beta plegadas denominadas A, B y C, ocho o nueve hélices alfa y un sitio central reactivo (RCL) (Whisstock *et al.*, 2010). Estas proteínas regulan procesos como la coagulación sanguínea (cascada de coagulación), inflamación, activación de complemento y el mantenimiento de la homeostasis, sus efectos pueden ser usados por la garrapata para interrumpir el balance homeostático del hospedador, permitiendo así la infestación (Meekins *et al.*, 2017)

Las Serpinas conforman la más grande y variada familia de inhibidores de proteasas, en la que se han identificado 1500 proteínas en humanos, insectos, nematodos, plantas, hongos, artrópodos, artrópodos hematófagos y virus. Sin embargo, tienen una región en común que es la más significativa para su función, donde se encuentra su sitio central reactivo (RCL) (Law *et al.*, 2006). Este RCL es el que genera la interacción con la proteasa objetivo, está constituido entre 20 a 24 residuos y por su estructura es sumamente flexible y es expuesto al solvente (Stein *et al.*, 1990; Huntington, 2011). Para llevar a cabo su función, las Serpinas primero se deben unir a la proteasa mediante su RCL. Cuando este sitio central reactivo es separado por la proteasa, realiza un cambio conformacional inusual, el cual consiste en que el RCL se inserta en el centro de la hoja beta plegada-A formando una hoja beta adicional, esta transición se denomina “transición estresada (S) a relajada (R)”; esto deforma la estructura de la proteasa y evita que realice la catálisis, provocando su inhibición (Whisstock y Bottomley, 2006). Al inmunizar el ganado con Serpinas como RaS-1, RaS-2 y HLS1, se ha observado una reducción en la tasa de alimentación de las garrapatas, así como una mayor mortalidad de *Haemaphysalis* spp. y *Rhipicephalus* spp. Por lo cual, son antígenos promisorios para desarrollar inmunógenos que sean usados como vacunas contra garrapatas (Imamura *et al.*, 2006; Rodríguez-Valle *et al.*, 2015).

2.14. Serpina RmS-17

En *R. microplus* se han identificado 22 Serpinas, dentro de ellas se encuentra la proteína RmS-17, la cual ha sido estudiada como posible potencial vacunal. Esta proteína se encuentra principalmente en las glándulas salivales de la garrapata, aunque también es posible encontrarla en ovario y en el intestino medio, donde podría desempeñar un papel en la hematofagia permitiendo la absorción de sangre y manteniéndola en un estado fluido en el sitio de alimentación y después de la ingestión, lo cual interrumpe el balance homeostático del hospedador, por ende, está involucrada con la respuesta inmune de la garrapata. También se ha evidenciado que

interrumpe el tiempo de recalcificación del hospedador, lo cual está relacionado con la inhibición del factor XIa, implicado en la cascada de coagulación (Tirloni *et al.*, 2015).

Un estudio realizado por Tirloni en (2016), en el que se obtuvo una recombinante de RmS-17 utilizando el sistema de expresión de *P. pastoris*, demostró que la glicosilación de la proteína es importante para su reconocimiento por anticuerpos. Así mismo, se incubó dicha recombinante con una proteasa diana y un suero policlonal obtenido de la inoculación en conejos, lo cual evidenció una disminución de la función inhibitoria de la Serpina; esto podría sugerir que los anticuerpos producidos durante la inmunización podrían bloquear la función inhibitoria de la Serpina durante la alimentación interfiriendo con su desarrollo.

Por otra parte, un estudio reciente realizado por Coutinho en (2020) donde se evaluó el efecto de varias Serpinas sobre la respuesta inmune innata y adaptativa, se determinó que RmS-17 puede inhibir la permeabilidad vascular en la inflamación aguda e inhibir la actividad metabólica de los linfocitos, lo que se asocia con la disminución en la proliferación de linfocitos.

Recientemente se hizo el análisis molecular de un polipéptido derivado de la proteína RmS-17 en cepas y aislados de garrapatas *R. microplus* en México. El polipéptido se analizó mediante diferentes algoritmos bioinformáticos a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína RmS-17; cabe resaltar, que en esta región se encuentra el sitio central reactivo el cual es importante para la propiedad inhibitoria de las Serpinas. Dicha región se comparó con una amplia variedad de cepas y aislados de *R. microplus* y se encontró del 98% al 100% de identidad, lo que demuestra el alto grado de conservación del polipéptido RmS-17, lo que resulta favorable para el desarrollo de un antígeno vacunal para el control de *R. microplus* en distintas zonas geográficas de México (Martínez-Masa *et al.*, 2020).

2.15. *Komagataella (Pichia) pastoris*

Komagataella pastoris, más conocida como *P. pastoris* es una levadura perteneciente a la clase *Sacaromicetos* y al género *Komagataella* (Love *et al.*, 2016). Se utiliza ampliamente en la expresión de proteínas recombinantes, debido a su capacidad de integrar material genético foráneo a sus cromosomas, mediante la recombinación homóloga simple. Es una alternativa con respecto a los sistemas de expresión bacterianos, sobre todo, si se requieren modificaciones postraduccionales (Batt, 2014). En cuanto a su genoma tiene aproximadamente 9.4 Mb organizadas en cuatro

cromosomas, no tiene plásmidos nativos y normalmente se encuentra en estado haploide, aunque en condiciones adversas como la falta de nitrógeno, se estimula la forma diploide (de Schutter *et al.*, 2009).

Esta levadura es metilotrófica, es decir, tiene la capacidad de metabolizar el metanol como única fuente de carbono. El genoma de *P. pastoris* tiene dos genes (AOX1 y AOX2) que codifican para dos enzimas alcohol oxidasa (AOX); dichas enzimas usan el oxígeno molecular para oxidar el metanol hasta formaldehído. La levadura tiene poca afinidad por el oxígeno, por lo que genera grandes cantidades de la enzima en compensación. Cuando la levadura se crece en metanol como única fuente de carbono, la enzima AOX1 comprende más del 30% de la proteína soluble; mientras que AOX2 tiene un promotor más débil, que genera solo el 15% de la actividad oxidasa en la célula; por lo cual el promotor de AOX1 es el más utilizado (Batt, 2014).

De acuerdo a la capacidad que tiene la levadura para metabolizar el metanol, existen diferentes fenotipos de manera comercial: Mut⁺ que tiene mayor capacidad de metabolizar el metanol porque ambos genes AOX están intactos; Mut^s que tiene una baja capacidad de metabolizar el metanol, debido a que el gen AOX1 se encuentra interrumpido; Mut⁻ que tiene mínima capacidad de metabolizar el metanol, porque los genes AOX están interrumpidos y es incapaz de sobrevivir en presencia de metanol (Inan y Meagher, 2001). Ambos promotores, AOX1 y AOX2, tienen un sistema de regulación, el cual funciona con el mecanismo de represión/desrepresión que en altas concentraciones de glicerol y glucosa reprime la transcripción de los genes AOX, y el mecanismo de inducción que permite alcanzar altos niveles de expresión de la enzima cuando se cambia la fuente de carbono a metanol (Cregg *et al.*, 1993).

Uno de los factores más importantes en los sistemas de expresión eucariontes, son las modificaciones postraduccionales, debido a que están relacionadas con la estabilidad, el plegamiento, la antigenicidad y la actividad biológica de la proteína, entre otros (Lis y Sharon, 1993). *P. pastoris* es capaz de realizar procesamiento de secuencias señal, plegamiento de proteínas, generación de puentes disulfuro en el retículo endoplasmático, formación de estructuras secundarias locales, procesamiento proteolítico y glicosilación. Este último es muy importante ya que *P. pastoris* puede realizar N- y O-glicosilación, a diferencia de otras levaduras no hace hipermanosilaciones, ni presenta enlaces α 1-3 en las cadenas de manosas, ambas características están relacionadas con la hiperantigenicidad (Daly y Hearn, 2005). Los

oligosacáridos adicionados en las proteínas secretadas por *P. pastoris*, por lo general contienen en sus cadenas Man₈GlcNAc₂ o Man₉GlcNAc₂ (Montesino *et al.*, 1998).

Existe una amplia variedad de vectores de expresión para *P. pastoris*, algunos tienen un casete de expresión en el cual se encuentra la región 5' del promotor AOX1 y una pequeña secuencia derivada de un fragmento de AOX1 que es necesario para terminar la transcripción. También se encuentra el sitio múltiple de clonaje en el cual se inserta el material genético foráneo, este sitio se encuentra entre el promotor y el terminador. Para su mantenimiento en *E. coli*, estos vectores cuentan con un origen de replicación para su propagación, además tienen marcadores de selección tanto para *P. pastoris* como para *E. coli*. Otros vectores cuentan con señal del factor alfa (α -MF) de *Saccharomyces cerevisiae* para la secreción de proteínas, etiquetas de detección por anticuerpos y cola de polihistidinas para purificación (Invitrogen , 2010).

Algunas de las ventajas de usar el sistema de expresión de *P. pastoris* es que tiene un promotor regulado, alcanza elevadas densidades celulares, altos niveles de producción intra y extracelular de las proteínas de interés, habilidad de realizar modificaciones postraduccionales, rápida velocidad de crecimiento en medio de cultivo económicos y baja secreción de proteínas nativas al medio de cultivo (Vogl *et al.*, 2013).

2.16. Proteínas de *R. microplus* producidas en *P. pastoris*

Con la finalidad de controlar las infestaciones por *R. microplus*, desde décadas anteriores se han evaluado distintas proteínas de esta garrapata en *P. pastoris* utilizando diferentes cepas, vectores y fenotipos. El primer ensayo documentado realizó una comparación de los niveles de expresión del antígeno Bm86 entre *E. coli* y *P. pastoris*, donde se observó una mayor expresión de Bm86 en la levadura y la glicosilación del antígeno; además, en los ensayos de inmunización se observó un daño significativo en las garrapatas como resultado de la respuesta inmune contra el antígeno (Rodríguez *et al.*, 1994). Más adelante se desarrolló la vacuna Gavac utilizando el antígeno Bm86, obteniendo resultados favorables en los ensayos de inmunización, adicionalmente se demostró que dicha proteína expresada en *P. pastoris* podría ser buen candidato para combinar vacunas ya que funciona como inmunógeno y como adyuvante (García-García *et al.*, 1998).

Otro antígeno que ha sido clonado y expresado en *P. pastoris* es el Bm95, del cual se obtuvo una recombinante glicosilada que resultó eficaz sobre el número de garrapatas de diferentes cepas, incluso las que no se veían afectadas tras la vacunación del bovino con Bm86 (García-García *et al.*, 2000). Así mismo, el ADNc que codifica una región de interés de la aquaporina RmAQP1 se llevó a expresión utilizando el sistema de *P. pastoris* obteniendo así un antígeno prometedor para futuros ensayos inmunológicos (Guerrero *et al.*, 2014).

Las Serpinas son proteínas que han sido ampliamente estudiadas, en el 2016 se logró expresar en *P. pastoris* los antígenos RmS-3, RmS-6 y RmS-17, todos resultaron estar glicosilados y al ser enfrentados con antisuero bovino, solo las formas glicosiladas se lograron unir correctamente, lo que podría indicar que este proceso es muy importante para dichas proteínas. Adicionalmente, estos inmunógenos demostraron un papel inductor inmunogénico en la respuesta humoral, por lo que se pueden incluir como candidatos vacunales (Tirloni *et al.*, 2016). En un estudio posterior se obtuvo una recombinante de la Serpina RmS-15, la que es importante para la alimentación de las garrapatas (Xu *et al.*, 2016).

Recientemente se desarrolló la vacuna Ixovac usando germoplasma de la proteína Bm86 de una cepa mexicana de *R. microplus* "Media Joya", la que fue clonada y expresada en *P. pastoris*, obteniendo un antígeno glicosilado con resultados prometedores (Cunha *et al.*, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso excesivo de ixodicidas como la herramienta principal para el control de la garrapata *R. microplus* ha resultado en residuos en los productos derivados de los bovinos, toxicidad en los animales, efectos nocivos en el medio ambiente, además de selección de garrapatas resistentes. Esta problemática hace necesaria la utilización de métodos alternativos, como el control inmunológico basado en antígenos vacunales. En la actualidad, existen dos vacunas comerciales, no obstante, su eficacia es limitada debido a polimorfismos en los genes de cepas geográficamente distantes, llegando a tener un efecto nulo en algunos casos. Es por lo que se hace relevante el diseño de antígenos vacunales a partir de cepas locales y/o nacionales.

R. microplus posee unas proteínas llamadas Serpinas, las cuales son altamente conservadas y están relacionadas en procesos de alimentación, reproducción e interacción con la respuesta inmune del hospedador. Dentro de esta superfamilia está la proteína RmS-17 presente principalmente en las glándulas salivales de la garrapata, dicha proteína tiene características suficientes para ser considerada como candidato vacunal, además de tener una región de interés altamente conservada entre cepas de *R. microplus* en México, por lo tanto, podría usarse para controlar infestaciones por garrapatas *R. microplus* en distintas zonas geográficas de México.

Es importante mencionar que, en la producción de proteínas recombinantes se debe buscar un sistema de expresión que se adecue a las necesidades de la proteína, algunas requieren modificaciones postraduccionales como la glicosilación para poder llevar a cabo su actividad biológica normal (Eichler, 2019). La proteína RmS-17 tiene varios sitios de glicosilación los cuales están relacionados con el reconocimiento por anticuerpos, por lo cual el sistema de expresión de *P. pastoris* es adecuado para obtener un polipéptido recombinante de RmS-17, que posteriormente se pueda usar como inmunógeno.

IV. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar un polipéptido recombinante a partir de la secuencia inferida de la Serpina RmS-17 en el sistema de expresión de *P. pastoris* como propuesta de control de *R. microplus*.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✧ Amplificar y clonar el fragmento de interés en el vector *pJET1.2/Blunt*
- ✧ Subclonar el fragmento de interés en el vector de expresión pPICZαB
- ✧ Obtener cepa de *P. pastoris* X33 transformada con el plásmido pPICZαB/RmS-17.
- ✧ Caracterizar el tipo de mutante obtenida de *P. pastoris*.
- ✧ Caracterizar la curva de crecimiento celular de la cepa transformada.
- ✧ Determinar las condiciones de expresión del polipéptido recombinante de RmS-17 en medio completo (BMMY) usando metanol como única fuente de carbono.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo de manera compartida en los laboratorios de Artropodología y Epizootiología del CENID-SAI sede Palo alto y sede Jiutepec del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicados en CDMX y el Estado de Morelos.

6.1. Selección de la región de interés de la proteína RmS-17

La proteína RmS17 posee un dominio en el que se encuentra el RCL, que le confiere especificidad contra la proteasa objetivo para así producir su efecto inhibitorio, además de ser altamente conservada en la familia de Serpinas (Rodríguez-Valle *et al.*, 2015). Previamente, el grupo de investigación de la Unidad de Artropodología del CENID-SAI, INIFAP, analizó una región de interés dentro de la cual se encuentra el RCL, compuesta por 435 pb que van del nucleótido 643 - 1.077 de la secuencia completa; así mismo, la región corresponde a 145 aa. localizados entre los aa. 215 al 359 de la secuencia aminoacídica total. Dicha región está constituida por cuatro hélices alfa, siete láminas beta y una amplia proporción de giros aleatorios, es intracelular ya que no posee péptido señal ni región transmembranal, tiene un sitio de glicosilación en el residuo 48 y dos epítomos lineales de células B predichos como altamente inmunogénicos. También se demostró que la región seleccionada es altamente conservada entre cepas de *R. microplus* (Martínez-Masa *et al.*, 2020). Basando en lo anterior, se seleccionó para el presente estudio esta región de interés.

6.2. Amplificación y purificación de la región de interés

Se partió del plásmido pET100-D-TOPO/RmS-17 del cual se aisló el inserto, para ello se usó el oligonucleótido directo (5'-CACGTGATGTACGAACAGATCTCAGC-3') y el oligonucleótido reverso (5'-TCTAGAGCAGCTGCACTCTTCGTGTA-3') con los sitios de restricción *Pml* I y *Xba* I añadidos respectivamente, estos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. La reacción de PCR se realizó en tubos de microcentrífuga utilizando: 0.05 U/ μ L de *Taq* DNA polimerasa, buffer de reacción, 4 mM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTPs (PCR Master Mix (2X) Thermo Fisher Scientific™), 0.5 μ M de oligonucleótidos, 10 ng del producto de amplificación obtenidos de la RT-PCR y 5 μ L de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 50 μ L. La amplificación de la región de interés se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante (Fig. 6). Para la visualización, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris,

Acetato, EDTA) y para estimar el tamaño del amplicón y la concentración aproximada, se comparó su concentración aproximada con un marcador de peso molecular de 1Kb. La purificación se llevó a cabo a partir de 25 µL del producto de amplificación extraídos del gel de agarosa, utilizando el kit comercial FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen®), mediante el protocolo ya establecido en la Unidad de Epizootiología del CENID-SAI, INIFAP.

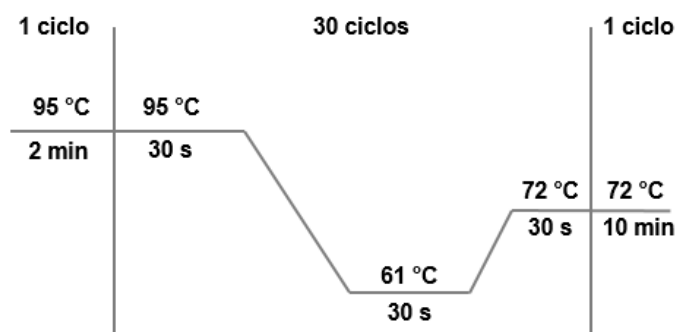


Figura 6. Condiciones de ciclo térmico de PCR para la amplificación del fragmento de interés seleccionado de la proteína RmS17. Se observan las temperaturas de desnaturalización inicial, desnaturalización, alineación, extensión y extensión final.

6.3. Ligación de la región de interés al vector de resguardo pJET1.2/Blunt

La región amplificada y purificada de 449 pb (con los sitios de restricción incluidos) se ligó al vector de resguardo pJET1.2/Blunt (Invitrogen), para ello, se agregó el inserto en una relación molar aproximada 1:6 (vector/inserto); este vector tiene un peso molecular de 2974 pb, un origen de replicación pUC ori, un promotor *Lac UV5*, un gen letal *eco47IR*, un marcador *bla* (ApR) que le confiere resistencia a la ampicilina y un sitio múltiple de clonación (Fig. 7). Para la ligación se utilizaron 10 µL del buffer de reacción 2X, 1 µL de la enzima blunting DNA y 7 ng del inserto. La mezcla se incubó a 70 °C por 5 minutos y se llevó a cabo un choque térmico en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se agregó 1 ng del vector pJET1.2/Blunt y 1 µL de la enzima ligasa, para un volumen final de mezcla de ligación de 20 µL, y se incubó a 22 °C durante toda la noche.

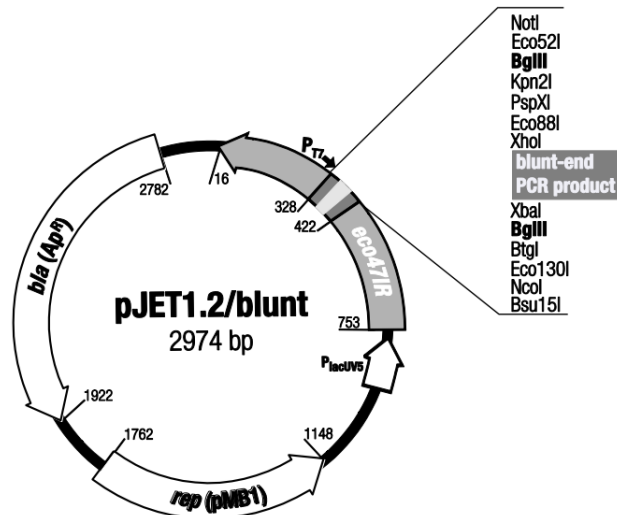


Figura 7. Mapa del vector de clonación pJET1.2 / blunt (Invitrogen).

6.4. Preparación de células competentes de *E. coli* One Shot Top 10

El producto de ligación se utilizó para transformar las células competentes de *E. coli* One Shot Top 10 (Invitrogen), las cuales se prepararon utilizando el método de Cohen *et al.*, (1972) de CaCl₂ y choque térmico, con algunas modificaciones. Dicho proceso se llevó a cabo inoculando 50 µL de medio LB con células de *E. coli* One Shot Top 10 y 25 mL de medio LB, se incubó a 37 °C a 250 rpm por aproximadamente 3 horas (densidad óptica de 0.35 UA) para la preparación de las células competentes. Una vez que se obtuvieron las células competentes se utilizaron 200 µL y 10 µL de producto de ligación, para cada transformación. La mezcla se colocó en hielo por un minuto y se llevó a choque térmico a 42 °C por 90 segundos exactamente, inmediatamente después se colocó en hielo por dos minutos; seguido de esto, se adicionaron 800 µL de medio LB y se incubó a 37 °C por 45 minutos con agitación moderada. Terminada la incubación se plaquearon por 200 µL de las células transformadas en cajas de agar LB + antibiótico (ampicilina 100 µg/mL, zeocina (25 µg/mL) y se incubaron a 37 °C por 16 horas. Por último, se seleccionaron diez colonias transformadas positivas, es decir que incorporaron el vector, y de manera independiente se propagaron en 5 mL de medio LB con 5 µL antibiótico y se dejaron en crecimiento toda la noche a 37 °C a 250 rpm. Al siguiente día, todos los pre cultivos se sembraron en cajas de agar LB + antibiótico y, se almacenaron a 4 °C para su conservación hasta ser analizados.

6.5. Extracción de plásmidos

Una vez que terminó la incubación se pusieron a crecer todos los pre cultivos en cajas de agar LB + antibiótico (ampicilina 100 µg/mL, zeocina 25 µg/mL) y posteriormente se

almacenaron a -20 °C para conservar las colonias. Por otra parte, la extracción de ADN plasmídico se realizó con el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2001), con el kit comercial FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen®), mediante el protocolo ya establecido en la Unidad de Epizootiología del CENID-SAI, INIFAP. Las extracciones se eluyeron en 100 µL de agua libre de nucleasas y para su visualización, fueron separadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% en buffer TAE (Tris, Acetato, EDTA). Por último, se realizó una dilución 1:20 de los plásmidos y se analizaron mediante PCR con el mismo protocolo establecido anteriormente para identificar la región de interés. Los amplicones obtenidos en la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % en buffer TAE (Tris, Acetato, EDTA).

6.6. Digestión y liberación de la región de interés de RmS-17 a partir del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17

Con el objetivo de seleccionar la clona que tuviera la región de interés clonada en la orientación deseada, se digirió el plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17 con la enzima *Xba* I. Esto, como estrategia fundamental para asegurar que el inserto quedara en fase cuando se subclonara en el vector de expresión pPICZαB, debido a que tanto el inserto como el vector pJET1.2/Blunt tenían el sitio de restricción *Xba* I (Fig. 8).

El vector pJET1.2/Blunt/RmS-17 fue extraído y purificado de las colonias transformadas positivas en las cuales se visualizó la región de interés, se digirió con la enzima de restricción *Xba* I (Invitrogen) por dos horas a 37 °C; la digestión se realizó con 2 µL de buffer de la enzima (10X), 10 µL (1 µg) de vector, 0.1 µL (1 U) de la enzima *Xba* I y 7.9 µL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 20 µL, al finalizar la incubación se detuvo la reacción incubando el producto por 20 minutos a 65 °C.

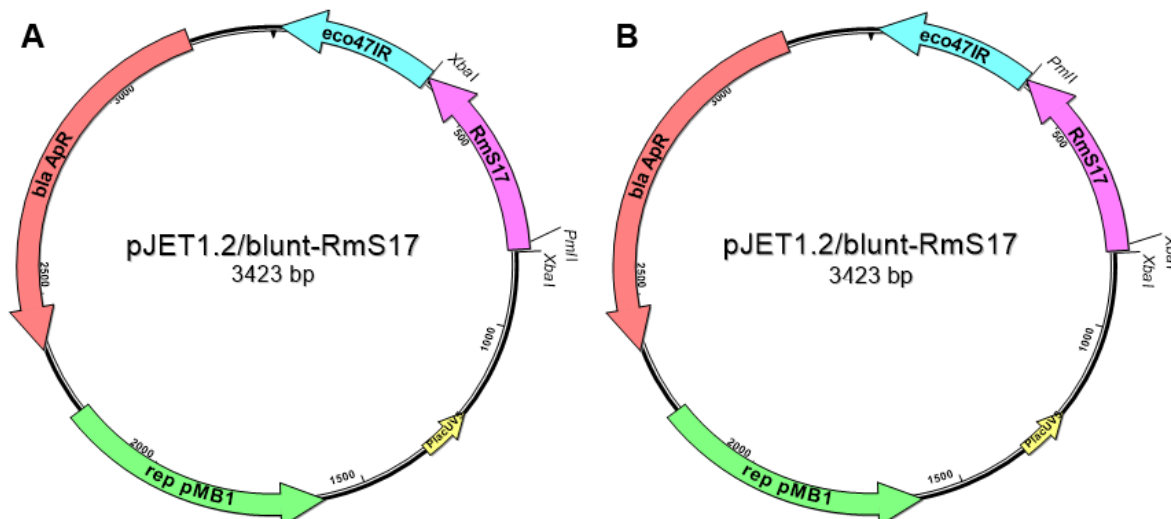


Figura 8. Mapa del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17. **(A)** el inserto ligado con el sitio de restricción de *Pml* I en la región 5' y *Xba* I en la región 3', muestra la orientación deseada. **(B)** el inserto ligado con el sitio de restricción de *Pml* I en la región 3' y *Xba* I en la región 5', muestra la orientación no deseada.

El siguiente paso fue extraer el inserto del vector de resguardo mediante una doble digestión enzimática, primero con *Pml* I la cual abrió el vector y posteriormente con *Xba* I quien liberó el inserto. Después se realizó una purificación de banda, que se llevó a cabo a partir de 110 μ L del producto de digestión, utilizando el kit comercial FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen®), mediante el protocolo ya establecido en la Unidad de Epizootiología del CENID-SAI, INIFAP. La purificación se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % en buffer TAE (Tris, Acetato, EDTA), y se comparó con un marcador molecular de 1 Kb.

6.7. Subclonación en el vector de expresión pPICZ α B

Para realizar la subclonación en el vector de expresión pPICZ α B (Invitrogen), primero se linealizó dicho vector realizando cortes enzimáticos con *Pml* I y *Xba* I en el sitio múltiple de clonación, en el cual posteriormente se ligó la región de RmS-17 de 441 pb, para ello, primero se estimó la concentración del inserto (10 ng/10 μ L) y del vector (92 ng/ 5 μ L) comparando la concentración aproximada con un marcador molecular de 1Kb, después, se agregó el inserto en una relación molar aproximada 1:3 (vector/inserto).

El vector pPICZ α B tiene un peso molecular de 3597 pb (Fig. 9), está compuesto por un origen de replicación pUC para la replicación y mantenimiento en *E. coli*, un marcador *Sha ble* que le confiere resistencia a la zeocina, promotores EM7 (procariota) y TEF1 (eucariota) para la expresión del gen de resistencia a la zeocina, el origen de

replicación 5' AOX1 para la expresión en presencia del metanol, la señal de terminación de la transcripción de AOX1 para su poliadenilación, la señal de secreción del factor α (Glu-Lys-Arg-Glu-Ala-Glu-Ala) para la secreción de la proteína al medio extracelular, un sitio múltiple de clonaje donde se ligó el inserto, un epítipo c-myc para la identificación de la proteína en western blot utilizando anticuerpos contra la misma, una etiqueta de seis histidinas para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad y un codón de paro (TGA).

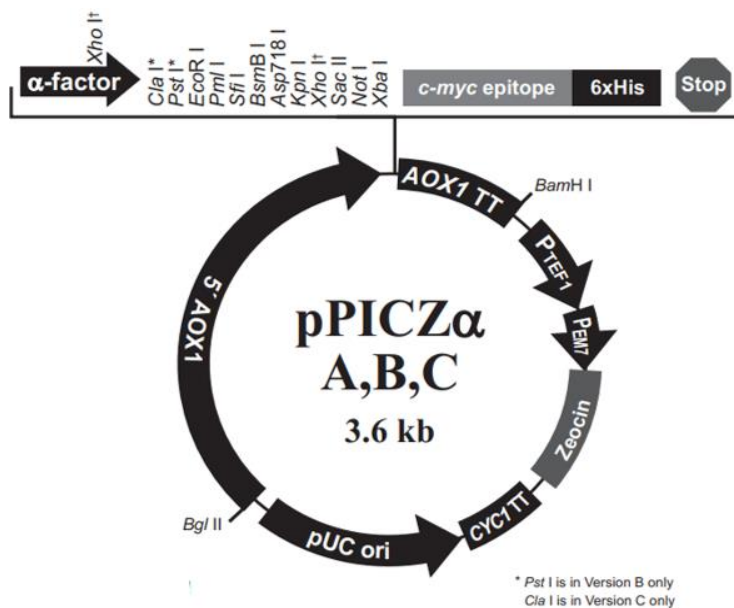


Figura 9. Mapa del vector de expresión pPICZ α B (Invitrogen).

Finalmente, con la mezcla de ligación (pPICZ α B/RmS-17) se transformaron células competentes de *E. coli* One Shot Top 10, usando zeocina (25 μ g/mL) como antibiótico. Se seleccionaron colonias para realizar extracción de ADN plasmídico y dichos plásmidos se caracterizaron por pruebas de patrón de digestión, PCR y secuenciación. Para esta última los insertos de tres colonias se secuenciaron usando los oligonucleótidos diseñados para la región de interés de RmS-17, en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT, UNAM) mediante secuenciación automatizada en un equipo Applied Biosystems. Las muestras se prepararon de acuerdo a los lineamientos establecidos por el IBT.

6.8. Preparación de células competentes de *P. pastoris* X33

Con el objetivo de realizar recombinación homóloga entre el plásmido pPICZ α B/RmS-17 y el locus de AOX1 del genoma de *P. pastoris* X33, se linealizó el plásmido en la región 5' AOX1 utilizando el sitio de restricción de la enzima *Pme* I (Invitrogen). Posteriormente, se transformaron células competentes de *P. pastoris* X33 (Invitrogen)

con el producto de digestión purificado, se utilizó el método de LiCl (Gietz y Schiestl, 2007). Este proceso se llevó a cabo a partir de un precultivo, el cual fue inoculado con 20 μ L de células *P. pastoris* X33 en 10 mL de caldo YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa), incubando a 30 °C a 240 rpm durante toda la noche. Una vez crecido el precultivo se usó para inocular 30 mL de caldo YPD y se dejó en crecimiento hasta alcanzar una D.O. de 1 a 600 nm para posteriormente preparar las células competentes con LiCl a 100 mM.

Para la transformación de cada colonia se utilizaron 50 μ L de células *P. pastoris* X33 y 10 μ L de plásmido linealizado, adicionalmente se transformó un control negativo (50 μ L células competentes sin inserto). Para la mezcla de cada transformación se adicionaron 240 μ L de polietilenglicol (PEG-3350) al 50%, 36 μ L de LiCl al 1 M, 5 μ L de DNA de esperma de salmón desnaturalizado en TE y 20 μ L de plásmido linealizado, se resuspendió la mezcla por dos minutos hasta homogeneizar. Después se incubó a 30 °C por 30 minutos sin agitación y de inmediato se llevó a choque térmico a 42 °C por 25 minutos exactamente. Posteriormente, se realizó una centrifugación por cinco minutos a 8000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de caldo YPD, después se incubó por cuatro horas a 30 °C con agitación constante. Terminada la incubación se plaquearon 100 μ L de cada transformación en cajas de agar YPD + zeocina (200 μ g/mL) y se incubaron a 30 °C por tres días. Por último, se seleccionaron cuatro colonias de cada transformación para hacer precultivos en 10 mL de caldo YPD + zeocina (200 μ g/mL) con el objetivo de guardar permanentes en glicerol al 33% a -80 °C para conservar cada colonia.

6.9. Extracción de ADN genómico de las transformantes de *P. pastoris* X33

La obtención de ADN genómico se realizó mediante el método de Hoffman (1987) con algunas modificaciones de acuerdo con protocolos establecidos en el CENID-SAI, INIFAP. A partir de los precultivos de cada colonia seleccionada en 10 mL de caldo YPD + zeocina (200 μ g/mL), se realizó lisis celular con 200 μ L de solución de lisis (Tritón al 2%, SDS al 1%, NaCl a 100 mM, Tris-HCl a 10 mM, EDTA al 0.2 M). Posteriormente, se adicionaron 200 μ L de solución de purificación (25 mL de fenol, 24 mL de cloroformo, 1 mL de alcohol isoamílico), con el fin de obtener las tres fases (acuosa, interfase y orgánica). Con ayuda de perlas de vidrio y vórtex se hizo lisis celular y la fase acuosa se recuperó para adicionar 10 μ L de acetato de sodio al 3 M frío para precipitar el ADN. Por último, se adicionaron 850 μ L de etanol absoluto para

facilitar la precipitación y se dejó incubando a -20 °C durante toda la noche. Al siguiente día se realizaron lavados al pellet con etanol frío al 70% y se resuspendió finalmente con 100 µL de agua libre de nucleasas.

Con el objetivo de analizar cualitativa y cuantitativamente el ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % en buffer TAE (Tris, Acetato, EDTA), y se comparó con un marcador molecular de 1 Kb. Luego, se obtuvo la concentración del DNA de cada colonia midiendo la absorbancia a 260/280 nm con un Nanophotometer®. Por último, se llevó a cabo una amplificación del inserto de RmS-17 a partir de ADN genómico de *P. pastoris* X33 con el objetivo confirmar la transformación.

6.10. Determinación del fenotipo Mut de las células competentes de *P. pastoris* X33

Para confirmar el fenotipo Mut⁺ de las cepas transformadas, primero se aislaron las recombinantes de plásmido pPICZαB/RmS-17 y se incubaron en caldo YPD + zeocina (200 µg/mL) a 30 °C a 240 rpm, durante toda la noche. Posteriormente se sembró cada colonia de manera independiente y simultánea en placas de medio MDH (medio mínimo con dextrosa e histidina) y MMH (medio mínimo con metanol e histidina) y se dejó incubando a 30 °C durante tres días. Por último, se comparó el crecimiento de cada colonia en ambos medios.

6.11. Expresión de la proteína RmS-17 en X33/RmS-17

Para llevar a cabo las pruebas de expresión se utilizó el método de Cregg y Higgins (1998) con algunas modificaciones establecidas en la Unidad de Epizootiología del CENID-SAI, INIFAP. Los ensayos se iniciaron a partir de cinco mL de medio YPD inoculado con la colonia recombinante y se dejó creciendo a 30 °C por 24 horas. Este precultivo se utilizó para inocular 100 ml de medio complejo de glicerol tamponado (BMGY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1.34% de base nitrogenada de levadura, 0.00004 % de biotina y 1% de glicerol), con una D.O. inicial de 0.05 en matraces de 250 ml y se incubó a 30 °C en agitación constante a 240 rpm, hasta llegar a una D.O. de 6 a 600 nm, y así aumentar la biomasa de *P. pastoris* X33.

Una vez que se logró este objetivo, se procedió a realizar la prueba de inducción con metanol, para ello, las células se recuperaron por centrifugación y se re-suspendieron

en 100 ml de medio complejo de metanol tamponado (BMMY: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 100 mM de fosfato de potasio pH 6, 1.34% de base nitrogenada de levadura, 0.00004 % de biotina y 0.5% de metanol), con una D.O. inicial de 1, en matraces de 500 mL y se incubó a 30 °C con agitación constante a 240 rpm para inducir la expresión. Se dejó en crecimiento alimentando con metanol a una concentración final de 1% cada 24 horas durante cuatro días. Durante todo el ensayo se tomaron muestras y se midió el crecimiento celular mediante la absorbancia para posteriormente analizarlos. Se realizaron diversos ensayos de expresión en el que se determinaron las condiciones óptimas para la producción de la proteína, teniendo en cuenta el protocolo de Invitrogen y lo descrito por otros autores

6.12. Caracterización del crecimiento celular de X33/RmS-17

La colonia X33 sin transformar y la colonia recombinante X33/RmS-17 se cultivaron en matraces con 50 mL de medio YPD, esto se realizó por triplicado. Las colonias se incubaron a 30 °C con constante agitación a 240 rpm y se monitoreó su crecimiento celular a lo largo de 50 horas, comenzando con una D.O. de 0.1 a 600 nm. Se tomaron muestras cada dos horas para determinar el crecimiento celular midiendo la densidad óptica (DO) de los cultivos en las fases exponencial, de desaceleración y estacionaria. Los resultados fueron comparados con el modelo de crecimiento celular y utilizando la herramienta “solver” de Excel se iteraron los valores experimentales. El siguiente paso fue graficar los resultados obtenidos en cada medición con la herramienta SigmaPlot 12.5 para obtener una curva de crecimiento de las levaduras y así poder compararlas.

6.13. Electroforesis desnaturalizante e inmunodetección

Cada muestra de cultivo tomada de la expresión de X33/RmS-17 se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos a 10 °C, para separar las células del medio de cultivo. Primero se realizó una lisis celular al sedimento para analizar la fracción intracelular utilizando tampón de rompimiento (50 mM de fosfato monobásico de sodio pH 7.4, 1 mM de EDTA y 5% de glicerol), se agregó un volumen de perlas de vidrio (0.5 mm) y se sometió a ocho ciclos de 30 segundos de agitación en vórtex seguido de 30 segundos de incubación en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se usó para la determinación de proteína total usando el ensayo de Bradford (1976) con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para la curva patrón. Finalmente, se analizaron 25 µg de proteína en geles de PAGE-SDS.

Por otra parte, las proteínas del medio libre de células se concentraron diez veces precipitando con sulfato de amonio al 80% e incubando a 4 °C durante toda la noche en agitación constante, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos a 10 °C y el sedimento se resuspendió en agua destilada estéril. A continuación, las muestras se dializaron con Tris-HCl al 5 mM pH 8.0 (500 volúmenes de muestra inicial) en agitación constante.

Cada muestra obtenida se separó en geles de SDS-PAGE al 12% de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Las bandas se visualizaron con una solución de tinte (0.05 % Azul de Coomassie G-250, 10% ácido acético, 50% metanol) y el exceso de colorante se eliminó con la solución de desteñido (10% ácido acético, 50% metanol). Para la inmunodetección por Western blot se utilizó el método de Burnette (1981) con algunas modificaciones establecidas en la Unidad de Epizootiología del CENID-SAI, INIFAP. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en transferencia semi seca a 24 V por 55 minutos, usando un tampón de transferencia (1.515 g de Tris-base, 7.2 g de glicina, 100 mL de metanol, 0.5 g de SDS para 500 mL) y se bloqueó con 5% de leche descremada en un tampón de PBS-Tween al 0.1% (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.15 M de NaCl, 0.05% de tween 20) a 4 °C durante 16 horas con agitación moderada. Posteriormente la membrana se lavó tres veces con PBS-Tween al 0.1% y se incubó con diversos anticuerpos para la detección de la proteína recombinante: el anticuerpo anti-myc con una dilución 1:5000, y el anticuerpo anti-His con una dilución 1:5000 como primer anticuerpo e IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, Invitrogen) como segundo anticuerpo (1:5000). Por último, cada membrana se lavó tres veces con PBS-Tween al 0.1% y las bandas se revelaron con 20 mL de PBS pH 7.4, 0.0125 g de Diaminobencidina (DAB) y 25 µL peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 30%.

VII. RESULTADOS

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

Se seleccionó un polipéptido a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína RmS-17 reportada en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (AHC98668.1). En la figura 10 se observa la región constituida por 435 pb (A) equivalentes a 145 aminoácidos (B), localizada entre los nucleótidos 643-1.077 y los aminoácidos 215 y 359 de la proteína completa.

(A) Secuencia nucleotídica del polipéptido de RmS-17 cepa "Porto Alegre"
ATGTACGAACAGATCTCAGCGGGGTACGCCCGAGACGACGAGACGAACGCCGATGTTCTGGACCTG CCTTACGCCGGGCTCGACTACAGCCTGACGATCATTCTTCTAGAGAGAGGACTGGTGTGGACGCGC TGAGGCAGAATCTATCGTGGCCATCTTCCAACGCCTTCTGTCCAAGCTCAACATGAATTCTCCCATG GAGGTGTCGCTGCCCAAGTTCAAGATCGAGGGCTCGTACAACTGAAGGCGCCCTGTCGGCGCTA GGAGCCTCGAAGGCCTTCGACGAGCGATATGCCGACTTCTCCGGCATCAGCGGCGCCCGTGACCTG ACCATATACGACGTCGTTACAAGGCCGTGGTTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGT GCCACTGCAGTCATCTTCTACACGAAGAGTGACGCT
(B) Secuencia aminoacídica del polipéptido de RmS-17 cepa "Porto Alegre"
MYEQISAGYARDDETNADVLDLPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSKLNMNSPMEVSL PKFKIEGSYKLPKAPLSALGASKAFDERYADFSGISGARDLTIYDVVHKAVVEVNEEGSEAAGATAVIFYTKS AA

Figura 10. Secuencia (A) nucleotídica y (B) aminoacídica del polipéptido seleccionado de RmS-17 de *R. microplus* cepa "Porto Alegre" reportada en la NCBI.

7.2. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (Cuadro 2) se diseñaron de acuerdo con las directrices establecidas en el protocolo de PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific™), usando la secuencia nucleotídica de RmS-17 cepa "Porto Alegre". Con el fin de subclonar el polipéptido de RmS17 en el vector de expresión para *P. pastoris*, los oligonucleótidos fueron diseñados para que la región de interés quede en fase con el vector de expresión pPICZαB, para lo cual se insertaron sitios de restricción (*Pml* I y *Xba* I). Ambos oligonucleótidos tienen una longitud de 26 pb, fueron sintetizados en la Unidad de Secuenciación del IBT-UNAM y utilizando la herramienta OligoAnalyzer, se confirmó que se encontraran dentro de los parámetros óptimos. Al realizar el ensayo de gradiente de temperatura ambos oligonucleótidos hibridaron mejor a una temperatura de 61 °C.

Oligonucleótidos	Tm °C	Secuencia
Forward	61 °C	5'- CAC GTG ATG TAC GAA CAG ATC TCA GC -3'
Reverse	61 °C	5'- TCT AGA GCA GCT GCA CTC TTC GTG TA -3'

Cuadro 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del polipéptido RmS-17 de *R. microplus* y subclonación en pPICZαB.

7.3. Amplificación y purificación de la región de interés

Para la amplificación del fragmento de interés se utilizó cDNA y se probaron distintas temperaturas para determinar la Tm °C óptima en la que los oligonucleótidos amplificaban. En la figura 11 se observan cinco carriles en los cuales se evidenció un peso molecular entre 250 y 500 pb. El amplicón esperado fue de 449 pb por los sitios de restricción añadidos a la región de interés.

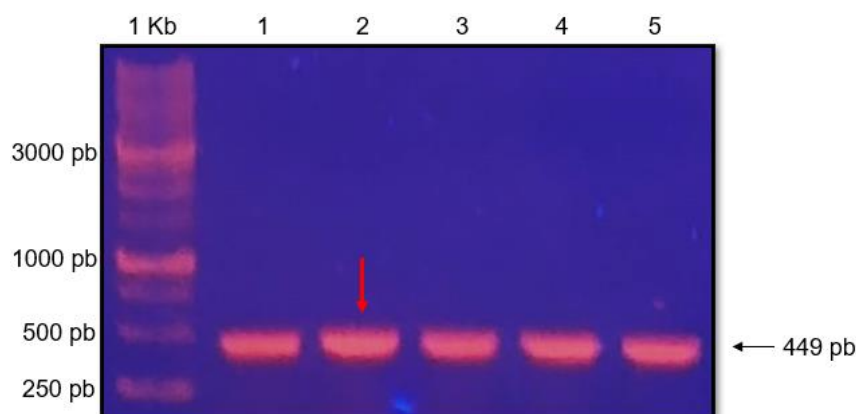


Figura 11. Amplificación del fragmento de interés de RmS-17 de la garrapata *R. microplus*, con los sitios de restricción (*Pml* I y *Xba* I) añadidos, equivalente a 449 pb. Temperaturas analizadas (carril 1: 59 °C, carril 2: 60.6 °C, carril 3: 63.1 °C, carril 4: 67.1 °C, carril 5: 69 °C). Gel de agarosa al 1 % con Buffer TAE 1X; Marcador de peso molecular 1 Kb.

Como se puede observar en la figura anterior, todas las temperaturas probadas amplificaron el fragmento de interés; sin embargo, a una temperatura de 60.6 °C (línea roja) la intensidad de la banda es mayor, por lo cual se seleccionó para los siguientes ensayos. Posteriormente, el producto de PCR fue purificado a partir del gel de agarosa y posteriormente se comparó con el bandeo generado por el marcador de peso molecular de 100 Pb, se observa una banda entre 400 y 500 pb. Al contrastar la intensidad de la banda obtenida, con la intensidad de las diferentes bandas generadas por el patrón de peso molecular, se puede estimar una concentración aproximada de 70 µg. Finalmente se procedió a clonar el producto purificado en el vector de resguardo.

7.4. Ligación de la región de interés al vector de resguardo pJET1.2/Blunt

Para poder llevar a cabo la subclonación en el vector de expresión del gen RmS-17, era necesario llevar a cabo una primera clonación en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt y así poder realizar adecuadamente la digestión enzimática. Con el programa SeqBuilder de DNASTar se realizó el diagrama del vector con el inserto de interés (Fig. 12). En dicho diagrama se observa que el inserto RmS-17 se clonó con el sitio de restricción *Xba* I posicionado en la región 5' del vector.

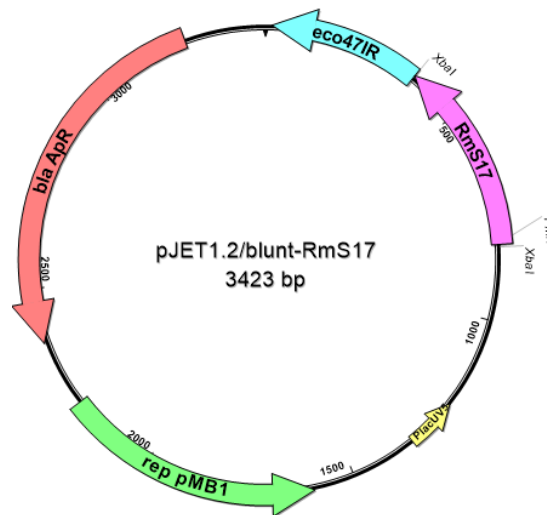


Figura 12. Mapa de la ligación en el vector de clonación pJET1.2 / blunt en la orientación esperada.

7.5. Transformación de células competentes de *E. coli* con el plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17

Con el producto de ligación se procedió a llevar a cabo la transformación, en la figura 13 se observa como control negativo células *E. coli* One Shot Top 10 que sufrieron el proceso de transformación, pero a las cuales no se les añadió ningún inserto (A); como control positivo células transformadas en la Unidad de Epizootiología del CENID-SAI, INIFAP con un plásmido pJET anteriormente caracterizado (B); la transformación de las células *E. coli* One Shot Top 10 con el producto de ligación; vector pJET1.2/Blunt/RmS-17 (C). Se seleccionaron diez colonias de la transformación con el vector pJET1.2/Blunt/RmS-17 para hacer extracción del plásmido.

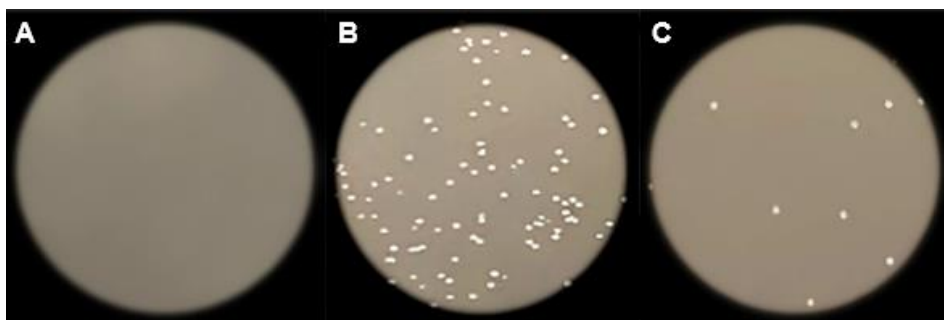


Figura 13. Transformación de las células *E. coli* One Shot Top 10 en agar LB + ampicilina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), incubadas a 37 °C a 200 rpm durante toda la noche. **(A)** control negativo, **(B)** control positivo y **(C)** vector pJET1.2/Blunt/RmS-17.

7.6. Extracción del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17 y amplificación de la región de interés

Una vez propagadas las clonas seleccionadas se extrajo el ADN plasmídico y se analizó en geles de agarosa, de lo cual se obtuvo una banda de cada una de las colonias de pJET1.2/Blunt/RmS-17 como se observa en la figura 14 (A). El siguiente paso fue amplificar la región de interés a partir de la extracción del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17. En la figura 14-B se pudo observar el bandeo correspondiente al gen Rms-17 en todas las colonias con excepción de la número nueve.

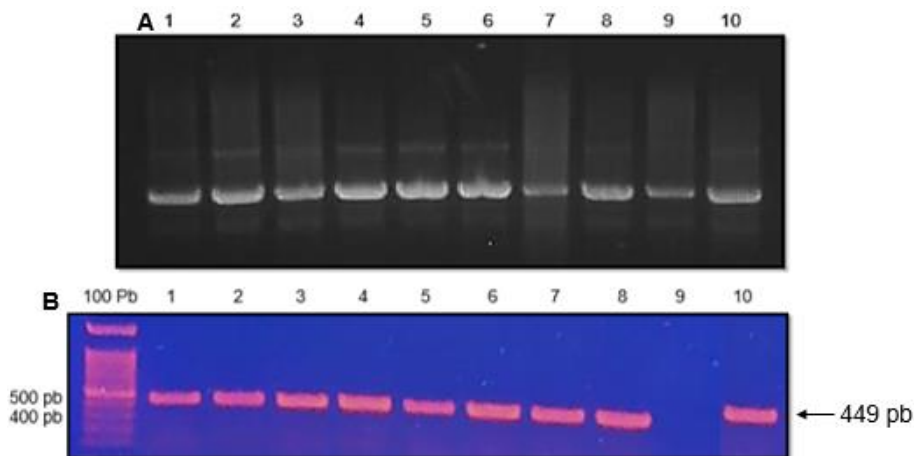


Figura 14. **(A)** extracción del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17, **(B)** amplificación de la región de interés de RmS-17. Geles de agarosa al 0.7% con Buffer TAE 1X; Marcador peso molecular 100 pb.

7.7. Digestión y liberación de la región de interés de RmS-17 a partir del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17

Todos los plásmidos que contenían el gen Rms-17, fueron sometidos a un análisis por patrones de restricción con la enzima *Xba* I para seleccionar la clona con el gen en la orientación deseada, ya que la digestión con *Xba* I permite la liberación de un producto

de 444 pb, si fue clonado con la orientación buscada. Como se observa en la siguiente figura, en la digestión que se hizo del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17, se obtuvieron clonas con el inserto en dos orientaciones diferentes. De las nueve colonias, solo tres (líneas rojas) tenían la orientación buscada, lo cual se evidencia con la presencia de dos bandas, una a la altura entre 250 y 500 pb que corresponde al inserto y la otra cercana a 3000 pb correspondiente al vector (Fig. 15). Posteriormente, se seleccionó una colonia para llevar a cabo la subclonación en el vector de expresión.

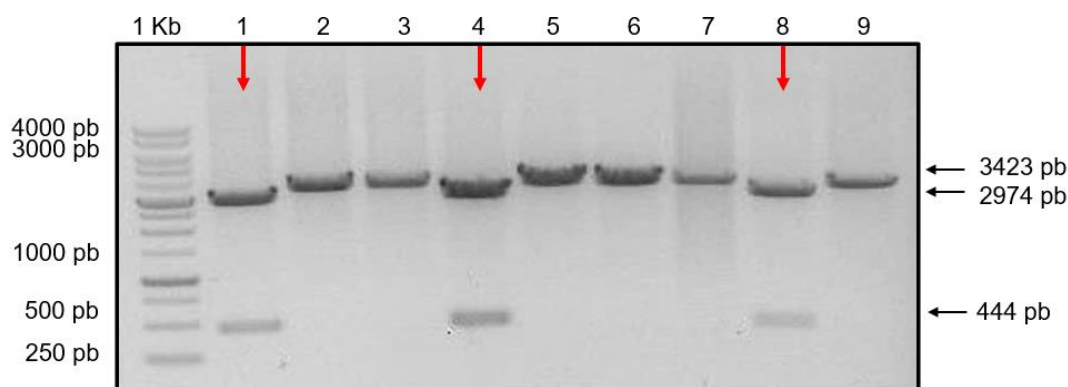


Figura 15. Digestión del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17 con la enzima de restricción *Xba* I. Colonia 1, 4 y 8 tienen el inserto en la orientación esperada. Gel de agarosa al 0.7% con Buffer TAE 1X; Marcador de peso molecular 1 Kb.

7.8. Doble digestión enzimática con *Pml* I y *Xba* I

La colonia seleccionada con el plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17 fue sometido a dos cortes por patrones de restricción con las enzimas *Pml* I y *Xba* I (Carril 1). La primera enzima tenía la función de abrir el plásmido y la segunda se utilizó para liberar el inserto de RmS-17. De dicha digestión se obtuvo un doble bandeo, la banda de mayor altura (2974 pb) corresponde al vector pJET1.2/Blunt y la banda de menor altura (441 pb) corresponde al inserto RmS-17 (Fig. 16). A continuación, se purificó el producto de digestión a partir del gel de agarosa y al comparar la intensidad de la banda obtenida con la intensidad de las diferentes bandas generadas por el patrón de peso molecular de 1 Kb, se estimó una concentración aproximada de 10 ng.

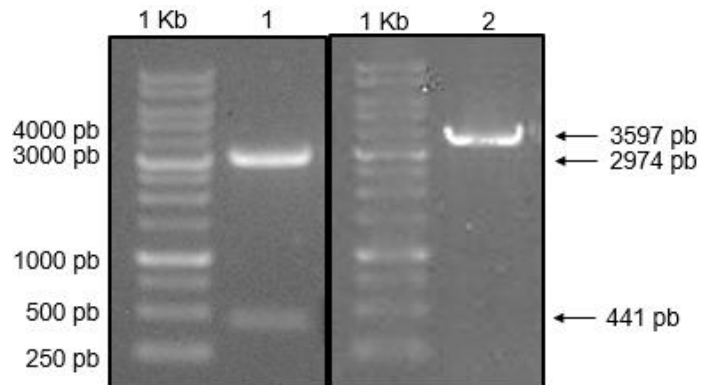


Figura 16. Doble digestión del plásmido pJET1.2/Blunt/RmS-17 (carril 1) y del vector pPICZαB (carril 2) con las enzimas de restricción *Pml* I y *Xba* I. Gel de agarosa al 0.7% con Buffer TAE 1X; Marcador de peso molecular 1 Kb.

Por otra parte, el vector pPICZαB fue sometido a dos cortes por patrones de restricción con las enzimas *Pml* I y *Xba* I (Carril 2) para la ligación con el inserto RmS-17. Como se puede observar en la figura 16, con la doble digestión se obtuvo una banda entre los 3000 y 4000 pb, la cual corresponde con el peso aproximado del vector. Posteriormente el producto de digestión se purificó y se estimó una concentración aproximada de 92 ng.

7.9. Subclonación de la región de interés de Rms-17 en el vector de expresión pPICZαB

Con el programa SeqBuilder se realizó el diseño de la ligación de la región de interés (inserto) al vector pPICZαB (Fig. 17). Esto se hizo con el fin de visualizar la construcción del plásmido pPICZαB/RmS-17. En la figura se puede observar que el inserto RmS-17 se clonó con el sitio de restricción *Pml* I en la región 5' y el sitio de restricción *Xba* I en la región 3' del vector.

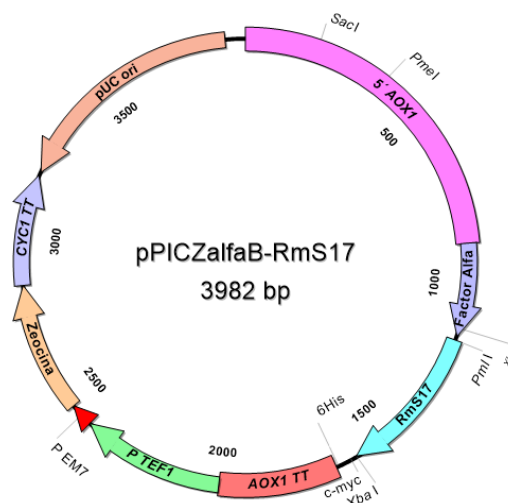


Figura 17. Mapa de la ligación entre el inserto RmS-17 y el vector de expresión pPICZαB.

Posteriormente, se realizó la transformación en células competentes. En la figura 18 se puede observar el control negativo de la transformación en las células *E. coli* One Shot Top 10, las cuales sufrieron el proceso de transformación, pero sin ningún inserto (A); después se puede ver el control positivo para el cual se utilizó el vector pPICZαB sin ningún tipo de digestión para mantener su integridad y así fuera incorporado por las células Top 10 (B); por último, se encuentra la transformación de las células Top 10 con el producto de ligación (C). Se seleccionaron siete colonias de la transformación con el vector pPICZαB/RmS-17 para hacer extracción del plásmido.

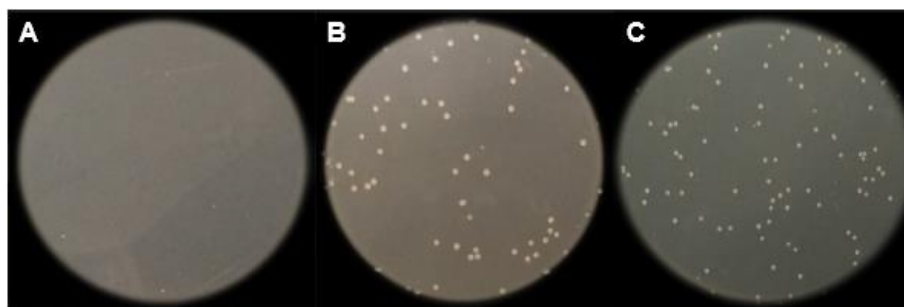


Figura 18. Transformación de las células *E. coli* One Shot Top 10 en agar LB + zeocina (25 µg/mL), incubadas a 37 °C a 250 rpm durante 16 horas. (A) control negativo, (B) control positivo y (C) plásmido pPICZαB/RmS-17.

7.10. Extracción del plásmido pPICZαB/RmS-17 de las células competentes y amplificación de la región de interés

Una vez propagadas las siete clonas se extrajo el ADN plasmídico (Fig. 19-A) y se analizó en gel de agarosa. De los carriles dos al ocho se observa una banda correspondiente a cada una de las colonias de pPICZαB/RmS-17 seleccionadas; adicionalmente, en el carril uno se pudo visualizar el control positivo. Posteriormente, se amplificó la región de interés (Fig. 19-B) a partir de la extracción del plásmido pPICZαB/RmS-17; en el carril uno se puso la mezcla de master mix sola como control negativo, en el carril dos un control positivo, y de los carriles tres al nueve se logra observar una banda correspondiente con lo esperado del inserto Rms-17 en todas las colonias.

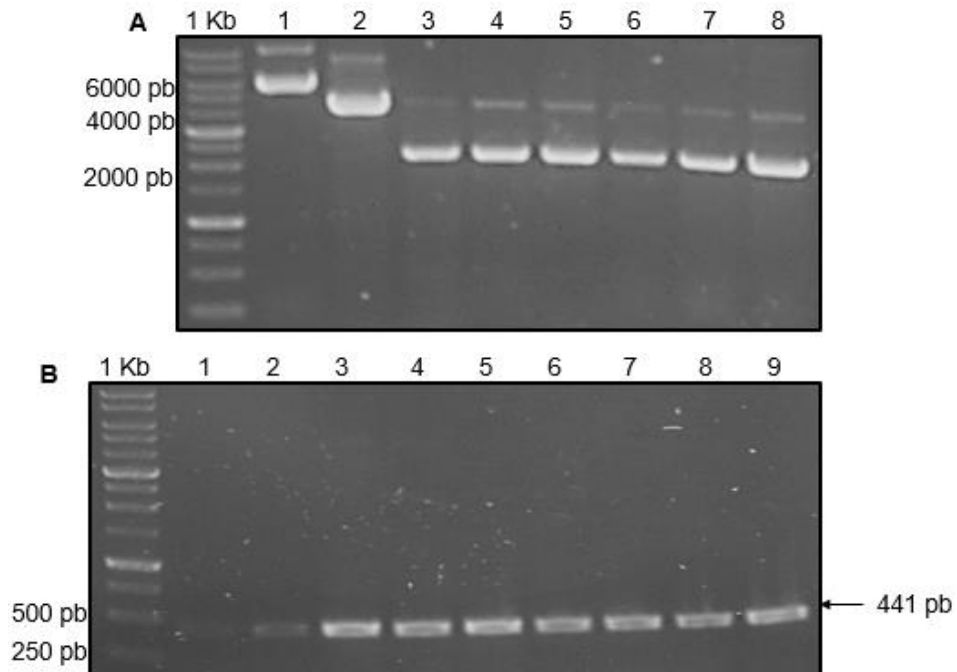


Figura 19. (A) extracción del plásmido pPICZαB/RmS-17, **(B)** amplificación de la región de interés de RmS-17. Geles de agarosa al 0.7% con Buffer TAE 1X; Marcador de peso molecular 1 Kb.

7.11. Caracterización por patrones de restricción del plásmido pPICZαB/RmS-17 con *Pml* I y *Xba* I

El producto de extracción de las colonias seleccionadas se digirió con las enzimas de restricción *Pml* I y *Xba* I para confirmar que se podía liberar el inserto RmS-17 del vector pPICZαB. De las digestiones se obtiene un patrón de doble bandeado en todas las colonias (Fig. 20), la banda de mayor altura (3541 pb) corresponde al vector pPICZαB y la banda de menor altura (441 pb) corresponde al inserto RmS-17. Se seleccionaron tres colonias (líneas rojas) para continuar con los ensayos y realizar la secuenciación del plásmido pPICZαB/RmS-17.

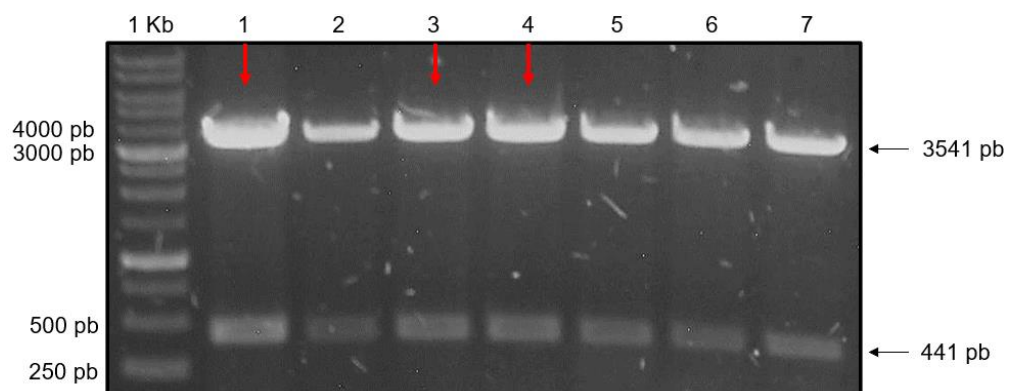
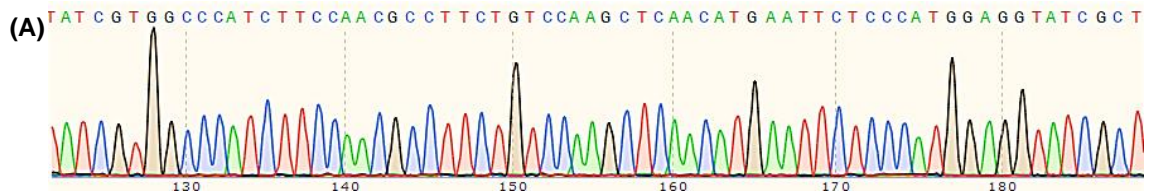


Figura 20. Doble digestión del plásmido pPICZαB/RmS-17 con las enzimas de restricción *Pml* I y *Xba* I. Gel de agarosa al 0.7% con Buffer TAE 1X; Marcador de peso molecular 1 Kb.

7.12. Secuenciación del plásmido pPICZαB/RmS-17

A continuación, en la figura 21 se puede observar una fracción de los electroferogramas (A) obtenidos del IBT, con los cuales se determinó la secuencia consenso obtenida del plásmido pPICZαB/RmS-17 extraído de las tres diferentes colonias de Top 10. Se puede observar una secuenciación confiable ya que se observan picos únicos y bien definidos por cada nucleótido. La región está constituida por 435 pb (B), equivalentes a 145 aminoácidos (C). Se realizó un alineamiento con la secuencia de RmS-17 de la cepa Porto Alegre reportada en el NCBI (AHC98668.1) y se observaron ligeras variaciones. En cuanto a la cadena aminoacídica, se observa un cambio en el aminoácido de la posición 112, en lugar de una treonina (T) se observa una valina (V). Con este ensayo se comprobó la obtención de una secuencia útil para producir la proteína en la levadura.



(B) Secuencia nucleotídica del polipéptido de RmS-17 cepa "Media Joya"

ATGTACGAACAGATCTCAGCGGGGTACGCCAGAGACGACGAGACGAACGCCGATGTTCTGGACCTGC
 CTTACGCCGGGCTTGACTATAGCCTGACGATCATTCTTCTAGAGAGAGGACTGGTGTGGACGCGCTG
 AGGCAGAATCTATCGTGGCCCATCTTCCAACGCCCTTCTGTCCAAGCTCAACATGAATTCTCCCATGGAG
 GTATCGCTGCCCAAGTTCAAGATCGAGGGCTCGTACAACTGAAGGCGCCCCTGTCGGCGCTAGGAGC
 CTCGAAGGCCTTCGACGAGCGATATGCCGACTTCTCCGGCATCAGCGGTGCCCGTGACCTTGTAATAT
 ACGACGTCGTTCAACAAGGCCGTAGTCGAGGTTAACGAGGAAGGCAGCGAGGCTGCCGGTGCCACTGC
 AGTGATCTTCTACACGAAGAGTGACGCT

(C) Secuencia aminoacídica del polipéptido de RmS-17 cepa "Media Joya"

MYEQISAGYARDDETNADVLDLPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSKLNMNSPMEVSLPK
 FKIEGSYKLPKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLVYDVVHKAVVEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA

Figura 21. (A) electroferograma de la secuenciación de pPICZαB/RmS-17, obtenida con el oligonucleótido directo diseñado para la región de interés de la proteína. Secuencia (B) nucleotídica y (C) aminoacídica de la región de interés de RmS-17 inferida de los resultados de secuenciación. Las letras de color rojo representan las variaciones.

7.13. Digestión enzimática del plásmido pPICZαB/RmS-17 con *Pme I*

Con el objetivo de incorporar por recombinación homóloga el vector de expresión al cromosoma de la levadura, se llevó a cabo una digestión del plásmido con la enzima *Pme I* que tiene un único sitio de corte dentro del promotor AOX1. Una vez realizada la digestión del plásmido pPICZαB/RmS-17 con la enzima de restricción *Pme I*, se visualizó el resultado en un gel de agarosa; en el carril 1 se cargó el plásmido pPICZαB/RmS-17 sin digerir, en los carriles 2 y 3 se cargaron los

plásmidos pPICZ α B/RmS-17 de las dos colonias de manera independiente (Fig. 22-A). Posteriormente, el producto de digestión fue purificado y se visualizó en gel de agarosa (Fig. 22-B). Se contrastó la altura de la única banda obtenida de cada colonia purificada, con el marcador de peso molecular de 1Kb y se observó una banda de 3982 pb, el cual es equivalente al peso esperado del plásmido pPICZ α B/RmS-17 linealizado.

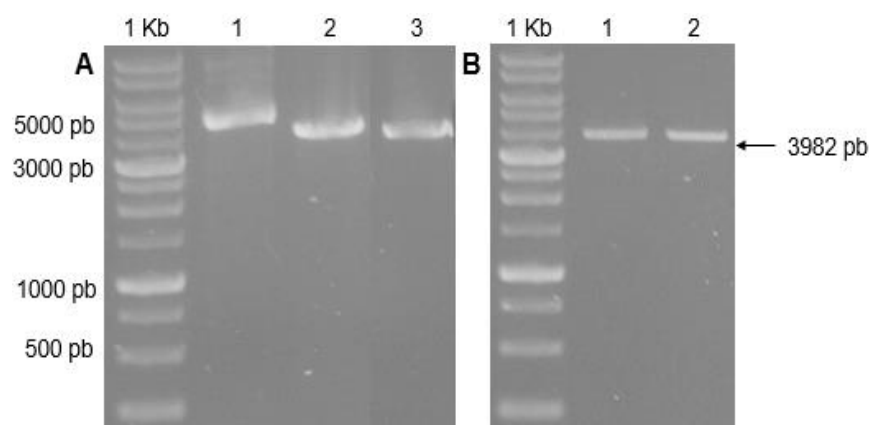


Figura 22. (A) digestión del plásmido pPICZ α B/RmS-17 (colonia 1 y 4) con la enzima *Pme* I. **(B)** purificación del plásmido pPICZ α B/RmS-17 linealizado. Geles de agarosa al 0.7% con Buffer TAE 1X; Marcador de peso molecular 1 Kb.

7.14. Transformación de células competentes de *P. pastoris* X33 con el plásmido pPICZ α B/RmS-17

En la figura 23 se puede observar el control negativo de la transformación en las células de *P. pastoris* X33, las cuales se sometieron al mismo protocolo, excepto por la adquisición del plásmido (A); después se puede ver la transformación de *P. pastoris* X33 con el plásmido pPICZ α B/RmS-17 de la colonia 1 linealizado y purificado (B); por último, se encuentra la transformación de *P. pastoris* X33 con el plásmido pPICZ α B/RmS-17 de la colonia cuatro linealizado y purificado (C). Como ambas colonias presentaban crecimiento, se puede inferir que incorporaron el plásmido, ya que de lo contrario no podrían crecer en presencia de la zeocina. Se seleccionaron cuatro colonias de cada transformación con el vector pPICZ α B/RmS-17 para extraer el ADN genómico.

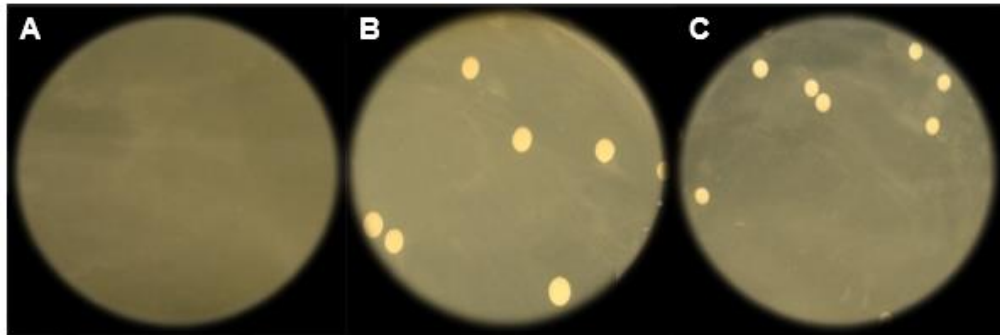


Figura 23. Transformación de las células *P. pastoris* X33 en agar YPD + zeocina (200 µg/mL), incubadas a 28 °C durante 72 horas. **(A)** control negativo, **(B)** plásmido pPICZαB/RmS-17 de la colonia 1 **(C)** plásmido pPICZαB/RmS-17 de la colonia 4.

7.15. Extracción del ADN genómico de las transformantes de *P. pastoris* X33 y amplificación de la región de interés

Una vez propagadas las ocho clonas seleccionadas se extrajo el ADN genómico y se analizó en gel de agarosa. Posteriormente, se amplificó la región de interés del plásmido pPICZαB/RmS-17 y se visualizó nuevamente en geles de agarosa (Fig. 24). En el carril uno se cargó ADN de *P. pastoris* sin transformar, en el carril dos se cargó el vector pPICZαB con el inserto RmS-17 previamente analizado, del carril tres al seis se cargaron las cuatro clonas seleccionadas de una colonia, y del carril siete al diez se observan las cuatro clonas seleccionadas de otra colonia. De todas las clonas seleccionadas se logró amplificar el inserto RmS-17, por lo cual todos integraron el plásmido pPICZαB/RmS-17 aunque en distintas concentraciones.

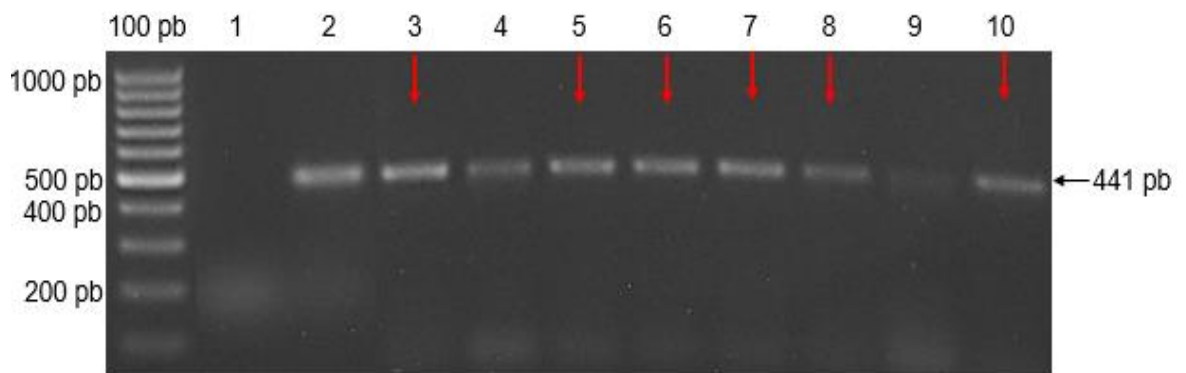


Figura 24. amplificación de la región de interés de RmS-17. Las líneas rojas indican las clonas seleccionadas para las pruebas de expresión. Geles de agarosa al 0.7% con Buffer TAE 1X; Marcador de peso molecular de 100 pb.

7.16. Determinación del fenotipo Mut de las células competentes de *P. pastoris* X33

Al momento de realizar la integración del plásmido al cromosoma de la levadura por recombinación homóloga podía ocurrir una integración o una interrupción de la región promotora de AOX1. El que ocurriera un proceso u otro iba a determinar las condiciones de expresión de la proteína de interés, por lo tanto, era importante analizar este suceso. Como se puede observar en la figura 25, todas las colonias fueron capaces de crecer tanto en el medio mínimo MDH (A) como en el MMH (B), después de tres días de incubación a 30 °C. Debido a que las células pudieron crecer eficazmente en el medio con metanol como única fuente de carbono, esto indicó que incorporaron el plásmido pPICZ α B/RmS-17 por integración de su promotor nativo AOX1 al locus de AOX en el cromosoma 4 y que el proceso de transformación no tuvo efecto significativo en la viabilidad celular. El 100% de las transformantes aquí obtenidas fueron Mut⁺. Posteriormente las ocho colonias se llevaron a pruebas de expresión teniendo en cuenta las condiciones de la inducción en una cepa Mut⁺.

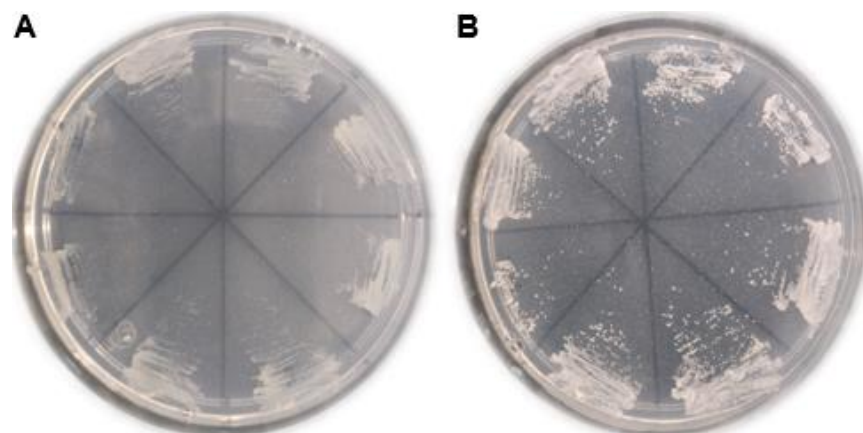


Figura 25. Transformantes pPICZ α B/RmS-17 cultivados en placas con medio (A) MDH y (B) MMH.

7.17. Prueba de expresión del plásmido pPICZ α B/RmS-17 en *P. pastoris* X33

La primera prueba de expresión a pequeña escala se realizó durante 70 horas, el cultivo se alimentó con metanol al 1% cada doce horas. Durante este tiempo se midió la absorbancia para obtener la cinética de crecimiento de *P. pastoris* X33 (Fig. 26-A). Como se puede observar en la figura A, durante 72 horas se incubaron seis clonas de X33/RmS-17. De la cinética celular se puede inferir que dichas clonas pudieron usar el metanol como única fuente de carbono debido a que tenían un crecimiento celular

exponencial hasta las 35 horas, seguida por una fase desaceleradora y finalmente a las 60 horas de inducción alcanzó la fase estacionaria. También se puede ver que las células alcanzaron absorbancias entre 12 y 16 en el pico más alto de la fase exponencial. Seguidamente se analizó el medio libre de células de cada cultivo mediante Western blot usando Anti-His para identificar la etiqueta de histidina (Fig. 26-B), del carril tres al ocho se muestran los resultados de las seis clonas, en el carril de la clona 4.1 se puede observar una banda de aproximadamente 40 kDa. El siguiente paso fue seleccionar dicha clona para realizar los ensayos de expresión intracelular.

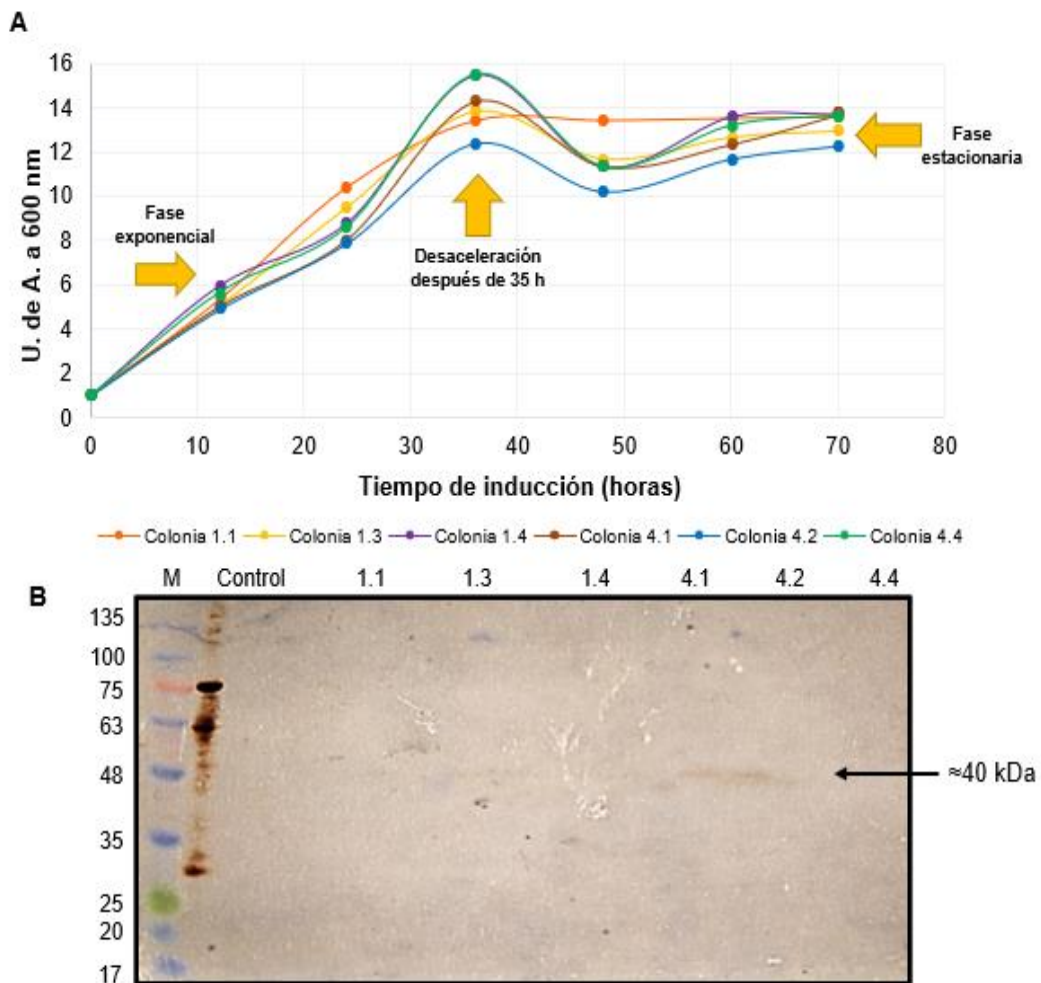


Figura 26. (A) cinética de crecimiento de las clonas (1.1, 1.3, 1.4, 4.1, 4.2, 4.4) de *P. pastoris* X33 en medio BMMY con metanol. **(B)** western blot obtenido del medio libre de células del ensayo de expresión de todas las clonas de *P. pastoris* X33. (M) marcador de peso molecular en kDa. La línea roja señala la banda observada.

7.18. Caracterización del crecimiento celular de X33/RmS-17

Para llevar a cabo correctamente los ensayos de expresión en *P. pastoris* X33/RmS-17, primero se determinó el comportamiento de las células con respecto a la colonia X33 sin transformar. Para ello, fue muy importante conocer las fases de la curva de

crecimiento celular en el medio de crecimiento YPD de cada levadura, para posteriormente cambiar la fuente de carbono, ya sea por glicerol o por metanol. Como se puede observar en la figura 27, los datos experimentales obtenidos se usaron para construir la curva de crecimiento a lo largo del tiempo. Estos datos no se ajustaron al modelo de crecimiento celular, sin embargo, seguían la curva de crecimiento celular típica.

La colonia transformada no tuvo diferencias significativas en su crecimiento en comparación con las células sin transformar y, por lo tanto, se observa un comportamiento similar con el paso de las horas, lo que indicaría que la incorporación de ADN foráneo no alteró los parámetros cinéticos de la colonia transformante ni su capacidad de crecimiento. En la figura 27 podemos observar un comportamiento típico con sustrato limitado, ambas levaduras tardaron entre seis y ocho horas en salir de la fase de latencia y a partir de las diez horas entraron en fase exponencial y se mantuvieron así hasta las 40 horas donde comienza la fase de desaceleración indicando que el cultivo empezó a agotar los nutrientes y entró en fase estacionaria.

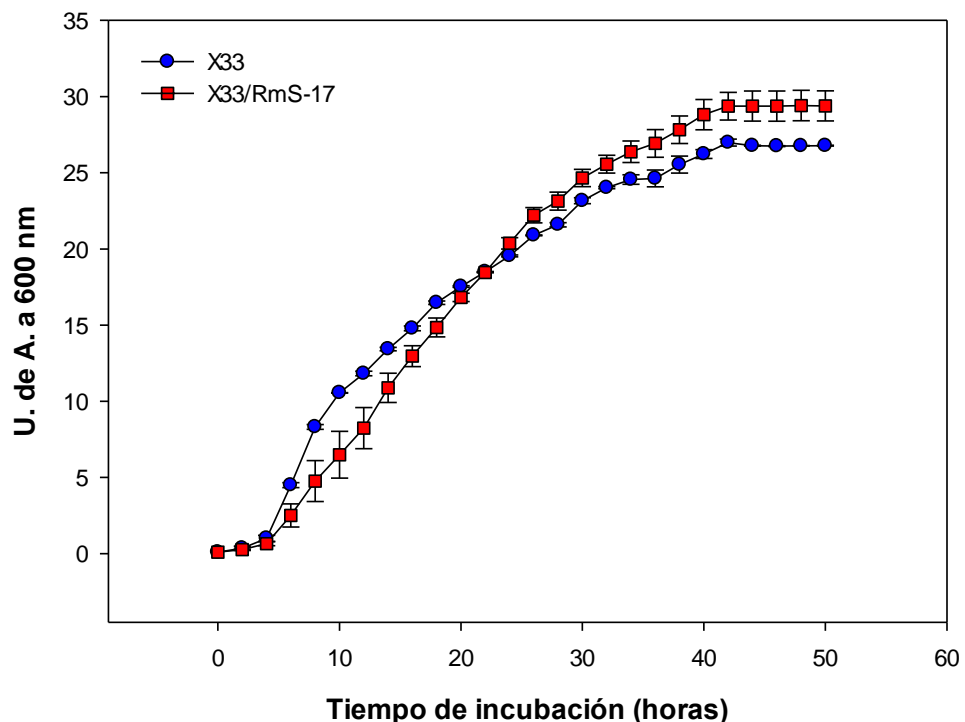


Figura 27. Curva de crecimiento celular de *P. pastoris* X33 (azul) y X33/RmS-17(rojo) durante su crecimiento en el medio YPD.

7.19. Caracterización de la expresión intracelular de RmS-17 en *P. pastoris* X33

La clona seleccionada se llevó a una segunda prueba de expresión alimentando con metanol al 1% cada doce horas. Posteriormente se analizó la expresión intracelular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida teñida con azul de Coomassie (Fig. 28-A), además de su inmunodetección por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-c-myc para identificar la etiqueta myc presente en el plásmido (Fig. 28-B). En ambos geles se observó primero el marcador de peso de 120 kDa, a continuación, en el carril de control se cargaron células *P. pastoris* X33 sin transformar, en el carril 2 células X33/RmS-17 con doce horas de expresión, en el carril 3 células X33/RmS-17 con 24 horas de expresión, en el carril cuatro células X33/RmS-17 con 36 horas de expresión, en el carril cinco células X33/RmS-17 con 48 horas de expresión y en el carril seis células X33/RmS-17 con 60 horas de expresión. Tanto en el Coomassie como en el Western blot se visualizó una banda de aproximadamente 40 kDa la cual no se observa en las células *P. pastoris* X33 sin transformar con el plasmido pPICZαB/RmS-17.

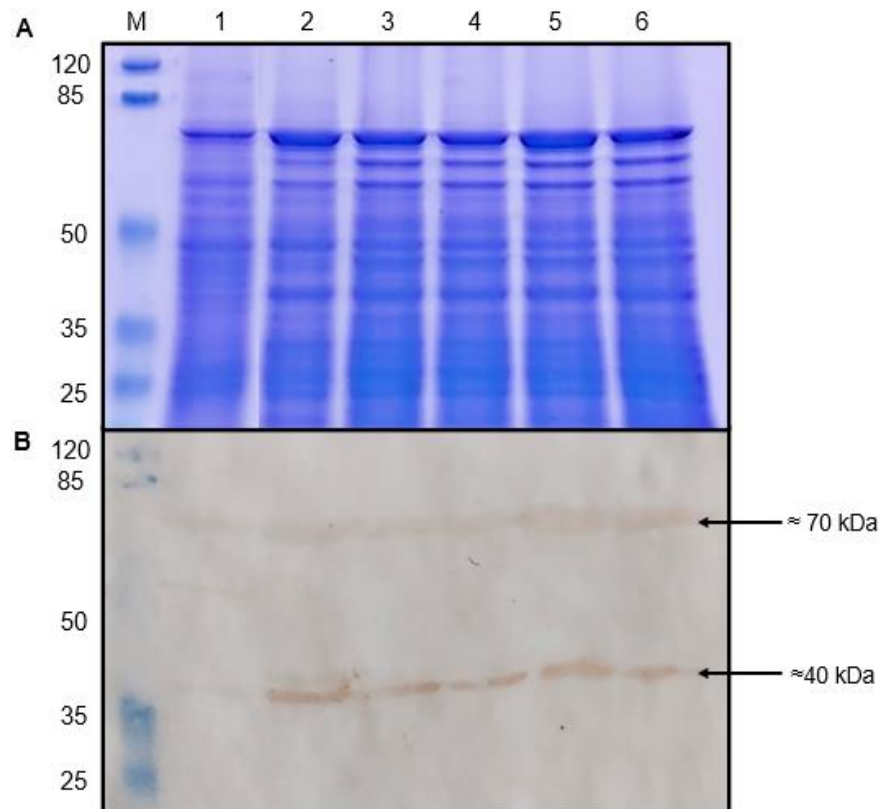



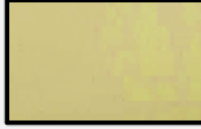




Figura 28. (A) Coomassie y **(B)** Western blot de la expresión intracelular de RmS-17 en *P. pastoris* X33 en medio BMMY con metanol (carril 1: control, carril 2: 12 horas, carril 3: 24 horas, carril 4: 36 horas, carril 5: 48 horas, carril 6: 60 horas). (M) marcador de peso molecular en kDa.

7.20. Caracterización de la expresión de X33/RmS-17 en diferentes medios de inducción

La clona se llevó a una prueba de expresión de 96 horas en los medios BMMY (medio mínimo amortiguado con metanol, suplementado con peptona y extracto de levadura), BMMH (medio mínimo amortiguado con metanol e histidina) y MMH (medio mínimo con metanol e histidina) de manera independiente, los cultivos se alimentaron con metanol al 2% cada 24 horas. Paulatinamente, se analizó la expresión intracelular mediante inmunodetección por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-c-myc para identificar la etiqueta myc presente en el plásmido (Cuadro 3). Como se puede observar, solo se identificó la proteína en células crecidas en medio BMMY.

Medio de expresión	Resultado (Horas de inducción)	
	48 horas	96 horas
BMMY		
BMMH		
MMH		

Cuadro 3. Comparación entre los western blot obtenidos de la expresión intracelular de RmS-17 en *P. pastoris* X33 en medios BMMY, BMMH y MMH con metanol.

7.21. Expresión extracelular de X33/RmS-17 con diferentes concentraciones de fuente de carbono

Se determinó la concentración de la proteína RmS-17 que se obtuvo usando diferentes porcentajes de metanol, esto mediante el método Bradford. Se llevaron a cabo pruebas de inducción independientes a la cepa X33/RmS-17 alimentando con 1%, 2% y 3% de metanol absoluto, cada 24 horas. Una vez terminada la inducción se tomaron muestras de medio libre de células precipitado y dializado para el análisis extracelular,

con el programa Sigma se visualizaron los resultados de la concentración que se obtuvo con diferentes porcentajes de metanol (Fig. 29).

Como se observa en la figura 29 no se encontró una diferencia significativa en inducir con el 1 y 2% de metanol, por el contrario al inducir con el 3% de metanol se determinó una concentración menor de proteína en el medio extracelular.

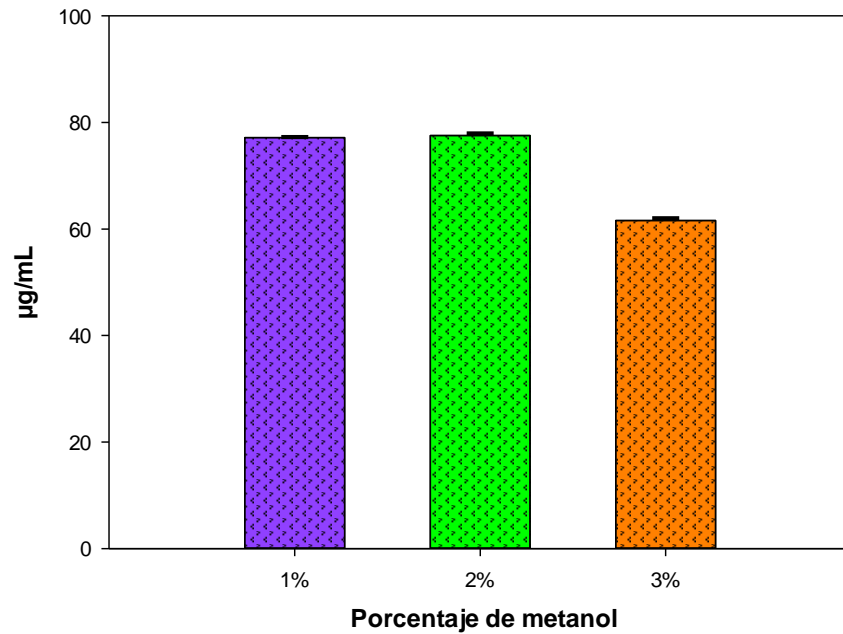


Figura 29. Concentración total de proteína recuperada del medio extracelular de *P. pastoris* X33 en medio BMMY con diferentes concentraciones de metanol.

VIII. DISCUSIÓN

En la actualidad, los programas de control integral contra la garrapata *R. microplus* se enfocan en el uso de vacunas desarrolladas como la glicoproteína Bm86 (de la Fuente *et al.*, 1999; de Vos *et al.*, 2001; Canales *et al.*, 2009; Almazán *et al.*, 2010), sin embargo, presenta variaciones en su eficacia por la presencia de polimorfismos en su gen codificador (Fragoso *et al.*, 1998; García-García *et al.*, 1999; García-García *et al.*, 2000; de Vos *et al.*, 2001; Peconick *et al.*, 2008). Por tal razón, en el presente estudio se obtuvo una secuencia recombinante de la Serpina RmS-17 de *R. microplus* cepa Media Joya expresada en la levadura *P. pastoris* X33. Dicha secuencia está constituida por 435 pb equivalentes a 145 aminoácidos, dentro de esta secuencia se identificó un RCL de 16 residuos, adicionalmente en el residuo 48 se observa un sitio de N-glicosilación, esto coincide por lo reportado por Martínez (2020). Al realizar el alineamiento entre la secuencia recombinante y la secuencia de RmS-17 de la cepa Porto Alegre reportada en el NCBI (Tirloni *et al.*, 2014) se identificaron mutaciones silenciosas a nivel de nucleótidos, con una homología del 99.7%, por lo cual se infiere que es una región altamente conservada como lo menciona Rodríguez Valle (2015). Esto sugiere que la secuencia del polipéptido de RmS-17 se encuentra conservada entre las cepas reportadas de México y Brasil.

De igual manera, se realizó un alineamiento entre la secuencia obtenida y la secuencia consenso de RmS-17 reportada por Martínez (2020), en dicha investigación se analizaron diferentes cepas y aislados de garrapatas *R. microplus* proveniente de distintas zonas geográficas de México para obtener una secuencia consenso. A nivel de aminoácidos se advierte una homología del 99.32% con un cambio en la posición 112, en lugar de una treonina (T) se observa una valina (V), aunque dicho reemplazo es no conservativo puede no tener efecto sobre la función de la proteína como lo menciona Martínez (2010). Además, estudios realizados previamente han demostrado que se necesita una diferencia mayor al 2.8% en la secuencia aminoacídica para causar variaciones en la respuesta inmune post vacunación (García-García *et al.*, 1999). También es importante mencionar que el cambio no se encuentra dentro del sitio central reactivo de la proteína (RCL), así como tampoco dentro de la región de epítomos B, ni el residuo glicosilado, es decir, no está dentro de ningún sitio importante de la proteína. Por último, se realizó el modelamiento tridimensional de ambas secuencias (datos no mostrados) y al compararlos no se encontraron diferencias

estructurales. Por todo lo anterior, se puede inferir que el reemplazo de aminoácido no representa un cambio significativo en cuanto a la función descrita de la proteína.

En cuanto al desarrollo de nuevos antígenos vacunales se han utilizado distintas herramientas, la más implementada en este proyecto es la producción de proteínas recombinantes. Se seleccionó esta estrategia porque si bien es cierto que este requiere más tiempo para llevar a cabo el desarrollo y producción de una vacuna, también presenta ventajas como la generación de una respuesta inmune segura y sólida, así como la facilidad de almacenamiento y transporte (Dingermann, 2008). Existe una amplia variedad de sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes los cuales se pueden clasificar en dos grandes grupos: procarionte y eucarionte. Ambos se han utilizado ampliamente y aunque los sistemas procariontes tienen tiempos de duplicación menores, también tienen limitaciones como la agregación intracelular, el plegamiento incorrecto, incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales, pérdida de la transformante con las replicaciones, entre otras. Por el contrario, los sistemas eucariontes pueden solucionar estos inconvenientes además de tener expresión secretora, líneas celulares estables y ser de fácil manipulación genética (Karbalaeei, Rezaee y Farsiani, 2020). Estudios previos han comparado los sistemas procariontes como *E. coli* y eucariontes como *P. pastoris* y se ha demostrado que estos últimos son más adecuados para la producción de proteínas recombinantes (Watelet *et al.*, 2002; Przylucka *et al.*, 2017; Ejike *et al.*, 2021).

Este sistema de *P. pastoris* ha sido ampliamente utilizado para la expresión de proteínas de distintas topologías y ha demostrado los mayores niveles de rendimiento como lo mencionan otros autores (Kolb *et al.*, 2000; Alkhalfioui *et al.*, 2011). Presenta ventajas como el plegamiento, la secreción de proteínas recombinantes al entorno externo de la célula, una baja producción de proteínas secretoras endógenas y distintos tipos de glicosilación (Daly y Hearn, 2005). Es importante recalcar este último aspecto debido a que más de la mitad de las proteínas existentes están glicosiladas y dichos procesos de glicosilación confieren propiedades estructurales y funcionales a las proteínas por lo cual se hacen relevantes. Además, se encuentran relacionados con el funcionamiento y la eficacia de diversos procesos biológicos (Jasminka y Gordan, 2017). Brevemente, las Serpinas son una superfamilia de proteínas que se expresan en distintos organismos incluidas las garrapatas (Ye *et al.*, 2001), muchas de estas se modifican postraduccionalmente mediante glicosilación. Estas modificaciones

desempeñan un rol importante en la activación de la acción inhibitoria, así como en la regulación de la secreción o la estabilidad del plasma, la interacción con activadores como los glucosaminoglicanos y el reconocimiento por anticuerpos (Gettins, 2002; Oertwig *et al.*, 2017). En el caso del polipéptido de RmS-17 se identificó una N-glicosilación en el residuo 48, lo que indicaría que se añadió el carbohidrato N-acetilglucosamina al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina. Este proceso de glicosilación que realiza *P. pastoris* podría participar en la interacción con la respuesta inmune del hospedador como lo demuestra Tirloni (2016) en su investigación, la cual además corrobora que RmS-17 se secreta como una glicoproteína, también evidencia que al usar un suero de ganado post infestación por garrapatas *R. microplus* y retarlo con una recombinante de RmS-17 de *R. microplus* obtenida en *P. pastoris*, se observa una menor reactividad con la proteína desglucosilada en comparación con la glicosilada. Aunque esto no asegura que la glicosilación es esencial para inducir una respuesta inmune protectora, sería conveniente realizar ensayos de inmunización.

En el presente estudio se obtuvo una cepa de *P. pastoris* X33 productora de un polipéptido de la proteína RmS-17 de *R. microplus* cepa Media Joya utilizando el vector pPICZ α B. Para lograr las condiciones óptimas de dicha expresión primero fue necesario determinar el fenotipo de la cepa utilizada. En investigaciones previas en las que se ha empleado la cepa X33 se observa que la mayoría de las mutantes presentan un fenotipo Mut⁺ (Pedro *et al.*, 2015) resultados que coinciden con lo obtenido en este proyecto. Cabe mencionar que Canales en su investigación (2008) demostró que dicha cepa presenta niveles más altos de expresión en comparación con las cepas Mut^s, esto se puede deber a las características intrínsecas de la enzima AOX1 responsable del 80% de la degradación del metanol, el cual es el inductor de la producción del polipéptido recombinante.

Como lo menciona Karbalaei (2020) el sistema de expresión en *P. pastoris* requiere de la optimización de condiciones para lograr la máxima producción de la proteína de interés. Estas especificaciones van a variar de acuerdo con la cepa y la proteína diana como lo describen Fan (2012) y Xia (2012) quienes expresan proteínas con diferentes condiciones en el mismo sistema de *P. pastoris*. Las condiciones óptimas de expresión del polipéptido de RmS-17 de este estudio fueron: crecimiento de células en medio BMMY a una D.O inicial de 1 a 600nm, alimentaciones con metanol absoluto al 1% cada 24 horas, incubación a una temperatura de 28 °C en agitación constante de 240

rpm durante 96 horas. Esto es similar a lo descrito en varios estudios reportados en la literatura, en los cuales se expresan diversas proteínas de garrapatas en el mismo sistema de producción eucarionte (Casquero *et al.*, 2011; Rodríguez-Valle *et al.*, 2012; Guerrero *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Tirloni *et al.*, 2016). Así mismo, se ha evidenciado que *P. pastoris* tiene un comportamiento típico en el que alcanza altos niveles de biomasa y D.O., al igual que tiempos de duplicación prolongados (Chang *et al.*, 2006), lo cual se pudo corroborar en este estudio.

Los distintos ensayos de expresión realizados en este proyecto permiten inferir que la célula transformada tiene la capacidad de producir el polipéptido de RmS-17 de manera intracelular, este tipo de expresión ya se ha reportado en *P. pastoris* en diferentes ocasiones (Maresová *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2012). En este estudio la producción del polipéptido recombinante inicia desde las primeras doce horas post inducción con metanol y continua presente hasta las 96 horas de experimentación. La identificación del polipéptido mediante western blot evidencia varias señales juntas que corresponden específicamente a la proteína ya que posee la etiqueta c-myc y los anticuerpos monoclonales van dirigidos hacia esa etiqueta. No obstante, se observan bandas a distintos pesos moleculares, lo cual se puede deber a la presencia de la proteína aún unida al factor α o a parte de él debido a que la enzima KEX2 aún no lo reconoce para su liberación al medio extracelular, también pueden ser formas de la proteína listas para salir al medio extracelular, proteína en diferentes estadios de procesamiento y distintos patrones o formas inmaduras de glicosilación (Lombardi *et al.*, 2010).

A lo largo de los ensayos de inducción la identificación de la expresión intracelular se hizo evidente, por el contrario, la detección extracelular fue un tanto más compleja. A pesar de concentrar diez veces el volumen del medio y de realizar inducciones durante ocho días como lo sugiere Cerriteño-Sánchez (2016) en un estudio previo, no se ha podido visualizar la presencia del polipéptido recombinante secretado, no obstante, la cuantificación de proteína del medio extracelular indica que es posible recuperar la proteína que se encuentra allí. Esto corrobora lo descrito en el manual de Invitrogen en el que se menciona que la levadura secreta bajas cantidades de proteínas a su medio extracelular, por lo que su visualización no siempre es efectiva. Esto también lo demuestran los resultados de Yongkiettrakul en el (2009), quien obtuvo un bajo nivel de secreción de la neuraminidasa de influenza aviar (A/H5N1) al expresarlo en *P. pastoris*.

IX. CONCLUSIONES

- ✧ En este proyecto se logró diseñar eficientemente un sistema de expresión para la región de interés de la proteína RmS-17 utilizando el vector pPICZ α B, cuyo marco de lectura quedó en fase.
- ✧ Se obtuvo una clona de *P. pastoris* X33 productora de la región de interés de la proteína RmS-17 de *R. microplus* cepa "Media joya", la cual tiene un fenotipo Mut⁺ y es capaz de crecer utilizando el metanol como fuente de carbono. Esta se denominó X33/RmS-17.
- ✧ La caracterización de la expresión ha permitido evidenciar que el medio BMMY es óptimo para llevar a cabo los ensayos de expresión, así como alimentar los cultivos con 1% de metanol absoluto, incubando a 28 °C en agitación constante a 240 rpm.
- ✧ Se deben realizar ensayos de reconocimiento y evaluar la capacidad protectora del polipéptido recombinante contra de garrapatas *R. microplus*.
- ✧ Se deben buscar nuevas alternativas de control como las vacunas para reducir el uso de sustancias químicas que afectan el medio ambiente, contaminan los productos que se obtienen de los animales y generan poblaciones de garrapatas resistentes.

X. REFERENCIAS

- Aguirre, A., Lobo, F., Casquero-Cunha, R., García, M., & Andreotti, R. (2016). Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a Rhipicephalus vaccine. *Veterinary Parasitology*.
- Akhtar, M., Muhammad, F., LA, L., Hussain, I., & MI, A. (2011). Immunity against ticks-A. *Pak Vet J*, 31(1), 9-16.
- Alkhalfioui, F., Logez, C., Bornert, O., & Wagner, R. (2011). Expression systems: *Pichia pastoris*. En W. Wiley-VCH, *Production of membrane proteins—strategies for expression and isolation*. In A. S. Robinson (Ed.).
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F., & et, a. (2010). Identification and characterization of Rhipicephalus (Boophilus) microplus candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research*, 106, 471-479.
- Almazán, C., O, M.-C., Moreno-Cid, J., Galindo, R., 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*.
- Alonso-Díaz, M., Rodríguez-Vivas, R., Fragoso-Sánchez, H., & Rosario-Cruz, R. (2006). Ixodicide resistance of the the Boophilus microplus tick to ixodicides. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(2), 105-113.
- Barker, S., & Murrell, A. (2008). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Ticks: biology, disease and control*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Batt, C. (2014). *Pichia pastoris*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3, 1686-1692.
- Bentancourt, A., Patiño, F., Torres, O., & Eugenio, B. (2005). Prueba de establo para evaluar la efectividad de la vacuna Tick-Vac MK® contra la garrapata Boophilus microplus. *Acovez*, 34(3), 18-25.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.
- Burnette, W. (1981). Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins From Sodium Dodecyl Sulfate--Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection With Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal Biochem*, 112(2), 195-203.
- Canales, M., Almazán, C., Naranjo, V., Jongejan, F., & de la Fuente, J. (2009). Vaccination with recombinant Boophilus annulatus Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against B. annulatus and B. microplus infestations. *BMC Biotechnology* 9, 29.
- Canales, M., de la Lastra, J. M., Naranjo, V., Nijhof, A. M., Hope, M., Jongejan, F., & de la Fuente, J. (2008). Expression of recombinant Rhipicephalus (Boophilus) microplus, R. annulatus and R. decoloratus Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *BMC biotechnology*, 8(14).
- Casquero, R., Andreotti, R., & Pereira, F. (2011). Rhipicephalus (Boophilus) microplus: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, 20(2), 103-110.
- Center for Food Security and Public Health (CFSPH). (2007). Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Iowa State University: College of Veterinary Medicine.

- Cerriteño-Sánchez, J. L., Santos-López, G., Rosas-Murrieta, N., Reyes-Leyva, J., Cuevas-Romero, S., & Herrera-Camacho, I. (2016). Production of an enzymatically active and immunogenic form of ectodomain of Porcine rubulavirus hemagglutinin-neuraminidase in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*, 33-7.
- Céspedes, N., Vargas, M., Sánchez, H., & Vázquez, Z. (2002). Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*.
- Chang, S., Shieh, C., Lee, G., Akoh, C., & Shaw, J. (2006). Optimized growth kinetics of *Pichia pastoris* and recombinant *Candida rugosa* LIP1 production by RSM. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 11(1-2), 28-40.
- Cohen, S., Chnag, A., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69(8), 2110–2114.
- Cortés-Vecino, J. (2011). Garrapatas: estado actual y perspectivas. *Biomédica*.
- Coutinho, M., Bizzarro, B., Tirloni, L., Berger, M., Freire, O., Sá-Nunes, A., & Silva, V. I. (2020). *Rhipicephalus microplus* serpins interfere with host immune responses by specifically modulating mast cells and lymphocytes. *Garrapatas Disne*.
- Cregg, J., & David, H. (1998). Protocolos de *Pichia*. *Métodos en Biología Molecular*.
- Cregg, J., Vedvick, T., & Raschke, W. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia Pastoris*. *BioTechnology*, 11, 905-910.
- Criado, M., Sánchez, S., & Ferreiros, C. (2008). Vacunología clásica y nuevas tecnologías en el diseño de vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Cunha, R., Pérez de León, A., Leite, F., Pinto, L., Santos-Júnior, A., & Andreotti, R. (2012). Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. Obtenido de *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*.
- Da Cruz, D. (2016). Efeito de serpinas de *Rhipicephalus microplus* na liberação de peróxido de hidrogênio de macrófagos. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.
- Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C., Narasimhan, S., Anguita, J., & Fikrig, E. (2009). Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host & Microbe*, 6, 482-492.
- Daly, R., & Hearn, M. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal Of Molecular Recognition*, 18, 119-138.
- de la Fuente, J., & Kocan, K. (2003). Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Vaccine*, 583-593.
- de la Fuente, J., & Kocan, K. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*, 275-283.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J., Kocan, K., & Willadsen, P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, 8, 23-28.

- de la Fuente, J., Rodríguez, M., & Garcia-Garcia, J. (2000). Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916, 617-621.
- de la Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J., Méndez, L., . . . R, L. (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genetic Analysis Biomolecular Engineering*, 15, 143-148.
- de Schutter, K., Lin, Y.-C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., . . . Callewaert, N. (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27(6).
- de Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P., & Jongejan, F. (2001). Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Experimental Applied Acarology*, 25, 245-261.
- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnology Journal*, 90–97.
- Domínguez, D., Torres, F., & Rosario, R. (Junio de 2016). Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(9).
- Domínguez-García, D., Rosario-Cruz, R., Almazán-García, C., Saltijeral, J., & de la Fuente, J. (2010). *Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los ixodídeos y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.
- Eichler, J. (Abril de 2019). Protein glycosylation. *Current Biology*, 29(7). Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30939300/>
- Ejike, U., Chan, C., Lim, C., & Lim, R. (2021). Functional evaluation of a recombinant fungal immunomodulatory protein from *L. rhinoceros* produced in *P. pastoris* and *E. coli* host expression systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(7), 2799-2813.
- Environmental Science. (2018). Control profesional de plagas. Garrapatas. Obtenido de <https://www.environmentalscience.bayer.es/Pest-Management/O-que controlar/Ticks>
- Estrada-Peña, A. (2015). Orden Ixodida: Las garrapatas. *Revista IDE@ - SEA*(13), 1-15.
- Estrada-Peña, Z., & Fragoso, S. (2006). The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Exp. Appl. Acarol.*
- Faccioli, V. (2011). Garrapatas (acari: ixodidae y argasidae) de la colección de invertebrados del Museo Provincial De Ciencias Naturales Florentino Ameghino. Santa Fe, Argentina.
- Fan, G., Katroliá, P., Jia, H., Yang, S., Yan, Q., & Jiang, Z. (2012). High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 34(11), 2043-8.
- Fernandez-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R., & Alonso-Díaz, M. (2012). First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 338-342, 338-342.
- FIRCO. (2017). La ganadería en México. <https://www.gob.mx/firco/articulos/laganaderia-en-mexico?idiom=es> .
- Fragoso, H., Hoshman-Rad, P. O., Rodríguez, M., Redondo, M., Herrera, L., & de la Fuente, J. (1998). Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine*, 16, 1990-1992.

- Freeman, J., Davey, R., Kappmeyer, L., Kammlah, D., & Olafson, P. U. (2010). Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasit Vectors*.
- García-García, J., González, I., González, D., Valdés, M., Méndez, L., Lamberti, J., . . . De la Fuente, J. (1999). Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Experimental and Applied Acarology*, 23, 883-895.
- García-García, J., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., . . . et, a. (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, 18(21), 2275-2287.
- García-García, J., Soto, A., Nigro, F., Mazza, M., Joglar, M., Hechevarría, M., . . . Fuente, J. d. (1998). Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine*, 16(9), 1053-5.
- Gettins. (2002). Serpin structure, mechanism and function. *Chem Rev*, 102, 4751-4804.
- Gietz, D., & Schiestl, R. (2007). Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1).
- González-Romo, F., & Picazo, J. (2015). El desarrollo de nuevas vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(8), 557-568.
- González-Sáenz, J. (2007). Importancia de las garrapatas *Boophilus* en la exportación de ganado. *Symposium Internacional: Garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis*.
- Guerrero, F., Andreotti, R., Bendele, K., Cunha, R., Miller, R., Yeater, K., & Pérez de León, A. (2014). *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. *Parasit Vectors*, 7.
- Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T., Estrada-Peña, A., Horak, I., & Barker, S. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*.
- Hoffman, C., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267-272.
- Hovious, J. (2009). Tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immuneresponse. *Journal of Investigative Dermatology*, 129, 2337-2339.
- Huntington, J. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of thrombosis and haemostasis*.
- Imamura, S., Namangala, B., Tajima, T., Enala, T., Yasuda, J., Ohashi, K., & Onuma, M. (2006). Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine*.
- Imamura, S., Silva Vaz Junior, I., Ohashi, K., & Onuma, M. (2005). A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*, 1301-11.
- Inan, M., & Meagher, M. (2001). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioengng*, 92, 585-589.
- Invitrogen . (2010). Protocolo para expresión de proteínas recombinantes usando pPICZ y pPICZ α en *Pichia pastoris*.
- Jasminka, K., & Gordan, L. (2017). Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. *Methods Mol Biol*, 1503:1-12.

- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 1-15.
- Kim, T., Tirloni, L., Radulovic, Z., Lewis, L., Bakshi, M., Hill, C., . . . Mulenga, A. (2015). Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. *International journal for parasitology*, 45(9-10), 613–627.
- Kolb, V., Makeyev, E., & Spirin, A. (2000). Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system. *J. Biol. Chem.*, 16597-16601.
- Labuda, M., Trimnell, A., Lickova, M., Kazimirova, M., Davies, G., Lissina, O., . . . Nuttall, P. (2006). An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog*, 2(4), 27.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (227, Ed.) *Nature*, 680-685.
- Lagunes-Quintanilla, R., & Bautista-Garfias, C. (2020). El control inmunológico: Una alternativa contra garrapatas del ganado bovino. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(1), e2263.
- Law, R., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A., Silverman, G., & Wong, W. (2006). An overview of the serpin superfamily. *BioMed Central*.
- León-Clavijo, M., & Hernández - Rojas, E. (2012). Descripción de la proteína Bm86, polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. *NOVA* .
- Lew-Tabor, A., Bruyeres, A., Zhang, B., & Valle, M. (2014). *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks Tick Borne Diseases*, 5, 500-510.
- Lis, H., & Sharon, N. (1993). Protein glycosylation—structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem*, 218, 1-27.
- Lombardi, A., Bursomanno, S. L., Traini, R., Colombatti, M., Ippoliti, R., Flavell, D., . . . Fabbrini, M. (2010). *Pichia pastoris* as a host for secretion of toxic saporin chimeras. *FASEB J*, 24(1), 253-65.
- Love, C., Shah, K., Whittaker, C., Wu, J., Barlett, C., Ma, D., . . . Love, C. (2016). Comparative genomics and transcriptomics of *Pichia pastoris*. *BMC Genomics*, 17-550.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., & Pérez-Sánchez, R. (2012). Garrapatas: características anatómicas, epidemiológicas y ciclo vital. Detalles de la influencia de las garrapatas sobre la Producción y sanidad animal. *PV Albéitar*. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA).
- Maresová, H., Marková, Z., Valesová, R., Sklenár, J., & Kyslík, P. (2010). Heterologous expression of leader-less pga gene in *Pichia pastoris*: intracellular production of prokaryotic enzyme. *BMC Biotechnol*, 10(7).
- Martínez-Frías, M. (2010). Structure and function of the DNA and genes. Types of alterations of the gene function through mutation. *SEMERGEN* , 36(5), 273-277.
- Martínez-Masa, N., Hernández-Ortiz, R., ValdezEspinoza, U., Castro-Saines, E., Aguilar-Díaz, H., & Lagunes-Quintanilla, R. (2020). Análisis molecular de un polipéptido de la proteína RmS-17 para el desarrollo de un antígeno vacunal contra garrapatas

- Rhipicephalus microplus en México. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 7(3), e2537.
- Meekins, D., Kanost, M., & Michel, K. (Academic Press de 2017). Serpins in arthropod biology. In *Seminars in cell & developmental biology*, 62, 105-119.
- Montesino, R., García, R., Quintero, O., & Cremata, J. (1998). Variation in N-Linked Oligosaccharide Structures on Heterologous Proteins Secreted by the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 14, 197-207.
- Mulenga, A., Khumthong, A., & Blandon, M. (2007). Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *The Journal of Experimental Biology*, 210, 3188-3198.
- Narasimhan, S., Sukumaran, B., Bozdogan, U., Thomas, V., Liang, X., De Ponte, K., . . . 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.
- Oertwig, K., Ulbrichta, D., Hanke, S., Pippelb, J., Bellmann-Sickerta, K., Sträter, N., & T. Heikera, J. (2017). Glycosylation of human vaspin (SERPINA12) and its impact on serpin activity, heparin binding and thermal stability. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1865, 1188-1194.
- Olds, C., Mwaura, S., Odongo, D., Scoles, G., Bishop, R., & Daubenberger, C. (2016). Induction of humoral immuneresponse to multiple recombinant *Rhipicephalus appendiculatus* antigens and their effect on tick feedingsuccess and pathogen transmission. *Parasites & Vectors*, 9(484), Doi: 10.1186/s13071-016-1774-0.
- Peconick, A., Sossai, S., Girão, F., Rodriguez, M., Souza e Silva, C., Guzman, Q., Patarroyo, J. (2008). Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Experimental Parasitology*, 119:37-43.
- Pedro, A., Opolzer, D., Bonifácio, M., Maia, C., Queiroz, J., & Passarinha, L. (2015). Evaluation of MutS and Mut+ *Pichia pastoris* Strains for Membrane-Bound Catechol-O-Methyltransferase Biosynthesis. *Appl Biochem Biotechnol*, 175, 3840–3855.
- Pegram, R., Tatchell, R., de Castro, J., Chizyuka, H., Creek, M., McCosker, P., & et, a. (1993). Tick control: new concepts. *World Animal Rev*, 2(11), 74-75.
- Perez-Cogollo, L., Rodríguez-Vivas, R., Ramirez-Cruz, G., & Miller, R. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 168(1), 165-169.
- Polanco-Echeverry, D., & Ríos-Osorio, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*.
- Prevot, P., Couvreur, B., Denis, V., Brossard, M., Vanhamme, L., & Godfroid, E. (2007). Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*, 3284-92.
- Przylucka, A., Akcapinar, G., Bonazza, K., Mello-de-Sousa, T., Mach-Aigner, A., Lobanov, V., . . . Druzhinina, I. (2017). Comparative physiochemical analysis of hydrophobins produced in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 159, 913-923.
- Rajput, Z., Hu, S., Chen, W., Arijo, A., & Xiao, C. (2006). Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *J Zhejiang Univ Science B*.

- Robbertse, L., Baron, S., Van-Der, M.-N., Madder, M., Stoltz, W., & Maritz-Olivier, C. (2016). Genetic diversity, acaricide resistance status and evolutionary potential of a *Rhipicephalus microplus* population from a disease-controlled cattle farming area in South Africa. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 7, 595-603.
- Rodríguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., Falcón, V., . . . Valdés, M. (1994). High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol*, 33(2), 135-146.
- Rodríguez-Valle, M., Vance, M., Moolhuijzen, P., Tao, X., & Lew-Tabor, A. (2012). Differential recognition by tick-resistant cattle of the recombinantly expressed *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor-3 (RMS-3). *Ticks Tick Borne Dis*, 3(3), 159-69.
- Rodríguez-Valle, M., Xu, T., Kurscheid, S., & Lew-Tabor, A. (2015). *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterisation assessment. *Parasit Vectors*, 8, 7.
- Rodríguez-Vivas, R., Grisbi, L., Pérez de León, A., Silva, H., Torres-Acosta, J., Sánchez, H., . . . García, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61-74.
- Rodríguez-Vivas, R., Rivas, A., Chowell, G., Fragoso, S., Rosario, C., García, Z., . . . Schwager, S. (2007). Spatial distribution of acaricide profiles *Boophilus microplus* (strains susceptible or resistant to acaricides) in south eastern Mexico. *Veterinary Parasitology*, 146, 158-169.
- Rodríguez-Vivas, R., Rodríguez-Arevalo, F., Alonso-Díaz, M., Fragoso-Sánchez, H., Santamaría, V., & Rosario-Cruz, R. (2006). Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico: Potential risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 75, 280-286.
- Rodríguez-Vivas, R., Rosado-Aguilar, J., Ojeda-Chi, M., Pérez-Cogollo, L., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. (2014). Integrated control of ticks in bovine livestock. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3).
- Rosario, R., Domínguez, D., Rojas, E., Ortiz, M., & Martínez, F. (2009). Estrategia para el control de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Jiutepec, México: CENID-PAVET, INIFAP. Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México.
- Rosario-Cruz, R., Guerrero, F., Miller, R., Rodríguez-Vivas, R., Domínguez-García, D., Cornel, A., . . . George, J. (2005). Roles Played by Esterase Activity and by a Sodium Channel Mutation Involved in Pyrethroid Resistance in Populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Collected from Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 42(6), 1020-1025.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Tercera edición: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schuijt, T., Coumou, J., Narasimhan, S., Dai, J., DePonte, K., Wouters, D., . . . Fikrig, E. (2011). A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease agent. *Cell Host & Microbe*, 136-46.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2018). Bovino carne y leche Población ganadera 2009 - 2018 Cabezas. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/516353/Inventario_2018_Bovinos.pdf.

- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria - SENASICA. (12 de Noviembre de 2021). Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp. Gobierno de México.
- Simo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., & Bonnet, S. (2017). The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 281.
- Skaggs, R., Acuña, R., Torell, L., & Southard, L. (2004). Exportaciones de Ganado en pie de México hacia los Estados Unidos: ¿De dónde viene el ganado y hacia dónde va? . *Revista Mexicana de agronegocios*.
- Sonenshine, D., & Roe, R. (2013). *The Biology of Ticks*. Oxford University Press.
- Stein, P., Leslie, A., Finch, J., Turnell, W., McLaughlin, P., & Carrell, R. (1990). Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Nature*.
- Suárez-Pedroso, M., Méndez-Mellor, L., Valdéz, M., de Moura-Souza, R., ReisCamargo, A., & Vargas, N. (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*.
- Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Akiko, T., Ohashi, K., & Onuma, M. (2003). A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine*, 2844-51.
- Temeyer, K., Chen, A., Davey, R., Guerrero, F., Howell, J., Kammlah, D., . . . Welch, J. (2012). Nuevos enfoques para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*.
- Tirloni, L. (2015). Saliva de carrapatos: estudo proteômico e caracterização de proteínas salivares na relação parasito-hospedeiro. Centro de biotecnologia do estado do rio grande do sul.
- Tirloni, L., Kim, T., Coutinho, M., Ali, A., Seixas, A., Termignoni, C., . . . da Silva Vaz, I. (2016). The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.
- Tirloni, L., Seixas, A., Mulenga, A., Da-Silva, V., & Termignoni, C. (2014). A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp Parasitol*, 137, 25–34.
- Vogl, T., Hartner, F., & Glieder, A. (2013). New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 1-8.
- Watelet, B., Quibriac, M., Rolland, D., Gervasi, G., Gauthier, M., Jolivet, M., & Letourneur, O. (2002). Erratum to "characterization and diagnostic potential of hepatitis B virus nucleocapsid expressed in *E. coli* and *P. pastoris*". *J Virol Methods*, 102(1), 175-90.
- Whisstock, J., & Bottomley, S. (2006). Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding. *Current Opinion in Structural Biology*.
- Whisstock, J., Silverman, G., Bird, P., Bottomley, S., Kaiserman, D., Luke, C., & al, e. (2010). Serpins Flex Their Muscle II. structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *Biol Chem (American Society for Biochemistry and Molecular Biology)*.

- Willadsen, P. (2006). Tick control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*, 138, 161-168.
- Willadsen, P., Mckenna, R., & Riding, G. (1988). Isolation from the cattle tick *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *International Journal for Parasitology*, 18, 183-189.
- Xia, W., Fu, W., Cai, L., Cai, X., Wang, Y., Zou, M., & Xu, D. (2012). Expression, purification and characterization of recombinant human angiogenin in *Pichia pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76(7), 1384-8.
- Xu, T., Lew-Tabor, A., & Rodríguez-Valle, M. (2016). Effective inhibition of thrombin by *Rhipicephalus microplus* serpin-15 (RmS-15) obtained in the yeast *Pichia pastoris*. *Ticks Tick Borne Dis*, 7(1), 180-187.
- Ye, S., Cech, A., Belmares, R., Bergstrom, R., Tong, T., Corey, D., . . . Goldsmith, H. (2001). The structure of a Michaelis serpin–protease complex. *Nature Structural Biology*, 8:979-983.
- Yin, H., Liu, Z., Zhang, A., Zhang, T., Luo, J., Shen, J., . . . Zhang, Z. (2012). Intracellular expression and purification of the Canstatin-N protein in *Pichia pastoris*. *Gene*, 504(1), 122-6.
- Yongkiettrakul, S., Boonyapakron, K., Jongkaewwattana, A., Wanitchang, A., Leartsakulpanich, U., Chitnumsub, P., . . . Yuthavong, Y. (2009). Avian influenza A/H5N1 neuraminidase expressed in yeast with a functional head domain. *Virology Methods*, 156(1-2), 44-51.

XI. ANEXOS

11.1. Anexo 1



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



iniap
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

EL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN DISCIPLINARIA EN
SALUD ANIMAL E INOCUIDAD

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: BACT. DANIELA LARA GUTIÉRREZ

Por impartir la conferencia **"Expresión de proteínas en el vector de *Pichia Pastoris*"**
en el Curso Teórico-Virtual Estrategias para el diseño y producción de Proteínas
Recombinantes de agentes virales de interés pecuario
3 al 5 de agosto de 2021.
Duración de 10 horas.
Sede CENID-SAI, Palo Alto, Cuajimalpa, CDMX,



CENID
SALUD ANIMAL
E INOCUIDAD
MC. Enrique Herrera López
Director del CENID-SAI



Dra. Julieta Sandra Cuevas Romero
Presidente Comité Organizador

11.2. Anexo 2



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

**EL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
EN CELAYA, A TRAVÉS DEL DEPARTAMENTO DE
INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

Bac. Daniela Lara Gutiérrez

Por su destacada exposición del trabajo de investigación:

Expresión de proteínas en *Pichia pastoris*.

Que se llevó a cabo en el **Simposium "XXVII Jornada de Ingeniería Bioquímica"**,
celebrado del 18 al 22 de octubre de 2021.

Celaya, Gto., 22 de octubre de 2021



DR. JOSÉ ENRIQUE BOTELLO ÁLVAREZ
COORDINADOR GENERAL DEL EVENTO



IBQ. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ
JEFA DEL DEPARTAMENTO



11.3. Anexo 3



El Gobierno del Estado de Michoacán, a través del Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación, en colaboración con el Tecnológico Nacional de México, campus Instituto Tecnológico de Morelia y el respaldo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgan la presente:

CONSTANCIA

A: **DANIELA LARA GUTIÉRREZ ; RODOLFO ESTEBAN LAGUNES QUINTANILLA; JOSÉ LUIS CERRITEÑO SÁNCHEZ; JULIETA SANDRA CUEVAS ROMERO; MIGUEL ÁNGEL ALONSO DÍAZ**
POR LA EXPOSICIÓN DE SU PONENCIA **SÍNTESIS DE UN POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE DE RMS-17 DE RHIPICEPHALUS MICROPLUS EN EL SISTEMA DE EXPRESIÓN PICHIA PASTORIS** EN EL EJE 1. INVESTIGACIÓN BÁSICA DE LA MESA 3: CIENCIAS AGRÍCOLAS Y BIOTECNOLOGÍA

En el marco de las actividades académicas del



Morelia, Michoacán, a 22 de Octubre de 2021

Biol. María Piedad Trujillo García
Directora General del Instituto de Ciencia
Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán

Dr. José Luis Gil Vázquez
Director del Tecnológico Nacional de México,
campus Instituto Tecnológico de Morelia

11.4. Anexo 4

20 REUNIONES 21 científicas
14, 15, 17 y 18 de noviembre
NACIONES UNIDAS DE INVESTIGACIÓN Y INNOVACIÓN
PECUARIA, AGRÍCOLA, FORESTAL Y ACUÍCOLA PESQUERA

Ciencia para vivir

REUNIONES NACIONALES DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN PECUARIA, AGRÍCOLA, FORESTAL Y ACUÍCOLA PESQUERA

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

Daniela Lara Gutiérrez, Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla, José Luis Cerriteño Sánchez, Julieta Sandra Cuevas Romero, Miguel Ángel Alonso Díaz

Por su participación con el trabajo denominado:
CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN PARA LA PROTEÍNA Rms-17 DE Rhipicephalus microplus EN Pichia pastoris

DR. LUIS ÁNGEL RODRIGUEZ DEL BOSQUE
Vicepresidente del Comité Organizador Nacional

CIUDAD DE MÉXICO 10, 11 Y 12 DE NOVIEMBRE DE 2021

Logos for: LXI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; XI Reunión Nacional de Investigación Forestal; XI Reunión Nacional de Investigación Agrícola; VII Reunión Nacional de Investigación Acuícola y Pesquera.

11.5. Anexo 5

