



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Identificación del gen *hrf* (*histamine release factor*) de *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) y la evaluación de su transcripción.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado en **Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Presenta:

Luis Felipe Monroy Pérez

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Santiago de Querétaro, Qro. a 25 de Mayo de 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



Identificación del gen *hrf* (*histamine release factor*) de *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) y la evaluación de su transcripción.

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en **Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Presenta:

Luis Felipe Monroy Pérez

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Sinodales

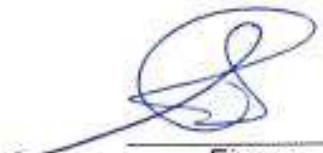
Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente


Dr. Diego Josimar Hernández Silva
Secretario


Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Vocal


MSPAS. Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio
Vocal

MSPAS. Chyntia Quetzalli Pérez Almeida
Vocal


Firma


Firma


Firma


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
, 2022
México

Resumen

La garrapata *Amblyomma mixtum* que fue recientemente restablecida como una especie perteneciente al grupo *A. cajennense s.l.*, posee una amplia distribución en la república mexicana y es la segunda garrapata de importancia para la producción bovina nacional. Debido al desarrollo de resistencia de las garrapatas hacia los acaricidas, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de control. Proteínas involucradas con mecanismos biológicos como la alimentación son un blanco para el desarrollo de vacunas. Los Factores Liberadores de Histamina (HRF), involucrados en la alimentación, han demostrado ser buenos candidatos vacunales por su alto grado de conservación y expresión en todas las fases de crecimiento. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente el gen *hrf* de *A. mixtum* y analizar su transcripción. A través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la utilización de la secuenciación automatizada de SANGER se logró obtener el marco de lectura abierto (ORF) completo de 519 pares de bases correspondiente a una secuencia de 173 aminoácidos de la proteína HRF de *A. mixtum*. Se observó un alto grado de homología con otros genes reportados en especies de garrapatas como: *Amblyomma variegatum*, *A. americanum*, *Dermacentor andersoni*, *D. silvarum*, *D. variabilis*, *Hyalomma anatolicum*, *H. dromedarii* y *Rhipicephalus microplus*, tanto a nivel nucleotídico (82.85 a 93.06%) como a nivel de aminoácidos (91.33 a 97.11 %). Al mismo tiempo, se obtuvo la secuencia parcial del gen *beta-actina*, usado como control de transcripción, obteniendo un fragmento de 670 pares de bases correspondiente a una secuencia de 223 aminoácidos de la proteína beta-actina de *A. mixtum*. La transcripción de ambos genes se comprobó mediante una PCR con Retrotranscripción (RT-PCR) y electroforesis en gel de agarosa. Con este trabajo se comprueba que la garrapata *A. mixtum* posee un gen *hrf* que se transcribe, el cual puede ser evaluado como un candidato vacunal que contribuya al control inmunológico de esta.

Palabras clave: *Amblyomma mixtum*, Factor Liberador de Histamina, secuenciación, transcripción.

Summary

The *Amblyomma mixtum* tick that was recently reestablished as a species belonging to the *A. cajennense s.l.* group, has a wide distribution in the Mexican Republic and is the second most important tick for national bovine production. Due to the development of tick resistance to acaricides, it is necessary to search for new control alternatives. Proteins involved in biological mechanisms such as feeding are a target for vaccine development. Proteins involved in biological mechanisms such as feeding are a target for vaccine development. Histamine Releasing Factors (HRF), involved in feeding, have proven to be good vaccine candidates due to their high degree of conservation and expression in all growth phases. The objective of this work was to molecularly characterize the *hrf* gene of *A. mixtum* and to analyze its transcription. Through the Polymerase Chain Reaction (PCR) and the use of automated SANGER sequencing, it was possible to obtain the complete open reading frame (ORF) of 519 base pairs corresponding to a sequence of 173 amino acids of the HRF protein from *A. mixtum*. A high degree of homology with other tick's reported genes as: *Amblyomma variegatum*, *A. americanum*, *Dermacentor andersoni*, *D. silvarum*, *D. variabilis*, *Hyalomma anatolicum*, *H. dromedarii* y *Rhipicephalus microplus*, was observed both at the nucleotide level (82.85 to 93.06%) and at the amino acid level (91.33 to 97.11%). At the same time, the partial sequence of the *beta-actin* gene, used as transcription control, was obtained, obtaining a fragment of 670 base pairs corresponding to a sequence of 223 amino acids of the *A. mixtum* beta-actin protein. The transcription of both genes was verified by Reverse Transcription PCR (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. With this work it is confirmed that the tick *A. mixtum* has an *hrf* gene that is transcribed, which can be evaluated as a vaccine candidate that contributes to its immunological control.

Keywords: *Amblyomma mixtum*, *Histamine Release Factor*, sequencing, transcription.

Dedicatorias

El presente trabajo va dedicado con especial cariño a mi familia. Mi mamá, Sara Pérez, por enseñarme a ser perseverante, mi papá, Felipe Monroy, por demostrarme que se tiene que trabajar duro por lo que uno quiere, a mis hermanos, Daniel Monroy y Mariana Monroy, por darme una sonrisa cuando más lo necesite.

A la memoria de mis abuelos Rodolfo Monroy (†) y Alfredo Pérez (†), por sus invaluable enseñanzas y consejos que trato de honrar día con día. Siempre estarán en mi corazón y en mis oraciones.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ciencias Naturales, a la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia y a todos los maestros de los que tuve el honor de ser su alumno.

Agradecimientos

Como mis abuelos y padres me enseñaron, doy primero las gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí.

Agradezco mi padres y hermanos por siempre ser ese pilar de apoyo incondicional para siempre seguir adelante pese las adversidades.

Doy un especial agradecimiento al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por siempre confiar en mí, brindarme su apoyo y siempre ser un ejemplo de lo que es ser un gran profesionalista y gran ser humano.

A todos mis maestros y amigos que formaron parte durante toda esta etapa.

A Aránzazu Campos, por ser ese rayo de luz en mi vida que siempre me brinda una sonrisa y todo su apoyo.

A Raúl Moya, por su amistad incondicional que atesoro con mucho cariño.

Al Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro y todos sus integrantes. Gracias por abrirme por las puertas y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo. Al Dr. Diego Hernández, al Lic. Andrés Velázquez, al MSPAS Aldo Pavón, la MSPAS Chyntia Pérez, la MSPAS Alma Cárdenas, al MSPAS Roberto Guerrero, al MC Edwin Hernández y todos los demás integrantes del laboratorio por su apoyo y consejos.

Tabla de Contenido

Resumen.....	iii
Summary	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos.....	vi
Tabla de Contenido.....	vii
Índice de Cuadros.....	x
Índice de Figuras	xii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
2.1 <i>Amblyomma mixtum</i>	2
2.1.1 Taxonomía.....	2
2.1.2 Reclasificación de <i>A. mixtum</i> (Koch, 1844).....	4
2.1.3 Distribución geográfica del género <i>Amblyomma</i>	5
2.1.3.1 Distribución del complejo <i>A. cajennense sensu latu</i>	6
2.1.3.2 Distribución geográfica de <i>A. mixtum</i>	8
2.1.4 Importancia económica y en la salud pública de <i>Amblyomma mixtum</i>	9
2.1.5 Ciclo de vida	11
2.1.6 Métodos de Control.....	13
2.1.6.1 Método de control farmacológico	14
2.1.6.2 Control biológico (plantas y hongos entomopatógenos).....	15
2.1.6.3 Control inmunológico.....	16
2.2 Proteínas.....	18
2.2.1 Factor Liberador de Histamina (Histamine Release Factor, HRF)	18
2.2.2 Actina (beta-Actina)	20
III. Objetivos.....	22

3.1	Objetivo general	22
3.2	Objetivos específicos	22
IV.	Hipótesis	22
V.	Materiales y métodos	23
5.1	Material biológico utilizado	23
5.2	Aprobación por el Comité de Bioética	23
5.3	Obtención de material genético.....	23
5.3.1	Extracción de ARN total.....	23
5.3.2	Obtención de cDNA	25
5.3.2.1	Tratamiento con DNasa	25
5.3.2.2	RT-PCR.....	26
5.3.3	Extracción de ADN total.....	26
5.4	Amplificación y clonación del gen <i>hrf</i>	28
5.4.1	Selección y diseño de iniciadores	28
5.4.2	Amplificación del gen <i>hrf</i>	32
5.4.3	Purificación del amplicón obtenido	33
5.4.4	Protocolo de transformación y clonación	35
5.4.4.1	Ligación inserto-vector	35
5.4.4.2	Transformación y clonación	36
5.4.4.3	PCR de colonia	37
5.4.4.4	Purificación de plásmido	38
5.5	Secuenciación y análisis de las secuencias del gen <i>hrf</i>	38
5.6	Amplificación y clonación de un fragmento del gen <i>actina (beta-actina)</i>	39
5.7	Secuenciación y análisis de las secuencias del fragmento del gen <i>beta-actina</i>	41
5.8	Análisis de transcripción del gen <i>hrf</i> y un fragmento del gen <i>beta-actina</i>	42
VI.	Resultados	45
6.1	Amplificación de los genes mediante PCR.....	45

6.1.1 Gen <i>hrf</i>	45
6.1.2 Fragmento del gen <i>beta-actina</i>	45
6.2 Transformación y clonación de los amplicones.....	46
6.2.1 Gen <i>hrf</i>	46
6.2.2 Fragmento del gen <i>beta-actina</i>	47
6.3 Secuenciación y análisis de las secuencias.....	48
6.3.1 Gen <i>hrf</i>	48
6.3.1.1 Alineación de secuencias analizadas.....	48
6.3.1.2 Análisis bioinformático de la secuencia consenso del gen de <i>hrf</i>	51
6.3.2 Fragmento del gen <i>beta-actina</i>	52
6.3.2.1 Alineación de secuencias analizadas.....	52
6.3.2.2 Análisis bioinformático de la secuencia consenso del gen de <i>beta-actina</i>	54
6.4 Análisis de transcripción de los genes.....	55
6.4.1 Gen <i>hrf</i>	55
6.4.2 Fragmento del gen <i>beta-actina</i>	56
VII. Discusión.....	58
VIII. Conclusión.....	61
IX. Referencias.....	62
X. Anexos.....	71
Anexo 1. Secuencia del gen <i>hrf</i> de <i>A. mixtum</i>	71
Anexo 2. Secuencia de aminoácidos del gen <i>hrf</i> de <i>A. mixtum</i>	71
Anexo 3. Secuencia parcial del gen <i>beta-actina</i> de <i>A. mixtum</i>	71
Anexo 4. Secuencia parcial de aminoácidos del gen <i>beta-actina</i> de <i>A. mixtum</i>	72

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Ixodicidas y lactonas macrocíclicas utilizados en México para el control de garrapatas en el ganado bovino.....	15
Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen hrf de <i>A. mixtum</i> a una concentración total de 0.25 μ M.	30
Cuadro 3. Características de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen hrf de <i>A. mixtum</i> a una concentración total de 0.10 μ M.	31
Cuadro 4. Cantidades de reactivos para usar en la reacción de amplificación del gen hrf de <i>A. mixtum</i>	33
Cuadro 5. Protocolo de termociclado para la amplificación del gen hrf de <i>A. mixtum</i>	33
Cuadro 6. Cantidades de reactivos para usar en la re-amplificación del producto de PCR del gen hrf de <i>A. mixtum</i>	34
Cuadro 7. Cantidades requeridas para ligación inserto-vector para el gen hrf.	36
Cuadro 8. Cantidades de reactivos para usar en la PCR de colonia de la clonación del gen hrf de <i>A. mixtum</i>	37
Cuadro 9. Cantidades de reactivos para usar en la reacción de amplificación del fragmento del gen beta-actina de <i>A. mixtum</i>	40
Cuadro 10. Cantidades requeridas para ligación inserto-vector para el fragmento del gen beta-actina de <i>A. mixtum</i>	41
Cuadro 11. Cantidades de reactivos para usar en el análisis de transcripción del gen hrf de <i>A. mixtum</i>	43
Cuadro 12. Cantidades de reactivos para usar en el análisis de transcripción del gen beta-actina de <i>A. mixtum</i>	43
Cuadro 13. Protocolo de termociclado para el análisis de transcripción de los genes hrf y beta-actina de <i>A. mixtum</i>	44
Cuadro 14. Análisis blast de las secuencias obtenidas de nucleótidos y aminoácidos del gen hrf de <i>A. mixtum</i>	51

Cuadro 15. Análisis blast de las secuencias obtenidas de nucleótidos y aminoácidos del fragmento del gen beta-actina de *A. mixtum*.....54

Índice de Figuras

Figura 1. Taxonomía de la garrapata <i>Amblyomma mixtum</i> (Koch, 1884)	3
Figura 2. Distribución de diferentes géneros de garrapatas por continente de acuerdo en su interés de investigación	6
Figura 3. Distribución de las 6 especies del Complejo <i>Amblyomma cajennense</i> s. l. en América.....	7
Figura 4. Modelaje de nichos ecológicos para <i>A. mixtum</i>	9
Figura 5. Ciclo biológico de <i>A. mixtum</i> en bovinos en el noreste de México.....	13
Figura 6. Estructura general de la proteína TCTP	19
Figura 7. Amplificación del gen <i>hrf</i> de <i>A. mixtum</i> con protocolo de gradiente de temperatura de alineamiento.	45
Figura 8. Amplificación del fragmento del gen <i>beta-actina</i> de <i>A. mixtum</i>	46
Figura 9. PCR de colonia del gen <i>hrf</i> de <i>A. mixtum</i>	47
Figura 10. PCR de colonia del gen <i>beta-actina</i> de <i>A. mixtum</i>	48
Figura 11. Alineación de las secuencias clonadas del gen <i>hrf</i> de <i>A. mixtum</i>	50
Figura 12. Análisis de dominios funcionales en la proteína HRF de <i>A. mixtum</i>	52
Figura 13. Alineación de las secuencias clonadas del gen <i>beta-actina</i> de <i>A. mixtum</i>	53
Figura 14. Análisis de dominios de arquitectura del fragmento de la proteína Beta-Actina de <i>A. mixtum</i>	55
Figura 15. Resultado del análisis de transcripción del gen <i>hrf</i> de <i>A. mixtum</i>	56
Figura 16. Resultado del análisis de transcripción del gen <i>beta-actina</i> (parcial) de <i>A. mixtum</i>	57

I. Introducción

Las garrapatas son de importancia veterinaria, médica y económica, no solo debido a su capacidad de transmitir patógenos tanto de animales como de humano, también, son los mayores vectores de transmisión de una gran variedad de microorganismos patógenos, más que ninguno otro artrópodo, además, pueden causar condiciones tóxicas graves, como parálisis y toxicosis, irritación y alergia (Jongenjan y Uilenberg, 2004; Levin y Schumacher, 2016; Zannou *et al.*, 2021). Las garrapatas se consideran como uno de los factores sanitarios más importantes que limita la ganadería en el trópico afectando el 80% de la población bovina del mundo (Polanco y Ríos, 2016). En México, se tiene registradas 77 especies de garrapatas que pueden parasitar una gran variedad de hospederos, incluido el ganado bovino y al hombre; su distribución se determina por factores ambientales, así como por las prácticas de control o erradicación sobre estos parásitos. Las principales especies de importancia para la ganadería bovina en la República Mexicana son : *Rhipicephalus microplus*, *R. anulatus* y *Amblyomma cajennense* (*A. mixtum*) (SENASICA, 2021).

Amblyomma mixtum es una garrapata generalista neotropical de importancia médica en humanos y veterinaria ampliamente distribuida en el continente americano, desde los Estados Unidos de América hasta Ecuador, teniendo una alta probabilidad de ocurrencia a lo largo del Golfo de México y en una menor proporción en los estados del Pacífico, América Central y la parte norte de Sudamérica (Aguilar-Domínguez *et al.*, 2021b). El impacto que tiene en el ganado es amplio, debido al rol que la garrapata juega como vector mecánico de *Anaplasma* spp., que causa una significativa mortalidad; para caballos es un importante vector de varias especies de *rickettsias*. Por otro lado, la importancia en la salud pública de este ectoparásito radica en el alto rango de hospederos, que incluye los humanos, cérvidos, jabalíes y reptiles, todo esto sumado a su capacidad de ser vector de

patógenos zoonóticos (Aguilar-Dominguez *et al.*, 2021a; Aguilar-Dominguez *et al.*, 2021b).

La aparición de garrapatas resistentes a los acaricidas ha enfocado los esfuerzos de los investigadores en la búsqueda de nuevas alternativas para su control (Lagunes y Bautista, 2020). El control inmunológico es efectivo, ecológico y económico, y se refiere al desarrollo de vacunas contra garrapatas. Este se ha basado en la identificación y caracterización de candidatos vacunales siendo, entre los más importantes candidatos: proteínas estructurales, proteasas y sus inhibidores, o moduladores de la respuesta inmune (Prevot *et al.*, 2007). Los componentes de la saliva de garrapatas tienen una alta importancia pues se puede obtener información sobre la evolución de la alimentación basada en sangre por parte de los artrópodos, además de ser blancos vacunales para combatir las garrapatas o las enfermedades que estas transmiten (Ribeiro *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2011). En varias especies de garrapatas se ha identificado un factor de liberación de histamina (Histamine Release Factor o HRF), esta proteína se expresa en varios tejidos (glándulas salivales, el intestino medio, los ovarios y los hemocitos) además de expresarse en todas las etapas de desarrollo, lo que la convierte en un candidato para uso como antígeno de una vacuna contra garrapatas (Bartley *et al.*, 2009; Mulenga y Azad, 2005).

II. Antecedentes

2.1 Amblyomma mixtum

2.1.1 Taxonomía

Las garrapatas son ectoparásitos obligados que se alimentan de sangre de vertebrados. Pertenecen al Filo Arthropoda, que contiene más del 80% de todas las especies animales. Son invertebrados cuyas características principales son un exoesqueleto quitinoso duro, cuerpo segmentado y extremidades articuladas. Dentro de este Filo, estas forman parte de la clase Arachnida, la cual se caracteriza

por tener el cuerpo dividido en dos partes: el cefalotórax y el abdomen. Son de la Sub-clase Acari o Acarina, Orden Metastigmata (Ixodida); la subclase puede dividirse también en tres linajes principales: Opiloacariformes, Acariformes y Parasitiformes, siendo las garrapatas (orden Ixodida) agrupadas en este último (Wall y Shearer, 2001; Almazán *et al.*, 2016, Nava *et al.*, 2019).

Dentro del orden Metastigmata existen tres familias: la Ixodidae, conocidas como garrapatas duras, la Argasidae, conocidas como garrapatas blandas, y la Nuttalliellidae, con un solo grupo pequeño de especies de garrapatas en Sudáfrica (Wall y Shearer, 2001; Estrada-Peña, 2015). Para el 2014 se tenía un registro de 711 especies distintas alrededor del mundo para la familia Ixodidae (garrapatas duras), siendo las garrapatas del género *Amblyomma* pertenecientes a esta familia (Figura 1). Así mismo, se describe la existencia de 132 especies diferentes para el género *Amblyomma* en el mundo, sumando otras tres especies más que fueron descritas en los últimos años: *A. interandinum*, *A. patinoi* y *A. tonelliae* (Guglielmone y Nava, 2014).

Reino	Filo Arthropoda
Animalia	Clase Arachnida
	Subclase Acarina
	Orden Metastigmata (Ixodida)
	Familia Ixodidae
	Genero <i>Amblyomma</i>
	Especie <i>mixtum</i>

Figura 1. Taxonomía de la garrapata *Amblyomma mixtum* (Koch, 1884). Traducido y modificado de Parola y Raoult, 2001 y Taylor, Coop, & Wall, 2017.

2.1.2 Reclasificación de *A. mixtum* (Koch, 1844)

A. mixtum se describió por primera vez por Koch (1844), un aracnólogo alemán, basándose en el material que se tenía en el Museo für Naturkunde Berlín; el cual consistía en ejemplares recolectados en México (Nava *et al.*, 2014a). En esa descripción Koch, toma en cuenta y describe *Acarus cajennensis* (*Amblyomma cajennense*) y lo integra al recién nombrado género *Amblyomma* (Nava *et al.*, 2014b). *Amblyomma cajennense* fue descrita por Fabricius (1787), como *Acarus cajennensis*. Neumann (1899) menciona a *A. mixtum* junto con *A. tenellum*, también reportada por Koch (1844), e *Ixodes herrerae* como sinónimos de *A. cajennense*.

Durante mucho tiempo se discutió sobre la taxonomía de *A. cajennense*, donde los estudios morfológicos terminaban en opiniones contradictorias, algunos autores consideraban diferencias fenotípicas para separar a las diferentes especies de *A. cajennense*. Por otro lado, algunos autores atribuían las diferencias en la morfología a un polimorfismo intraespecífico, quedando este razonamiento como el más aceptado y, desde 1953 Aragão y Fonseca, colocaron a todas las especies relacionadas como sinónimos de *A. cajennense*. En 1958 Kohls, tras analizar los especímenes de Koch, llega a la misma conclusión que Aragão y Fonseca (1953) (Beati *et al.*, 2013), dejando a la garrapata *A. mixtum* como un sinónimo de *A. cajennense*. Recientemente, tras la realización de algunos experimentos de cruzamiento en laboratorios usando garrapatas de diferentes áreas geográficas de Brasil y Argentina, se obtuvieron resultados de fecundación extremadamente bajos, sugiriendo que *A. cajennense* era un complejo con unidades taxonómicas distintas dependiendo de la región donde se localizasen (Mastropaolo *et al.*, 2001; Beati *et al.*, 2013). Beati y colaboradores (2013), usaron análisis de ADN nuclear y mitocondrial, concluyendo que *A. cajennense* es un grupo de 6 especies distintas que han evolucionado por separado al menos desde hace 13.2 millones de años, desde el Mioceno, cuando se tuvo el levantamiento andino provocando cambios en la topología y como consecuencia cambios en el clima y la ecología del Neotrópico aislando algunos ejemplares del resto.

A partir de todos estos recientes análisis se determinó que *A. cajennense* es un grupo de 6 garrapatas filogenética y morfológicamente diferentes que se agrupan en un solo complejo denominado *A. cajennense sensu lato* (*A. cajennense s.l.*), donde *A. cajennense sensu stricto* (*A. cajennense s.s.*) es una de las especies pertenecientes a este, sumándose a este grupo *A. interandinum*, *A. patinoi* y *A. tonelliae* y quedando restablecidas *A. mixtum* y *A. sculptum* (Nava *et al.*, 2014b; Almazán *et al.*, 2016).

2.1.3 Distribución geográfica del género *Amblyomma*

La distribución de las garrapatas a lo largo del mundo no es homogénea, además, en algunas zonas se tienen ambientes favorables para las garrapatas, pero aún no han sido introducidas. Factores como la ausencia o baja densidad de hospederos es un factor relevante para la distribución de estos parásitos (Zannou *et al.*, 2021). Para el caso específico del género *Amblyomma*, Zannou y colaboradores (2021), realizaron un estudio sobre la distribución de garrapatas a nivel mundial (Figura 2) a través de las principales especies estudiadas por regiones, encontrando que el género *Amblyomma* presenta una especial distribución con alto interés en África y América principalmente, mientras que Europa representa el género menos estudiado. En África Subsahariana e India Occidental hay casos reportados de Fiebre Africana transmitida por garrapatas del género *Amblyomma* (Fournier y Raoult, 2020). En Sudáfrica *A. variegatum* es una de las especies más estudiadas debido a la transmisión de patógenos como *Ehrlichia ruminantium* (Zannou *et al.*, 2021). Para el caso de América, el género *Amblyomma* posee varias especies de garrapatas que se han adaptado al continente (Almazán *et al.*, 2016). En Estados Unidos *Amblyomma americanum* (“the lone star tick”) está considerada como una de las garrapatas de mayor importancia en la salud pública y tiene importancia en medicina veterinaria (Ma *et al.*, 2021). *A. maculatum*, es otra garrapata que tiene distribución desde el centro y sur de Estados Unidos, México y parte de América del sur (Wall y Shearer, 2001).

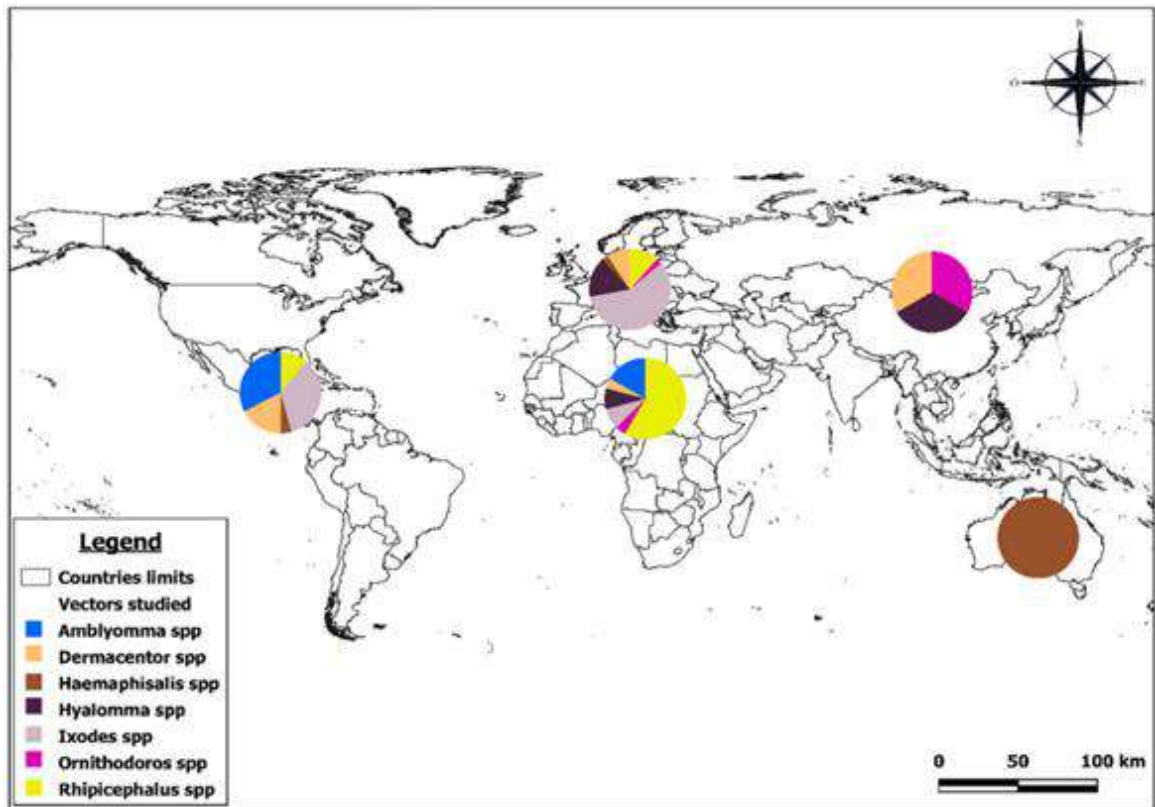


Figura 2. Distribución de diferentes géneros de garrapatas por continente de acuerdo en su interés de investigación. Modificado de Zannou *et al.*, 2021.

2.1.3.1 Distribución del complejo *A. cajennense sensu lato*

Nava y colaboradores (2014b), basándose en 3 distintas colecciones de garrapatas de diferentes partes del continente americano, crearon una base de datos de la distribución del género *Amblyomma* y las especies pertenecientes al complejo *A. cajennense s.l.*, encontrando que tienen presencia desde el sur de Texas, EUA, hasta el norte de Argentina (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**3). Por lo que, *A. cajennense s.s.* se limita a la Rondonia, Amazonia de Brasil y la Guayana Francesa, *A. sculptum* se localiza en el norte de Argentina, Bolivia, Paraguay y la costa centro oeste de Brasil, *A. tonelliae* en la región del Chaco (del centro norte de Argentina hasta Bolivia y Paraguay), *A. interandinum* en Perú, *A. patinoi* en la cordillera este de Colombia y *A. mixtum* desde el sur de Texas (EUA) hasta Ecuador (Almazán *et al.*, 2016; Estrada-Peña *et al.*, 2014). En años recientes

Rivera-Paez y colaboradores (2016), han reportado la presencia de *A. mixtum* en Colombia usando análisis morfológicos y moleculares.



Figura 3. Distribución de las 6 especies del Complejo *Amblyomma cajennense* s. l. en América. * *Amblyomma cajennense* s.s.; † *Amblyomma tonelliae* n. sp.; ‡ *Amblyomma interandinum* n. sp.; # *Amblyomma patinoi* n. sp.; ■ *Amblyomma mixtum*; ○ y X *Amblyomma sculptum*. Nava et al., 2014b.

2.1.3.2 Distribución geográfica de *A. mixtum*

A. mixtum tiene la mayor distribución dentro de los 6 miembros del complejo, abarcando desde el sur de Texas, USA, hasta el este de Ecuador (Aguilar-Domínguez *et al.*, 2021b). Por lo tanto, *A. mixtum* es la garrapata que se encuentra parasitando de forma común tanto a bovinos como a equinos dentro de México y con la que tienen contacto las personas que se dedican a la ganadería (Almazán *et al.*, 2016).

En cuanto a su distribución en el país, Illoldi *colaboradores* (2012), estudiaron la distribución y preferencias climáticas de *A. mixtum* (antes *A. cajennense*) en México, encontrando la presencia de esta en casi todos los estados, excepto Aguascalientes, Ciudad de México, Morelos y Tlaxcala. Con una mayor distribución en Veracruz y Tamaulipas, con predilección por zonas cálidas con una preferencia altitudinal entre 0 y 2800 m, con un ideal de 200 a 1000 m. Además, esta garrapata tiene una preferencia hacia localidades con altas temperaturas constantes, en un rango de temperatura de los 13° a 26°C con una media de 16°C (Aguilar-Domínguez *et al.*, 2021b).

Recientemente, Aguilar y *colaboradores* (2021), se dieron a la tarea de estudiar la distribución potencial de *A. mixtum*, consiguiendo un mapa de nichos ecológicos y su distribución en México basados en reportes y tomando en cuenta características como temperatura anual media, el rango diurno medio, la temperatura estacional, entre otros, así como los principales estados del país con presencia de esta especie (Figura 4). El resultado encontrado fue que la garrapata tiene un rango de accesibilidad de prácticamente todo el país, exceptuando Baja California, Baja California Sur, Sonora y algunas zonas del sureste del país, presentando una mayor preferencia hacia los estados en el Golfo de México y un poco menos hacia el

Pacífico; concluyendo que *A. mixtum* es una especie endémica de México a Ecuador y, particularmente en la región conocida como Planicie Costera del Golfo de México.

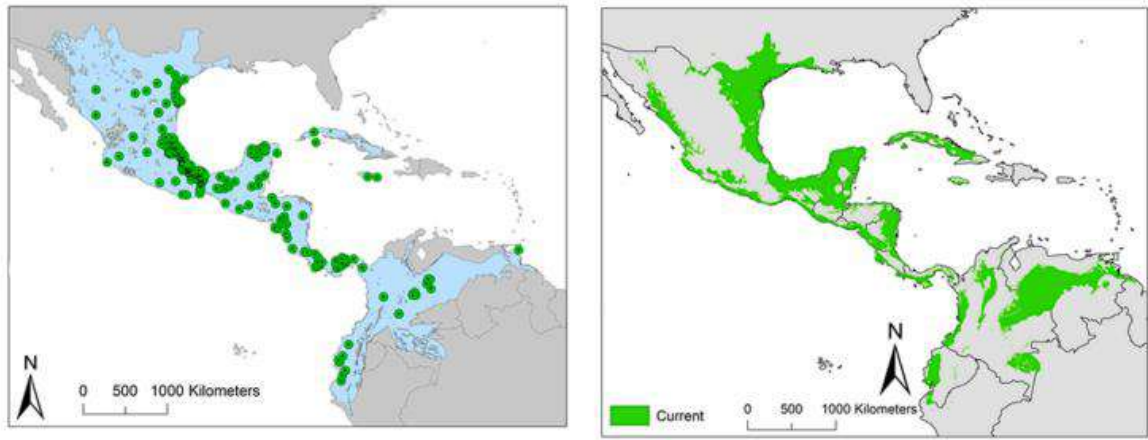


Figura 4. Modelaje de nichos ecológicos para *A. mixtum*. Izquierda, mapa de América donde las marcas verdes representan los puntos de ocurrencia de *A. mixtum* y la región accesible se encuentran en azul. Derecha, modelaje de nicho ecológico de *A. mixtum* en la actualidad. Modificado de Aguilar *et al.*, 2021.

2.1.4 Importancia económica y en la salud pública de *Amblyomma mixtum*.

Amblyomma mixtum (Koch, 1884) se describe como la segunda garrapata de importancia para la especie bovina que se localiza en el trópico mexicano (Almazán *et al.*, 2016). Esta garrapata provoca infestaciones en sus hospederos y es un importante vector de patógenos zoonóticos como *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico de Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas (FMMR) y otros patógenos con potencial de transmisión por garrapatas como *R. amblyommatis* y *Theileria equi* (Aguilar-Domínguez *et al.*, 2021b). Beck y Orzco (2015), señalan a *Amblyomma mixtum* como un vector de *Rickettsia* spp, *Ehrlichia chaffeensis*, *Borrelia* spp, *Coxiella burnetti*, y el virus de la Encefalomiелitis Venezolana equina.

Para el 2009 se emitió una alerta epidemiológica por brote de rickettsiosis en Baja California, con un total de 1,471 casos sospechosos en todo el año. En 2015, el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) de la Secretaría de Salud de México emitió una Declaración de

Emergencia Epidemiológica para la FMMR en las regiones del norte de México, donde los estados de Baja California y Sonora eran los más relevantes (López-Castillo *et al.*, 2018). Estudios reportan una mortalidad del 8-10% en la población en general, siendo del 30% para la población pediátrica, la cual es mucho mayor a la reportada en zonas endémicas de Estados Unidos (2-7%), esto está relacionado con la pobreza y el difícil acceso a sistemas de salud (Álvarez-Hernández *et al.*, 2016), alcanzado hasta un 80% de mortalidad en los últimos 100 años (Álvarez-Hernández *et al.*, 2017).

Los efectos causados por especies del género *Amblyomma* en el hospedador son relevantes debido al gran tamaño del parásito, una hembra adulta puede llegar a ingerir de 1 a 3 ml de sangre en un periodo de 3-4 semanas, y si la parasitosis es elevada, el volumen de la pérdida de sangre se incrementa, así como las lesiones en la piel (Quijada *et al.*, 2006; Taylor, Coop, y Wall, 2017). La importancia de este género de garrapatas radica en la capacidad de producir daños físicos en el ganado como debilidad, fiebre y mortalidad. Debido que las piezas bucales son muy desarrolladas, producen una herida profunda en la piel provocando necrosis dérmica focal y hemorragia, seguida por una respuesta inflamatoria involucrando eosinofilia, en algunas ocasiones. Esta herida generada puede infectarse con *Staphylococcus* spp., causando un absceso cutáneo local e incluso piemia; además que estas lesiones generadas pueden predisponer miasis (Almazán *et al.*, 2016; Taylor, Coop, & Wall, 2017). Todo esto, genera un impacto negativo al ganado sobre la capacidad de expresar su potencial productivo, generando reducción del peso corporal, disminución de la producción láctea y cárnica; así como severas dermatitis causadas por mordeduras, que reducen la calidad de vida de los hatos, y generación de anemia por infestaciones masivas (Jongenjan y Uilenberg, 2004; Polanco y Ríos, 2016; Lagunes y Bautista, 2020).

La presencia de garrapatas en el país pone en riesgo la producción nacional bovina de carne con 2.027 millones de toneladas y un valor aproximado de 139,612 millones de pesos (MXN), así como a la producción de leche con 12,275 millones

de litros con un valor aproximado de 79,597 millones de pesos (MXN), además de afectar 4.5 millones de empleos directos e indirectos que este sector genera. Cabe mencionar, que estos parásitos ponen en riesgo el inventario nacional de 35,224,960 cabezas de ganado bovino, con un valor estimado de 563,880.55 millones de pesos (MXN) del ganado en pie (SENASICA, 2021). La distribución de la garrapata representa un problema de salud pública para los trabajadores en actividades ganaderas en México y otros países con problemas de infestaciones mixtas al estar expuestos a estos parásitos (Aguilar-Domínguez *et al.*, 2021b)

2.1.5 Ciclo de vida

Las garrapatas ixódidas tienen un ciclo de vida que involucra cuatro estadios: huevos, larvas (3 pares de patas), ninfas (4 pares de patas) y adultos (4 pares de patas). Son arácnidos que presentan un ciclo de vida hemimetábolo, de metamorfosis incompleta. Para lograr este ciclo, existen tres patrones de alimentación, que varían de acuerdo con el número de hospedadores utilizados como fuente de alimento durante su ciclo de vida (Polanco y Ríos, 2016). Para aquellas que habitan bosques y pastizales donde hay un suministro relativamente abundante de hospedadores y en hábitats donde las condiciones son adecuadas para una buena supervivencia durante la fase fuera del hospedador, se ha adoptado un ciclo de vida de tres hospedadores (Taylor, Coop, & Wall, 2017). Estas garrapatas llevan a cabo ambas mudas en el suelo, de modo que las ninfas deben encontrar un segundo hospedador y las adultas un tercero después de la muda, siendo la mayoría de las especies del género *Amblyomma* las que tienen este tipo de ciclo de vida (Jongenjan & Uilenberg, 2004).

Para la garrapata *A. mixtum*, su ciclo biológico, en condiciones controladas, se logró completar en un rango de 133 a 193 días, teniendo presencia de las fases adultas sobre el ganado durante todo el año con una mayor abundancia en verano, con el aumento de la temperatura y de la precipitación pluvial. Las fases larvarias y ninfas se pueden observar en los meses de marzo y septiembre tanto en el ganado como

en la vegetación, por lo que, *A. mixtum* presenta dos ciclos biológicos por año (Almazán *et al.*, 2016). Las garrapatas esperan en la vegetación de forma activa o pasiva hasta que pase un hospedero y subir a él, lo cual logra gracias a los estímulos que se generan, como movimiento (vibraciones y/o sombras bloqueando la luz), CO₂ o las feromonas que generan (Beck & Orzco, 2015).

El ciclo de esta garrapata en bovinos comienza con las larvas de 3 pares de patas, estas suben al hospedador, se alimentan y completan su repleción en un período de 3 a 5 días, para posteriormente desprenderse y caer al suelo. Estas larvas repletas mudan en el suelo en un período de 21 a 30 días al estadio de ninfa con 4 pares de patas. Una vez mudado a ninfa, esta sube a un segundo hospedador y se alimenta durante 3 a 6 días. La ninfa repleta cae al suelo y realiza la muda en 20 a 28 días. Las garrapatas hembra y macho adultos de 4 pares de patas suben al tercer hospedador para alimentarse y realizar la cópula. La repleción de la hembra dura de 7 a 12 días, una vez repletas se desprenden del hospedador y caen al suelo para llevar a cabo la oviposición en un periodo de 25 a 29 días. La incubación de los huevos se lleva a cabo en el suelo durante 8 a 12 días para finalizar con la eclosión de larvas (Figura 5). La duración de este ciclo y sus fases dependerá de tener las condiciones ambientales adecuadas y disponibilidad de hospedadores (Jongenjan y Uilenberg, 2004; Almazán *et al.*, 2016; Landulfo *et al.*, 2016; Polanco y Ríos, 2016; Piña *et al.*, 2017).

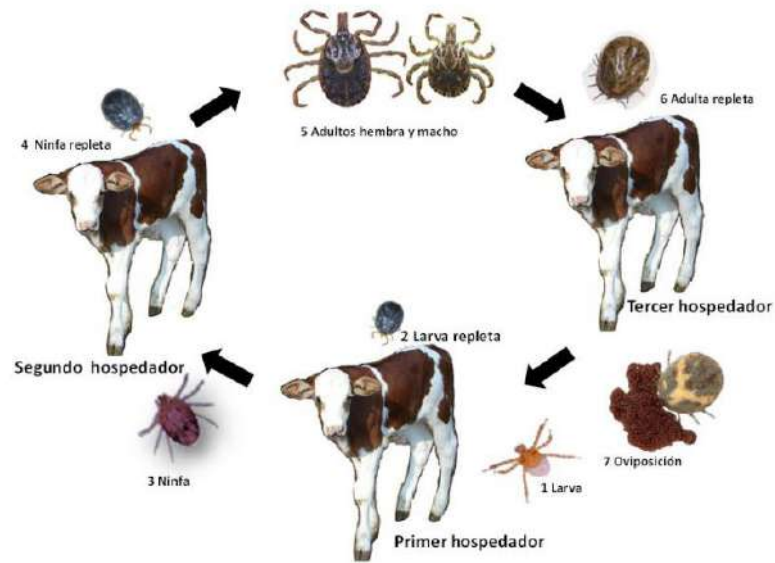


Figura 5. Ciclo biológico de *A. mixtum* en bovinos en el noreste de México. Almazán *et al.*, 2016.

2.1.6 Métodos de Control

Las garrapatas son una amenaza para la salud de los humanos y de los animales, tanto domésticos como salvajes (Fernandes *et al.*, 2012). Además, estos parásitos son intrínsecamente difíciles de controlar (Polar, Moore, Kairo, & Ramsubhag, 2008). El problema de resistencia a ixodicidas ha generado un interés por buscar métodos de control alternativos, siendo el desarrollo de vacunas contra garrapatas una gran medida alternativa por ser tanto práctica como sustentable. Algunas otras pueden ser la cría y la selección de animales genéticamente resistentes o controles biológicos usando feromonas, introducción de depredadores naturales, rotación, descanso y quema controlada de praderas, así como el tipo de vegetación (Prevot *et al.*, 2007; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014; Lagunes y Bautista, 2020).

Teniendo en cuenta estos aspectos, el control se está encaminando hacia la idea de un control integrado de garrapatas como la mejor opción, el cual consiste en el uso sistemático de dos o más métodos de control (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

Estos métodos seleccionados pueden clasificarse dentro de alguna de estas categorías: farmacológico, biológico o inmunológico.

2.1.6.1 Método de control farmacológico

El método más utilizado es el uso de productos químicos, conocidos como ixodicidas, cuya función es interrumpir el ciclo biológico con su aplicación a intervalos específicos mediante baños de aspersion, inmersión, derrame dorsal e inyectables (Lagunes y Bautista, 2020).

Estos productos son exitosos si se usan de manera adecuada por su acción rápida sobre garrapatas localizadas sobre los bovinos, pero poco efectivos sobre larvas en la vegetación, obligando a un uso continuo de estos; con problemas con la residualidad y la selección de poblaciones resistentes, con efecto adverso al medio ambiente y contaminación de subproductos para consumo humano (Lagunes y Bautista, 2020). Los ixodicidas por elección en México se engloban en organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, fenilpirazolonas e inhibidores del desarrollo. Además, se ha visto que las lactonas macrocíclicas también logran controlar las infestaciones. El Cuadro 1 muestra los ixodicidas utilizados (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Ixodicidas y lactonas macrocíclicas utilizados en México para el control de garrapatas en el ganado bovino. Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014.

Familia	Sustancia Activa	Forma de aplicación
Organofosforados	Coumafos	Inmersión, aspersión
	Clorpirifos	Inmersión, aspersión
	Clorfenvinfos	Inmersión, aspersión
Piretroides sintéticos	Cipermetrina	Inmersión, aspersión, derrame dorsal
	Deltametrina	Inmersión, aspersión, derrame dorsal
	Flumetrina	Inmersión, aspersión, derrame dorsal
	Lambdacyalotrina	Derrame dorsal
	Alfacipermetrina	Inmersión, aspersión, derrame dorsal
Amidinas	Amitraz	Inmersión, aspersión
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	Inyectable, derrame dorsal
	Moxidectina	Inyectable
	Doramectina	Inyectable
Fenilpirazolonas	Fipronil	Derrame dorsal
Inhibidores del desarrollo	Fluazurón	Derrame dorsal

2.1.6.2 Control biológico (plantas y hongos entomopatógenos)

Dentro de los controles biológicos, el tipo de vegetación, así como su composición, poseen un efecto directo sobre la supervivencia de algunas fases de las garrapatas, donde algunas leguminosas pueden atrapar en secreciones a las larvas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). Por ejemplo, Fernandez-Ruvalcaba y colaboradores (2004), mencionan el uso estratégico de las gramíneas forrajeras *Melinis minutiora* y *Andropogon gayanus* que tienen la capacidad de limitar la infestación de las garrapatas gracias a la secreción de metabolitos secundarios que se expresan como sustancias viscosas, adhesivas, olorosas o tóxicas con un efecto desfavorable para para algunas etapas de búsqueda de huésped de las garrapatas, de manera que se pueda reducir el riesgo de encuentro garrapata-bovino.

Otros agentes biológicos usados como control pueden ser hongos entomopatógenos (*Metarhizium* sp; *Beauveria* sp), bacterias (*Cedecea lapagei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter agglomerans*), nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditidae* y *Steinernematidae*) y hormigas reguladoras (*Solenopsis germinata*, *S. saevissima*, *Camponotus rengira* y *Ectatomma quadridens*) (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). Se han reportado alrededor de 58 especies de hongos con efecto sobre 73 especies pertenecientes a la subclase Acarina, además, la alta variabilidad genética entre estos microorganismos es considerada una característica atractiva para su uso como método de control, debido a que se pueden aislar cepas con características óptimas para su uso eficaz, como: alta virulencia, resistencia a rayos UV y resistencia a la desecación, que pueden propiciar una buena adaptación a las distintas condiciones ambientales (Fernandes *et al.*, 2012).

Tanto los ácaros como las garrapatas poseen susceptibilidad a hongos entomopatógenos, por lo que estos microorganismos han sido usados como un potencial control biológico y han mostrado una alta habilidad para matar garrapatas bajo condiciones de laboratorio (Polar *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2012), teniendo dos estrategias de uso: aplicación sobre los pastos y aplicación tópica sobre los bovinos. La primera estrategia ha demostrado resultados prometedores debido al potencial de mantener bajas las poblaciones de garrapatas inmaduras, pero con la desventaja de que se requieren grandes cantidades de infusiones y su constante aplicación sobre áreas grandes (Polar *et al.*, 2008). Los principales mecanismos fisiopatológicos de los hongos entomopatógenos al infectar artrópodos son: penetración de la cutícula, proliferación de micelio en el hemocele del hospedador y producción de metabolitos tóxicos (Fernandes *et al.*, 2012).

2.1.6.3 Control inmunológico

El uso de las vacunas como control inmunológico representa una alternativa con buen futuro para disminuir la infestación de artrópodos y a la par, limitar y evitar la

transmisión de patógenos (Lagunes y Bautista, 2020). En este aspecto, la creación de vacunas gira alrededor de la identificación y caracterización de candidatos vacunales (Prevot *et al.*, 2007).

A la mitad de la década de los años ochenta se originó la idea de vacunas contra garrapatas, donde se usaron como antígeno vacunal proteínas provenientes de extractos crudos de garrapatas (Lagunes y Bautista, 2020). Wikel en 1981 identificó y utilizó proteínas de glándulas salivales de *Dermacentor andersoni* logrando buenos resultados en experimentos en cobayos. Un poco después, Brown, Shapiro y Askenase en 1984 identificaron una proteína de 20 kDa en *A. americanum* presente en la saliva y asociada al cemento de adhesión de la garrapata. Y, a finales del siglo pasado, se caracterizó en la garrapata *Haemaphysalis longicornis* una proteína de 29 kDa denominada p29, la cual posee similitud al colágeno que reduce la repleción y mortalidad de larvas y ninfas (Mulenga *et al.*, 1999). Las vacunas utilizadas de manera comercial surgieron en 1993 en Australia (TickGard®) y en 1997 en América Latina (Gavac®), las cuales utilizaban el antígeno Bm86, una glicoproteína de membrana presente en el intestino medio de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* Pero su uso es limitado debido a la variación de esta proteína entre especies y entre géneros (de la Fuente *et al.*, 2007; Lagunes y Bautista, 2020).

En los últimos años, los estudios con garrapatas ixódidas han demostrado que utilizar la vacunación con antígenos salivales “expuestos” para reducir la infestación, como por ejemplo la proteína del iris o el HRF, son altamente viables (Bartley *et al.*, 2009; Prevot *et al.*, 2007). Otro ejemplo es el antígeno de la saliva sialostatina L2, con el cual se inmunizaron cuyos, disminuyendo la capacidad de ninfas de *Ixodes scapularis* para alimentarse (Kotsyfakis *et al.*, 2008). Recientemente, el equipo de trabajo de Rodríguez-Mallon (2020), utilizaron el péptido pP0 (proteína ribosomal P0) como antígeno vacunal frente a la garrapata *A. mixtum* inmunizando conejos, teniendo una efectividad del 54% contra larvas.

Con el inicio de la era post-genómica se ha revolucionado la manera de identificar, diseñar y desarrollar antígenos, iniciando con un análisis *in silico* del genoma detectando genes de interés para un uso potencial en vacunas (Lagunes y Bautista, 2020).

2.2 Proteínas

2.2.1 Factor Liberador de Histamina (Histamine Release Factor, HRF)

La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP), también llamada Factor liberador de Histamina (HRF) es altamente conservada y está presente en organismos eucariontes con funciones muy variadas, y cuyas formas extracelulares, en su forma dimerizada, es capaz de inducir la liberación de citocinas y otras moléculas señaladores de varios tipos de células inmunitarias (Bartley *et al.*, 2009; Bommer, 2017). En 1995 Susan MacDonald y colaboradores identificaron por a vez una función extracelular para esta proteína como un Factor Liberador de Histamina en pacientes alérgicos (MacDonald *et al.*, 1995). Esta proteína tiene similitud con la familia de proteínas Mss4/Dss4, grupo llamado “nucleotide-free chaperones”, en su estructura soluble cuenta con tres dominios mayores: el dominio de bucle flexible, dominio α -helicoidal y dominio cadena β (Figura 6) (Bommer, 2017).

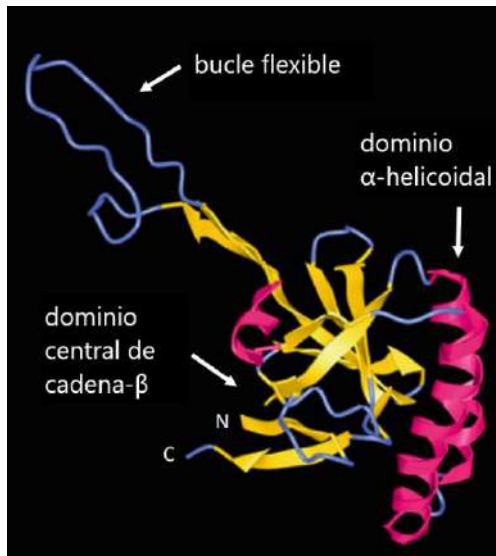


Figura 6. Estructura general de la proteína TCTP. Los elementos de la estructura secundaria se destacan de la siguiente manera: magenta: hélices- α , amarillo: láminas- β , líneas azules: áreas no estructuradas; Traducido y modificado de Bommer, 2017.

En garrapatas, la alimentación depende de una serie de sustancias farmacológicamente activas en la saliva que actúan contra las respuestas hemostáticas e inmunitarias del hospedador, afectando tanto a la respuesta innata como a la adaptativa (Ribeiro *et al.*, 2006; Dai *et al.*, 2010; Langhansova *et al.*, 2015; Levin y Schumacher, 2016). Dentro estas sustancias destacan los HRFs, descritos originalmente en ascitis y eritroleucemia en ratones (Gachet *et al.*, 1999; Mulenga & Azad, 2005). En las garrapatas ixódidas se tiene el reporte de un homólogo de esta proteína que es expresado en diferentes tejidos con una relevancia importante en las glándulas salivales (Mulenga *et al.*, 2003; Mulenga & Azad, 2005; Dai *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011; Langhansova *et al.*, 2015).

Experimentos realizados por Dai y colaboradores (2010) demostraron que un HRF recombinante de *Ixodes scapularis* fue capaz de unirse a basófilos del hospedero y estimular la liberación de Histamina. Se ha demostrado que la histamina reduce

tanto la alimentación como la secreción de saliva de las garrapatas y actúa como un mediador de la inflamación promoviendo el reclutamiento de células proinflamatorias (Langhansova *et al.*, 2015). Por lo que las garrapatas han desarrollado proteínas de unión a histamina (PUH) para neutralizar estos efectos, lo cual resulta contrastante con la presencia de un factor que provoque liberación de histamina; se piensa que las PUH y HRF tienen participación en diferentes fases de la alimentación, teniendo que los HRF's se liberan en las fases tardías (48-72 hrs) y cumple con un rol importante para la repleción (Mulenga *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2010; Langhansova *et al.*, 2015).

La forma en que actúa el HRF es después de su dimerización, a través de la unión directa con anticuerpos de tipo E para desencadenar la liberación de histamina de mastocitos y basófilos (Bommer, 2017). El aumento de la concentración de histamina probablemente modula la permeabilidad vascular para mejorar el flujo sanguíneo en la lesión de alimentación y, por lo tanto, facilita la repleción por garrapatas (Mulenga & Azad, 2005; Dai *et al.*, 2010; Langhansova *et al.*, 2015).

2.2.2 Actina (beta-Actina)

Organismos de todos los reinos de la vida dependen de filamentos de la proteína Actina la cual provee de estructura y soporte para los movimientos internos de las células (Pollard, 2016). La actina se considera una super familia de genes presentes en todas los organismos eucariontes y codifican para una gran variedad de proteínas con diferentes funciones (Herman, 1993). Dentro de la gran variedad de procesos se encuentran: motilidad celular, transporte intracelular, flujo citoplasmático y endocitosis. Existen tres isotipos principales de actina: Alpha, Beta y Gamma, lo cuales muestran más del 90% de homología de amino ácidos entre los isotipos y más del 98% de homología en miembros de grupos isotipicos particulares (da Silva *et al.*, 2005). Además, se sabe que la similitud de las isoformas está más relacionada con el tejido donde se expresan, que entre las especies (Kabsch & Vandekerckhove, 1992).

La proteína actina se puede encontrar ya sea como una molécula monomérica (G-actina), o como un polímero filamentoso (F-actina). Esta consiste en una sola cadena polipeptídica de alrededor de 375 residuos cuya secuencia de aminoácidos y propiedades bioquímicas están muy conservadas a lo largo de la evolución (Kabsch & Vandekerckhove, 1992).

Los genes de actina suelen clasificarse como musculares (alfa) o no musculares (citoesqueleto: beta y gamma), estos últimos se expresan de manera constitutiva en todas las células, lo que lo lleva a ser usado como un control interno en los estudios de expresión de genes (Kreuzer *et al.*, 1999; Horigane *et al.*, 2007). Por ejemplo, la actina citoesquelética de insectos se expresa de manera ubicua desde embriones hasta adultos (Horigane *et al.*, 2007).

El gen de *beta-actina* ha sido usado con anterioridad como un control dentro de la caracterización de genes en garrapatas (Luo *et al.*, 2020). Da Silva y colaboradores, en 2005, amplificaron un gen de actina para *R. microplus* y *Haemaphysalis longicornis*, con grados de conservación superiores al 96%, además de comprobar su expresión en diferentes fases, desde larvas hasta adultas repletas, así como de diferentes tejidos (ovarios, intestino y glándulas salivales).

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente el gen *hrf* (histamine release factor) de la garrapata *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844).

3.2 Objetivos específicos

1. Extraer ADN y ARN de garrapatas *A. mixtum*
2. Clonar y secuenciar el gen *hrf*.
3. Clonar y secuenciar un fragmento del gen *beta-actina* de *A. mixtum*.
4. Evaluar la transcripción del gen *hrf* de garrapatas *A. mixtum*.

IV. Hipótesis

La garrapata *A. mixtum* tiene un gen *hrf* el cual se transcribe.

V. Materiales y métodos

5.1 Material biológico utilizado

El material genético (ADN y ARN) utilizado para los experimentos realizados en esta tesis se obtuvo de garrapatas *Amblyomma mixtum* de una colonia mantenida en laboratorio en la Facultad de Ciencias Naturales, cuyas incubaciones se realizaron en Campus Juriquilla y las repleciones en la Nave de Infectómica Animal (NINFA) en Campus Amazcala, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). Esta colonia es mantenida por el MSPAS MVZ Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio quien facilitó varios ejemplares de esta especie.

5.2 Aprobación por el Comité de Bioética

Todos los experimentos y procedimientos realizados durante el desarrollo de la presente tesis fueron previamente revisados y aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, otorgando al proyecto el número de aprobación: 35FCN2021.

5.3 Obtención de material genético

5.3.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó por la técnica de Fenol-Cloroformo, basado en el método del fabricante de TRIzol Reagent® (Invitrogen, California, USA), el cual se describe a continuación. Las muestras de garrapatas *A. mixtum* que se trabajaron fueron:

- A. Hembras adultas sin alimentar
- B. Ninfas sin alimentar
- C. Larvas sin alimentar
- D. Ninfas repletas
- E. Larvas repletas

Protocolo

I. Lisado de la muestra

Por cada 50-100 mg de muestra se agregó 1 ml de TRIzol Reagent® y junto con nitrógeno líquido se maceraron en un mortero colocado en nieve carbónica hasta hacer polvo la muestra. Ya macerada la muestra se pasó a un microtubo de 1.5 ml para dejarla reposando en hielo por 5 min, la muestra se homogeneizó con vortex por 10 segundos y se agregaron 200 µl de Cloroformo por cada 1 ml de TRIzol usado. Se homogeneizó con vortex 15 s y se dejó reposar por 3 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó por 15 min a 12,000 g (gravidades) a 4 °C obteniendo la separación de la muestra en 3 fases, de superior a inferior: fase acuosa, interfase y fase de fenol-cloroformo. La fase acuosa se colectó con mucho cuidado para ser colocada en un nuevo microtubo estéril. Se colocó la muestra nuevamente en hielo.

II. Precipitado del ARN

Se agregó 1 volumen de Isopropanol frío por 1 volumen de muestra, se incubó por 10 min a 4 °C y se centrifugó 10 min a 12,000 g a 4 °C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante dejando únicamente el pellet que se formó al fondo del tubo y se regresó a hielo.

III. Lavado del ARN

Se resuspendió el pellet del paso anterior en 500 µl de etanol grado biología molecular al 75% a 4° C, se agitó en vortex brevemente y se centrifugo 5 min a 7,500 g a 4 °C. El siguiente pasó fue decantar la muestra con cuidado de no tirar el pellet y se repitió este paso las veces necesarias hasta que se obtuvo un pellet completamente blanco. Después de obtener ese resultado se dejó secar el pellet de 5-10 min.

IV. Solubilización del ARN

El pellet se resuspendió en 35 µl de agua grado biología molecular. Se incubó a 55 °C por 10-15 min, obteniendo con este paso final el material genético.

Se usó un NanoDrop™ 2000/2000c para, mediante espectrofotometría, cuantificar la muestra y evaluar su pureza con los valores de los ratios 260/280 y 260/230. A la par, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del material genético usando GelRed™ (GOLDBIO, St. Louis, USA) como solución tampón de carga para visualizar el producto y 100 pbs DNA Ladder (Gold Biotechnology, St. Louis, USA) como indicador de referencia de talla molecular. Se visualizó en un Fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System marca BioRad. El ARN se guardó a -70 °C hasta su uso posterior.

5.3.2 Obtención de cDNA

Para la obtención del ADN complementario (cDNA) se utilizó una retrotranscripción (RT-PCR) con el kit comercial Tetro™ cDNA Synthesis Kit (No. de catálogo BIO65043. Meridian, Ohio, USA,) siguiendo las indicaciones del fabricante que se mencionan más adelante. Antes de realizar la RT-PCR, se dio un tratamiento con DNasa a la muestra de ARN usando el kit comercial DNasa I, amplification grade (No. de catálogo 18068015. Invitrogen, California, USA), siguiendo indicaciones del fabricante que se mencionan a continuación.

5.3.2.1 Tratamiento con DNasa

Para un volumen final de 10 µl se colocó en un microtubo de 0.2 ml:

- 1 µg de ARN (1 µl)
- 1 µl de X10 DNasa I Reaction Buffer
- 1 µl de DNasa I
- Cbp 10 µl de agua grado biología molecular (7 µl)

Esto se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min y luego se le agregó 1 µl de EDTA (25 mM) para inactivar la acción de la DNasa. Se incubó por 10 min a 65

°C y pasado este tiempo se colocó inmediatamente en hielo y se dejó reposar un par de minutos.

5.3.2.2 RT-PCR

Para un volumen final de 20 µl se colocó en un microtubo de 0.2 ml por duplicado, esto con el objetivo de tener un control negativo:

- 5 µl de ARN total tratado con DNasa (10 µl)
- 0.5 µl de Iniciador Oligo dT
- 0.5 µl de Iniciador Random Hexamers
- 1 µl de X5 RT Buffer
- 1 µl de Ribosafe RNasa inhibitor
- Cbp 20 µl de agua grado biología molecular (2 µl)

Al tubo con la muestra a retrotranscribir se le agregó 1 µl de Tetro Reverse Transcriptase, dejando el tubo por duplicado sin la enzima(control negativo). Esto se incubó 10 min a 25 °C. Posterior a esto, se incubó 30 min a 45 °C y por último 5 min a 85 °C. Pasado estas incubaciones, se dejó reposar en hielo un par de minutos. Las muestras se guardaron a –20 °C hasta su uso.

5.3.3 Extracción de ADN total

Para la extracción del ADN total se usó un vial con larvas de *A. mixtum* sin alimentar, en total el vial tenía 1 gr de huevos. Del vial se separaron aproximadamente tres cuartos del total de larvas en un microtubo de polipropileno de 1.5 ml. Para facilitar el manejo se metió el vial por 5 min a 4 °C para aletargar las larvas. El método de extracción se realizó con base en el protocolo del kit comercial Dneasy® Blood & Tissue kit de la empresa Qiagen (Hilden, Alemania). El protocolo se realizó con la guía las instrucciones del fabricante, realizando algunas modificaciones para su uso con garrapatas:

- 1) Se congeló el tubo con garrapatas en nitrógeno líquido por 2-3 minutos, después se colocó en hielo y se maceró con un pistilo estéril hasta hacer polvo la mayoría de la muestra; se volvió a congelar con nitrógeno varias veces para que no bajará la temperatura.
- 2) Se agregaron 180 µl de búfer AL y se maceró nuevamente. Después se le agregaron 20 µl de Proteinasa K y se volvió a macerar.
- 3) A continuación, se le agregaron 200 µl de búfer RBC y se homogeneizó con ayuda de un vortex por 2 minutos. Se incubó a 55 °C toda la noche. Pasado este tiempo se homogeneizó la muestra por 2 min y se centrifugó a 576 g por 1 min en una microcentrífuga de alta velocidad Corning® LSE™ (modelo 6765-HS). Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo estéril con mucho cuidado de no tocar la parte sólida.
- 4) El siguiente paso fue agregar 200 µl de búfer AL, se homogeneizó y se incubó a 70 °C/ 10 min, después se agregaron 200 µl de etanol absoluto grado biología molecular y se mezcló por inversión un par de minutos. Esta muestra se pasó a una columna DNeasy spin, incluida en el kit, con ayuda de una micropipeta, y se dejó reposar por 2 min para luego centrifugar a 5,899 g/ 1 min.
- 5) Posterior a eso se pasó la columna a un tubo nuevo, se le agregaron 500 µl de Búfer AW1 y se dejó reposar por 5 min. Después se centrifugó a 5,899 g/ 1 min. Se le agregaron 500 µl de Búfer AW2 y se dejó reposar por 5 min para luego centrifugar a 5899 g/ 1 min. Se decantó y centrifugó nuevamente a 15,578 g/ 1 min para secar la columna.
- 6) Como último, se puso la membrana en un tubo nuevo y se le agregaron 50 µl de Búfer AE, se incubó a 37 °C por 5 min y se centrifugó a 5,899 g/ 1 min (se usaron 50 µl de Búfer AE para aumentar la concentración, debido a que se necesita una elevada concentración, además de que el kit n, es para sangre y otros tejidos, no para garrapatas. Misma razón por la cual se incubó a 37 °C). La columna se cambió a otro tubo y se repitió el paso. En estos tubos es en donde tenemos las muestras de ADN.

Se uso un NanoDrop™ 2000/2000c para, mediante espectrofotometría, cuantificar la muestra y evaluar su pureza con base en los radios 260/280 y 260/230. A la par, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del material genético usando GelRed™ (GOLDBIO, St. Louis, USA) como Búfer de carga para visualizar el producto, 100 pbs DNA Lader (Gold Biotechnology, St. Louis, USA) como indicador de referencia de talla molecular y se visualizó en un Fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System marca BioRad. El ADN se guardó a -20 °C.

5.4 Amplificación y clonación del gen *hrf*

5.4.1 Selección y diseño de iniciadores

Para la amplificación del gen *hrf* de *A. mixtum* se utilizaron un par de iniciadores previamente utilizados por Mulenga & Azad (2005) para amplificar el mismo gen en la garrapata *Dermacentor variabilis* y sus ortólogos en *D. andersoni*, *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma americanum*. Este método se utilizó debido a que no se cuenta con el genoma reportado en esta especie de garrapata. Los iniciadores fueron:

- Forward ATGCTGATTTTTAAGGATAAGATC
- Reverse CATTTTTCTTCATCCAGACCATG

Los iniciadores fueron sometidos a un análisis de comparación con la herramienta bioinformática Blast (Blast®) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar su similitud con otras secuencias reportadas de este gen en otras especies de garrapatas y conocer las regiones donde podrían alinearse. Tras realizado este análisis se decidió tomar como moldes las secuencias reportadas del gen en las garrapatas *A. americanum* (código de acceso DQ009481.1) y *Rhipicephalus microplus* (código de acceso KU297174.1) por tres razones, 1) son las secuencias que más similitud tienen con los iniciadores, 2) una de las especies es del mismo género de la garrapata que se trabajó, y 3) Mulenga & Azad (2005)

realizaron un análisis filogenético con una gran variedad de genes *hrf/tctp* reportados donde los de *A. americanum* y *R. microplus* son los de mayor similitud. Con estas dos secuencias se realizó una alineación junto con los iniciadores para delimitar las zonas de alineamiento y su similitud entre sí, esto con ayuda del programa bioinformático de libre acceso Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Se detectó la presencia de una base de diferencia para cada iniciador en las dos secuencias, por lo que se procedió a degenerar la base en cada iniciador para cubrir las dos posibilidades (T y C), intercambiando tanto en el iniciador sentido como en el antisentido una “T” por una “Y” (Johnson, 2010), evitando usar la degeneración en el extremo 3’ (Kwok *et al.*, 1994). Los oligonucleótidos resultantes fueron:

- Forward ATGCTGATTTTTAAGGAYAAGATC
- Reverse CATTTTYTCTTCATCCAGACCATG

Estos iniciadores resultantes se analizaron con ayuda del programa OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) de la Compañía Integrated DNA Technologies para determinar si sus características eran las óptimas y cuales podrían ser las condiciones adecuadas de termociclado para una Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) (McPherson & Møller, 2006; Chuang , Cheng, & Yang, 2013). En los cuadros 2 y 3 se resumen las características de los dos iniciadores a dos concentraciones distintas de estos: 0.10 μ M y 0.25 μ M.

Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *hrf* de *A. mixtum* a una concentración total de 0.25 μ M.

Característica	Iniciador Forward	Iniciador Reverse	Referencia (Chuang, Cheng, & Yang, 2013; McPherson & Møller, 2006)
Tamaño	24	24	20-25
Terminación 3'	ATC	ATG	C o G
Tm °C	Min Med Max	Min Med Max	50-65 °C
	58 58.9 60.2	60.9 61.2 61.8	
Ta	53-58	55.9-59.8	50-65 °C (2-5 menos Tm)
% G y C	31.2 %	39.6 %	40-60
Regiones repetidas	TT TTT	T TTT YT	Evitar > 3
Horquillas	0.38	0.36	$\Delta G \geq -3$ kcal/mol
Homodímeros	-4.85	-5.38	$\Delta G \geq -6$ kcal/mol
Heterodímeros	-6.05	-6.05	$\Delta G \geq -6$ kcal/mol

Cuadro 3. Características de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *hrf* de *A. mixtum* a una concentración total de 0.10 μ M.

Característica	Iniciador Forward			Iniciador Reverse			Referencia (Chuang, Cheng, & Yang, 2013; McPherson & Møller, 2006)
Tamaño	24			24			20-25
Terminación 3'	ATC			ATG			C o G
Tm °C	Min	Med	Max	Min	Med	Max	50-65 °C
	56.9	57.8	59.1	59.8	60.1	60.7	
Ta	51.9-57.1			54.8-58.7			50-65 °C (2-5 menos Tm)
% G y C	31.2 %			39.6 %			40-60
Regiones repetidas	TT TTT			T TTT YT			Evitar +3
Horquillas	0.38			0.36			$\Delta G \geq -3$ kcal/mol
Homodímeros	-4.85			-5.38			$\Delta G \geq -6$ kcal/mol
Heterodímeros	-6.05			-6.05			$\Delta G \geq -6$ kcal/mol

El par de iniciadores se mandó sintetizar con la empresa T4Oligo de la compañía DNA Sintético SAPI de CV (Irapuato, Guanajuato, México).

Por último, se realizó una PCR *in silico* para determinar el tamaño de amplicón que se podría esperar para *A. mixtum*. Este se realizó con las secuencias de *A. americanum* (No. Acceso KU297174.1) y *R. microplus* (No. Acceso DQ009481.1) como base en el programa GENTle (Universidad de Colonia, Alemania), obteniéndose un amplicón de 518 pbs para ambas secuencias, por lo que se esperaba un amplicón de alrededor de 500 pbs para *A. mixtum*.

5.4.2 Amplificación del gen *hrf*

Para la amplificación del gen *hrf* se llevó a cabo una PCR utilizando el cDNA proveniente de hembras adultas sin alimentar de garrapatas *A. mixtum*.

Se utilizó al gen de *beta-actina* como control positivo para la estandarización utilizando los iniciadores mencionados por Wang *et al.* (2008) para uso en *beta-actina* multiespecie. Además, se aprovechó su uso para clonar y secuenciar el fragmento amplificado; por lo que a la par de todo el proceso para el gen *hrf* se realizó lo mismo para el gen *beta-actina*. Los procesos y cantidades de reactivos para este gen se explican más adelante.

Para la reacción de PCR se utilizó un volumen final de 10 μ l por microtubo, con un total de 8 muestras, para realizar una PCR en gradiente, incluyendo un control negativo (el cual no tenía material genético) y un control positivo para *beta-actina*. La reacción contenía 5 μ l de MyTaq™ Mix (No. de catálogo BIO25042, Bioline, Luckenwalde, Alemania), 0.1 μ l de iniciador Forward e iniciador Reverse, con una concentración de 10 μ M para obtener una concentración final de 0.1 μ M, 1 μ l de cDNA y 3.8 μ l de agua grado biología molecular por muestra, estos valores se resumen en el cuadro 4. Se usó el protocolo de termociclado para la amplificación del gen *hrf* descrito en el Cuadro 5, basado en las características antes descritas de los oligonucleótidos, la concentración utilizada y con las recomendaciones descritas por McPherson & Møller (2006). Se usó un termociclador T100™ Thermal Cycler marca Bio-Rad para la realización de este. Al terminar, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% a 85 volts por 30 min usando GelRed™ (GOLDBIO, St. Louis, USA) como Búfer de carga para visualizar el producto, 100 pbs DNA Lader (Gold Biotechnology, St. Louis, USA) como indicador de referencia de talla molecular y se visualizó en un Fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System marca BioRad.

Cuadro 4. Cantidades de reactivos para usar en la reacción de amplificación del gen *hrf* de *A. mixtum*.

Reactivo	1X	8X
MyTaq™ Mix	5 µl	40 µl
Iniciador Forward 10 µM	0.1 µl	0.8 µl
Iniciador Reverse 10 µM	0.1 µl	0.8 µl
cDNA	1 µl	7 µl
H2O	3.8 µl	30.4 µl
Volumen final	10 µl	79 µl

Cuadro 5. Protocolo de termociclado para la amplificación del gen *hrf* de *A. mixtum*.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	3 min	1
Desnaturalización	94 °C	15 seg	
Alineación	55-61 °C	15 seg	35
Extensión	72 °C	17 seg	
Extensión final	72 °C	1 min	1
	12 °C	∞	1

5.4.3 Purificación del amplicón obtenido

El producto obtenido en la amplificación se sometió a una re-amplificación por PCR usando un volumen final de 50 µl por duplicado, con un control negativo de 10 µl. En el cuadro 6 se resumen las cantidades de reactivos que se usaron. El protocolo de termociclado fue exactamente el mismo que el anterior con las mismas especificaciones. La electroforesis se realizó en gel de agarosa a una concentración de 1% y se corrió a 50 volts por 50 min cargando todo el volumen obtenido en la reacción. El producto de este paso se visualizó con ayuda de un transiluminador UV marca Acurreis™ para poder cortar la banda del tamaño deseado con un bisturí

nuevo. El siguiente paso fue colocar estas bandas cortadas del gel en un tubo de 1.5 ml y pesarlas.

Cuadro 6. Cantidades de reactivos para usar en la re-amplificación del producto de PCR del gen *hrf* de *A. mixtum*

Reactivo	1X	2X
MyTaq™ Mix	27.5 µl	55 µl
Iniciador Forward 10 µM	0.55 µl	1.1 µl
Iniciador Reverse 10 µM	0.55 µl	1.1 µl
cDNA	5 µl	10 µl
H2O	26.4 µl	52.8 µl
Volumen final	60 µl	120 µl

Para la purificación se usó el kit comercial EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (No. de catálogo BS354, Bio Basic, Ontario, Canadá), siguiendo las indicaciones del fabricante descritas a continuación:

1. Se agregaron 400 µl de Binding Buffer II por cada 100 mg de peso del gel, posteriormente se incubó a 55 °C por 10 min agitando ocasionalmente hasta que se disolvió la agarosa.
2. Se vació todo el contenido del tubo en una columna EZ-10 y se dejó reposar por 2 min. Pasados estos 2 min se centrifugó a 9218 g por 2 min en una microcentrífuga de alta velocidad Corning® LSE™ modelo 6765-HS para luego descartar el filtrado del tubo.
3. Se le agregaron 750 µl de solución de lavado y se centrifugó a 9218g por 1 min para luego descartar el filtrado del tubo. Se repitió este paso una vez más y se centrifugó una vez más a 9218 g por 1 min.
4. A continuación, se pasó la columna a un tubo limpio de 1.5 ml y se le agregaron 40 µl de agua grado biología molecular. El siguiente paso fue dejar

incubar a temperatura ambiente por 2 min y posterior a eso se centrifugó a 9218 g por 2 min.

El tubo con el material genético purificado se utilizó para cuantificar el DNA por espectrofotometría con un NanoDrop™ 2000/2000c. La muestra tuvo una concentración de 24.1 ng/μl y se guardó a -20 °C hasta su posterior uso.

5.4.4 Protocolo de transformación y clonación

Para el proceso de clonación se utilizó el sistema TOPO-Cloning TA, con el vector PCR 2.1-TOPO de Invitrogen® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), la cepa *E. coli TOP10* y el kit comercial MINIPRED GE Healthcare ilustra. A continuación, se describen los pasos que se siguieron:

5.4.4.1 Ligación inserto-vector

Este paso se realizó el mismo día que se purificó el amplicón esperado. Para la ligación se utilizó una relación molar 3:1 de inserto-vector, para lo cual, lo primero fue calcular los ng necesarios de inserto con la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{Kb del inserto}}{\text{Kb del vector}} \times \text{ng del vector}$$

Donde:

Kb del inserto= 0.518

Kb del vector= 3.9 kb

ng del vector= 10 ng/μl

$$\frac{0.518}{3.9} \times 10 = 1.32$$

Este valor se multiplicó por 3, dando un total de 3.98 ng requeridos de inserto. Se tenía una alícuota del inserto a una concentración de 2.41 ng/μl y por una regla de tres se consiguieron los microlitros necesarios. Ocupando 1.65 μl de inserto.

$$\frac{3.98 \text{ ng} \times 1 \mu\text{l}}{2.41 \text{ ng}} = 1.65 \mu\text{l}$$

Siguiendo las indicaciones del proveedor del sistema TOPO-Cloning TA se usaron las cantidades para un volumen final de 6 μl descritas en el cuadro 7; estas se colocaron en un microtubo de 0.2 ml el cual se agitó levemente y se incubó a 23 °C por 30 min. Al salir se guardó a -20 °C hasta su uso.

Cuadro 7. Cantidades requeridas para ligación inserto-vector para el gen *hrf*.

Reactivo	Volumen (μl)
Producto fresco PCR	1.65
Solución de sal	1
Vector TOPO	1
Agua	2.35

5.4.4.2 Transformación y clonación

El siguiente paso fue hacer la transformación de las células competentes, para lo cual se usaron 2 viales de 50 μl de células competentes, uno para la clonación y el otro para control. Al vial de la clonación se le agregó todo el volumen de la ligación del inserto-vector y al control se le agregaron 6 μl de PUC57. Estos se dejaron incubar por 30 min en hielo y pasado este tiempo se sometió a un choque térmico a 42 °C por 30 segundos y de inmediato se regresó al hielo para dejarlo reposar por 5 min. Al vial de la clonación se le agregaron 250 μl de medio S.O.C y al control 50 μl , luego pasaron a incubación a 37 °C con agitación a 200 rpm por 1 hora. Posteriormente, las células de la clonación se sembraron en cajas Petri con Agar LB (Luria-Bertani) y ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$). Las células transformadas se agregaron a tres placas usando 25 μl para la primera, 50 μl para la segunda y 175 μl a la tercera. A la placa con el control se le agregaron 25 μl ; con ayuda de un asa

bacteriológica estéril se esparcieron de manera uniforme los volúmenes adicionados a cada agar. Una vez realizado esto, se dejaron incubar de 16 a 18 hrs a 37 °C.

5.4.4.3 PCR de colonia

Una vez terminado el tiempo de incubación se procedió a verificar si la transformación y clonación resultaron exitosas, para lo cual se seleccionaron 10 UFC, a las cuales se les realizó una PCR con el objetivo de verificar la presencia del inserto. Para cada muestra se utilizó un volumen final de 10 µl conformado por los reactivos mencionados en el cuadro 8. El ADN molde que se utilizó para esta reacción fueron las colonias seleccionadas las cuales se colectaron con ayuda de un palillo de madera estéril. Además, se utilizó un control positivo al cual se le agregó ADN previamente purificado del gel de agarosa, y un control negativo sin material genético. El protocolo de termociclado fue modificado en la desnaturalización inicial, pasando de 3 min a 5 min, para romper la membrana celular y liberar el ADN plasmídico.

Cuadro 8. Cantidades de reactivos para usar en la PCR de colonia de la clonación del gen *hrf* de *A. mixtum*.

Reactivo	1X	12X
MyTaq™ Mix	5 µl	60 µl
Iniciador Forward 10 µM	0.10 µl	1.2 µl
Iniciador Reverse 10 µM	0.10 µl	1.2 µl
Agua	4.8 µl	57.6 µl
Volumen final	10 µl	120 µl

El resultado se analizó con una electroforesis en gel de agarosa 1.5% a 50 volts por 45 min usando GelRed™ (GOLDBIO, St. Louis, USA) como búfer de carga para

visualizar el producto, HyperLader™ 1 Kbs DNA (No. catálogo bio33-025, Bioline, Meridian Bioscience, USA) como indicador de referencia de talla molecular y se visualizó en un Fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System marca BioRad.

5.4.4.4 Purificación de plásmido

Se seleccionaron 4 clonas que tuvieran presencia del amplicón esperado y se incubaron en 20 ml de medio LB (Luria-Bertani) adicionado con ampicilina (50 µg/ml) a 37°C por 16-18 hrs con agitación a 250 rpm. Una vez terminada la incubación, en microtubos de 1.5 ml estériles se vaciaron 1.5 ml de cada cultivo y se centrifugaron 16,000xg por 2 min. Se decantó la fase líquida quedando únicamente en el tubo la biomasa, este paso se repitió hasta que se centrifugó un volumen total de 5 ml por muestra. Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit comercial MINIPRED Illustra™ plasmid Mini spin Kit (No. de catálogo 28-9041-69, GE Healthcare, Chicago, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al final, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 1.5% a 50 volts por 45 min para corroborar la presencia del plásmido usando GelRed™ (GOLDBIO, St. Louis, USA) como búfer de carga para visualizar el producto, HyperLader™ 1 Kbs DNA (No. catálogo bio33-025, Bioline, Meridian Bioscience, USA) como indicador de referencia de talla molecular y se visualizó en un Fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System marca BioRad.

5.5 Secuenciación y análisis de las secuencias del gen *hrf*.

La secuenciación se realizó a través del método SANGER, para lo cual, las muestras de las clonas 3, 8 y 9 fueron enviadas a la Unidad de Servicios Genómicos LANGEBIO-CINVESTAV, campus Guanajuato (Guanajuato, Mex.). Se uso un NanoDrop™ 2000/2000c para, mediante espectrofotometría, cuantificar la muestra y evaluar su pureza con los valores de los ratios 260/280 y 260/230 para cumplir con los requerimientos que la empresa solicita. Para las tres clonas se utilizaron los iniciadores universales “T7 forward” y “M13 Reverse primer”.

La empresa regresó un archivo con un electroferograma por clona y por iniciador usado, dando dos electroferogramas por clona. Estos fueron analizados con el programa GENTle (Universidad de Colonia, Alemania) tanto en sentido con el iniciador M13 Reverse y en anti-sentido con el iniciador T7, para luego alinear las secuencias con el programa bioinformático en línea Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y revisar la similitud entre secuencias. Con el programa Seqret (https://www.ebi.ac.uk/Tools/sfc/emboss_seqret/) se obtuvo la secuencia final en formato FASTA. Se realizó un análisis de comparación con la herramienta bioinformática Blast (Blast®) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el objetivo de comprobar la similitud con secuencias ya reportadas. Además, se usaron los programas: "GENSCAN" (<http://hollywood.mit.edu/GENSCAN.html>) para identificar intrones, exones, codón de inicio, codón de paro y la secuencia de proteínas del gen, y el programa bioinformático en línea SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) para identificación de dominio de proteínas. Por último, con la secuencia de aminoácidos se realizó un análisis de comparación con otras secuencias reportadas en el Gen Bank realizando un análisis blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar la similitud con otras secuencias reportadas.

5.6 Amplificación y clonación de un fragmento del gen *actina* (*beta-actina*).

Como se mencionó anteriormente, la amplificación de un fragmento del gen *beta-actina* se utilizó como control positivo para los experimentos. Por lo tanto, se clonó y secuenció a la par del gen *hrf*. Para la amplificación, se utilizó un volumen final de 12 µl con una concentración final de iniciadores de 0.25 µM. Las cantidades de reactivos se resumen en el cuadro 9. Se usó el protocolo de termociclado del gen *hrf* (Cuadro 5) para la amplificación, ocupando la temperatura de 59 °C en el alineamiento, posterior a esto se prosiguió con la electroforesis antes mencionada.

Cuadro 9. Cantidades de reactivos para usar en la reacción de amplificación del fragmento del gen *beta-actina* de *A. mixtum*.

Reactivo	1X
MyTaq™ Mix	6 µl
Iniciador Forward 2.5 µM	1.2 µl
Iniciador Reverse 2.5 µM	1.2 µl
cDNA	1 µl
H2O	2.6 µl
Volumen final	12 µl

Este producto se sometió a una re-amplificación por PCR usando un volumen final de 60 µl por duplicado, con un control negativo de 10 µl, para su posterior purificación con el kit comercial EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (No. de catálogo BS354, Bio Basic, Ontario, Canadá). El proceso fue de la misma forma que para el gen *hrf*. Al final, se usó un NanoDrop™ 2000/2000c para determinar la concentración de la muestra, que fue de 68.13 ng/µl.

Con este resultado obtenido, se procedió con el protocolo de transformación y clonación para lo cual se sometió al mismo procedimiento utilizado y descrito para el gen *hrf* usando el sistema TOPO-Cloning TA, con el vector PCR 2.1-TOPO de Invitrogen® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), la cepa *E. coli TOP10* y el kit comercial MINIPRED GE Healthcare ilustra. Para la ligación se utilizó una relación molar 3:1 de inserto-vector, indicándonos que se ocupaban 5.38 ng de inserto, requiriendo 0.8 µl de inserto. Se siguieron las indicaciones del proveedor del sistema TOPO-Cloning TA para las cantidades de reactivos requeridos con cantidades para un volumen final de 6 µl descritas en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Cantidades requeridas para ligación inserto-vector para el fragmento del gen *beta-actina* de *A. mixtum*.

Reactivo	Volumen (μl)
Producto fresco PCR	0.8
Solución de sal	1
Vector TOPO	1
Agua	3.2

El siguiente paso fue realizar la transformación y clonación, para lo cual se utilizó el mismo protocolo antes descrito con las mismas proporciones y cantidades de reactivos utilizados para el gen *hrf*. Una vez seleccionadas las 10 colonias transformantes se realizó una PCR de colonia para comprobar la presencia del inserto de la misma manera antes mencionada. Las colonias seleccionadas fueron las 3, 8 y 9, a las cuales se les realizó un protocolo de purificación de ADN plasmídico incubando cada una en 20 ml de medio LB adicionado con ampicilina (50 μ g/ml) a 37°C por 16-18 hrs con agitación a 250 rpm, para posteriormente seguir las indicaciones del proveedor del kit comercial MINIPRED Ilustra™ plasmipred Mini spin Kit (No. de catálogo 28-9042-69, GE Healthcare, Chicago, USA), corroborando la presencia del plásmido con una electroforesis en gel de agarosa a 1.5% a 50 volts por 45 min.

5.7 Secuenciación y análisis de las secuencias del fragmento del gen *beta-actina*.

Al igual que con el gen *hrf*, se utilizó el método SANGER para la secuenciación solicitando dicho servicio con la Unidad de Servicios Genómicos LANGEBIO-CINVESTAV, campus Guanajuato (Guanajuato, Mex.) cumpliendo con los requerimientos que la empresa solicita. Para las tres clonas se utilizaron los iniciadores universales “T7 forward” y “M13 Reverse primer”.

Los electroferogramas fueron analizados con el programa GENTle (Universidad de Colonia, Alemania) para luego alinear las secuencias con el programa

bioinformático Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y revisar la similitud entre secuencias. Además del uso de los programas Seqret (https://www.ebi.ac.uk/Tools/sfc/emboss_seqret/) para obtener el formato FASTA, Blast (Blast®) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comprobar la similitud con secuencias nucleotídicas ya reportadas, “GENSCAN” (<http://hollywood.mit.edu/GENSCAN.html>) para identificar intrones, exones, codón de inicio, codón de paro y la secuencia de aminoácidos del gen. El programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) se usó para identificación de dominio de proteínas y se realizó un análisis blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar la similitud con otras secuencias de aminoácidos reportadas.

5.8 Análisis de transcripción del gen *hrf* y un fragmento del gen *beta-actina*.

Para corroborar si el gen *hrf* de *A. mixtum* se transcribe, se realizó una PCR utilizando como material genético: ADN, cDNA y ARN de larvas repletas; los iniciadores utilizados fueron los mismo usados para la amplificación previa, tanto para *hrf* como *beta-actina*. Las cantidades de reactivos que se usaron para esta reacción fueron para un volumen final de 25 µl por muestra, siendo 4 muestras por gen: la primera una amplificación en ADN, la segunda una amplificación en cDNA, la tercera un control negativo, con solo agua, y la cuarta un control con ARN sin RT-Polimerasa. Las cantidades utilizadas de cada reactivo se resumen en el Cuadro 11 y Cuadro 12. A cada muestra se le agregaron 2.5 µl del material genético correspondiente.

Cuadro 11. Cantidades de reactivos para usar en el análisis de transcripción del gen *hrf* de *A. mixtum*.

Reactivo	1X	3X
MyTaq™ Mix	12.5 µl	37.5 µl
Iniciador Forward 10 µM	0.25 µl	0.75 µl
Iniciador Reverse 10 µM	0.25 µl	0.75 µl
Agua	9.5 µl	28.5 µl
Volumen final	22.5 µl	67.5 µl

Cuadro 12. Cantidades de reactivos para usar en el análisis de transcripción del gen *beta-actina* de *A. mixtum*.

Reactivo	1X	3X
MyTaq™ Mix	12.5 µl	37.5 µl
Iniciador Forward 10 µM	1 µl	3 µl
Iniciador Reverse 10 µM	1 µl	3 µl
Agua	8 µl	24 µl
Volumen final	22.5 µl	67.5 µl

El protocolo de termociclado que se usó se describe en el cuadro 13. La temperatura de alineación utilizada fue de 59 °C tanto para el gen *hrf* como para *beta-actina*, de acuerdo con los resultados obtenidos en la amplificación previa. Se usó un termociclador T100™ Thermal Cycler marca Bio-Rad para la realización del PCR. Al terminar, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% a 50 volts por 50 min usando GelRed™ (GOLDBIO, St. Louis, USA) como búfer de carga para visualizar el producto, 100 pbs DNA Lader (Gold Biotechnology, St. Louis, USA) como indicador de referencia de talla molecular y se visualizó en un Fotodocumentador ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System marca BioRad.

Cuadro 13. Protocolo de termociclado para el análisis de transcripción de los genes *hrf* y *beta-actina* de *A. mixtum*.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	15 seg	
Alineación	59 °C	15 seg	34
Extensión	72 °C	17 seg	
Extensión final	72 °C	1 min	1
	12 °C	∞	1

VI. Resultados

6.1 Amplificación de los genes mediante PCR

6.1.1 Gen *hrf*

Mediante el uso de la PCR con un protocolo de gradiente y cDNA de larvas repletas de *A. mixtum* se consiguió un fragmento con un tamaño previsto de 518 pbs con el uso de los oligonucleótidos “*FwHRF-Mue*” y “*RvHRF-Mue*” para todas las temperaturas utilizadas, figura 7.

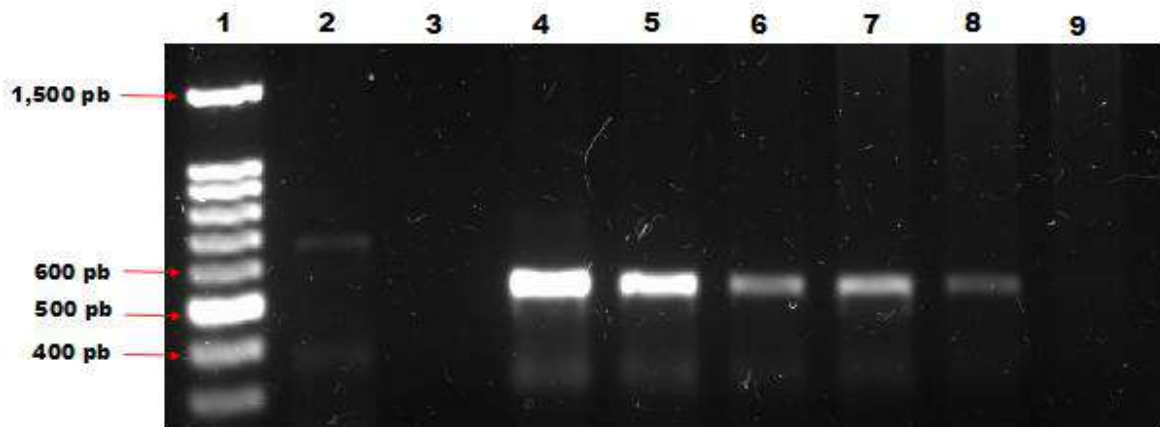


Figura 7. Amplificación del gen *hrf* de *A. mixtum* con protocolo de gradiente de temperatura de alineamiento. Los resultados se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% con Gel Red™ como agente intercalante. 1) Marcador de talla molecular 100 pbs; 2) Control positivo con iniciadores para *beta-actina*; 3) Control negativo; 4) Amplificación con una temperatura de 55 °C; 5) Amplificación con una temperatura de 55.9 °C; 6) Amplificación con una temperatura de 56.2 °C; 7) Amplificación con una temperatura de 57.3 °C; 8) Amplificación con una temperatura de 58.7 °C; 9) Amplificación con una temperatura de 60.6 °C. Las amplificaciones coinciden con el tamaño de bases esperado (518 pbs).

6.1.2 Fragmento del gen *beta-actina*.

El fragmento del gen *beta-actina* se amplificó a partir de cDNA de larva y cDNA de adulta sin repletar. Los oligonucleótidos utilizados amplificaban en PCR un

fragmento de arriba de las 700 pbs en protocolos anteriormente usados en el laboratorio. Los resultado que coincide con estos datos como se muestra en la figura

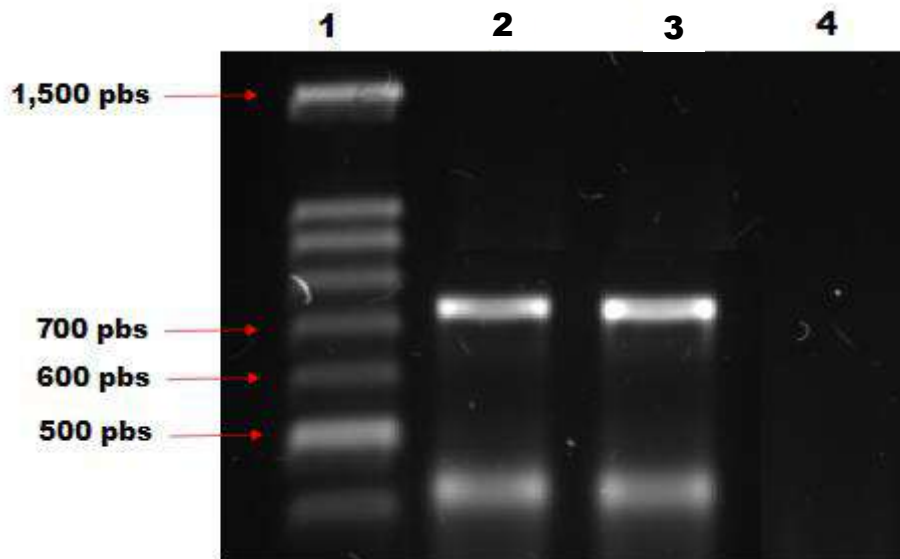


Figura 8. Amplificación del fragmento del gen *beta-actina* de *A. mixtum*. Los resultados se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% con Gel Red TM como agente intercalante. 1) Marcador de talla molecular de 100 pbs; 2) cDNA de Larva; 3) cDNA de hembras adultas sin repletar; 4) Control Negativo sin ADNc. Las amplificaciones coinciden con el tamaño de bases esperado (>700 pbs).

6.2 Transformación y clonación de los amplicones

6.2.1 Gen *hrf*

El amplicón de 518 pbs amplificado y purificado correspondiente al gen *hrf* de *A. mixtum* se ligó en un vector 2.1 PCR TOPO TA Cloning y posterior a esto se realizó la transformación y clonación en células *E. coli*. Para corroborar si fue efectivo el procedimiento y determinar la presencia del inserto en el ADN plasmídico bacteriano se realizó un PCR de colonia a 10 diferentes UFC, donde se comprobó que las 10

colonias presentaban el inserto del tamaño esperado (518 pbs) como se observa en la figura 9.

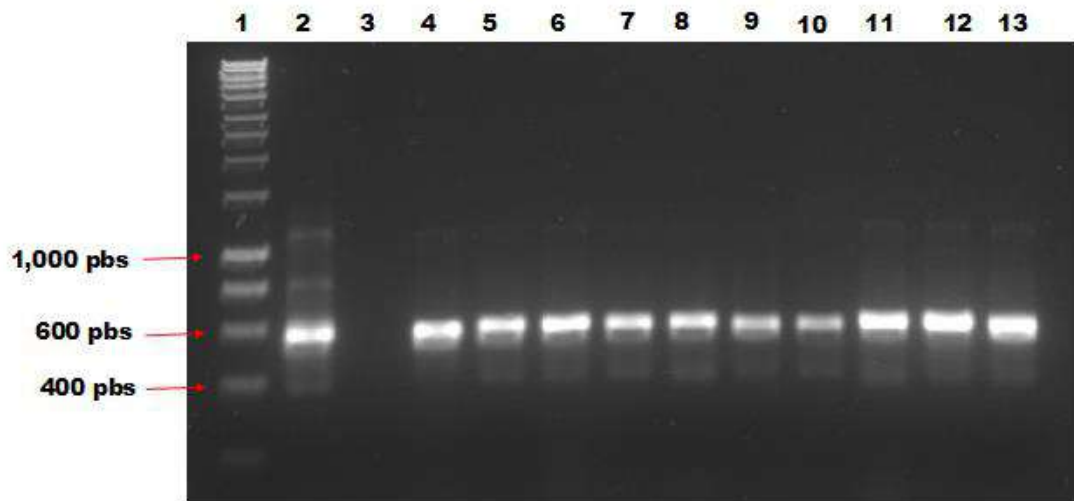


Figura 9. PCR de colonia del gen *hrf* de *A. mixtum*. Los resultados se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% con Gel Red [™] como agente intercalante; se logró seleccionar 10 colonias con el inserto esperado (518 pbs). 1) Marcador de talla molecular 1 Kb; 2) Control positivo con cDNA previamente purificado para la clonación; 3) Control negativo sin ADN; 4) Colonia 1; 5) Colonia 2; 6) Colonia 3; 7) Colonia 4; 8) Colonia 5; 9) Colonia 6; 10) Colonia 7; 11) Colonia 8; 12) Colonia 9; 13) Colonia 10.

6.2.2 Fragmento del gen *beta-actina*.

Para el fragmento del gen *beta-actina* de *A. mixtum*, el amplicón purificado se ligó de la misma manera anterior al vector 2.1 PCR TOPO TA y se realizó la transformación y clonación en células *E. coli*. Para corroborar la presencia del inserto en el ADN plasmídico bacteriano, se realizó una PCR de colonia a 10 diferentes UFC, esperando un amplicón superior a las 700 pbs. El resultado fue similar al anterior con la presencia del gen en las 10 colonias seleccionadas como se puede observar en la figura 10.

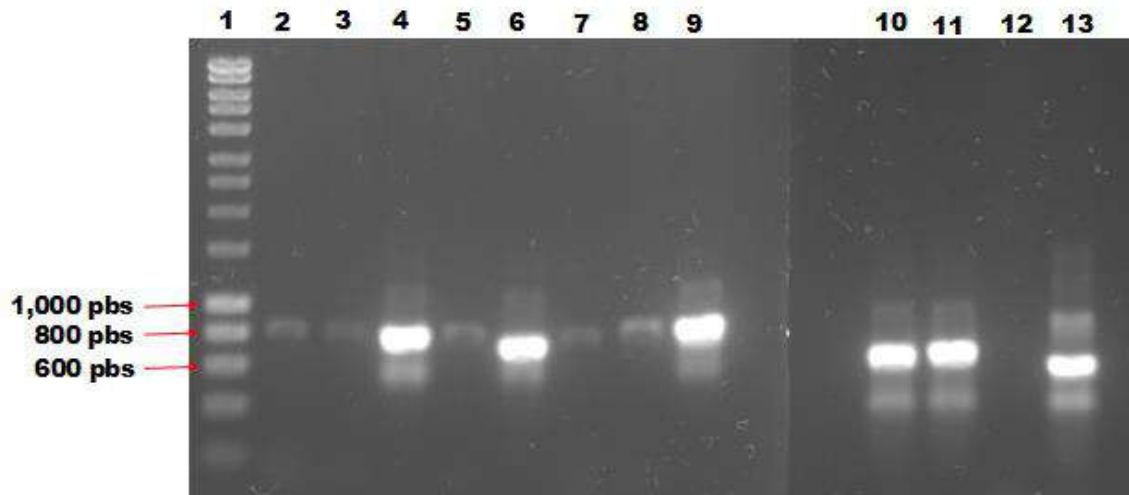


Figura 10. PCR de colonia del gen *beta-actina* de *A. mixtum*. Los resultados se visualizaron en gel de Agarosa al 1.5% con Gel Red TM como agente intercalante; se logró seleccionar 10 colonias con el inserto esperado (>700 pbs). 1) Marcador de talla molecular 1 Kb; 2) Colonia 1; 3) Colonia 2 ; 4) Colonia 3; 5) Colonia 4; 6) Colonia 5; 7) Colonia 6; 8) Colonia 7; 9) Colonia 8; 10) Colonia 9; 11) Colonia 10; 12) Control negativo; 13) Control positivo con cDNA previamente purificado para la clonación.

6.3 Secuenciación y análisis de las secuencias

Ambos genes fueron purificados de un cultivo de 3 colonias seleccionadas para cada gen y secuenciados por el método de secuenciación capilar de Sanger en una empresa particular.

6.3.1 Gen *hrf*

6.3.1.1 Alineación de secuencias analizadas

A partir de tres clonas seleccionadas con el inserto (clona 3, clona 8 y clona 9), se obtuvieron dos pares de electroferogramas para cada clona, uno correspondiente al iniciador “M13 Reverse” que es la secuencia complementaria, y el otro correspondiente al iniciador “T7” dando la secuencia en sentido, a excepción de la clona 3 donde solo se obtuvo la secuencia correspondiente al iniciador “M13”.

Después de analizar los electroferogramas y eliminar las regiones correspondientes al vector, el resultado fueron 5 secuencias de 519 pbs: Rev-Compl_C3-HRFAM-Muel_M13, Rev-Compl_C8-HRFAM-Muel_M13, C8-HRFAM-Muel_T7, Rev-Compl_C9-HRFAM-Muel_M13 y C9-HRFAM-T7. Estas secuencias se alinearon para poder compararlas (figura 11) y obtener así una secuencia consenso. La secuencia consenso resultante del alineamiento se muestra en el Anexo 1 en formato FASTA.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   ATGCTGATTTTTAAGGCAAGATCAGTGGTGATGAGATGTTCCACCGATTCCAGCAAGTAC   60
C8-HRFam-Mue1_T7              ATGCTGATTTTTAAGGCAAGATCAGTGGTGATGAGATGTTCCACCGATTCCAGCAAGTAC   60
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   ATGCTGATTTTTAAGGATAAGATCAGTGGTGATGAGATGTTCCACCGATTCCAGCAAGTAC   60
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   ATGCTGATTTTTAAGGATAAGATCAGTGGTGATGAGATGTTCCACCGATTCCAGCAAGTAC   60
C9-HRFam-Mue1_T7              ATGCTGATTTTTAAGGATAAGATCAGTGGTGATGAGATGTTCCACCGATTCCAGCAAGTAC   60
*****T*****G*****

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   AAGTTGGTGGACGACTGCATCTTCAAGTCGAATGCCAGCATGTCACTCGAAAGCAAGGA   120
C8-HRFam-Mue1_T7              AAGTTGGTGGACGACTGCATCTTCAAGTCGAATGCCAGCATGTCACTCGAAAGCAAGGA   120
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   AAGTTGGTGGACGACTGCATCTTCAAGTCGAATGCCAGCATGTCACTCGAAAGCAAGGA   120
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   AAGTTGGTGGACGACTGCATCTTCAAGTCGAATGCCAGCATGTCACTCGAAAGCAAGGA   120
C9-HRFam-Mue1_T7              AAGTTGGTGGACGACTGCATCTTCAAGTCGAATGCCAGCATGTCACTCGAAAGCAAGGA   120
*****

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   GAGATCCAGCTGGATGCTCCAATCCATCGGGCAAGAGCTTGATGAGGGCACCGACGAG   180
C8-HRFam-Mue1_T7              GAGATCCAGCTGGATGCTCCAATCCATCGGGCAAGAGCTTGATGAGGGCACCGACGAG   180
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   GAGATCCAGCTGGATGCTCCAATCCATCGGGCAAGAGCTTGATGAGGGCACCGACGAG   180
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   GAGATCCAGCTGGATGCTCCAATCCATCGGGCAAGAGCTTGATGAGGGCACCGACGAG   180
C9-HRFam-Mue1_T7              GAGATCCAGCTGGATGCTCCAATCCATCGGGCAAGAGCTTGATGAGGGCACCGACGAG   180
*****T*****G*****

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   TCTGTGGAGAGTGGTTTGGACCTAGTGC TGAACATGCGCTCTTGTGAGACGGGCTTCAGC   240
C8-HRFam-Mue1_T7              TCTGTGGAGAGTGGTTTGGACCTAGTGC TGAACATGCGCTCTTGTGAGACGGGCTTCAGC   240
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   TCTGTGGAGAGTGGTTTGGACCTAGTGC TGAACATGCGCTCTTGTGAGACGGGCTTCAGC   240
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   TCTGTGGAGAGTGGTTTGGACCTAGTGC TGAACATGCGCTCTTGTGAGACGGGCTTCAGC   240
C9-HRFam-Mue1_T7              TCTGTGGAGAGTGGTTTGGACCTAGTGC TGAACATGCGCTCTTGTGAGACGGGCTTCAGC   240
*****

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   AAGGCTGACTACAAAACTACCTCAAACTTACACAAGGCTCTTCAGGAGAAGTGAAG   300
C8-HRFam-Mue1_T7              AAGGCTGACTACAAAACTACCTCAAACTTACACAAGGCTCTTCAGGAGAAGTGAAG   300
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   AAGGCTGACTACAAAACTACCTCAAACTTACACAAGGCTCTTCAGGAGAAGTGAAG   300
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   AAGGCTGACTACAAAACTACCTCAAACTTACACAAGGCTCTTCAGGAGAAGTGAAG   300
C9-HRFam-Mue1_T7              AAGGCTGACTACAAAACTACCTCAAACTTACACAAGGCTCTTCAGGAGAAGTGAAG   300
*****A*****C*****

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   GAAGAGGGAAAGTCAGCAGAGGAGATCGAAGATGCCAAGGCCAAACTTACTGCGGCCGTC   360
C8-HRFam-Mue1_T7              GAAGAGGGAAAGTCAGCAGAGGAGATCGAAGATGCCAAGGCCAAACTTACTGCGGCCGTC   360
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   GAAGAGGGAAAGTCAGCAGAGGAGATCGAAGATGCCAAGGCCAAACTTACTGCGGCCGTC   360
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   GAAGAGGGAAAGTCAGCAGAGGAGATCGAAGATGCCAAGGCCAAACTTACTGCGGCCGTC   360
C9-HRFam-Mue1_T7              GAAGAGGGAAAGTCAGCAGAGGAGATCGAAGATGCCAAGGCCAAACTTACTGCGGCCGTC   360
*****T*****

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   AAGAAGGTGCTACCCAAGTTGGATGACTACCAAGTTTTTCTTGCCGAGTCTGCAACCCG   420
C8-HRFam-Mue1_T7              AAGAAGGTGCTACCCAAGTTGGATGACTACCAAGTTTTTCTTGCCGAGTCTGCAACCCG   420
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   AAGAAGGTGCTACCCAAGTTGGATGACTACCAAGTTTTTCTTGCCGAGTCTGCAACCCG   420
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   AAGAAGGTGCTACCCAAGTTGGATGACTACCAAGTTTTTCTTGCCGAGTCTGCAACCCG   420
C9-HRFam-Mue1_T7              AAGAAGGTGCTACCCAAGTTGGATGACTACCAAGTTTTTCTTGCCGAGTCTGCAACCCG   420
*****C*****

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   GAAGGCATTGTGGTCTCCTGGAATACCGCGAGAAGCCTGGTGGTGGCGAGACAGCTGTG   480
C8-HRFam-Mue1_T7              GAAGGCATTGTGGTCTCCTGGAATACCGCGAGAAGCCTGGTGGTGGCGAGACAGCTGTG   480
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   GAAGGCATTGTGGTCTCCTGGAATACCGCGAGAAGCCTGGTGGTGGCGAGACAGCTGTG   480
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   GAAGGCATTGTGGTCTCCTGGAATACCGCGAGAAGCCTGGTGGTGGCGAGACAGCTGTG   480
C9-HRFam-Mue1_T7              GAAGGCATTGTGGTCTCCTGGAATACCGCGAGAAGCCTGGTGGTGGCGAGACAGCTGTG   480
*****

Rev-Comp1_C8-HRFam-Mue1_M13   ATGATGTTCTTCAAGCATGGTCTGGATGAAGAAAAATG   519
C8-HRFam-Mue1_T7              ATGATGTTCTTCAAGCATGGTCTGGATGAAGAAAAATG   519
Rev-Comp1_C3-HRFam-Mue1_M13   ATGATGTTCTTCAAGCATGGTCTGGATGAAGAAAAATG   519
Rev-Comp1_C9-HRFam-Mue1_M13   ATGATGTTCTTCAAGCATGGTCTGGATGAAGAAAAATG   519
C9-HRFam-Mue1_T7              ATGATGTTCTTCAAGCATGGTCTGGATGAAGAAAAATG   519
*****T*****

```

Figura 11. Alineación de las secuencias clonadas del gen *hrf* de *A. mixtum*. Las colonias usadas fueron la 3, 8 y 9. Se encierran en rojo las bases de nucleótidos que son diferentes entre las secuencias, debajo de estas se señala la base que predomina entre las secuencias.

6.3.1.2 Análisis bioinformático de la secuencia consenso del gen de *hrf*

Dentro de los análisis bioinformáticos se realizó un blast tanto de la secuencia consenso de nucleótidos como de aminoácidos (la secuencia de 173 aminoácidos se muestra en el anexo 2), esto para comparar similitud con demás secuencias reportadas en GenBan, los resultados se resumen en el cuadro 14. Con ayuda de la herramienta bioinformática en línea GenScan se observó la ausencia de intrones, teniendo como resultado un exón. Se obtuvo el codón de inicio, pero no el codón de paro. Así mismo, la identificación de dominios funcionales de proteínas con el programa Pfam (figura 12) demostró que la secuencia de aminoácidos pertenece a la familia Pfam TCTP (Translationally Controlled Tumour Protein), sinónimo de HRF.

Cuadro 14. Análisis blast de las secuencias obtenidas de nucleótidos y aminoácidos del gen *hrf* de *A. mixtum*.

Secuencias homologas	Nucleótidos			Aminoácidos		
	identidad (%)	E-value	Cobertura (5)	Identidad (%)	E-value	Cobertura
<i>Amblyomma variegatum</i>	93.06	0.0	100	97.11	6e-119	100
<i>Dermacentor andersoni</i>	83.82	6e-135	100	91.91	2e-112	100
<i>D. silvarum</i>	83.62	3e-133	100	91.33	7e-112	100
<i>D. variabilis</i>	83.62	3e-133	100	91.91	2e-112	100
<i>Hyalomma anatolicum</i>	83.43	3e-132	100	92.49	1e-112	100
<i>H. dromedarii</i>	83.24	6e-130	100	92.49	1e-121	100
<i>A. americanum</i>	83.24	6e-130	100	91.33	5e-121	100
<i>Rhipicephalus microplus</i>	82.85	1e-126	100	97.11	6e-118	100

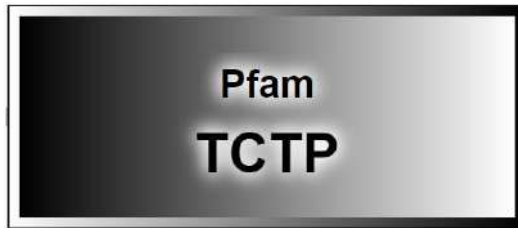


Figura 12. Análisis de dominios funcionales en la proteína HRF de *A. mixtum*.

6.3.2 Fragmento del gen *beta-actina*.

6.3.2.1 Alineación de secuencias analizadas

Para el gen de *beta-actina* se seleccionaron tres clonas con el inserto (clona 3, clona 8 y clona 9) para ser secuenciadas, teniendo como resultado dos pares de electroferogramas para cada clona, uno correspondiente al iniciador “M13 Reverse” que es la secuencia sentido, y el otro correspondiente al iniciador “T7” dando la secuencia complementaria. Después de analizar los electroferogramas y eliminar las regiones correspondientes al vector, el resultado fueron 4 secuencias de 670 pbs: ACTINA_A_mixtum-C3pM13R, ACTINA_A_mixtum-C3pT7F_RevComp, ACTINA_A_mixtum-C8pM13R, ACTINA_A_mixtum-C8pT7F_RevComp, y 4 secuencias de 669 pbs: Clona9-ACTINA1_A-mixtum_M13, Clona9-ACTINA1_A-mixtum_T7_RevComp, Clona9-ACTINA2_A-mixtum_M13 y Clona9-ACTINA2_A-mixtum_T7_RevComp, puesto que esta última clona se mandó por duplicado. Estas secuencias se alinearon primero entre clona observando que no había diferencias entre las secuencias pertenecientes a la misma clona, obteniendo una secuencia por cada clona: Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum (Parcial), Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum (parcial) y Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum (Parcial). A estas se les realizó un alineamiento para poder compararlas (figura 13) y obtener así una secuencia consenso, la cual se muestra en el anexo 3.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  GGTGTGATGGTTGGCATGGGCCAGAAGGACAGCTACGTGGGCACGAGGCCAGAGCAA  60
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  GGTGTGATGGTTGGCATGGGCCAGAAGGACAGCTACGTGGGCACGAGGCCAGAGCAA  60
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  -GGTGTGATGGTTGGCATGGGCCAGAAGGACAGCTACGTGGGCACGAGGCCAGAGCAA  59
*****
G
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  GCGTGGTATCCTCACCTGAAACACCCATTGAGCACGGCATCGTCACTCAACTGGGATGA  120
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  GCGTGGTATCCTCACCTGAAACACCCATTGAGCACGGCATCGTCACTCAACTGGGATGA  120
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  GCGTGGTATCCTCACCTGAAACACCCATTGAGCACGGCATCGTCACTCAACTGGGATGA  119
*****
G
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CATGGAGAAGATCTGGCACACACCTTCTACAACGAGCTGCGTCTGCTCCCAGGAGCA  180
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CATGGAGAAGATCTGGCACACACCTTCTACAACGAGCTGCGTCTGCTCCCAGGAGCA  180
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CATGGAGAAGATCTGGCACACACCTTCTACAACGAGCTGCGTCTGCTCCCAGGAGCA  179
*****
T
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CCCAGTGTCTCACTGAAGCCCTCTGAACCCAGGGCAACCGTGAGAAGATGACCCA  240
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CCCAGTGTCTCACTGAAGCCCTCTGAACCCAGGGCAACCGTGAGAAGATGACCCA  240
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CCCAGTGTCTCACTGAAGCCCTCTGAACCCAGGGCAACCGTGAGAAGATGACCCA  239
*****
A
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  AATCATGTTGAGACCTTCAACACGCCGCCATGTACGTGCGATCCAGGCTGTGCTCTC  300
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  AATCATGTTGAGACCTTCAACACGCCGCCATGTACGTGCGATCCAGGCTGTGCTCTC  300
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  AATCATGTTGAGACCTTCAACACGCCGCCATGTACGTGCGATCCAGGCTGTGCTCTC  299
*****
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CCTGTACGCCCTCCGGTCTACCACCGGATTGTGCTCGACTCCGGCGATGGTGTCTCCCA  360
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CCTGTACGCCCTCCGGTCTACCACCGGATTGTGCTCGACTCCGGCGATGGTGTCTCCCA  360
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CCTGTACGCCCTCCGGTCTACCACCGGATTGTGCTCGACTCCGGCGATGGTGTCTCCCA  359
*****
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CACGGTGCCCATCTACGAGGGATACGCCCTGCCCCACGCCATCTGCGTCTGGACCTTGC  420
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CACGGTGCCCATCTACGAGGGATACGCCCTGCCCCACGCCATCTGCGTCTGGACCTTGC  420
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CACGGTGCCCATCTACGAGGGATACGCCCTGCCCCACGCCATCTGCGTCTGGACCTTGC  419
*****
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CGGCCGCGACCTCACCGACTACCTCATGAAAATCCTCACCGAGAGGGGCTACTCTTTCAC  480
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CGGCCGCGACCTCACCGACTACCTCATGAAAATCCTCACCGAGAGGGGCTACTCTTTCAC  480
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CGGCCGCGACCTCACCGACTACCTCATGAAAATCCTCACCGAGAGGGGCTACTCTTTCAC  479
*****
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CACCACCTGCCGAGCGTAAATTTGTCGATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTGCCCC  540
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CACCACCTGCCGAGCGTAAATTTGTCGATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTGCCCC  540
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CACCACCTGCCGAGCGTAAATTTGTCGATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTGCCCC  539
*****
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CAGTTTCGAGCAGGAGATGGCAACCGCCCTCCTCTTCCCTGGAGAACTGTACGA  600
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CAGTTTCGAGCAGGAGATGGCAACCGCCCTCCTCTTCCCTGGAGAACTGTACGA  600
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CAGTTTCGAGCAGGAGATGGCAACCGCCCTCCTCTTCCCTGGAGAACTGTACGA  599
*****
A A T
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  GCTGCCCGACGGTCAAGGTGATCACCATTGCAACGAGCGCTTCCGTTGCCAGAGCCCT  660
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  GCTGCCCGACGGTCAAGGTGATCACCATTGCAACGAGCGCTTCCGTTGCCAGAGCCCT  660
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  GCTGCCCGACGGTCAAGGTGATCACCATTGCAACGAGCGCTTCCGTTGCCAGAGCCCT  659
*****
G
Clona3-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CTTCCAGCCA 670
Clona8-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CTTCCAGCCA 670
Clona9-ACTINA_Amblyomma-mixtum(Parcial)  CTTCCAGCCA 669
*****

```

Figura 13. Alineación de las secuencias clonadas del gen *beta-actina* de *A. mixtum*. Las colonias usadas fueron la 3, 8 y 9. Se encierran en rojo las bases de nucleótidos que son diferentes entre las secuencias, debajo de estas se señala la base que predomina entre las secuencias.

6.3.2.2 Análisis bioinformático de la secuencia consenso del gen de *beta-actina*

El análisis con la herramienta bioinformática Blast (Blast®) de la secuencia parcial del gen de *beta-actina* tanto de nucleótidos como de aminoácidos se realizó de la misma manera anterior para comparar similitud con demás secuencias reportadas en GenBank del NCBI, el cual se resume en el cuadro 15 (la secuencia parcial de 223 aminoácidos se muestra en el anexo 4). Con ayuda de la herramienta en línea GenScan observamos únicamente la ausencia de intrones en la secuencia, teniendo como resultado un solo exón, teniendo que efectivamente es un fragmento del transcrito. Usando la secuencia parcial de aminoácidos del gen para la identificación de dominio de la arquitectura de proteína con el programa Pfam se demostró que la secuencia de aminoácidos posee la estructura de las proteínas de Actina (figura 14) .

Cuadro 15. Análisis blast de las secuencias obtenidas de nucleótidos y aminoácidos del fragmento del gen *beta-actina* de *A. mixtum*.

Secuencias similares	Nucleótidos			Aminoácidos		
	identidad (%)	E-value	Cobertura (%)	Identidad (%)	E-value	Cobertura
<i>Dermacentor silvarum</i>	93.12	0.0	99	100	5e-172	100
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	93.12	0.0	99	99.55	7e-171	100
<i>D. variabilis</i>	93.12	0.0	99	100	5e-172	100
<i>H. flava</i>	92.83	0.0	99	100	5e-172	100
<i>Rhipicephalus microplus (variant X1)</i>	92.83	0.0	99	100	5e-172	100
<i>R. microplus (variant X2)</i>	92.83	0.0	99	100	5e-172	100
<i>R. appendiculatus</i>	92.83	0.0	99	100	5e-172	100
<i>Ixodes scapularis</i>	91.93	0.0	99	100	3e-164	100



Figura 14. Análisis de dominios de arquitectura del fragmento de la proteína Beta-Actina de *A. mixtum*.

6.4 Análisis de transcripción de los genes

6.4.1 Gen *hrf*

Como método de evaluación para corroborar si el gen *hrf* de *A. mixtum* se transcribe en esta especie, se realizó un análisis de retrotranscripción (RT-PCR).

El resultado mostró el amplicón esperado de alrededor de 500 pbs aproximadamente con el uso de cDNA, como se había observado con anterioridad; sin embargo, no se obtuvo ninguna amplificación con el uso de ADN genómico (figura 15), pero si presencia de amplificación con el control positivo (*beta-actina*) (figura 16). Se incluyó como control negativo de RT-PCR el ARN tratado con DNasa sin RT polimerasa.

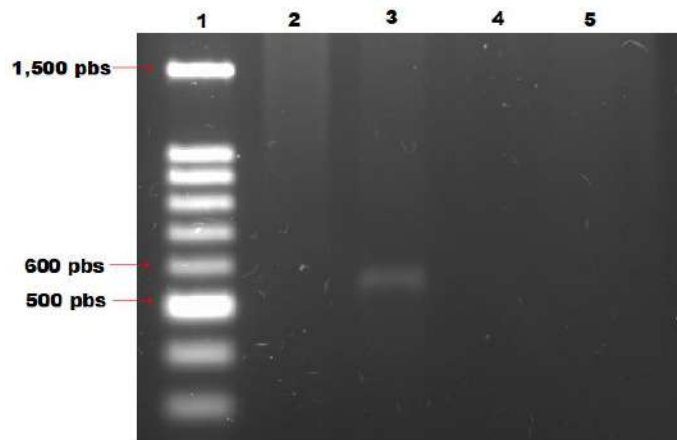


Figura 15. Resultado del análisis de transcripción del gen *hrf* de *A. mixtum*. Los resultados se visualizaron en gel de Agarosa al 1.5% con Gel Red™ como agente intercalante. 1) marcador de talla molecular 100 pbs; 2) Amplificación con ADN de *A. mixtum*; 3) Amplificación con cDNA de *A. mixtum*; 4) Control con agua libre de nucleasas; 5) Control negativo con ARN de *A. mixtum* tratado con DNasa sin RT polimerasa.

6.4.2 Fragmento del gen *beta-actina*.

El análisis de transcripción del gen parcial de *beta-actina* de *A. mixtum* se utilizó como control positivo para corroborar si el gen *hrf* se transcribe en la garrapata *A. mixtum*.

El resultado de la PCR mostró el amplicón esperado de 700 pbs aproximadamente con el uso de cDNA, como se había observado con anterioridad, así como un amplicón de mayor tamaño (800 pbs aproximadamente) con el uso de ADN genómico. Esto demuestra que el fragmento amplificado del gen de *beta-actina* se transcribe y posee al menos un intrón en su secuencia genómica. Se incluyó como control negativo de RT el ARN tratado con DNasa sin RT polimerasa. (figura 16).

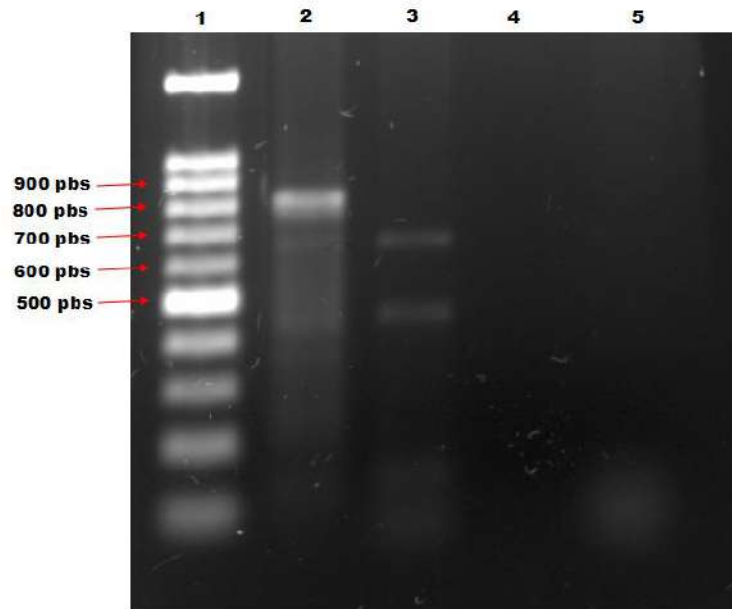


Figura 16. Resultado del análisis de transcripción del gen *beta-actina* (parcial) de *A. mixtum*. Los resultados se visualizaron en gel de Agarosa al 1.5% con Gel Red TM como agente intercalante. 1) marcador de talla molecular 100 pbs; 2) Amplificación con DNA de *A. mixtum*; 3) Amplificación con cDNA de *A. mixtum*; 4) Control con agua libre de nucleasas; 5) Control negativo con ARN de *A. mixtum* tratado con DNasa sin RT polimerasa.

VII. Discusión

Las garrapatas son consideradas uno de los factores sanitarios más importantes que limitan la ganadería en el trópico afectando el 80% de la población bovina del mundo (Polanco & Ríos, 2016). Recientemente se ha descrito que *A. mixtum* posee una gran distribución a lo largo de la república mexicana siendo está considerada una especie endémica y la segunda con importancia para la salud pública, la economía y la ganadería en México (Aguilar-Domínguez *et al.*, 2021; SENASICA, 2021).

El tratamiento intensivo con ixodicidas contra *R. microplus* ha abierto nichos ecológicos que cepas resistentes de *A. mixtum* han aprovechado para aumentar la parasitosis y establecerse como el parásito de mayor importancia (Almazán *et al.*, 2016). Esto ha generado un interés por buscar métodos de control alternativos, como vacunas contra garrapatas como una medida tanto práctica como sustentable cuya creación gira alrededor de la identificación y caracterización de candidatos vacunales (Prevot *et al.*, 2007). Algunos candidatos descritos son Bm86, Subolesina, Ferritina 2, Bm95, MSP1 y TROSPA; sin embargo, no hay vacunas disponibles contra *A. mixtum*, por lo que es necesaria una investigación para identificar antígenos candidatos que puedan ser desarrollados como vacuna (Almazan *et al.*, 2018). Debido a esto, se propuso caracterizar el gen Factor Liberador de Histamina (*hrf*) de la garrapata *A. mixtum* empleando los resultados y metodología utilizada en otros trabajos (Mulenga *et al.*, 2003; Mulenga & Azad, 2005).

Los resultados de la caracterización del gen *hrf* fueron posibles gracias a la utilización de un par de iniciadores antes descritos por Mulenga & Azad (2005) usados para caracterizar homólogos de este gen y un protocolo de degeneración de bases. Debido a que no se cuenta con el genoma reportado para *A. mixtum* se tomaron como base secuencias de este gen de *A. americanum* (código de acceso DQ009481.1) y *Rhipicephalus microplus* (código de acceso KU297174.1) por la

similitud que tienen con los iniciadores, pues una de las especies es del mismo género. Además, un análisis filogenético realizado por Mulenga & Azad (2005) demostró que los genes de *hrf* de *A. americanum* y *R. microplus* son los más emparentados. En este trabajo se logró amplificar un gen *hrf* de 519 pares de bases, el cual es mucho menor que los cDNAs completos obtenidos por Mulenga *et al.* (2003) y Mulenga & Azad, (2005), pero si concuerda con el marco de lectura abierto (ORF) que obtuvieron de estos cDNAs, aunque también difiere en 3 pbs de tamaño con el reportado por Ribeiro y colaboradores (2011) para *A. variegatum*, además de tener una diferencia de 2 pbs con las secuencias predichas de *R. microplus* (número de acceso XM_037436114.1), *R. sanguineus* (número de acceso XM_037655552.1) y *Dermacentor silvarum* (número de acceso XM_037707824.1).

Con base en el análisis bioinformático realizado de la secuencia obtenida del gen *hrf* de *A. mixtum*, se observó un alto porcentaje de identidad a nivel nucleotídico con valores desde 82.85% (para *R. microplus*) a 93.06% (para el caso de *A. variegatum*), así como un mayor porcentaje a nivel de aminoácidos, cuyos valores van desde 91.33% (para *Dermacentor silvarum* y *A. americanum*) a 97.11% (para *A. variegatum* y *R. microplus*). Esto corrobora lo mencionado por Mulenga & Azad, (2005), ya que los ortólogos de *hrf* de garrapatas poseen un alto grado de conservación entre especies. Así mismo, sus proteínas pueden generar un alto grado de inmunorreactividad cruzada (Bommer & Thiele, 2004). Comparada con la Subolesina, otro candidato vacunal presente en la saliva, que presenta un alto porcentaje de identidad tanto entre especies como entre géneros, muy similar al obtenido para el gen *hrf*, aunque es menor respecto a *A. cajennense* (80.90%), pero con un menor grado de conservación a nivel de aminoácidos entre géneros con valores que van desde el 77.72% (*R. microplus*) hasta porcentajes entre 80 y 90% como en el caso de *A. cajennense* con 81.18%. Esta aparente expresión global de los ortólogos del gen *hrf* entre garrapatas con un alto grado de conservación, sumado a la importancia de esta proteína para las fases finales de repleción de las garrapatas

(Mulenga & Azad, 2005; Dai *et al.*, 2010; Langhansova *et al.*, 2015), hace a esta familia de proteínas un antígeno ideal para el desarrollo de estrategias de control de estos parásitos (Mulenga & Azad, 2005).

La actina es considerada una super familia de genes que se presenta en todas los organismos eucariontes y codifican para una gran variedad de proteínas con diferentes funciones (Herman, 1993), como es el caso de la actina citoesqueletal de insectos que se expresa de manera ubicua desde embriones hasta adultos (Horigane *et al.*, 2007). En el caso de los resultados de amplificación del gen *beta-actina* con los oligonucleótidos mencionados por Wang y colaboradores (2008) se logró amplificar de forma parcial a un gen *beta-actina* de 670 pares de bases, el cual, con ayuda de el analisis bioinformático, se corroboró su similitud con secuencias de beta actina y homólogos reportados en otras especies y géneros de garrapatas como *Dermacentor silvarum*, *Rhipicephalus microplus*, *Ixodes scapularis*, entre otros, con identidad elevada a nivel nucleotídico (de 93.12% a 91.93%) y un 100% de identidad a nivel de aminoácidos para la mayoría de las secuencias reportadas. La expresión estable y de manera constitutiva en todas las células de las garrapatas de los genes *beta* y *gamma actina* demuestra que es un control interno adecuado para estudios de expresión génica en todas las etapas y estados de alimentación (Kreuzer *et al.*, 1999; Horigane *et al.*, 2007).

En cuanto al resultado obtenido en el analisis de transcripción, para el gen *hrf* no se logró amplificar alguna secuencia con el uso de ADN, sin embargo, si se obtuvo un amplicón de alrededor de 800 pbs para el gen de *beta-actina* (control positivo). Se carece de la secuencia génica de esta garrapata, por lo que no se sabe si dentro de su secuencia del gen *hrf* hay intrones y en que regiones podrían estar. Para el caso de las garrapatas *Dermacentor silvarum*, *R. microplus* y *R. sanguineus*, si se tiene secuenciado su genoma y en sus secuencias predichas marcan la presencia de 5 exones para *D. silvarum* y *R. microplus*, y 7 exones para *R. sanguineus*, correspondientemente. Por lo que, la secuencia genómica del gen *hrf* de *A. mixtum* probablemente posee intrones que coincidan con la posición de alguno de los

oligonucleótidos. Sin embargo, con el análisis informático realizado se puede observar que la secuencia obtenida efectivamente es un transcripto, por lo que el gen *hrf* es un gen que se transcribe.

VIII. Conclusión

La garrapata *Amblyomma mixtum* posee el gen factor liberador de histamina (*hrf*), el cual se transcribe.

Se logró por primera vez caracterizar el gen que codifica para la proteína HRF y un fragmento del gen beta-actina en esta garrapata. Así como como comprobar la expresión de ambos genes demostrando su transcripción. Además, el *hrf* posee un alto porcentaje de homología con los genes reportados en otras especies y géneros tanto a nivel nucleotídico (82.85 a 93.06%) como a nivel de aminoácidos (97.11 a 91.33%) comparado con algunos otros candidatos presentes en la saliva de las garrapatas como es el caso de Subolesina, haciéndolo un posible candidato como antígeno vacunal con posibles reacciones cruzadas para diferentes especies de garrapatas que coexisten dentro de un ecosistema como lo son *A. mixtum* y *R. microplus* gracias al alto grado de homología que presenta.

IX. Referencias

- Aguilar-Domínguez, D., Moo-Llanes, D., Sánchez, S., Becker, I., Feria, T. P., Pérez de León, A., & Romero, D. (2021). Potential distribution of *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) in climate change scenarios in the Americas. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(6), 101812. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101812>
- Aguilar-Dominguez, M., Romeo-Salas, D., Sánchez, S., Serna, R., Rosas, G., Cruz, A., & Pérez de León, A. (2021). Morphometrics of *Amblyomma mixtum* in the State of Veracruz, México. *Pathogens*, 10(5), 533. doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens10050533>
- Almazan, C., Aguilar, G., Rodriguez, S., Mosqueda, J., & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 23(8), 1535–1551. doi:<https://doi.org/10.2741/4659>
- Almazán, C., Torres-Torres, A., Torres-Rodríguez, L., Soberanes, N., & Ortiz, M. (2016). Aspectos Biológicos de *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) en el Noreste de México. *Quehacer Científico en Chiapas*, 11(2), 10-19.
- Álvarez-Hernández, G., Candia, M., Delgado, J., Acuña, N. H., Vargas, A. P., & Licona, J. D. (2016). Fiebre maculosa de las Montañas Rocosas en niños y adolescentes mexicanos: cuadro clínico y factores de mortalidad. *Salud Pública de México*, 58(3), 385-392. doi:<https://doi.org/10.21149/spm.v58i3.7908>
- Álvarez-Hernández, G., González, J. F., Hernández, N. S., Ryan, R., Barton, C., & Paddock, C. (2017). Rocky Mountain spotted fever in México: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(6), e189-e196. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1).
- Aragão, H. B., & Fonseca, F. (1953). Notas de ixodología: V - A propósito da validade de algumas espécies do género *Amblyomma* do continente

- americano (Acari: Ixodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 51, 485-492. doi:<https://doi.org/10.1590/S0074-02761953000100014>.
- Bartley, K., Nisbet, A. J., Offer, J. E., Sparks, N. H., Wright, H. W., & Huntley, J. F. (2009). Histamine release factor from *Dermanyssus gallinae* (De Geer): characterization and in vitro assessment as a protective antigen. *International journal for parasitology*, 39(4), 447–456. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.09.006>
- Beati, L., Nava, S., Burkman, E. J., Barros, D. M., Labruna, M. B., Guglielmone, A., . . . Faccini, J. L. (2013). *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 267. doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-267>
- Beck, D. L., & Orzco, J. P. (2015). Diurnal questing behavior of *Amblyomma mixtum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*, 66(4), 613–621. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-015-9928-x>
- Bommer, U. A. (2017). The Translational Controlled Tumour Protein TCTP: Biological Functions and Regulation. *Results and problems in cell differentiation.*, 64, 69–126. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-67591-6_4
- Bommer, U. A., & Thiele, B. J. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(3), 379–385. doi: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00213-9](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00213-9)
- Brown , S. J., Shapiro, S. Z., & Askenase, P. W. (1984). Characterization of tick antigens inducing host immune resistance. I. Immunization of guinea pigs with *Amblyomma americanum*-derived salivary gland extracts and identification of an important salivary gland protein antigen with guinea pig anti-tick antibody. *Journal of immunology*, 133(6), 3319–3325.
- Chuang , L., Cheng, Y., & Yang, C. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* , 35, 1541–1549. doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>

- da Silva , V., Imamura, S., Nakajima, C., Cardoso, F., Sanchez, C. A., Renard, G., . . . Onuma, M. (2005). Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Veterinary parasitology*, *127*(2), 147-155. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.002>
- Dai, J., Narasimhan , S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., & Fikrig, E. (2010). Tick Histamine Release Factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent. *PLoS Pathog*, *6*(11), e1001205. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001205>
- de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J., Kocan, J., & Willadsen, P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal health research reviews*, *8*(1), 23–28. doi:<https://doi.org/10.1017/S1466252307001193>
- Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vector: taxonomy, biology and ecology. *Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.*, *34*(1), 53-65. doi:<https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2345>
- Estrada-Peña, A., Tarragona, E. L., Vesco, U., de Meneghi, D., Mastropaolo, M., Mangold, A., . . . Nava, S. (2014). Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *Int. J. Parasitol.*, *14*(14), 1081-1089. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.007>
- Fabricius, J. C. (1787). *Mantissa insectorum. Sistens Species Nuper Detectas. Adiectis Synonymis, Observationibus, Descriptionibus, Emendationibus. Hafniae.* doi:<https://doi.org/10.5962/bhl.title.36471>
- Fernandes, É. K., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental parasitology*, *130* (3), 300–305. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.004>
- Fernandez-Ruvalcaba, M., Preciado-De-La Torre, F., Cruz-Vazquez, C., & Garcia-Vazquez , Z. (2004). Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus*

- larvae. *Experimental & applied acarology*, 32(4), 293–299. doi:<https://doi.org/10.1023/b:appa.0000023233.63268.cc>
- Fournier, P. E., & Raoult, D. (2020). Tick-Borne Spotted Fever Rickettsioses. En E. T. Ryan, & et al., *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition)* (págs. 587-593). Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00069-7>.
- Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., & Bommer, U. (1999). The growth-related, Translationally Controlled Protein P23 has properties of a Tubulin Binding Protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Sci*, 112(Pt 8), 1257–1271. doi:<https://doi.org/10.1242/jcs.112.8.1257>
- Guglielmone, A., & Nava, S. (2014). Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names-with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa*, 3767, 1–256. doi:<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3767.1.1>
- Herman, I. M. (1993). Actin isoforms. *Current opinion in cell biology*, 5(1), 48–55. doi:[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(05\)80007-9](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(05)80007-9)
- Horigane, M., Ogihara, K., Nakajima, Y., Honda, H., & Taylor, D. (2007). Identification and expression analysis of an actin gene from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Archives of insect biochemistry and physiology*, 64(4), 186–199. doi:<https://doi.org/10.1002/arch.20170>
- Illoldi, P., Rivaldi, C.-L., Sissel, B., Trout, R., Gordillo-Pérez, G., Rodríguez-Moreno, A., . . . Sarkar, S. (2012). Species distribution, models and ecological suitability analysis for potential tick vectors of Lyme Disease in México. *J Trop Med.*, 2012, 959101. doi:<https://doi.org/10.1155/2012/959101>
- Johnson, A. D. (2010). An extended IUAPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(10), 1386-1389. doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq098>
- Jongenjan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(S1), S3-S14. doi:<https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>

- Kabsch, W., & Vandekerckhove, J. (1992). Structure and function of actin. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 21, 49–76. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.21.060192.000405>
- Koch, C. L. (1844). Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken. *Archiv für Naturgeschichte.*, 10, 217-239. doi:<https://doi.org/10.5962/bhl.part.29560>
- Kohls, G. M. (1958). *Amblyomma imitator*, a new species of tick from Texas and México, and remarks on the synonymy of *A. cajennense* (Fabricius) (Acarina-Ixodidae). *J. Parasitol.*, 44(4), 430-433. doi:<https://doi.org/10.2307/3274329>
- Kotsyfakis, M., Anderson, J. M., Andersen, J. F., Calvo, E., Francischetti, I. M., Mather, T. N., . . . Ribeiro, J. M. (2008). Cutting edge: Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *Journal of immunology*, 181(8), 5209–5212. doi:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5209>
- Kreuzer, K. A., Lass, U., Landt, O., Nitsche, A., Laser, J., Ellerbrok, H., . . . Schmidt, C. A. (1999). Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of *beta-actin* transcripts as quantitative reference. *Clinical chemistry*, 45(2), 297–300. doi:<https://doi.org/10.1093/clinchem/45.2.297>
- Kwok, S., Chang, S.-Y., Sninsky, J. J., & Wang, A. (1994). A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR methods and applications*, 3(4), S39–S47. doi:<https://doi.org/10.1101/gr.3.4.s39>
- Lagunes, R., & Bautista, C. (2020). El control inmunológico: una alternativa contra garrapatas del ganado bovino. *Ecosist. Recur. Agropec.*, 7(1), e2263,. doi:<https://doi.org/10.19136/era.a7n1.2263>
- Landulfo, G. A., Luz, H. R., Sampaio, J. S., Faccini, J. L., & Barros-Battesti, D. M. (2016). Life cycle of *Amblyomma romitii* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 53(1), 48–53. doi:<https://doi.org/10.1093/jme/tjv160>
- Langhansova , H., Bopp , T., Schmitt , E., & Kopecky, J. (2015). Tick saliva increases production of three chemokines including monocyte chemoattractant protein-

- 1, a histamine-releasing cytokine. *Parasite Immunology*, 37(2), 92–96. doi:
<https://doi.org/10.1111/pim.12168>
- Levin, M. L., & Schumacher, L. B. (2016). Manual for maintenance of multi-host ixodid ticks in the laboratory. *Exp Appl Acarol.*, 70, 343–367. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-016-0084-8>
- López-Castillo, D., Vaquera-Aparicio, D., González, M. A., Martínez, R., Rodríguez, L., & Solórzano, F. (2018). Fiebre manchada de montañas rocosas: experiencia en 5 años de vigilancia activa en un hospital pediátrico de segundo nivel en el noreste de México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 75(5), 303-308. doi:<https://doi.org/10.24875/bmhim.m18000034>
- Ma, D., Lun, X., Li, C., Zhou, R., Zhao, Z., Wang, J., . . . Liu, Q. (2021). Predicting the potential global distribution of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) under near current and future climatic conditions, using the Maximum Entropy Model. *Biology*, 10, 1057. doi:<https://doi.org/10.3390/biology10101057>
- MacDonald, S. M., Rafnar, T., Langdon, J., & Lichtenstein, L. M. (1995). Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science*, 269(5224), 688–690. doi:<https://doi.org/10.1126/science.7542803>
- Mastropaolo, M., Nava, S., Guglielmone, A. A., & Mangold, A. J. (2011). Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Exp Appl Acarol*, 53, 371–375. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-010-9404-6>
- McPherson, M., & Møller, S. (2006). *PCR (second edition)*. New York, USA: Taylor & Francis.
- Mulenga, A., & Azad, A. (2005). The molecular and biological analysis of ixodic ticks histamine release factors. *Exp. Appl. Acarol.*, 37(3-4), 2015-229. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-005-3261-8>
- Mulenga, A., Macaluso, K. R., Simser, J. A., & Azad, A. F. (2003). The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, encodes a functional histamine release factor homolog. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 911–919. doi:[doi:10.1016/S0965-1748\(03\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00097-3)

- Mulenga, A., Sugimoto, C., Sako, Y., Ohashi, K., Musoke, A., Shubash, M., & Onuma, M. (1999). Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infection and immunity*, 67(4), 1652–1658. doi:<https://doi.org/10.1128/IAI.67.4.1652-1658.1999>
- Nava, S., Beati, L., Dunlop, J., & Guglielmone, A. (2014a). Reestablishment of *Amblyomma tenellum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5, 620-623. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.012>
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M. B., Cáceres, A. G., Mangold, A. J., & Guglielmone, A. A. (2014b). Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3), 252-276. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>
- Nava, S., Mangold, A. J., Simonato, G. E., Puntin, E., & Sproat, M. (2019). Guía para la identificación de las principales especies de garrapatas que parasitan a los bovinos en la provincia entre Ríos, Argentina (1ra edición ed.). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ediciones INTA.
- Neumann, L. G. (1899). Révision de la famille des Ixodidés (3e mémoire). *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 12, 205.
- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(6), 897–928. doi:<https://doi.org/10.1086/319347>
- Piña, F. T., da Silva, V., de Oliveira, L., García, M. V., Barros, J. C., Pérez de León, A. A., & Adreotti, R. (2017). Life cycle of *Amblyomma mixtum* (Acari: Ixodidae) parasitizing different hosts under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol*, 73, 257–267. doi:<https://doi.org/10.1007/s10493-017-0178-y>

- Polanco, D. E., & Ríos, L. A. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, 17(1), 81-95. doi:doi:10.21930/rcta.vol17_num1_art:463.
- Polar, P., Moore, D., Kairo, M. T., & Ramsubhag, A. (2008). Topically applied mycoacaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Exp Appl Acarol*, 46(1-4), 119-48. doi:https://doi.org/10.1007/s10493-008-9170-x
- Pollard, T. D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(8), a018226. doi:https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226
- Prevot, P. P., Couvreur, B., Denis, V., Brossard, M., Vanhamme, L., & Godfroid, E. (2007). Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*, 25(17), 3284–3292. doi:https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.008
- Quijada, T., Jiménez, M., Merchán, V., & Araque, C. (2006). Comportamiento poblacional de la garrapata *Amblyomma cajennense* F. (Acarina : Ixodidae) según época y manejo garrapaticida en fincas de bovinos de doble propósito de Las Yaguas, estado Lara, Venezuela. *Veterinaria Trop.*, 29(1-2), 7-22.
- Ribeiro, J. M., Alarcon-Chaidez, F., Francischetti, I., Mans, B. J., Mather, T. N., Valenzuela, J. G., & Wikel, S. K. (2006). An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(2), 111–129. doi:https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.11.005
- Ribeiro, J., Anderson, J. M., Manoukis, N. C., Meng, Z., & Francischetti, I. (2011). A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics*, 12, 136. doi:https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-136
- Rodríguez-Mallon, A., Encinosa, P. E., Bello, Y., Rosales, K., Montero, C., Vargas, M., & Estrada, M. P. (2020). A chemical conjugate of the tick P0 peptide is efficacious against *Amblyomma mixtum*. *Transboundary and emerging diseases*, 67 Suppl 2, 175–177. doi:https://doi.org/10.1111/tbed.13455

- Rodríguez-Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Pérez, L. C., Trinidad, I., & Bolio, M. E. (2014). Control integrado de garraptas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 295-309.
- SENASICA. (2021). Panorama nacional de Garrapata (*Boophilus* spp.): Análisis Estratégico de Riesgos. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural . Obtenido de https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/abril/PANGarrapataBoophilus24-03-21_d14af967-d0cc-4935-a6ba-dce18add7836.pdf
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2017). *Parasitología Veterinaria* (Cuarta Edición ed.). Río de Janeiro, Brasil: EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.
- Wall, R., & Shearer, V. (2001). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control* (2nd edition). Editorial Blackwell Science Ltd. doi:<https://doi.org/10.1002/9780470690505>
- Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., . . . Lai, R. (2008). Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PloS one*, 3(9), e3217. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003217>
- Wikel, S. K. (1981). The induction of host resistance to tick infestation with a salivary gland antigen. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 30(1), 284–288. doi:<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.284>
- Zannou, O. M., Ouedraogo, A. S., Biguezoton, A. S., Abatih, E., Coral-Almeida, M., Farougou, S., . . . Saegerman, C. (2021). Models for studying the distribution of ticks and tick-borne diseases in animals: a systematic review and a meta-analysis with a focus on Africa. *Pathogens*, 10, 893. doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens10070893>

X. Anexos

Anexo 1. Secuencia del gen *hrf* de *A. mixtum*

>*hrf*(histamine release factor) *Amblyomma mixtum* secuencia de nucleótidos hasta antes de codón de paro.

```
ATGCTGATTTTTAAGGATAAGATCAGTGGTGATGAGATGTTACCGATTCCAGCAAGTAC
AAGTTGGTGGACGACTGCATCTTCGAAGTCGAATGCCAGCATGTCACTCGAAAGCAAGGA
GAGATCCAGCTGGATGGTGCCAAATCCATCGGCGGAAGAGCTTGATGAGGGCACCGACGAG
TCTGTGGAGAGTGGTTTTGGACCTAGTGCTGAACATGCGTCTTGTTGAGACGGGCTTCAGC
AAGGCTGACTACAAAACTACCTCAAACTTACACAAAGGCCCTTCAGGAGAAGTGGAAAG
GAAGAGGGAAAGTCAGCAGAGGAGATCGAAGATGCCAAGGCCAAACTTACTGCGGCCGTC
AAGAAGGTGCTACCCAAGTTGGATGACTACCAGTTTTTCCTTGCGGAGTCCTGCAACGCG
GAAGGCATTGTGGGTCTCCTGGAATACCGCGAGAAGCCTGGTGGTGGCGAGACAGCTGTG
ATGATGTTCTTCAAGCATGGTCTGGATGAAGAAAAAATG
```

Anexo 2. Secuencia de aminoácidos del gen *hrf* de *A. mixtum*

>HRF(Histamine Release Factor) *Amblyomma mixtum* secuencia aminoácidos.

```
MLIFKDKISGDEMFTDSSKYKLVDDCIFEVEQCQHVTRKQGEIQLDGANPSAEELDEGTDE
SVESGLDLVLNMRLEVETGFSKADYKNYLKTYTKALQEKWKEEGKSAEEIEDAKAKLTAAG
KKVLPKLLDDYQFFLGESNAEGIVGLLEIREKPGGETAVMMFFKHGLDEEKM
```

Anexo 3. Secuencia parcial del gen *beta-actina* de *A. mixtum*

>*beta-actina* *Amblyomma mixtum* secuencia de nucleótidos parcial

```
GGGTGTGATGGTTGGCATGGGCCAGAAGGACAGCTACGTGGGCGACGAGGCCAGAGCAA
GCGTGGTATCCTCACCCCTGAAGTACCCCATTTGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGATGA
CATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGCA
CCCAGTGCTGCTCACTGAAGCCCCTCTGAACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATGACCCA
AATCATGTTCGAGACCTTCAACACGCCCGCCATGTACGTCGCGATCCAGGCTGTGCTCTC
CCTGTACGCCTCCGGTCGTACCACCGGTATTGTGCTCGACTCCGGCGATGGTGTCTCCCA
CACGGTGCCCATCTACGAGGGATACGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTTGC
CGGCCGCGACCTCACCGACTACCTCATGAAAATCCTCACCGAGAGGGGCTACTCTTTCAC
CACCCTGCCGAGCGTGAAATTGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTCGCCCT
CGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCCGCTCCTCCTCTTCCCTGGAGAAGTCGTACGA
GCTGCCCGACGGTCAGGTGATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGTTGCCAGAACCCCT
CTTCCAGCCA
```

Anexo 4. Secuencia parcial de aminoácidos del gen *beta-actina* de *A. mixtum*

GVMVGMGQKDSYVGDEAQS~~KG~~I~~L~~T~~L~~K~~Y~~P~~I~~E~~H~~G~~I~~V~~T~~N~~W~~D~~D~~M~~E~~K~~I~~W~~H~~H~~T~~F~~Y~~N~~E~~L~~R~~V~~A~~P~~E~~E~~H~~
P~~V~~L~~L~~T~~E~~A~~P~~L~~N~~P~~K~~A~~N~~R~~E~~K~~M~~T~~Q~~I~~M~~F~~E~~T~~F~~N~~T~~P~~A~~M~~Y~~V~~A~~I~~Q~~A~~V~~L~~S~~L~~Y~~A~~S~~G~~R~~T~~T~~G~~I~~V~~L~~D~~S~~G~~D~~G~~V~~S~~H~~
T~~V~~P~~I~~Y~~E~~G~~Y~~A~~L~~P~~H~~A~~I~~L~~R~~L~~D~~L~~A~~G~~R~~D~~L~~T~~D~~Y~~L~~M~~K~~I~~L~~T~~E~~R~~G~~Y~~S~~F~~T~~T~~T~~A~~E~~R~~E~~I~~V~~R~~D~~I~~K~~E~~K~~L~~C~~Y~~V~~A~~L~~
D~~F~~E~~Q~~E~~M~~A~~T~~A~~A~~S~~S~~S~~S~~L~~E~~K~~S~~Y~~E~~L~~P~~D~~G~~Q~~V~~I~~T~~I~~G~~N~~E~~R~~F~~R~~C~~P~~E~~A~~L~~F~~Q~~P