



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA VACUNA MULTIANTIGÉNICA Y
MULTIEPITÓPICA CONTRA GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus***

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ciencias Biológicas.

Presenta

M. en C. María Martina Esperanza Pérez Soria

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Querétaro, Qro. a 25 de enero de 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado En Ciencias Biológicas

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA VACUNA MULTIANTIGÉNICA Y
MULTIEPITÓPICA CONTRA GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus***

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ciencias Biológicas.

Presenta

María Martina Esperanza Pérez Soria

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Secretario

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Vocal

Dra. Raquel Cossio Bayugar
Suplente

Dra. Bertha Isabel Carbajal Gamez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre de 2019
México

El científico no busca un resultado inmediato, no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para los que vendrán, es decir, señalar el camino.

NIKOLA TESLA

DEDICATORIA

A los profesores y alumnos de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a todas las instituciones y personas que de una forma u otra participaron en la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo de los estudios de doctorado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por la beca otorgada y por todas las facilidades brindadas para lograr esta meta.

A la facultad de Ciencias Naturales en donde se adquirieron conocimientos y habilidades para lograr el presente proyecto de investigación.

Al Fondo de proyectos de proyectos especiales de rectoría (FOPER) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

A la Washington State University por permitirme realizar una estancia doctoral.

A PROCINORTE/Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture delegación Canadá por la beca recibida para la realización de la estancia en Estados Unidos.

Al honorable comité tutorial por su guía y colaboración en este proyecto, el cual está integrado por el Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón, Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú, Dra. Raquel Cossio Bayugar y Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez.

Gracias Dr. Juan Mosqueda por brindarme la oportunidad de integrarme al excelente equipo del laboratorio de investigación en inmunología y vacunas (LINVAS) para la realización de este proyecto, por el valioso apoyo, guía y amistad que siempre recibí y que hicieron posible culminar esta meta.

Al Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón por su gran apoyo, su paciencia y sus consejos para lograr esta meta.

A la Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú por su colaboración e interés en este proyecto de investigación.

A la Dra. Raquel Cossio Bayugar por su valioso apoyo con el transcriptoma de las secuencias.

A la Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez por su invaluable apoyo en la realización de este proyecto.

A Diego Josimar Hernández Silva por el invaluable apoyo brindado para la realización de este proyecto de investigación, así mismo por su grandiosa amistad.

Al Dr. Massaro W. Ueti y su hermosa familia por su importante apoyo durante mi estancia en la Universidad de Washington.

A la Dra. Hala Elsayed Hussein por su valiosa colaboración en el laboratorio de la Universidad de Washington y por su grandiosa amistad.

A Paul Lacy por su invaluable colaboración, su gran amistad y su admirable actitud de servicio, que logro que mi estancia en Estados Unidos fuera más divertida.

Al Dr. Joseph D. Busch de la Northern Arizona University por sus consejos, su interés y colaboración en la realización de este proyecto.

Al Dr. José de la Fuente, al Dr. Agustín Estrada Peña y a todos los integrantes del CYTED, por la información proporcionada.

A la Dra. Talina, Angelina Rodríguez Torres por su gran apoyo y sonrisa siempre nos da ánimo para seguir.

A Miguel Andrés Velazco Elizondo por su paciencia, su valioso apoyo y su gran amistad para la realización de este proyecto

A Beverly Ueti por su hermosa amistad y por hacer de mi estancia en Pullman una experiencia maravillosa.

A Christy Folley por la hermosa amistad y cuidados brindados durante mi estancia en Pullman.

A Eréndira Peña T. por su valioso apoyo en la realización de este proyecto y por su gran amistad.

A Edwin Esaú Hernández Arvizu por estar siempre ahí apoyando siempre cuando se requería.

A Gabriela Ramírez Silva por su apoyo incondicional y su gran amistad.

A Addis Abeba Banda Mendoza por su valioso apoyo y amistad en esta aventura.

A la Doctora Carmen Mejía por motivarme a seguir y guiarme hacia donde conducirme.

A Gabriela Serrano y América Cornejo por su interés y colaboración en el proyecto y por su amistad tan bonita.

A Antonio Ramírez Arteaga por su valioso apoyo y acompañamiento para realizar esta meta.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de inmunología y vacunas: Lorena Lara Olvera, Reyna Ortega Sánchez, Rodrigo Morales García, Aida Olguín Barrera, Alma Cárdenas Flores, Chyntia Pérez Almeida, Aldo Pavón Rocha, Mario Hidalgo Ruíz, Miguel Guzmán Rodríguez, Miguel Mercado Uriostegui, Susana Mejía López, Gilberto Reyes de Luna, Roberto Guerrero Solorio, Roxana Layseca, Elizabeth Estrella, Nadia Jiménez, Cristian Figueroa Venegas, Ismael Reynoso, Miguel Ángel González, Mauricio Medina, Andrea Lizarazo Zuluaga, Lineth J. Vega y a los que faltó mencionar, gracias mil por todo su apoyo, su afecto y los buenos momentos vividos.

Gracias infinitas a todos los integrantes de mi sistema familiar por ser y estar.

Gracias a mis padres, Margarita Soria Maya y Gerardo Florentino Pérez Vázquez (†), por todo su apoyo para realizar esta meta.

Gracias a mis hermanas, Salomé, Fátima, Cecilia, Judith y Paloma, así como a mi hermano Saúl y a mi sobrino Emiliano, quienes me inspiran y me motivan a seguir adelante.

A mis tías, tíos, primas y primos, que hacen la vida más simple y alegre.

A todas las personas que de una u otra forma han demostrado interés por este proyecto de investigación.

Gracias infinitas Universo Dios padre-madre por conspirar eternamente a mi favor.

Si tuviera la suerte de alcanzar alguno de mis ideales, sería en nombre de toda la humanidad.

NIKOLA TESLA

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
2. CAPÍTULO II	3
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	3
3. CAPÍTULO III	4
3.1 ANTECEDENTES.....	4
4. CAPÍTULO IV	18
4.1 HIPÓTESIS	18
5. CAPÍTULO V	18
5.1 OBJETIVOS	18
5.2 OBJETIVO GENERAL.....	18
5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	18
6. CAPÍTULO V	19
6.1 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ALÉLICA DE BMVDAC Y SUBOLESINA, DOS CANDIDATOS VACUNALES CONTRA <i>RHIPICEPHALUS MICROPLUS</i> EN AISLADOS DE MÉXICO	19
7. CAPÍTULO VII	35
7.1 DESARROLLO DE UNA VACUNA MULTIANTIGÉNICA, MULTIEPITÓPICA ANTI GARRAPATAS <i>R. MICROPLUS</i>	35
8. CAPITULO VIII	73
8.1 CONCLUSIONES GENERALES	73
9. CAPÍTULO IX	74
9.1 REFERENCIAS.....	74
10. CAPÍTULO X	81

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Campaña nacional para el control de garrapatas en México	5
Figura 2 Ciclo biológico de <i>R. microplus</i>	8
Figura 3 Etapas de la alimentación de la garrapata <i>R. microplus</i>	14
Figura 4 Mapa de recolección de garrapatas	38
Tabla 1 Condiciones de amplificación para PCR	41
Tabla 2 Criterios de selección para epítomos B	43
Tabla 3 Zonas geográficas de México de los aislados <i>R. microplus</i>	45
Tabla 4 Iniciadores seleccionados para cada proteína	46
Figura 5 Mapa bioinformático de la secuencia de <i>vitelogenina</i>	47
Figura 6 Alineamiento múltiple de las secuencias para <i>vitelogenina</i>	49
Tabla 5 Porcentajes de identidad y similitud para <i>vitelogenina</i>	50
Figura 7 Mapa bioinformático de la secuencia de <i>subolesina</i>	50
Figura 8 Alineamiento múltiple de las secuencias para <i>subolesina</i>	51
Tabla 6 Porcentajes de identidad y para <i>subolesina</i>	52
Tabla 7 Porcentajes de similitud para <i>subolesina</i>	52
Figura 9 Mapa bioinformático de la secuencia de <i>voraxina</i>	53
Figura 10 Alineamiento múltiple de las secuencias para <i>voraxina</i>	54
Tabla 8 Porcentajes de identidad y similitud para <i>voraxina</i>	54
Figura 11 Mapa bioinformático de la secuencia <i>bm86</i>	55

Figura 12 Mapa bioinformático de la secuencia <i>bm95</i>	56
Figura 13 Alineamiento múltiple de las secuencias para <i>bm86</i> y <i>bm95</i>	57
Tabla 9 Porcentajes de identidad y similitud para <i>bm86</i> y <i>bm95</i>	57
Figura 14 Mapa bioinformático de la secuencia <i>bmvdac</i>	58
Figura 15 Alineamiento múltiple de las secuencias para <i>bmvdac</i>	59
Tabla 10 Porcentajes de identidad y similitud para <i>bmvdac</i>	60
Figura 16 Mapa bioinformático de la secuencia <i>serpina</i>	61
Figura 17 Alineamiento múltiple de las secuencias para <i>serpina</i>	62
Tabla 11 Porcentajes de identidad y similitud para <i>serpina</i>	62
Figura 18 Mapa bioinformático de la secuencia <i>chitinasa</i>	63
Figura 19 Alineamiento múltiple de las secuencias para <i>chitinasa</i>	64
Tabla 12 Porcentajes de identidad para <i>chitinasa</i>	64
Tabla 13 Porcentajes de similitud para <i>chitinasa</i>	65
Figura 20 Mapa bioinformático de la secuencia <i>glutación-s-transferasa</i>	65
Figura 21 Alineamiento múltiple de las secuencias para <i>glutación-s-transferasa</i> ..	66
Tabla 14 Porcentajes de identidad y similitud para <i>glutación-s-transferasa</i>	67
Tabla 15 Péptidos seleccionados.....	68
Tabla 16 Ensamble de proteína quimérica	6

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es un artrópodo hematófago, considerado de los parásitos más dañinos en ganado bovino de zonas tropicales y subtropicales en México y el mundo. Se estima que parasita al 80% de bovinos a nivel mundial. La infestación por *R. microplus* afecta negativamente la productividad del ganado; transmite patógenos tales como *Babesia bovis* y *B. bigemina*, así como *Anaplasma marginale*. Las pérdidas económicas causadas, estimadas en billones de dólares en la industria ganadera, son resultado de la actividad directa en la alimentación de las garrapatas en su hospedero y del costo indirecto que ocasiona controlar tanto a las garrapatas como a las enfermedades producidas por los patógenos transmitidos. Actualmente el control está basado en el uso de acaricidas los cuales tienen eficacia limitada en la reducción de infestaciones debido a que las garrapatas han desarrollado resistencia a los acaricidas. Otros inconvenientes del uso de acaricidas incluyen la contaminación del medio ambiente, carne y leche. Esta problemática reafirma la necesidad de una estrategia alternativa para el control de la garrapata, tomando en cuenta la seguridad del medio ambiente, la salud humana y salud animal. En los años noventa aparecieron comercialmente las vacunas monoantigénicas Gavac y TickGARD, las cuales contenían el antígeno *R. microplus* Bm86. Sin embargo, los porcentajes de eficacia han sido muy variables en diferentes áreas geográficas, debido a variaciones alélicas en el gen Bm86. Por ejemplo, una diferencia del 3.4% en la secuencia de Bm86 entre las diferentes cepas puede ser suficiente para causar respuesta inmune ineficiente. El control inmunológico de las garrapatas utilizando vacunas puede mejorar sus resultados combinando dos o más antígenos. Es posible identificar antígenos conservados de intestino, glándula salival y ovario de garrapatas para desarrollar una vacuna que genere anticuerpos contra estos órganos e impida su función vital, causando su muerte. Derivado de lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar epítomos B conservados de antígenos de *R. microplus* de intestino, glándula salival y ovario para desarrollar una vacuna multiantigénica contra esta garrapata.

(Palabras clave: Garrapatas, *Rhipicephalus microplus*, vacuna, epítomos B.)

ABSTRACT

The *Rhipicephalus microplus* tick is a hematophagous arthropod, considered one of the most harmful parasites in cattle in tropical and subtropical areas in Mexico and the world. It is estimated that parasites 80% of cattle worldwide. *R. microplus* infestation negatively affects livestock productivity; It transmits pathogens such as *Babesia bovis* and *B. bigemina*, as well as *Anaplasma marginale*. The economic losses caused, estimated in billions of dollars in the livestock industry, an indirect cause of economics loss is due to diseases transmitted by ticks and tick control. Currently, control is based on the use of acaricides which have limited efficacy in reducing infestations because ticks have developed resistance to acaricides. Other drawbacks of the use of acaricides include pollution of the environment, meat and milk. This problem reaffirms the need for an alternative strategy for tick control, considering environmental safety, human health and animal health. The Gavac and TickGARD mono antigen vaccines appeared commercially in the 1990s, which contained the *R. microplus* Bm86 antigen. However, the efficacy percentages have been very variable in different geographical areas, due to allelic variations in the Bm86 gene. For example, a 3.4% difference in the sequence of Bm86 between different strains may be sufficient to cause an inefficient immune response. Immune control of ticks using vaccines can improve their results by combining two or more antigens. It is possible to identify conserved antigens of the intestine, salivary gland and ovary of ticks to develop a vaccine that generates antibodies against these organs and prevents their vital function, causing their death. Derived from the above, the objective of the present work was to identify conserved B epitopes of *R. microplus* intestine, salivary and ovarian antigens to develop a multi antigenic vaccine against this tick.

(Keywords: Ticks, *Rhipicephalus microplus*, vaccine, B-cell epitopes)

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las garrapatas ocasionan grandes pérdidas económicas en el ganado en todo el mundo, parasitan a una amplia gama de huéspedes vertebrados y transmiten una gran variedad de agentes patógenos más que cualquier otro grupo de artrópodos (Manjunathachar et al., 2014) (de la Fuente et al., 2017)

La garrapata *Rhipicephalus microplus* se alimenta de la sangre del ganado bovino, el cual es su hospedero y es considerada como uno de los parásitos más dañinos en el ganado de zonas tropicales y subtropicales. (Walker, 2009a).

La infestación por garrapata *R. microplus* afecta negativamente la productividad del ganado, transmite patógenos tales como *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* (Jonsson, 2006). Las pérdidas económicas en la industria ganadera son resultado de la actividad directa en la alimentación de las garrapatas en su hospedero y del costo que ocasiona controlar tanto a las garrapatas como a las enfermedades producidas por los patógenos que ellas transmiten (Mulenga et al., 2000).

El método tradicional para el control de garrapatas está basado en el uso de químicos acaricidas a los cuales las garrapatas han desarrollado resistencia (A. Fernández-Salas et al., 2012)(Graf et al., 2004). Tomando en cuenta la creciente preocupación por la seguridad del medio ambiente y la salud humana, se han vuelto necesarias las medidas de control alternativas (Livestock in food security, 2011)(Kumar et al., 2009). Actualmente una estrategia para el control de la garrapata es el desarrollo de la inmunidad en el hospedero al administrar antígenos de la garrapata por medio de vacunas, la cual es considerada como una alternativa rentable, amigable con el medio ambiente, es una tecnología económica y

potencialmente aplicable a una gran variedad de hospederos (De La Fuente and Kocan, 2006).

El control inmunológico de las garrapatas por medio de vacunas puede mejorar sus resultados utilizando la combinación de dos o más antígenos (Willadsen, 2008). Este enfoque ha sido avalado por los resultados de estudios experimentales en los cuales se observa mayor eficacia en las vacunas con antígenos múltiples que las que utilizaron un solo antígeno, incluyendo Bm86 (Willadsen, 2004) (Parizi et al., 2012) (Felix D. Guerrero et al., 2012). Existe un gran número de proteínas de garrapatas que han sido evaluadas como componentes para las vacunas, obteniendo diferentes porcentajes de protección (De La Fuente and Kocan, 2006)(Parizi et al., 2012) (Felix D. Guerrero et al., 2012) (Hajdusek et al., 2010) (TaHERi et al., 2014) (Parizi et al., 2009) (Tellam et al., 2002). Derivado de lo anterior, el objetivo del presente trabajo es identificar epítomos B conservados de antígenos de *Rhipicephalus microplus* de intestino, glándula salival y ovario para desarrollar y evaluar una vacuna multiantigénica y multiepitópica contra garrapatas.

CAPÍTULO II

2.1 JUSTIFICACIÓN

La garrapata *R. microplus* es responsable de pérdidas económicas estimadas en billones de dólares en la industria ganadera (Mulenga et al., 2000). El principal método de control está basado en el uso de químicos acaricidas los cuales están presentando eficacia limitada en la reducción de las infestaciones de garrapatas debido a que las garrapatas han desarrollado resistencia los acaricidas. Otros inconvenientes del uso de acaricidas incluyen la contaminación del medio ambiente, la contaminación de carne y leche (Graf et al., 2004), Por lo que es necesario el diseño de alternativas de control como es el control inmunológico, por lo cual es necesario identificar antígenos de la garrapata que generen una protección inmunológica en el ganado adecuada para ser considerados como componentes vacunales.

CAPÍTULO III

3.1 ANTECEDENTES

La garrapata *R. microplus* es un artrópodo hematófago, considerado de los parásitos más dañinos en el ganado bovino de zonas tropicales y subtropicales del mundo. Se estima que parasita al 80% de bovinos a nivel mundial (Alan S. Bowman, Patricia A. Nuttall, 2000).

La infestación por garrapata *R. microplus* afecta negativamente la productividad del ganado, transmite patógenos tales como *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* (Jonsson, 2006). Las pérdidas económicas en la industria ganadera son resultado de la actividad directa en la alimentación de las garrapatas en su hospedero y del costo que ocasiona controlar tanto a las garrapatas como a las enfermedades producidas por los patógenos que ellas transmiten (Mulenga et al., 2000).

Importancia económica

En México la garrapata *R. microplus* ocasiona pérdidas económicas en la ganadería bovina las pérdidas ocasionadas por esta garrapata son de \$ 573 millones de dólares anuales (Rodríguez-Vivas et al., 2017). De acuerdo al reporte emitido por SENASICA referente a la situación actual de la campaña para control de la garrapata (Figura 1), la superficie del territorio mexicano considerado en erradicación es de 67, 472.7676 km², es el 3.4% del territorio nacional, mientras que la superficie considerada como libre comprende 599,367.84 km², correspondiente al 30.60% del territorio nacional y el 65.96% corresponde a la superficie en control que comprende 1, 292, 407. 02 76 km² del territorio nacional (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2016).



Figura 1 Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata en México.

La ganadería en México cuenta con un estimado de 33, 779, 290 cabezas de ganado de las cuales 31, 289, 554 corresponden al ganado de carne y 2, 489, 696 al ganado lechero. México exporta a los Estados Unidos 945, 964 .00 cabezas para engorda al año, lo que equivale a \$ 281, 181, 258. 00 dólares anualmente, lo cual representa un ingreso importante para los productores nacionales (SAGARPA 2016). Sin embargo, cuando algún animal proveniente de México es detectado con garrapatas, se toman medidas que impiden el paso de los animales hacia los Estados Unidos, por lo tanto, la infestación por garrapatas se convierte en una barrera no arancelaria.

Por otro lado, el impacto económico indirecto proviene, por un lado, del costo del tratamiento para casos clínicos de las enfermedades que transmite la garrapata, los gastos en el control de las garrapatas y otros vectores, en especial acaricidas. Este impacto económico es debido además de limitaciones para emplear razas de mayor

productividad en zonas endémicas, restricciones comerciales de animales entre zonas y países, residuos de acaricidas en productos de origen animal (leche y carne), entre otros.(García-García et al., 2000)

Estrategias de control de la garrapata *R. microplus*

Durante el siglo diecinueve, el número de cabezas de ganado en el mundo empezó a incrementar para ser utilizados en la alimentación de la población humana de las naciones industrializadas, donde se dió un aumento en la conciencia de la relación entre la infestación del ganado por las garrapatas y el desastre epizootológico de la enfermedad en los hatos (Walker, 2009b). El beneficio económico de resolver la pregunta referente a la epidemiología y control de las enfermedades producidas por garrapatas en las zonas productoras de ganado como Sudáfrica, América Latina, Australia y sur de los Estados Unidos, ha motivado la investigación en los países afectados, sumando esfuerzos para la creación y comercialización de productos capaces de proporcionar protección al ganado (Vétérinaires Sans Frontières International, 2016).

Existen diferentes métodos que han sido utilizados para controlar a las garrapatas, tales como, control biológico, genético, métodos naturales y químicos, siendo este último el método más utilizado en el mundo (Graf et al., 2004), La práctica más común es la aplicación de acaricidas directamente en el hospedero, las formas comunes para su aplicación son los baños de inmersión, baños por aspersion, pour-on, spot-on, tratamientos orales e inyecciones (Graf et al., 2004).

La aplicación de los acaricidas en el ganado para el control de la garrapata es realizada utilizando diferentes métodos de acuerdo a la presentación del producto. Existen productos en polvo para ser diluidos en agua y aplicados al ganado con un aspersor o mediante baños de inmersión, productos para su aplicación inyectable, el bolo intraruminal, impregnar al bovino con acaricida más ferormonas, entre otros. La eficacia del acaricida depende del grado de toxicidad del químico, de la calidad,

de la dosis y del grado de dispersión del ingrediente activo depositado en el ganado interna o externamente, (Walker, 2009b).

Los métodos de control se basan en el conocimiento del ciclo biológico del parásito para evitar que las formas parasitarias lleguen al estado de teleógina o hembra repleta, previniendo su caída al suelo y evitando la reinfección de la pastura por las larvas. La garrapata *R. microplus* desarrolla su ciclo de vida en solo un huésped, lo que hace que tenga más posibilidades de éxito para finalizar su desarrollo. El ciclo de vida está compuesto por los estados evolutivos que son: huevo, larva, ninfa y adulto (Figura 1) (Sonenshine and Roe, 2013). En teoría, la garrapata permanece en el bovino alrededor de 21.5 días, durante este tiempo la larva inicia su alimentación hasta alcanzar la fase adulta, en donde se lleva a cabo la cópula, la garrapata hembra fecundada continua su alimentación hasta repletarse. Posteriormente la garrapata se desprende del hospedero para continuar con su ciclo biológico en el suelo, en donde se lleva a cabo la ovoposición (2,500 a 4,000 huevos), al final de esta fase la garrapata muere, la incubación y el nacimiento de las larvas cierran el ciclo biológico, el cual se realiza en aproximadamente 30 días. Desde que eclosiona el huevo hasta que la larva alcanza las condiciones óptimas o maduración transcurren alrededor de 4 a 7 días. Una vez transcurrido este tiempo, las larvas están listas fisiológicamente para trepar a los pastos en donde pueden permanecer hasta que encuentran un hospedero al cual adherirse, este tiempo puede ser de alrededor de 60 días. El desarrollo de la larva sin alimentar hasta convertirse en una hembra llena de sangre tarda alrededor de tres semanas. (Centers for Disease Control Parasites and Health, 2017). La garrapata se adhiere a la piel del hospedero por medio del hipostoma que al penetrar la piel del bovino para alimentarse de la sangre y otros fluidos ocasiona una lesión en la piel del bovino (Sonenshine and Roe, 2013), inmediatamente del primer contacto segregan un fluido llamado cemento, el cual fija a la garrapata en el sitio de la herida, con la finalidad de que la garrapata pueda alimentarse lentamente de la sangre durante

los días necesarios, dependiendo de la etapa de vida en que se encuentre. El cuerpo flexible y expandible crece hasta aproximadamente 100 a 120 veces de su tamaño original (Figura 2) por el alto consumo de sangre, que puede llegar a ser hasta de 15 ml. durante todo el ciclo (Nuttall, 1998) (Anderson and Magnarelli, 2008).



Figura 2. Ciclo biológico de la garrapata *R. microplus* (Modificado de Bayervet)

Los acaricidas químicos matan a las garrapatas pero han provocado el desarrollo de resistencia a estos en un gran número de especies de garrapatas (Manjunathachar et al., 2014). La resistencia a los acaricidas se ha generalizado en los países donde la garrapata *R. microplus* es un problema. La resistencia surge a través de los cambios genéticos en una población de garrapatas que produce modificaciones en el sitio de destino, el aumento del metabolismo, la disminución

de la capacidad del acaricida para penetrar las capas protectoras exteriores del cuerpo de la garrapata, (Felix David Guerrero et al., 2012).

La progresiva evolución de la resistencia de las garrapatas que afectan el ganado contra casi todos los acaricidas disponibles ha frustrado los esfuerzos de los productores en el manejo de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten al ganado, (Walker, 2009b) (Graf et al., 2004). A pesar de los inconvenientes que el uso de acaricidas conlleva, tales como el desarrollo de resistencia, la contaminación ambiental, la toxicidad natural y la presencia de residuos en la carne, leche, cuero y piel, los acaricidas continúan siendo la columna vertebral en el control de las garrapatas, (Lovis et al., 2013).

El uso excesivo de acaricidas ha ocasionado la aparición de resistencia a las diferentes familias de acaricidas que utilizan y debido a la velocidad con la que la resistencia aparece después de la liberación de una nueva molécula con actividad acaricida, por clase la creciente preocupación sobre la contaminación que los pesticidas producen en todas las formas de agricultura, su impacto ambiental y su presencia en los productos alimenticios y al costo elevado de las nuevas formulaciones de acaricidas (Sangster, 2001), ha llevado a buscar otras alternativas para el control de la garrapata de una forma más eficiente tanto para el medio ambiente como para la salud animal y humana (Livestock in food security, 2011).

Control inmunológico

En los años noventa aparecieron comercialmente las vacunas monoantigénicas Gavac y TickGARD, las cuales contenían el antígeno *R. microplus* Bm86. Sin embargo, los porcentajes de eficacia han sido muy variables en diferentes áreas geográficas, debido a variaciones alélicas en el gen Bm86. Por ejemplo, una diferencia del 3.4% (De La Fuente and Kocan, 2006) en la secuencia de Bm86 entre las diferentes cepas puede ser suficiente para causar respuesta inmune ineficiente (García-García et al., 1999).

En este contexto, la estrategia de desarrollar inmunidad en el hospedero al administrar antígenos de la garrapata por medio de la vacunación representa un enfoque muy prometedor ya que la aplicación de la vacuna no representa impacto para el medio ambiente y no genera contaminación residual en los productos de origen animal, las vacunas son fáciles de administrar, pueden ser producidas con costos menores a la producción de un químico, (Walker, 2009b) (Willadsen, 2004). Por otra parte, la vacunación puede dar lugar a mejoras en la calidad de vida y la productividad del animal, así como ventajas económicas (Felix D. Guerrero et al., 2012)(De La Fuente and Kocan, 2006). Por lo tanto, el control inmunológico de las garrapatas, utilizando vacunas puede mejorar sus resultados utilizando la combinación de dos o más antígenos (Willadsen, 2008). Este enfoque ha sido avalado por los resultados de estudios experimentales en los cuales se observa mayor eficacia en las vacunas con antígenos múltiples que las que utilizaron un solo antígeno, incluyendo Bm86 (Willadsen, 2004)(Parizi et al., 2012). Los anticuerpos del bovino pueden atravesar la barrera intestinal de la garrapata y ser regresados a la sangre por la saliva de la garrapata durante la alimentación como estrategia de protección de la garrapata (Felix D. Guerrero et al., 2012. Se ha reportado la presencia de inmunoglobulinas funcionales en la hemolinfa de *R. microplus* y se ha demostrado el paso de las proteínas de suero bovino incluyendo las inmunoglobulinas al hemocele de la garrapata. Se han encontrado moléculas intactas de IgG en *Ixodes ricinus* y se encontró además que aproximadamente el 2% de la concentración de las inmunoglobulinas presentes en el suero de bovino pasan al hemocele de la garrapata y que la actividad de los anticuerpos contra un antígeno de *R. microplus* en la hemolinfa de la garrapata completamente repleta, permanece durante al menos 48 horas después de completar el ciclo de vida parasitaria. La actividad de anticuerpos contra antígenos de *R. microplus* en la hemolinfa, sugiere que se podrían utilizar anticuerpos contra órganos internos y tejidos de intestino de las garrapatas, para controlar la infestación al interferir en las funciones fisiológicas.(da Silva Vaz et al., 1996). Para aumentar la eficacia del

control inmunológico se propone identificar antígenos conservados de intestino, glándula salival y ovario de las garrapatas para desarrollar una vacuna que genere anticuerpos contra todos estos órganos obstruyendo diversas funciones vitales, causando la muerte de la garrapata (Felix D. Guerrero et al., 2012)

Agbede y colaboradores, encontraron que cuando las garrapatas se alimentaron de bovinos inmunizados contra *R. microplus*, utilizando extractos derivados de las garrapatas hembras adultas; al realizar estudios histopatológicos de dichas garrapatas observó que el intestino era el sitio principal que presentaba daños. Las células digestivas fueron destruidas, dejando solo la lámina basal y la capa muscular. El daño ocasionado al intestino permitió a los leucocitos del hospedero entrar en la hemolinfa y destruir otros tejidos como células musculares, túbulos de Malpigi, las glándulas salivales no fueron afectadas. Las hembras que sobrevivieron también presentaron daños en células intestinales. En machos los resultados histopatológicos fueron similares, además se observaron daños en las glándulas accesorias del órgano reproductor. En las garrapatas del grupo control no se observaron estos efectos y no se han reportado en animales con resistencia adquirida de forma natural a la infestación por garrapatas. Lo que representa que la vacunación aparentemente estimuló un mecanismo diferente de la resistencia a las garrapatas. (Agbede and Kemp, 1986).

Existen varios estudios que desde el punto de vista teórico y práctico que apoyan el uso de vacunas para el control de garrapatas. La resistencia adquirida por el hospedero se expresa en reducción de hembras repletas, aumenta el tiempo de alimentación, disminuye la producción y la viabilidad de los huevos, inhibición de la muda y muerte de las garrapatas al alimentarse. (Parizi et al., 2009).

Diversas proteínas han sido identificadas con potencial para ser consideradas como candidatas para una vacuna anti garrapatas; de las cuales algunas han sido evaluadas en ensayos de vacunas, los resultados de estos estudios han demostrado la factibilidad de controlar las infestaciones por garrapatas, (de la

Fuente et al., 2007). Los resultados de estas investigaciones demostraron que las vacunas anti garrapatas pueden contribuir tanto al control de los patógenos transmitidos por las garrapatas por la disminución de la exposición del huésped susceptible a las garrapatas como a la reducción de la capacidad vectorial de la garrapata (Tellam et al., 2002) (Shahein et al., 2013) (Seixas et al., 2012) (Hajdusek et al., 2010) (Patarroyo et al., 2002) (Sugino et al., 2003) (Weiss and Kaufman, 2004) (Kumar et al., 2009), (Nijhof et al., 2007) (Mulenga et al., 1999) (Tsuda et al., 2001) (Imamura et al., 2006) (Aguirre et al., 2016) (Willadsen, 2004) (Radulović et al., 2014) (Mulenga et al., 2013) (Trimnell et al., 2005) (Trimnell et al., 2002) (Barrett and Stanberry, 2009) (Tirloni et al., 2014),

La alimentación de la garrapata implica tres diferentes regiones del tubo digestivo: (i) las partes de la boca, faringe y esófago para la adquisición del fluido, (ii) el intestino medio para la digestión de la sangre; y (iii) la parte saco rectal/canal anal para el almacenamiento y la eliminación de residuos (Sonenshine and Roe, 2013). Las glándulas salivales también contribuyen en el proceso de la alimentación, pero son externos al canal alimentario (Anderson and Magnarelli, 2008).

En la alimentación de la garrapata, la participación de las glándulas salivales, son vitales para la garrapata, debido a que sus secreciones son muy importantes en la lubricación de sus partes bucales, en la solubilización de la sangre para su alimentación, contienen potentes componentes que modulan la hemostasis del hospedero, la inflamación, la respuesta inmune, entre otras (Chmelař et al., 2016)

Debido a que las moléculas que contiene la saliva pueden modificar en el huésped la hemostasis, la respuesta inflamatoria, la respuesta inmune, dichas moléculas son consideradas como buenos candidatos para el desarrollo de una vacuna. Las estrategias de la vacunación con proteínas salivares de la garrapata son, por un lado, aislar el inmunosupresor salival que afecta el establecimiento del parásito e inducir la generación de anticuerpos contra este componente para neutralizar su actividad. Por el otro lado, está el utilizar las proteínas salivales que

generen una respuesta inmune fuerte que pueda matar al patógeno indirectamente. Además la combinación de estas dos estrategias pueden dar resultados (Marquardt, 2005).

Como ejemplo de proteínas secretadas por las garrapatas tenemos a la Subolesina, que es una proteína conservada evolutivamente en la garrapata *Ixodes scapularis*, que actúa como un antígeno protector de la garrapata, juega un papel importante en la digestión sanguínea, la reproducción y el desarrollo. Existe la hipótesis de que Subolesina desempeña un papel en la expresión génica y por lo tanto afecta a múltiples procesos celulares (de la Fuente et al., 2008). La inmunización con subolesina recombinante para proteger contra la infestación de garrapatas, resultó en una reducción de la supervivencia de la garrapata, en una reducción en la alimentación y en la reproducción (Almazán et al., 2003). Además, se observó que disminuyó la capacidad de las garrapatas para infectarse con *Anaplasma marginale*. En ensayos de inmunización de bovinos que posteriormente fueron desafiados con garrapatas se observó una eficacia del 40 a 60% (de la Fuente et al., 2007), por lo que Subolesina es considerado como un candidato vacunal de importancia (Almazán et al., 2010).

La digestión de casi todos los artrópodos hematófagos se produce en el lumen del intestino medio, es decir es extracelular, sin embargo, la digestión en las garrapatas es diferente. Excepto por la lisis de los eritrocitos y otras células de la sangre en el lumen del intestino medio, la digestión de las proteínas de la sangre, como la hemoglobina y otras moléculas es totalmente intracelular, se realiza dentro de las células epiteliales del intestino medio (Sonenshine and Roe, 2013) (Anderson and Magnarelli, 2008). La digestión intracelular es relativamente lenta, por lo que el proceso de la digestión de grandes volúmenes de sangre es gradual, lo que permite a la garrapata mantener grandes cantidades de la comida original que ingirió, como reserva o almacenamiento para muchas semanas, meses e incluso años en su tracto digestivo (Sonenshine and Roe, 2013) (Figura 3).

Las vacunas desarrolladas y comercializadas en los años noventa contra las infestaciones de garrapatas, son un ejemplo de proteínas secretadas en intestino, las cuales inducen protección inmunológica en el hospedero. Estas vacunas Gavac y TickGARD contienen el antígeno recombinante de *R. microplus* Bm86 de intestino (De La Fuente and Kocan, 2006). Estas vacunas diseñadas contra los antígenos intestinales (Bm86) de las garrapatas *R. microplus* inhiben su reproducción. Los anticuerpos producidos se unen al de la membrana de las células intestinales, inhiben la endocitosis e impiden que las garrapatas ingieran toda la sangre que sean capaces. En consecuencia, sus procesos digestivos se deterioran, los parásitos experimentan inanición, debilidad y pérdida de fecundidad, por lo que se desprenden finalmente del huésped. (Anderson and Magnarelli, 2008).

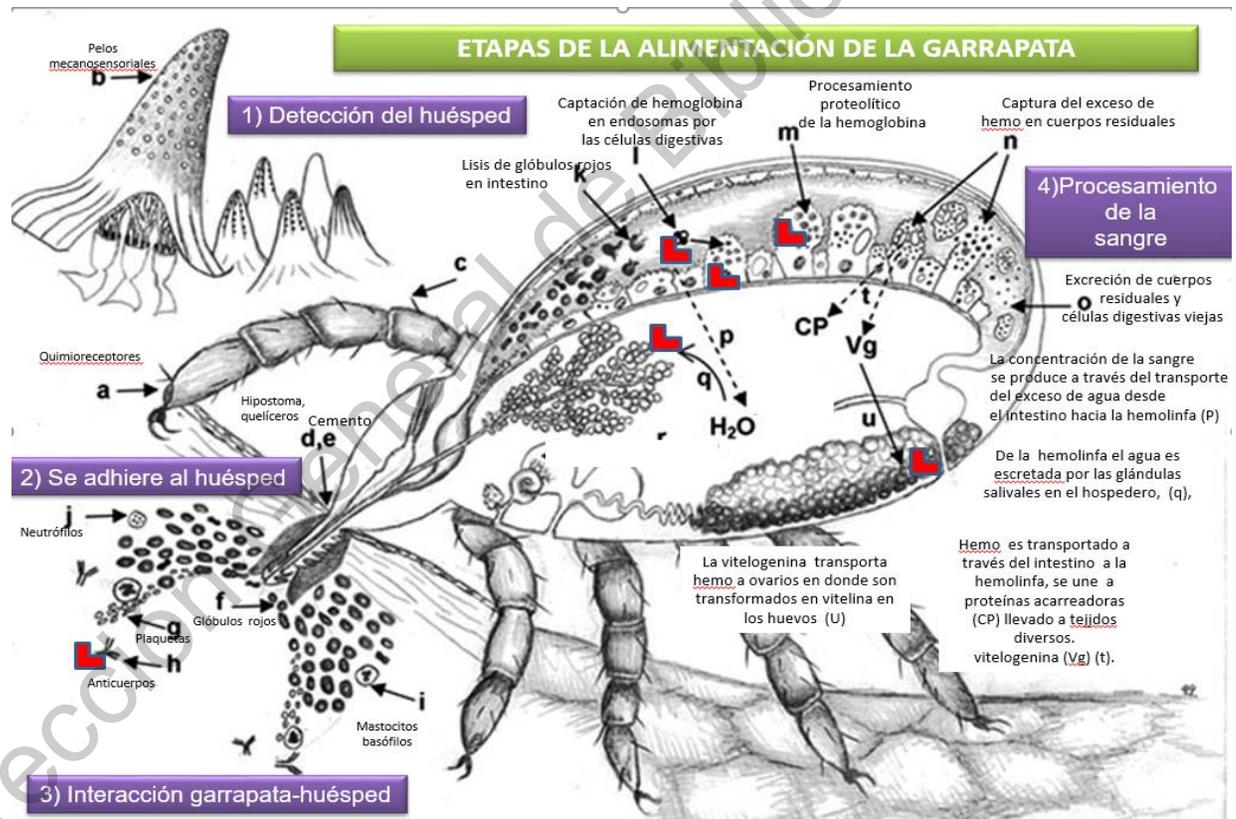


Figura 3. Etapas de la alimentación de la garrapata. (Modificado de William Marquardt. 2004).

BmVDAC es una porina mitocondrial que interviene en la regulación de la apoptosis en células infectadas. La función de BmVDAC es importante durante la invasión de *B. bigemina*. Los mecanismos moleculares implicados durante la infección de las células del intestino medio son de gran relevancia y actualmente desconocidos. La inmunización con BmVDAC mostró que había una importante expresión diferencial y una redistribución de la proteína BmVDAC entre las células del intestino medio de las garrapatas infectadas y no infectadas, lo que fue más evidente 24 horas después de la repleción de las garrapatas infectadas. La utilización de esta proteína como candidato vacunal contra la garrapata y para el bloqueo de la transmisión del patógeno, podría resultar una buena estrategia (Rodríguez-Hernández et al., 2015).

Experimentos dirigidos para la inmunización de bovinos con proteínas han sido apoyados con la demostración de que los anticuerpos funcionales son encontrados en la hemolinfa de la garrapata cuando la garrapata toma la sangre de un bovino inmunizado (da Silva Vaz et al., 1996). Este hallazgo abrió el camino para la utilización de proteínas de otros órganos de las garrapatas como blancos para vacunas y no solo de las proteínas del tracto digestivo (Parizi et al., 2009).

Lewis B. y colaboradores, demostraron que la Vitelogenina de la garrapata es sintetizada tanto en intestino medio como en la grasa corporal para después ser liberada en la hemolinfa y transportada al ovario en donde se integra a los oocitos y durante la vitelogénesis se convierte en vitelina. (Coons et al., 1982).

Estudios realizados respecto a la síntesis de la Vitelogenina sugieren un origen en el ovocito y un origen extra ovárico, en el cuerpo graso de la garrapata el cual consiste en ramificaciones de células unidas al sistema traqueal y órganos internos (Taheri et al., 2014).

Las células digestivas absorben el contenido de la sangre, la velocidad de la digestión se reduce durante el periodo de succión sanguínea rápida y es en este

momento cuando se forman las células productoras de vitelogenina, aunque la mayoría de la Vitelogenina (Vg1 y Vg2) se produce en el cuerpo graso, el intestino medio es el sitio de síntesis secundario de la Vitelogenina y se expresa después del apareamiento. La Vitelogenina es la única proteína que pueden unirse y transportar hemo (Marquardt, 2005)

En resultados obtenidos por Tellam y colaboradores, se observó la reducción de ovoposición de *R. microplus* al alimentarse de ovejas vacunadas con vitelina (Tellam et al., 2002), resultados similares se obtuvieron en *ornithodoros moubata* al alimentarse de la sangre de conejos inmunizados con vitelina, por lo que es considerado como un potencial candidato para el desarrollo de una estrategia antigarrapatas (Taheri et al., 2014).

Comercialmente las vacunas Gavac y TickGARD (Kaewmongkol et al., 2015), están basadas en la forma recombinante del antígeno oculto Bm86 de intestino en *R. microplus* (García-García et al., 1998). Sin embargo su eficacia varía de acuerdo a las cepas existentes en las diferentes zonas geográficas (de la Fuente et al., 2007), lo cual puede ser debido a variaciones alélicas en el gen *bm86* (De La Fuente and Kocan, 2006). Se considera que una diferencia del 3.4% en la secuencia de Bm86 entre las diferentes cepas es suficiente para causar una respuesta inmune ineficiente (García-García et al., 1999).

La estrategia de desarrollar inmunidad en el hospedero al administrar antígenos de la garrapata por medio de la vacunación representa un enfoque muy prometedor ya que la aplicación de la vacuna no representa impacto para el medio ambiente y no genera contaminación residual en los productos de origen animal, las vacunas son fáciles de administrar y pueden ser producidas con costos menores a la producción de un químico, (Willadsen, 2004). Por otra parte, la vacunación puede dar lugar a mejoras en la calidad de vida y la productividad del animal, así como ventajas económicas (Felix D. Guerrero et al., 2012)(De La Fuente and Kocan, 2006).

Aunque el número de candidatos vacunales ha aumentado rápidamente en los últimos años, existe poca información sobre su evaluación en los ensayos de vacunación. Existen antígenos que muestran efectos significativos, pero pocos son eficaces por sí mismos. Esto sugiere que las vacunas multiantígeno pueden ser una buena estrategia para el control de la garrapata (Schetters et al., 2016)

Las estrategias para el control de la garrapata continúan implementándose, renovándose e innovándose con la aplicación de la tecnología disponible para moderar el impacto adverso de las garrapatas y las enfermedades que transmiten en el ganado para carne y en el ganado lechero (Abbas et al., 2014).

Todos los esfuerzos dirigidos a implementar, extender y consolidar alternativas agroecológicas para el manejo de las garrapatas, son una apuesta contundente para disminuir costos, no solo en la industria ganadera sino en la salud pública, para aumentar la calidad de la salud humana y ambiental, bajo el principio de una sola salud. (Marisela Suarez et al. 2016).

CAPÍTULO IV

4.1 HIPÓTESIS

Una vacuna contra *R. microplus* debe incluir epítomos B conservados de antígenos presentes en el intestino, los ovarios y las glándulas salivales

CAPÍTULO V

5.1 OBJETIVOS

5.2 Objetivo General:

Desarrollar una vacuna multiantigénica y multiepitópica contra garrapatas *Rhipicephalus microplus*.

5.3 Objetivos Específicos:

- 1) Identificar y seleccionar antígenos presentes en el intestino, los ovarios y las glándulas salivales con potencial de protección.
- 2) Identificar cuatro péptidos con epítomos conservados de cada antígeno.
- 3) Determinar la variabilidad antigénica de las secuencias de los genes de los diferentes aislados.
 - a) Diseñar una vacuna multiantigénica y multiepitópica a base de los epítomos B identificados.

CAPITULO VI

Análisis de la variabilidad alélica de BmVDAC y Subolesina, dos candidatos vacunales contra *Rhipicephalus microplus* en aislados de México **Analysis of the allelic variability of BmVDAC and Subolesin, two vaccine candidates against *Rhipicephalus microplus* in isolates from Mexico**

María Martina Esperanza Pérez Soria¹, Diego Josimar Hernández Silva¹ y Juan Mosqueda¹

Palabras clave: garrapatas; *Rhipicephalus microplus*; antígenos; variabilidad antigénica; vacuna
Keywords: ticks; *Rhipicephalus microplus*; antigen; antigenic variability; vaccine

Recibido en: 29-04-2019 / Aceptado en: 05-07-2019

Resumen

Introducción: Las garrapatas *Rhipicephalus microplus* son ectoparásitos hematófagos que impactan económicamente la ganadería a nivel mundial. Los acaricidas han sido una estrategia de control efectiva pero que generan la resistencia a estos químicos y la contaminación del medio ambiente. Una alternativa para contrarrestar los daños adversos de los químicos es la utilización de vacunas, las cuales presentan eficacia variable, debido posiblemente a la diferencia en la secuencia de aminoácidos entre los antígenos de las garrapatas de diferentes zonas geográficas. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar la variabilidad de dos antígenos vacunales: BmVDAC (Voltage Dependent Anion Channel) y Subolesina de *R. microplus* en aislados provenientes de diferentes estados de México.

Método: Dos proteínas se seleccionaron con base a su eficacia como antígenos protectores: BmVDAC y Subolesina. Se colectaron garrapata *R. microplus* de distintos estados de México. Se realizaron extracciones ADN y ARN para la amplificación de *bmvdac* y subolesina respectivamente. Se obtuvieron las secuencias predichas de aminoácidos. Se hizo un análisis BLAST para confirmar la identidad entre las secuencias y alinearlas con el programa Clustal Omega para determinar el grado de similitud. Finalmente, se realizó un análisis con el programa MEGAX64 para determinar la relación filogenética de cada aislado.

Resultados: Para BmVDAC, se observó un porcentaje promedio de identidad y similitud del 99.79% entre las diferentes secuencias de aminoácidos. En aislados de Chiapas, Nayarit, Media Joya, Querétaro, Tamaulipas y Guerrero se observó un porcentaje de identidad y similitud del 99.87%. Jalisco, Tabasco y Sinaloa presentaron el 99.56% en identidad y similitud. En promedio se observa un porcentaje de variabilidad de 0.21%.

¹ Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales. Querétaro, Querétaro. E-mail: joel.mosqueda@uaq.mx
© Universidad De La Salle Bajío (México)

En el alineamiento de Subolesina con aislados de Yucatán, Nayarit, Querétaro, Chiapas, Sinaloa, Veracruz y Tamaulipas, y la cepa Munoz, se observó un porcentaje promedio de identidad del 99.87% y similitud del 100% entre las secuencias de aminoácidos. De las ocho secuencias, siete presentaron porcentaje de identidad del 99.91%, mientras que para Nayarit el porcentaje fue de 99.39%. La variabilidad promedio fue del 0.13%. Los análisis filogenéticos no mostraron diferencias significativas entre las secuencias utilizando el método UPGMA. El porcentaje promedio obtenido del método Bootstrap de 10000 réplicas para los árboles filogenéticos de *bmvdac* y *subolesina* fue de más del 50%.

Discusión o Conclusión: Este reporte representa la primera investigación respecto al grado de conservación entre aislados de *R. microplus* de diferentes estados en México para BmVDAC y Subolesina, dos candidatos vacunales contra esta garrapata. Considerando la variabilidad presentada entre las secuencias de los diferentes aislados de *R. microplus*, se puede concluir que BmVDAC y Subolesina son antígenos que se encuentran conservados, por lo que pueden considerarse como candidatos vacunales. Esta información es relevante para la selección de antígenos empleados en vacunas anti-garrapatas *R. microplus* en México.

Abstract

Introduction: *Rhipicephalus microplus* ticks are hematophagous ectoparasites that economically impact livestock industry worldwide. Acaricides have been an effective control strategy, but generate resistance to chemical compounds and environmental pollution. An alternative to counteract the chemical adverse effects is the vaccination usage, which is effective, environmentally friendly and unexpensive. However, still anti-tick vaccines present variable efficacy due to possible differences in amino acid sequences within tick antigens from geographically distinct isolates. The aim of this work was to analyze the variability of two vaccine antigens: BmVDAC (Voltage Dependent Anion Channel) and Subolesin from *R. microplus* isolates from different states of Mexico.

Methods: Two proteins were selected based on its efficacy as protective antigens: BmVDAC and Subolesin. *R. microplus* ticks was collected from different states of Mexico. Isolation of both DNA and RNA was performed to amplify *bmvdac* and *subolesin* respectively. Predicted amino acid sequences were obtained. A BLAST analysis was carried out to confirm the identity within

sequences and determine similarity by an alignment using Clustal Omega. Finally, to determine the phylogenetic relationship of each isolate an analysis by MEGAX64 software was performed.

Results: For BmVDAC, an average percentage of 99.79% identity and similarity was observed within the different aminoacid sequences. In the isolates from Chiapas, Nayarit, Media Joya, Queretaro, Tamaulipas and Guerrero a similarity and identity percentage of 99.87% was observed. Jalisco, Tabasco and Sinaloa a similarity and identity percentage of 99.56% was presented. On average, a variability percentage of 0.21% was observed.

The Subolesin alignment with isolates from Yucatan, Nayarit, Queretaro, Chiapas, Sinaloa, Veracruz, Tamaulipas, and the reference Munoz strain, an identity average percentage of 99.87% and similarity percentage of 100% was observed in the aminoacid sequences. Seven from eight sequences presented identity percentage of 99.91% whereas for Nayarit the percentage was 99.39%. The average variability was 0.13%. Phylogenetic analysis did not show significant differences between sequences using the UPGMA method. Average percentage obtained by 10000 replicas by Bootstrap method for *bmvdac* and *subolesin* was up to 50%.

Discussion and conclusion. This report represents the first research on the characterization of the variability for BmVDAC and Subolesin, two vaccine antigens against *R. microplus* isolates from different states of Mexico. Considering the low variability presented by the different *R. microplus* isolates sequences, we can conclude that BmVDAC and Subolesin are antigens that are conserved and can be considered as vaccine candidates. This information is relevant for antigen selection and vaccine design against *R. microplus* in Mexico.

Introducción

Las garrapatas ocasionan pérdidas económicas en el ganado a nivel mundial, parasitan una amplia gama de huéspedes vertebrados y transmiten una gran variedad de agentes patógenos, más que cualquier otro grupo de artrópodos (Prudencio *et al.*, 2010).

La garrapata *Rhipicephalus microplus* se alimenta de la sangre del ganado bovino, su hospedero definitivo, y es considerada como uno de los parásitos más dañinos en el ganado de zonas tropicales y subtropicales (Antunes *et al.*, 2014).

La infestación por garrapata *R. microplus* afecta negativamente la productividad del ganado, transmite enfermedades tales como la babesiosis y la anaplasmosis (Jonsson, 2006). Las

pérdidas económicas anuales en la industria ganadera son estimadas entre veintidós a treinta billones de dólares (Tabor *et al.*, 2016), las cuales son resultado de la actividad directa en la alimentación de las garrapatas en su hospedero y del costo que ocasiona controlar tanto a las garrapatas como a las enfermedades producidas por los patógenos que ellas transmiten (Manjunathachar *et al.*, 2014).

El método tradicional para el control de garrapatas está basado en el uso de químicos acaricidas a los cuales las garrapatas han desarrollado resistencia (Graf *et al.*, 2004). Esto dificulta la erradicación y el control de las garrapatas, por lo que el uso de productos químicos no representa la mejor opción (Sonenshine y Roe, 2013). Tomando en cuenta la creciente preocupación por la seguridad del medio ambiente, la salud humana y la salud animal, se han vuelto necesarias las medidas de control alternativas (Abbas *et al.*, 2014). Actualmente una estrategia para el control de la garrapata es el desarrollo de la inmunidad en el hospedero al administrar antígenos de la garrapata por medio de vacunas (Walker, 2009). La vacunación es considerada como una alternativa rentable, amigable con el medio ambiente, no genera contaminación residual en los productos de origen animal, es de fácil aplicación y es tecnología económica (Jonsson, 2006).

En los años noventa aparecieron comercialmente las vacunas contra la garrapata del ganado (Kaewmongkol *et al.*, 2015). Estas vacunas están basadas en la forma recombinante del antígeno oculto Bm86 del intestino de *R. microplus* (García-García *et al.*, 1998). Sin embargo, la eficacia de esta vacuna varía de acuerdo a los aislados existentes en las diferentes zonas geográficas (de la Fuente *et al.*, 2007), lo cual puede ser debido a variaciones alélicas en el gen *bms86* (De La Fuente y Kocan, 2006) (Sossai *et al.*, 2005). Una diferencia del 3.4% en la secuencia de Bm86 entre las diferentes cepas puede ser suficiente para causar una respuesta inmune ineficiente (García-García *et al.*, 1999). Se sugiere que existe una correlación inversa entre la eficacia de la vacuna y la variación del locus de *bms86* (Freeman *et al.*, 2010). Todo esto sugiere que un candidato vacunal debe ser conservado en su secuencia de aminoácidos entre distintas cepas o aislados para poder ser eficaz.

Existe un gran número de proteínas de garrapatas que han sido evaluadas como componentes para las vacunas, obteniendo diferentes porcentajes de protección, entre las que se encuentran BmVDAC y Subolesina (Taheri *et al.*, 2014). La proteína BmVDAC está presente en las células del intestino de la garrapata, es una porina mitocondrial, interviene en regulación de la

apoptosis en células infectadas, y tiene una sobre expresión importante durante la invasión de *Babesia bigemina* (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015). La proteína Subolesina se localiza en diferentes órganos de la garrapata como los ovarios, las glándulas salivales y el intestino. Además, interviene en la digestión de la sangre, la reproducción y el desarrollo de la garrapata (de la Fuente *et al.*, 2008). Un aspecto importante en la selección de antígenos que protejan contra las garrapatas, es la evaluación de la variabilidad alélica de los candidatos vacunales en las cepas de garrapatas de diferentes zonas geográficas; la identificación de secuencias peptídicas conservadas en estos candidatos vacunales permitirá obtener una vacuna con una protección elevada contra las diferentes cepas (de la Fuente y Kocan, 2003) (Manjunathachar *et al.*, 2014). Derivado de lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue analizar la variabilidad alélica en las secuencias de los antígenos vacunales BmVDAC y Subolesina de *R. microplus* en cepas provenientes de diferentes estados de México.

Método

Selección de proteínas de *R. microplus*

Se seleccionaron dos proteínas con base en su eficacia como antígenos candidatos vacunales, las cuales fueron: BmVDAC y Subolesina. Se obtuvieron las secuencias de referencia de la base de datos National Center of Biotechnology Information (NCBI), con los números de acceso GU994210.1 y ABA62328.1, respectivamente.

1) Colección de garrapatas *R. microplus* de México

Los aislados seleccionados de *R. microplus* fueron colectados de los estados de Jalisco, Tabasco, Chiapas, Nayarit, Querétaro, Tamaulipas, Guerrero y Sinaloa, además de la cepa de referencia Media Joya. Estos se utilizaron para amplificar el gen *bmvdac*. Para el gen *subolesina*, se utilizaron los aislados provenientes de Yucatán, Nayarit, Chiapas, Tamaulipas, Querétaro, Sinaloa y Veracruz, además de la cepa Muñoz utilizada como referencia. Por lo menos 30 hembras adultas de garrapatas *R. microplus* vivas fueron colectadas de distintos ranchos de cada estado. Fueron llevadas al laboratorio donde fueron lavadas y desinfectadas con benzal al 10%, se secaron con toallas de papel e inmediatamente fueron congeladas a -20°C hasta su uso.

Diseño de iniciadores

Para el diseño de iniciadores para amplificar cada uno de los genes seleccionados se utilizaron los programas, Primer3web versión 4.1.0 (<http://primer3.ut.ee/>); el programa Primer Blast de la base de datos *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) y finalmente, el programa GENTle (<http://gentle.magnusmanske.de/>).

Amplificación de los genes en los diferentes aislados

Los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes en los diferentes aislados de *R. microplus* fueron, para el gen *bmvdac*: 5' ATGGCTCCTCCGTGCTACGC 3' (sentido) y 5' CTTGTGTCCTCCCTGGTTGAA 3' (antisentido), utilizando como referencia la secuencia de *bmvdac* reportada en GenBank (cepa Media Joya) número de acceso GU994210.1. Para la amplificación del gen *subolesina*, la secuencia fue obtenida del GenBank (cepa Munoz) con número de acceso ABA62328.1. Los iniciadores utilizados fueron: 5' AAAGCGAACACATGACTGGG3' (sentido) y 5' TCCCGTATCTTGCTCTCTCG 3' (anti sentido). Para amplificar el gen *bmvdac*, el ADN genómico fue extraído de los ocho diferentes aislados de *R. microplus* de México mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen, Hiden, Alemania), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Para el gen *subolesina*, la transcriptasa reversa (RT)-PCR fue utilizada para amplificar el mRNA extraído utilizando el kit EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep (Bio Basic, inc, Toronto, Canadá) de los diferentes aislados de *R. microplus* provenientes de Yucatán, Nayarit, Tamaulipas, Chiapas, Querétaro, Sinaloa y Veracruz, el cADN fue sintetizado con SuperScript III First-Strand Synthesis System Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Para la reacción de PCR se utilizó un volumen de reacción total 20 µL: ADN 1 µL, (50 ng/µL), 1 µL de cada iniciador, 10 µL de PCR Master Mix, Promega, Wisconsin, USA) y 7 µL de agua libre de nucleasas.

La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 minutos seguida de 34 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento de 56°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto y el paso final de extensión a 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR se utilizaron para realizar la electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5%. Los geles fueron observados en el fotodocumentador para verificar que las amplificaciones presentaran la medida correcta, 780 pb para *bmvdac* y 442 pb para *subolesina*. Las bandas de los amplicones esperados fueron cortados del gel de agarosa y purificados utilizando el kit comercial de purificación de ADN Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). El ADN purificado fue enviado a secuenciar por el método automatizado de Sanger al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (Cuernavaca, Morelos, México).

Obtención de secuencias consenso, alineamiento múltiple y análisis bioinformático

A las secuencias de nucleótidos obtenidas del análisis y ensamblaje del resultado de la secuenciación se les realizó un análisis de búsqueda de marco de lectura abierto u ORF (Open Reading Frame) mediante el algoritmo bioinformático ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) que busca en la secuencia de nucleótidos la presencia de codones de inicio y de paro necesarios para su traducción a aminoácidos. De esta forma se obtuvo la secuencia de aminoácidos predicha correspondiente a cada gen de los diferentes aislados. Los análisis siguientes fueron realizados con estas secuencias.

Las secuencias de los diferentes aislados seleccionados fueron analizadas mediante el programa de alineamiento múltiple Clustal Omega y el programa BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) para la identificación de las regiones conservadas.

Para el análisis de identidad y similitud entre las diferentes secuencias se utilizó el programa SIAS (Sequence Identities and Similarities) <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias>.

Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos fueron contruidos basados en el Método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) utilizando el programa MEGAX64 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software) (Tamura *et al.*, 2013). Para evaluar la confiabilidad de las topologías del árbol inferidas, los análisis se realizaron utilizando el método estadístico Bootstrap con 10000 réplicas (Felsenstein, 1985). Para *bmvdac* se utilizó como grupo externo a *Ixodes scapularis* con número de acceso de GenBank XP_002408065.1 y *Amblyomma variegatum* con número de acceso BK007268.1. Para *subolesina* se utilizó como grupo externo a

Ixodes ricinus con número de acceso de GenBank ABA62325.1. y *Amblyomma cajennense* con número de acceso AGI44599.1.

Resultados

Los aislados de *R. microplus* fueron obtenidos de diferentes zonas geográficas de México como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Localización de las zonas geográficas de México de aislados de garrapatas *R. microplus* incluidas en el presente estudio.

Habitad de las garrapatas	Estado	Genes amplificados		Localización (Latitud, longitud)
		<i>bmvdac</i>	<i>subolesina</i>	
Noreste	Tamaulipas	✓	✓	22°39'35.6"N 98°15'14.1"W
Centro	Querétaro	✓	✓	21°11'00.03"N 99°16'38.8"W
Sureste	Tabasco	✓	✓	17°48'35.6"N 93°23'42.8"W
Noroeste	Sinaloa	✓	✓	23°17'18.8"N 106°25'02.3"W
Suroeste	Chiapas	✓	✓	16°18'11.8"N 91°55'29.9"W
Suroeste	Guerrero	✓	✓	18°22'01.0"N 100°37'57.6"W
Oeste	Jalisco	✓	✓	19°56'33.4"N 103°45'47.8"W
Oeste	Nayarit	✓	✓	21°32'34.05"N 104°56'71.09"W
Sureste	Yucatán	✓	✓	20°52'56.82"N 89°37'55.85"W
Este	Veracruz	✓	✓	20°05'12.5"N 97°02'43.7"W

La secuencia utilizada como referencia para *bmvdac* corresponde a un fragmento de 819 pares de bases y va de los nucleótidos 1 al 819 de la cepa Media Joya de Tapalpa, Jalisco, reportada previamente (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015), y de ese fragmento fueron amplificadas 750 pares de bases para el presente estudio. Este fragmento corresponde al 91.57% de la secuencia de referencia, y para *subolesina* la secuencia de referencia corresponde al fragmento de 442 pares de bases y va del nucleótido 1 al 442 de la cepa Munoz usada como referencia y publicada anteriormente (Almazán *et al.*, 2010). De ese fragmento fueron amplificados 438 pares de bases que corresponden al 99.3% de la secuencia utilizada como referencia.

Para el alineamiento múltiple de *bmvdac*, se analizaron ocho aislados de *R. microplus* además de la secuencia de referencia reportada en GenBank (Fig. 1). En donde se observan las zonas conservadas entre las diferentes secuencias, los aislados que presentan diferencias en este alineamiento son, Jalisco, Tabasco, Sinaloa, Nayarit y Chiapas, las cuales presentan solamente un aminoácido diferente.

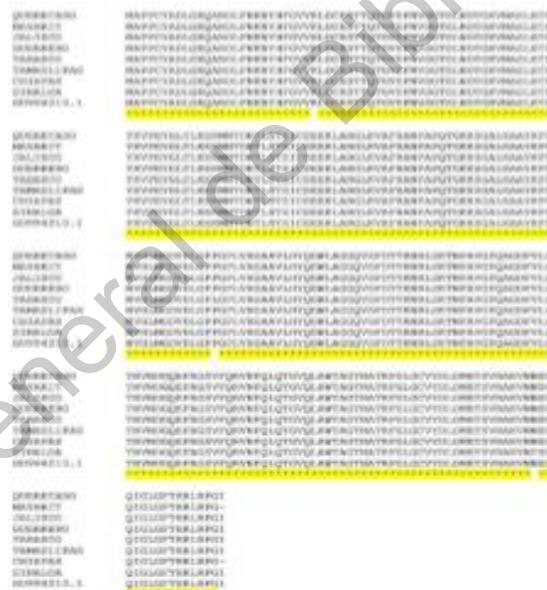


Fig. 1. Alineamiento múltiple de las secuencias de Jalisco, Tabasco, Chiapas, Nayarit, Querétaro, Tamaulipas, Guerrero, Sinaloa y la cepa de referencia GU994210.1. En amarillo están marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para el gen *bmvdac*. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) múltiple sequence alignment.

En promedio se observa un porcentaje del 99.79% de identidad y similitud. En seis de las nueve secuencias utilizadas provenientes de las diferentes zonas geográficas de México, se observó un porcentaje tanto de identidad como de similitud del 99.87% en las secuencias de aminoácidos de Chiapas, Nayarit, Media Joya, Querétaro, Tamaulipas y Guerrero. En las secuencias provenientes de Jalisco, Tabasco y Sinaloa presentaron el 99.56% en identidad y similitud. En promedio se observa un porcentaje de variabilidad de 0.21% entre las secuencias de *bmvdac*, como se indica en Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *bmvdac*. Se utilizó el programa SIAS, Sequences Identites and Similarities.

AISLADOS	QUERÉTARO	NAYARIT	JALISCO	GUERRERO	TABASCO	TAMAULIPAS	CHIAPAS	SINALOA	GU994210.1
QUERÉTARO	100%								
NAYARIT	100%	100%							
JALISCO	99.60%	99.60%	100%						
GUERRERO	100%	100%	99.60%	100%					
TABASCO	99.60%	99.60%	99.21%	99.60%	100%				
TAMAULIPAS	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%			
CHIAPAS	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%	100%		
SINALOA	99.60%	99.60%	99.21%	99.60%	99.21%	99.60%	99.60%	100%	
GU994210.1	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%	100%	99.60%	100%

Tabla 3. Porcentajes de Similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *bmvdac*. Se utilizó el programa SIAS, Sequences Identites and Similarities.

AISLADOS	QUERÉTARO	NAYARIT	JALISCO	GUERRERO	TABASCO	TAMAULIPAS	CHIAPAS	SINALOA	GU994210.1
QUERÉTARO	100%								
NAYARIT	100%	100%							
JALISCO	99.60%	99.60%	100%						
GUERRERO	100%	100%	99.60%	100%					
TABASCO	99.60%	99.60%	99.21%	99.60%	100%				
TAMAULIPAS	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%			
CHIAPAS	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%	100%		
SINALOA	99.60%	99.60%	99.21%	99.60%	99.21%	99.60%	99.60%	100%	
GU994210.1	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%	100%	99.60%	100%

En el alineamiento múltiple de subolesina con siete diferentes aislados provenientes de Yucatán, Nayarit, Querétaro, Chiapas, Sinaloa, Veracruz y Tamaulipas y la cepa Muñoz de referencia (Fig. 2), se observan las zonas conservadas entre las diferentes secuencias, los aislados que presentan diferencias en este alineamiento son, Sinaloa, Nayarit y Yucatán.



Fig. 2. Alineamiento múltiple de las secuencias de Yucatán, Nayarit, Querétaro, Sinaloa, Veracruz, Tamaulipas y la cepa de referencia ABA62328.1. En amarillo se encuentran marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para el gen *subolesina*. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

demás, se observó un porcentaje promedio de identidad del 99.87% y similitud del 100% entre las secuencias de aminoácidos. De las ocho secuencias, siete de ellas presentaron porcentaje de identidad del 99.91%, mientras que para la secuencia de Nayarit el porcentaje fue de 99.39% (tabla 4 y 5). La variabilidad promedio observada entre las secuencias de aminoácidos fue del 13%.

AISLADOS	ABA62328.1	CHIAPAS	NAYARIT	QUERÉTARO	TAMAULIPAS	VERACRUZ	SINALOA	YUCATÁN
ABA62328.1	100%							
CHIAPAS	100%	100%						
NAYARIT	99.31%	99.31%	100%					
QUERÉTARO	100%	100%	99.31%	100%				
TAMAULIPAS	100%	100%	99.31%	100%	100%			
VERACRUZ	100%	100%	99.31%	100%	100%	100%		
SINALOA	100%	100%	99.30%	100%	100%	100%	100%	
YUCATÁN	100%	100%	99.30%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 4. Porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *subolesina*. Se utilizó el programa SIAS, Sequences Identities and Similarities.

Análisis de la variabilidad alélica de BmVDAC y Subolesina, dos candidatos vacunales contra *Rhipicephalus microplus* en aislados de México

AISLADOS	ABA62328.1	CHIAPAS	NAYARIT	QUERÉTARO	TAMAULIPAS	VERACRUZ	SINALOA	YUCATÁN
ABA62328.1	100%							
CHIAPAS	100%	100%						
NAYARIT	100%	100%	100%					
QUERÉTARO	100%	100%	100%	100%				
TAMAULIPAS	100%	100%	100%	100%	100%			
VERACRUZ	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
SINALOA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
YUCATÁN	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 5. Porcentajes de similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *subolesina*. Se utilizó el programa SIAS, Sequences Identities and Similarities.

Tanto los alineamientos múltiples como los porcentajes de identidad y similitud resultantes en el presente estudio muestran la presencia de zonas conservadas entre las diferentes secuencias tanto para BmVDAC como para Subolesina; con base en lo reportado por García *et al.* (1999) y Freeman *et al.* (2010), referente a que el polimorfismo puede ser la causa de la variabilidad en la eficacia de la vacuna con el antígeno Bm86. BmVDAC y Subolesina, por su parte, presentan potencial para ser considerados como candidatos vacunales para el control de la garrapata *R. microplus* en México.

Los análisis filogenéticos mostraron similitudes muy elevadas en el árbol diseñado utilizando el método UPGMA. En el filograma construido para *bmvdac* con los aislados incluidos en el presente estudio se observan tres ramificaciones principales (Fig. 3), en la primera de ellas se encuentran, Chiapas, la cepa de referencia GU994210.1, Tamaulipas, Guerrero, Nayarit y Querétaro, las cuales presentan una misma secuencia genética localizada en diferentes zonas geográficas. Por otra parte, Sinaloa comparte una gran similitud con Tabasco y Jalisco. La segunda y tercera ramificación están conformada por las secuencias utilizadas como grupo externo (*Amblyomma variegatum* e *Ixodes Scapularis*). El porcentaje obtenido del método Bootstrap de 10000 réplicas es mayor al 50% como se observa en los nodos respectivos (Xiong, 2006).

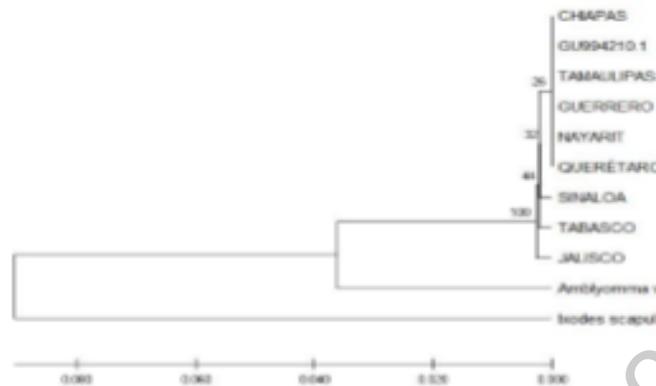


Fig. 3. Relación filogenética de los aislados de *R. microplus* para el gen *bmvda*. El árbol filogenético fue construido utilizando el método UPGMA. Al lado izquierdo del nodo se encuentra el porcentaje de soporte del método Bootstrap utilizando 10000 réplicas.

El árbol filogenético para *subolesina* presenta tres ramificaciones (Fig. 4), en la primera, se encuentran una misma secuencia genética en los aislados de Sinaloa, Yucatán, Veracruz, Tamaulipas, Querétaro, Chiapas y la cepa de referencia ABA62328, por una parte y por la otra, se encuentra Nayarit. En la segunda y tercera ramificación se encuentra la secuencia de *Amblyomma cajennense* e *Ixodes ricinus* respectivamente, ambas utilizadas como grupo externo. El porcentaje obtenido del método Bootstrap de 10000 réplicas es del 82%.

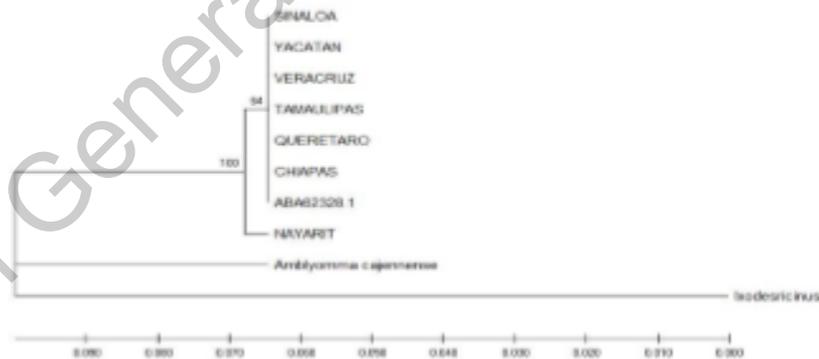


Fig. 1. Relación filogenética de los aislados de *R. microplus* para el gen *subolesina*. El árbol filogenético fue construido utilizando el método UPGMA. Al lado izquierdo del nodo se encuentra el porcentaje de soporte del método Bootstrap utilizando 10000 réplicas.

Discusión y Conclusiones

Este reporte representa la primera investigación de la caracterización de la variabilidad alélica para los genes *bmvdac* y *subolesina*, dos antígenos vacunales contra *R. microplus* entre aislados de diferentes estados en México. De acuerdo a lo reportado por Kaewmongkol *et al.*, 2015, la variabilidad en la secuencia obtenida de la garrapata *R. microplus* para Bm86 es una posible explicación referente al rango de eficacia presentada en la vacuna contra este parásito, utilizando como antígeno la proteína recombinante Bm86. Debido a esto, para amplificar *bmvdac* y *subolesina* se seleccionaron aislados representativos de diferentes áreas geográficas de México, para de esta manera determinar la variabilidad entre las secuencias provenientes de diferentes estados del país.

De acuerdo a los datos publicados por García-García *et al.*, 1999, la variabilidad superior al 3.4% entre las diferentes secuencias es suficiente para producir una respuesta inmune ineficiente, por lo que es importante destacar que la variabilidad entre las secuencias de aminoácidos de los aislados en el presente estudio es de un 0.21% para *bmvdac* y para *subolesina* se observa una variabilidad del 0.13%. Por consiguiente, con este análisis se considera que *bmvdac* y *subolesina* son antígenos que se encuentran conservados en las secuencias de las poblaciones de *R. microplus* de las diferentes zonas geográficas del país.

En el árbol filogenético para *bmvdac* se observa que las secuencias incluidas en la construcción del árbol presentan una misma secuencia genética localizada en seis diferentes zonas geográficas, lo cual indica que su alto porcentaje de similitud se encuentra disperso en las diferentes poblaciones de *R. microplus*; se observan diferencias en las secuencias de Jalisco, localizado en la zona oeste de México, Tabasco en el sureste y Sinaloa en el noroeste. En el árbol filogenético para *subolesina*, de las ocho secuencias incluidas para la construcción del árbol, siete de ellas provenientes de diferentes zonas geográficas comparten una misma secuencia genética, mientras que solo una de ellas, en este caso Nayarit localizado en la zona oeste del país, presenta variabilidad en su secuencia. Las diferencias observadas tanto *bmvdac* como en *subolesina* pueden ser debidas a la movilización del ganado del sur del país hacia los estados del norte y no a las diferentes zonas geográficas de donde provienen los aislados utilizados en el presente estudio, lo cual difiere de lo sugerido por De la Fuente *et al.*, 2007. El porcentaje obtenido del método Bootstrap utilizando 10000 réplicas tanto para *bmvdac* como para *subolesina* es superior al 50%, lo cual indica un soporte estadístico fiable, de acuerdo a lo reportado por Xion *et al.*, 2006.

Considerando la baja variabilidad alélica presentada entre las secuencias de los aislados de *R. microplus* de los diferentes estados de México, se concluye que tanto BmVDAC como Subolesina son antígenos que presentan secuencias altamente conservadas en aislados de México, por lo que pueden ser considerados como potenciales candidatos vacunales de acuerdo a lo reportado por Freeman *et al.*, 2010, donde sugiere que existe una correlación inversa entre la eficacia de la vacuna y la variación del locus; por lo tanto, esta información es relevante para la selección de antígenos empleados en las vacunas contra garrapatas *R. microplus*. Se sugiere la realización de evaluaciones *in vivo* para determinar su efectividad como inmunógenos.

Agradecimientos

A CONACyT y al Fondo de proyectos especiales de rectoría (FOPER) por el apoyo para la realización de este proyecto.

Referencias

- Abbas, Rao Z., Muhammad Arfan Zaman, Douglas D. Colwell, John Gilleard, y Zafar Iqbal. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology* 203 (1–2): 6-20.
- Almazán, Consuelo, Rodolfo Lagunes, Margarita Villar, Mario Canales, Rodrigo Rosario-Cruz, Frans Jongejan, y José de la Fuente. (2010). Identification and Characterization of Rhipicephalus (Boophilus) Microplus Candidate Protective Antigens for the Control of Cattle Tick Infestations. *Parasitology Research* 106 (2): 471-79.
- Antunes, Sandra, Octavio Merino, Juan Mosqueda, Juan A. Moreno-Cid, Lesley Bell-Sakyi, Rennos Fragkoudis, Sabine Weisheit, *et al.* (2014). Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasites & Vectors* 7: 42.
- De La Fuente, J., y K. M. Kocan. (2006). Strategies for Development of Vaccines for Control of Ixodid Tick Species. *Parasite Immunology* 28 (7): 275-83.
- Felsenstein, Joseph. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* 125 (1): 1-15.

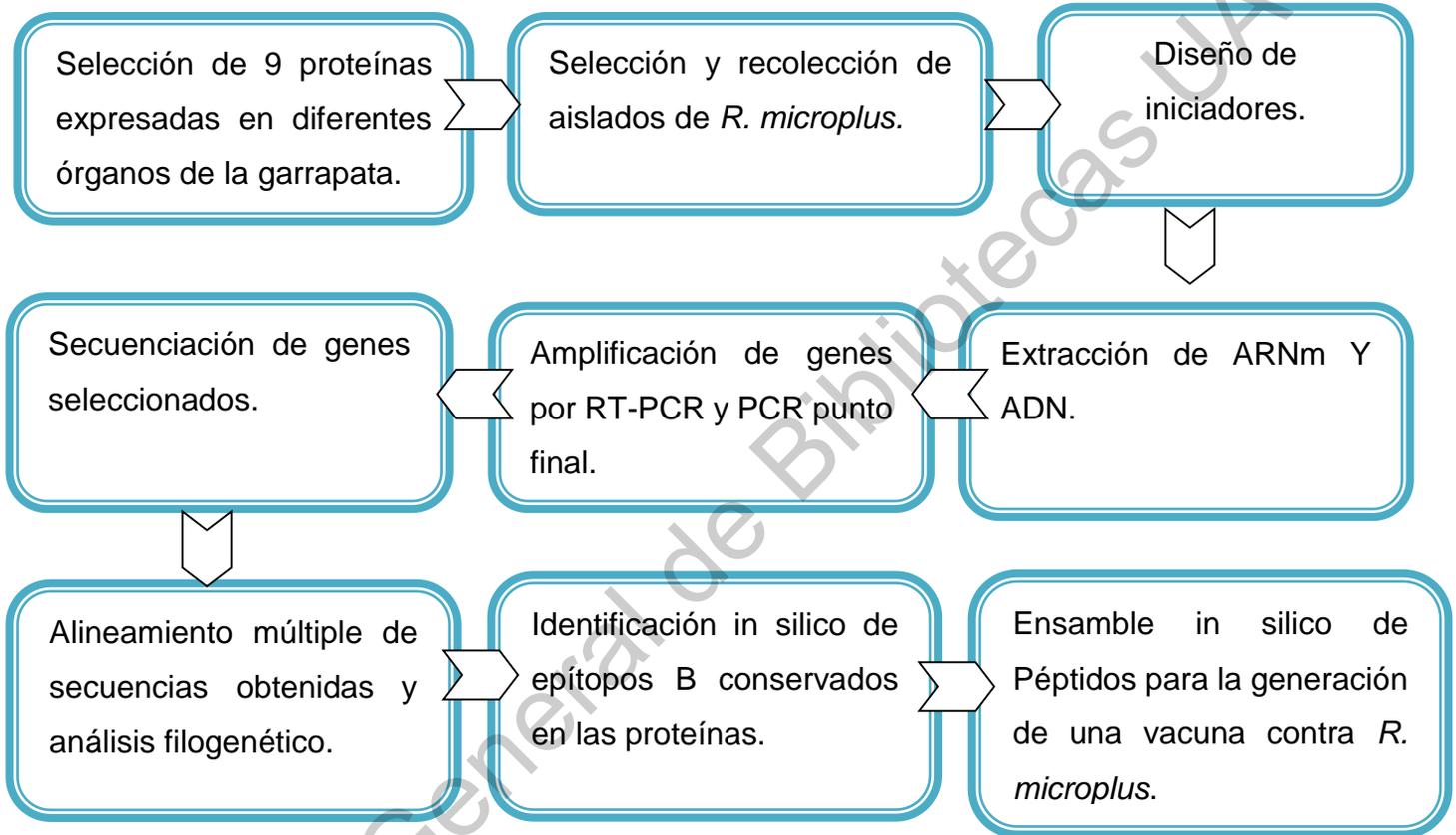
- Freeman, Jeanne M., Ronald B. Davey, Lowell S. Kappmeyer, Diane M. Kammlah, y Pia U. Olafson. (2010). Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasites & Vectors* 3: 101.
- Fuente, José de la, Consuelo Almazán, Mario Canales, José Manuel Pérez de la Lastra, Katherine M. Kocan, y Peter Willadsen. (2007). A Ten-Year Review of Commercial Vaccine Performance for Control of Tick Infestations on Cattle. *Animal Health Research Reviews* 8 (1): 23-28.
- Fuente, José de la, y Katherine M. Kocan. (2003). Advances in the Identification and Characterization of Protective Antigens for Recombinant Vaccines against Tick Infestations. *Expert Review of Vaccines* 2 (4): 583-93.
- Fuente, José de la, Christine Maritz-Olivier, Victoria Naranjo, Patricia Ayoubi, Ard M. Nijhof, Consuelo Almazán, Mario Canales, et al. (2008). Evidence of the Role of Tick Subolesin in Gene Expression. *BMC Genomics* 9: 372.
- García-García, J. C., I. L. Gonzalez, D. M. González, M. Valdés, L. Méndez, J. Lamberti, B. D'Agostino, et al. (1999). Sequence Variations in the Boophilus Microplus Bm86 Locus and Implications for Immunoprotection in Cattle Vaccinated with This Antigen. *Experimental & Applied Acarology* 23 (11): 883-95.
- García-García, J. C., A. Soto, F. Nigro, M. Mazza, M. Joglar, M. Hechevarria, J. Lamberti, y J. de la Fuente. (1998). Adjuvant and Immunostimulating Properties of the Recombinant Bm86 Protein Expressed in Pichia Pastoris. *Vaccine* 16 (9-10): 1053-55.
- Graf, J. F., R. Gogolewski, N. Leach-Bing, G. A. Sabatini, M. B. Molento, E. L. Bordin, y G. J. Arantes. (2004). Tick Control: An Industry Point of View. *Parasitology* 129 Suppl: S427-442.
- Jonsson, N. N. (2006). The Productivity Effects of Cattle Tick (Boophilus Microplus) Infestation on Cattle, with Particular Reference to Bos Indicus Cattle and Their Crosses. *Veterinary Parasitology* 137 (1-2): 1-10.
- Kaewmongkol, S., G. Kaewmongkol, N. Inthong, N. Lakkitjaroen, T. Sirinarumitr, C. M. Berry, N. N. Jonsson, R. W. Stich, y S. Jittapalpong. (2015). Variation among Bm86 Sequences in Rhipicephalus (Boophilus) Microplus Ticks Collected from Cattle across Thailand. *Experimental & Applied Acarology* 66 (2): 247-56.

- Manjunathachar, Haranahalli Vasanthachar, Buddhi Chandrasekaran Saravanan, Manickam Kesavan, Kumaragurubaran Karthik, Prakashkumar Rathod, Marappan Gopi, Paramasivam Tamilmahan, y Bharemaru Lingaraju Balaraju. (2014). Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4 (Supplement 2): S770-79.
- Prudencio, Carlos R., Andrea O. M. Marra, Rone Cardoso, y Luiz R. Goulart. (2010). Recombinant Peptides as New Immunogens for the Control of the Bovine Tick, *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*. *Veterinary Parasitology* 172 (1-2): 122-31.
- Rodríguez-Hernández, Elba, Juan Mosqueda, Gloria León-Ávila, Elizabeth J. Castañeda-Ortiz, María Elizabeth Álvarez-Sánchez, Alejandro D. Camacho, Alberto Ramos, y Minerva Camacho-Nuez. (2015). BmVDAC Upregulation in the Midgut of *Rhipicephalus Microplus*, during Infection with *Babesia Bigemina*. *Veterinary Parasitology* 212 (3-4): 368-74.
- Sonenshine, Daniel E., y R. Michael Roe. (2013). *Biology of Ticks*. OUP USA.
- Sossai, Sidimar, Ana P. Peconick, Policarpo A. Sales-Junior, Francismar C. Marcelino, Marlene I. Vargas, Elisangela S. Neves, y Joaquín H. Patarroyo. (2005). Polymorphism of the Bm86 Gene in South American Strains of the Cattle Tick *Boophilus Microplus*. *Experimental & Applied Acarology* 37 (3-4): 199-214.
- Taheri, M., S. Nabian, M. Ranjbar, R. Mazaheri Nezhad, A. Gerami Sadeghian, y A. Sazmand. (2014). Study of Vitellogenin in *Boophilus Annulatus* Tick Larvae and Its Immunological Aspects. *Tropical Biomedicine* 31 (3): 398-405.
- Tamura, Koichiro, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski, y Sudhir Kumar. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725-29.
- Walker, Alan R. (2009). Bowman A, Nuttall P: Ticks: Biology, Disease and Control. *Parasites & Vectors* 2: 1.
- Xiong, Jin. (2006). *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press.

CAPITULO VII

7.1 Desarrollo de una vacuna multiantigénica, multiepitópica anti garrapatas *R. microplus*.

Diseño experimental



MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de proteínas de diferentes órganos de *R. microplus*

La selección de las proteínas que se encuentran presentes en diferentes órganos de las garrapatas como son, las glándulas salivales, el intestino y los ovarios, se realizó con base en su eficiencia como antígenos protectores mediante el análisis de la información existente en la base de datos National Center of Biotechnology information (NCBI).

Las proteínas seleccionadas fueron: Vitelogenina, Subolesina, Voraxina, BM86, BM95, BMVDAC, Serpina, Chitinasa y Glutathion-S-Transferasa. Con números de acceso, EU086096.1, ABA62328.1, HQ014398.1, AF150891.2, GU994210.1, KC990110.1, GBBR01000100.1, AF077609.1.

La selección de las secuencias de las proteínas fue obtenida mediante UniProt (protein data base) y NCBI (protein data bases). El formato fasta utilizado para el análisis de las secuencias fue el programa Fast adaptive Shrinkage/Thresholding Algorithm.

Selección y Recolección de garrapatas *R. microplus* de México

Las garrapatas fueron colectadas manualmente en once diferentes estados de México tales como, Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Guerrero, Chiapas, Yucatán, Tabasco, Veracruz, Tamaulipas y Querétaro (Figura 4). La cepa utilizada como referencia fue Media Joya, la cual se encuentra en CENID-PAVET, en Cuernavaca, Morelos. Al menos 30 hembras adultas de garrapatas *R. microplus* fueron colectadas vivas de distintos ranchos de cada estado. En el laboratorio se lavaron y se desinfectaron con benzal al 10%, se secaron con toallas de papel y fueron congeladas a -70°C hasta su uso.



Figura 4. Estados de la República Mexicana de donde se realizó la recolección de garrapatas *R. microplus*. (Modificado de SENASICA 2016).

Selección y diseño de iniciadores

El diseño de los iniciadores específicos se realizó con base en las secuencias de referencia del GenBank correspondiente a cada gen, para lo cual se utilizaron las siguientes herramientas bioinformáticas: programa oligoanalyzer de la compañía IDT (www.idtdna.com/analizer/Applications/OligoAnalyzer/) programa Primer Blast de la base de datos del *National Center of Biotechnology information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) y el programa GENTle (<http://gentle.magnusmanske.de/>).

Extracción de ADN, ARNm y síntesis de ADNc

El ADN y ARNm utilizado en el presente trabajo fue extraído de garrapatas adultas de *R. microplus* provenientes de los diferentes estados de México. Para la

extracción de ADN de la garrapata completa *R. microplus* se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hiden, Alemania), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La extracción de ARNm de garrapata completa y de ovarios de *R. microplus* fue realizada utilizando el kit EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep (Bio Basic. Inc. Toronto, Canadá), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El ADNc se sintetizó del ARNm extraído utilizando el kit de (RT)-PCR superScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, carlsbad, California, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Amplificación de los genes en los diferentes aislados.

El ADN y el ADNc correspondiente a los once diferentes aislados de *R. microplus* fue utilizado para amplificar los diferentes genes seleccionados con los iniciadores específicos diseñados, esto fue realizado mediante la reacción de PCR punto final. Para la amplificación del gen *vitelogenina* fue utilizado ADNc de ovarios de *R. microplus*, y los iniciadores 5' ACGTCAAGACCCTCACCAGG 3' (sentido) y 5' CACTTGTAAGGCAGCACGAC 3' (antisentido), utilizando como referencia la secuencia mexicana reportada en GenBank (cepa Media Joya) con número de acceso EU086096.1. En el gen *subolesina*, la secuencia mexicana de referencia utilizada fue la cepa Munoz, con número de referencia ABA62328.1. Los iniciadores utilizados fueron: 5' AAAGCGAACACATGACTGGG 3' (sentido) y 5' TCCCGTATCTTGCTCTCTCG 3' (anti sentido) y se utilizó ADNc de garrapata completa. Los iniciadores utilizados para la amplificación de gen *voraxina* fueron: 5' TCTTGCGTACTGTTCGGACT 3' (sentido) y 5' TGCTCAAGTTCACCACCAAC 3' (antisentido) y se utilizó ADNc de ovarios de *R. microplus*. Como referencia se tomó la secuencia de la cepa IVRI/Bm/1998-1, de la India, con número de acceso JX502818.1. Además, se realizó la amplificación con la cepa "La Minita-Texas", conservada en la Universidad de Washington, USA. En cuanto a la amplificación del gen *bm86*, los iniciadores utilizados fueron: 5' AGCTATGGACGTTGCGTTGA 3' (sentido) y 5' GCTGCCCACTGCTTTGACA 3' (antisentido) y se utilizó cADN de garrapata completa. La

secuencia obtenida del GenBank utilizada como referencia fue la cepa Zapata 11, de Texas, USA, con número de acceso HQ014398.1. Los iniciadores utilizados para la amplificación del gen *bm95* fueron: 5' AGCTATGGACGTTGCGTTGA 3' (sentido) y 5' GGTCCGTATCGCTCCCAAAA 3' (antisentido) y se utilizó cADN de garrapata completa. La cepa "A" de Argentina fue utilizada como referencia, la cual tiene número de acceso GenBank AF150891.2. Para la amplificación de gen *bmvdac*, los iniciadores utilizados fueron: 5' ATGGCTCCTCCGTGCTACGC 3' (sentido) y 5' CTTGTGTCCTCCCTGGTTGAA 3' (antisentido) y se utilizó ADN de garrapata completa, utilizando como referencia la secuencia reportada en GenBank (cepa Media Joya) número de acceso GU994210.1, de México. Para el gen *serpina*, fueron utilizados los siguientes iniciadores: 5' CATTGAGCATCTCGGCTGC 3' (sentido) y 5' ACGGCTCCGAATGACAAACA 3' (antisentido) y se utilizó cADN de garrapata completa. La cepa "porto alegre" de Brasil, fue utilizada como referencia, con número de acceso KC990110.1. Para el gen *chitinasa*, se utilizaron los siguientes iniciadores para su amplificación: 5' CAGCTAACGCTACCACAGC 3' (sentido) y 5' TACGGGCACTTTCCTTCGTC 3' (antisentido), se utilizó cADN de garrapata completa. La secuencia utilizada como referencia fue "transcribed RNA", la cual fue transcrita en Brasil, con número de acceso GBBR01000100.1. Finalmente, para la amplificación del gen *glutathion-s-transferasa* se utilizaron los siguientes iniciadores: 5' GTAGCAAGCGGTCGTGGTAC 3' (sentido) y 5' GGCCACTTAATGCACTTGTCC 3' (antisentido), se utilizó cADN de garrapata completa. La cepa "Gonzalez" fue utilizada como referencia, es de Texas y su número de acceso es AF077609.1.

Para la realización de la reacción de todas las PCR se utilizó el siguiente protocolo; en una reacción de 20 µl volumen final: 1 µl de ADN, 1 µl de cada iniciador, 10 µl de PCR Master Mix (Promega) y 7 µl de agua libre de nucleasas. Se utilizó DNA de cada una de las once cepas con iniciadores de VDAC como control positivo y agua como control negativo. Bajo las condiciones de amplificación mostradas en el cuadro 1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación para las secuencias de *R. microplus* utilizadas en el presente trabajo de investigación.

GEN	DESNTURALIZACIÓN 3 minutos	DESNTURALIZACIÓN 30 segundos	ALINEAMIENTO 30 segundos	EXTENSIÓN 1 minuto	EXTENSIÓN FINAL 5 minutos
34 ciclos					
<i>vitelogenina</i>	95 °C	57 °C	95 °C	72 °C	72 °C
<i>subolesina</i>	95 °C	56°C	95 °C	72 °C	72 °C
<i>voraxina</i>	95 °C	56°C	95 °C	72 °C	72 °C
<i>bm86</i>	95 °C	60°C	95 °C	72 °C	72 °C
<i>bm95</i>	95 °C	60°C	95 °C	72 °C	72 °C
<i>bmvdac</i>	95 °C	56°C	95 °C	72 °C	72 °C
<i>serpina</i>	95 °C	56°C	95 °C	72 °C	72 °C
<i>chitinasa</i>	95 °C	57°C	95 °C	72 °C	72 °C
<i>glutation-s-transferasa</i>	95 °C	59°C	95 °C	72 °C	72 °C

Secuenciación

Los productos de PCR se utilizaron para la realización de electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5%. Los geles fueron observados en el fotodocumentador para verificar que las amplificaciones presentaran la medida correcta. 917 pb para *vitelogenina*, 484 pb para *subolesina*, 309pb para *voraxina*,

1503 pb para *bm86*, 879 pb para *bm95*, para *serpina* 958 pb, para *chitinasa* 975 pb, y para *glutation-s-transferasa* 975 pb. Las bandas de los amplicones esperados fueron cortados del gel de agarosa para ser purificados con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN purificado fue enviado al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Autónoma de México, para ser secuenciado por el método Sanger. Los resultados de la secuenciación fueron analizados y ensamblados utilizando el software Chromas 2.6.5 (www.technelysium.com.au), para obtener las secuencias de los genes.

Secuencias consenso y alineamiento multiple

A las secuencias de nucleótidos obtenidas del análisis y ensamblaje del resultado de la secuenciación se les realizó un análisis de búsqueda de marco de lectura abierto u ORF (Open Reading Frame) mediante el algoritmo bioinformático ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) que busca en la secuencia de nucleótidos la presencia de codones de inicio y de paro necesarios para su traducción a aminoácidos. De esta forma se obtuvo la secuencia de aminoácidos predicha correspondiente a cada gen de los diferentes aislados. Los análisis siguientes fueron realizados con estas secuencias.

Para la identificación de regiones conservadas y el análisis del grado de conservación de las proteínas en los diferentes aislados se realizaron alineamientos múltiples de los distintos aislados de cada proteína utilizando para ello el programa Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) y el programa BLAS (Basic Logical Alignment Search Tool).

Para el análisis de identidad y similitud entre las diferentes secuencias se utilizó el programa SIAS (Sequence Identities and Similarities) <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias>.

Identificación, selección de péptidos y análisis bioinformáticos

Una vez identificadas las regiones conservadas en los alineamientos múltiples de las diferentes secuencias, se prosiguió a la identificación y selección de cuatro péptidos por proteína que contengan los epítomos B conservados en garrapatas *R. microplus* utilizando la base de datos de Protein y Uniprot. La predicción de epítomos B conservados se realizó mediante herramientas bioinformáticas las cuales utilizan diferentes criterios de selección (Tabla2), así como diferentes algoritmos, tales como, BCEPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>), ABCpred (B-cell epitope prediction server) (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), IEDB (Immune epitope database and analysis resource) (<http://www.iedb.org/>) y el EMBOSS antigenic (<http://emboss.open-bio.org/wiki/Appdocs>). Finalmente se realizó un análisis con el programa BLAS (Basic Logical Aligment Search Tool), en la página del NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), para confirmar que la secuencia de aminoácidos de los péptidos que contengan los epítomos B conservados tengan 100% de identidad solo con la proteína correspondiente.

Tabla 2. Criterios de selección para epítomos B.

Herramienta bioinformática	Criterio de selección
ABCpred	Puntaje de probabilidad de ocurrencia de .80
BCEPred	Hidrofilicidad, antigenicidad y accesibilidad superior a 1
IEDB	Puntaje de probabilidad de ocurrencia superior a .80
EMBOSS ANTIGENIC	Superior a 1.100

Diseño y selección in silico de péptidos

Se seleccionaron los péptidos encontrados en regiones conservadas correspondientes a cada uno de los alineamientos múltiples, los cuales reconocieron todas las cepas reportadas de garrapatas *R. microplus* y que fueron identificados por al menos cuatro programas bioinformáticos de predicción de epítomos B. La selección para dichos péptidos se realizó considerando que la longitud de cada uno de ellos tuviera como mínimo 16 aminoácidos, que fueran específicos de *R. microplus*, es decir, que no crucen con péptidos encontrados en bovinos, que se estuvieran localizados en mínimo tres diferentes aislados o cepas y que al menos una de ellas fuera de origen mexicano.

Ensamble in silico de Péptidos para la generación de una vacuna contra *R. microplus*.

Finalmente, los péptidos seleccionados utilizando los diferentes programas bioinformáticos fueron ensamblados y evaluados *in silico* para evitar que se formen epítomos yuxtapuestos que puedan generar anticuerpos que no sean relevantes para la garrapata, además se utilizó glicina como unión entre péptidos para evitar la producción y reconocimiento de nuevos péptidos. Finalmente se seleccionó la mejor versión con base en los resultados obtenidos para la construcción de una proteína quimérica con función de vacuna multiantigénica y multiepitópica contra *R. microplus*.

RESULTADOS

Se seleccionaron nueve proteínas que se encuentran presentes en diferentes órganos de las garrapatas como son: Vitelogenina, Voraxina y Glutation-S-Transferasa de ovarios, de glándula salival se seleccionaron Subolesina, Serpina y Chitinasa, de Intestino se seleccionaron BmVDAC, Bm86 y Bm95. Los aislados que fueron seleccionados pertenecen a diez diferentes estados de México, como son: Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Guerrero, Chiapas, Querétaro, Tabasco, Yucatán Veracruz, Tamaulipas, la cepa Media Joya conservada en el CENID-PAVET. Cuernavaca, Morelos y una cepa es de Estados Unidos, en algunos casos se utilizó el transcriptoma de *R. microplus* para la localización de algunos genes, como puede observarse en la tabla 3.

Tabla 3. Zonas geográficas de México de los aislados de garrapatas *R. microplus* y los genes amplificados en el presente trabajo.

Habitad de las garrapatas	Estado	Genes amplificados								
		<i>subolesina</i>	<i>bmVDAC</i>	<i>vitelogenina</i>	<i>serpina</i>	<i>chitinasa</i>	<i>glutation/s-transferasa</i>	<i>voraxina</i>	<i>bm86</i>	<i>bm95</i>
Noroeste	Sinaloa	✓	✓	✓			✓	✓		
Oeste	Jalisco		✓							
Oeste	Nayarit	✓	✓	✓		✓	✓	✓		
Suroeste	Guerrero		✓							
Suroeste	Chiapas		✓	✓	✓		✓		✓	✓
Centro	Querétaro	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sureste	Tabasco		✓							
Sureste	Yucatán			✓			✓			
Este	Veracruz	✓		✓			✓			
Noreste	Tamaulipas	✓	✓	✓			✓		✓	✓
Cepa	CENID-PAVET.									
Media Joya	Cuernavaca, Morelos.		✓					✓		
Cepa Texas-La Minita	Washington State University. U.S.A.								✓	
Media Joya	Transcriptoma			✓	✓	✓	✓		✓	✓

Se diseñaron un total de nueve pares de iniciadores específicos, tal como se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Iniciadores seleccionados para cada proteína.

PROTEINA	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3'')	TAMAÑO PROTEINA	TAMAÑO AMPLICÓN	LOCALIZACIÓN
VITELOGENINA	ACGTCAAGACCCTCACCAGG	CACTTGTAAAGGCAGCACGAC	1807	917	237 A 1202
SUBOLESINA	AAAGCGAACACATGACTGGG	TCCCGTATCTTGCTCTCTCG	484	313	18-349
VORAXINA	TCTTGCCTACTGTTCGGACT	TGCTCAAGTTCACCACCAAC	419	329	39-386
BM86	AGCTATGGACGTTGCGTTGA	GCTGCCCACTGCTTTGACA	2022	724	261-1782
BM95	AGCTATGGACGTTGCGTTGA	GGTCCGTATCGCTCCCAAAA	2225	879	216-1120
BMVDAC	ATGGCTCCTCCGTGCTACGC	CTTGTGTCCTCCCTGGTTGAA	819	780	1-799
SERPINA	CATTGAGCATCTCGGCTGC	ACGGCTCCGAATGACAAACA	1143	958	104-1079
CHITINASA	CAGCTAACGCTACCACAGC	TACGGGCACTTTCCTTCGTC	1311	975	119-1069
GLUTATION-S- TRANSFERASA	GTAGCAAGCGGTCGTGGTAC	GGCCACTTAATGCACTTGTCC	781	648	6-672

La secuencia utilizada como referencia para amplificar el gen *vitelogenina* corresponde a un fragmento de 1807 pb y va de los nucleótidos 1 a 1807, de los cuales se logró la amplificación de 917 pb, para amplificar *subolesina* se utilizó el fragmento de 484 pb, que van de 1 al 484, de los cuales se amplificaron 484pb. Para *voraxina* la secuencia del fragmento utilizado fue de 419 pb, de los cuales fueron amplificados 346 pb. Para *bm86* el fragmento utilizado fue de 2022 pb, que van del 1 al 2022, de los cuales se amplificaron 693 pb. Para *bm95* el fragmento

utilizado fue de 2225 pb, que van de 1 al 2225, de los cuales fueron amplificados 693 pb. Para *bmvdac* el fragmento corresponde a 819 pb y van del 1 al 819 pb, de los cuales se amplificaron 780 pb. Para *serpina* el fragmento utilizado corresponde a 1143 pb, van de 1 al 1143, de las cuales se amplificaron 789 pb. Para *chitinasa*, el fragmento utilizado fue de 1311 pb y van de 1 al 1311pb, de las cuales fueron amplificados 890 pb. Por último, para *glutación-s-transferasa* se utilizó un segmento correspondiente a 824 pb, que van de 1 al 824 pb, de las cuales se amplificaron 590 pb.

Las características de interés de las secuencias de cada uno de los genes que fueron analizados con las diferentes herramientas bioinformáticas, se presentan a manera de resumen en cada una de ellas. Para *vitelogenina* podemos observar el mapa o resumen de la secuencia en la figura 5.

```
>ABS88989.1 vitellogenin, partial [Rhipicephalusmicroplus]
      10      20      30      40      50      60
ETPYERMHYK PATPGYETYE SEESYDYYPE YNQWNKTLVK HVLNVTLEGK HEGSLKKLTK
      70      80      90     100     110     120
LDFAYYHTLN KTLKHYYVDVKTLTRPLVSV FLNLTHVPVP SPFWYQPSFV GKDLVNATLY
      130     140     150     160     170     180
VTVGNEPEPF VLTYNATKTV QQLKGLHAYD ATPLLHWFVP QCLADQYAGN TVSYACRLAT
      190     200     210     220     230     240
VHDAHLNKQV VAFKVP TQVS PKVKSVALKF LSYLKFRMFP YATFYALPLT EQEYYVVFVK
      250     260     270     280     290     300
LNKTDVNPYV TVAHGELLLP GEKVVLTDLK LSKYLVPNLV LSGLDRLKH SVFEGHPHPPC
      310     320     330     340     350     360
SVGKNWVRTY DNVSYPLEVR FNCKYLVTSD CSAKHDFAVV AQPLDLTVGT KKLIVQLGPT
      370     380     390     400     410     420
VVELPPPDLY KAEVLLTVNG TYYVANTQD VVLPYKWDRK LLVTVYPTSG PHDPPVVKLT
      430     440     450     460     470     480
NSLKTFKLLF DGVNFFVWVN PLYQKTCGL CSNYDNEPYHEFVTPENWLV SNYSEFVASY
      490     500     510     520     530     540
GFGLPQCKEP LVTTLFVHYL EELKKPLGYE SSYPTHREYP THHEYPTHRÉ YPTHREYPTR
      550     560     570     580     590     600
HEYPTREYPT THHKYPTHHE YPTRHEYPTH HEYPTREYPT THHKYPPHHEPYPYTANLQREG
```

Figura 5. Mapa de la secuencia de *vitelogenina*. En color amarillo indica el codón de inicio y el codón de paro. En color rojo se presenta los iniciadores. El color verde indica la presencia de un dominio. En negro remarcado representa los péptidos seleccionados. No presenta péptido señal ni hélice transmembranal.

Para determinar que las secuencias obtenidas eran conservadas se realizó un alineamiento múltiple correspondiente a los diferentes genes, se analizaron los aislados que se amplificaron en conjunto con la cepa de referencia reportada en el GenBank y utilizada para cada caso en particular.

Para *vitelogenina* se analizaron siete aislados de *R. microplus*, la cepa de referencia y la secuencia de la cepa Media Joya obtenida del transcriptoma de *R. microplus* (Figura 5). En las nueve secuencias que integran este alineamiento se observa un 100 % de identidad y de similitud, tabla 5.

```

ABS88989.1      SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
MEDIAJOYA      SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
NAYARIT        SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
QUERETARO      SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
SINALOA        SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
TAMAULIPAS     SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
VERACRUZ       SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
YUCATÁN        SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
CHIAPAS        SVFLNLTHPVPPSPFFWYQPSFVGKDLVNATLYVTVGNEPEPFVLTYNATKTVQQLKGLHA
*****

ABS88989.1      YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
MEDIAJOYA      YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
NAYARIT        YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
QUERETARO      YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
SINALOA        YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
TAMAULIPAS     YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
VERACRUZ       YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
YUCATÁN        YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
CHIAPAS        YDATPLLHWFVPQCLADQYAGNTVSYACRLATVHDAHLNKQVVAFKVPTQVS PKVKSVAL
*****

ABS88989.1      KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
MEDIAJOYA      KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
NAYARIT        KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
QUERETARO      KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
SINALOA        KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
TAMAULIPAS     KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
VERACRUZ       KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
YUCATÁN        KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
CHIAPAS        KFLSYLKFRMFPYATFFYALPLTEQEEYVVFVKLNKTDVNPYVTVAHGELLLPGEKVVLTD
*****

ABS88989.1      LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
MEDIAJOYA      LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
NAYARIT        LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
QUERETARO      LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
SINALOA        LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
TAMAULIPAS     LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
VERACRUZ       LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
YUCATÁN        LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
CHIAPAS        LKLSKYLVPNLVLSGLDRLKHSVFEGHPHPPCSVGKNWVRTYDNVSYPLEVRPNCKYLVT
*****

ABS88989.1      SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
MEDIAJOYA      SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
NAYARIT        SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
QUERETARO      SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
SINALOA        SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
TAMAULIPAS     SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
VERACRUZ       SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
YUCATÁN        SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
CHIAPAS        SDCSAKHDFAVVAQPLDLTVGTTKLIIVQLGPTVVELPPPDLKAEVLLTVNGTYVYVANTT
*****

```

Figura 6. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *vitelogenina* de los aislados de Nayarit, Querétaro, Sinaloa; Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Chiapas, la cepa Media y la cepa de referencia ABS88989.1. En amarillo se indican las regiones conservadas de las diferentes secuencias para este gen. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

Tabla 5. Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *vitelogenina*. Se utilizó el programa SIAS, Secuencias Identites and Similarities.

AISLADOS	MEDIA JOYA	ABS88989.1	NAYARIT	QUERÉTARO	SINALOA	TAMAULIPAS	VERACRUZ	YUCATÁN	CHIAPAS
MEDIA JOYA	100%								
ABS88989.1	100%	100%							
NAYARIT	100%	100%	100%						
QUERÉTARO	100%	100%	100%	100%					
SINALOA	100%	100%	100%	100%	100%				
TAMAULIPAS	100%	100%	100%	100%	100%	100%			
VERACRUZ	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
YUCATÁN	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
CHIAPAS	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Para *subolesina* el mapa bioinformático nos muestra el resumen de las características de interés con que cuenta esta secuencia, lo cual puede observarse en la figura 7.

ABA62328.1 *R. microplus*

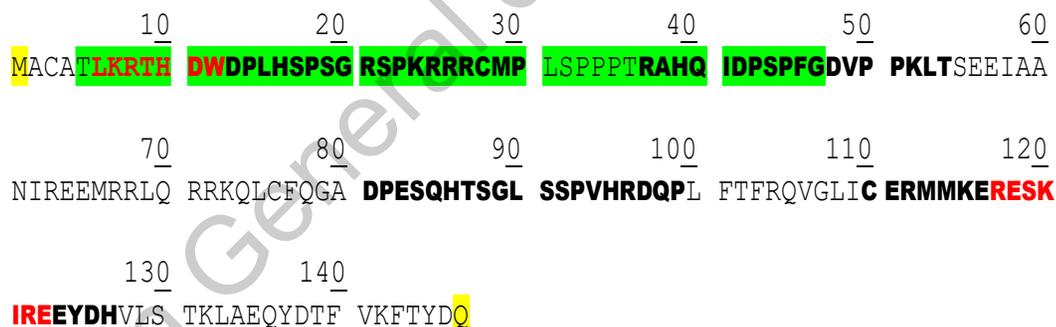


Figura 7. Mapa de la secuencia de *subolesina*. En color amarillo indica el codón de inicio y el codón de paro. En color rojo se presenta los iniciadores. El color verde indica la presencia de dos dominios. En negro remarcado representa los péptidos seleccionados. No presenta péptido señal ni hélice transmembranal.

En el alineamiento múltiple de *subolesina* con siete diferentes aislados provenientes de Yucatán, Nayarit, Querétaro, Chiapas, Sinaloa, Veracruz y Tamaulipas y la cepa Munoz de referencia (Figura 8), se observan las zonas conservadas entre las diferentes secuencias, los aislados que presentan diferencias en este alineamiento son, Sinaloa, Nayarit y Yucatán.



Figura 8. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *subolesina* y de los aislados de Yucatán, Nayarit, Querétaro, Sinaloa, Veracruz, Tamaulipas y la cepa de referencia ABA62328.1. En amarillo se encuentran marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para este gen. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

Además, se observó un porcentaje promedio de identidad del 99.87% y similitud del 100% entre las secuencias de aminoácidos. De las ocho secuencias, siete de ellas presentaron porcentaje de identidad del 99.91%, mientras que para la

secuencia de Nayarit el porcentaje fue de 99.39% (Tabla 6 y 7). La variabilidad promedio observada entre las secuencias de aminoácidos fue del 0.13%.

Tabla 6. Porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *subolesina*. Se utilizó el programa SIAS, Secuences Identites and Similarities.

AISLADOS	ABA62328.1	CHIAPAS	NAYARIT	QUERÉTARO	TAMAULIPAS	VERACRUZ	SINALOA	YUCATÁN
ABA62328.1	100%							
CHIAPAS	100%	100%						
NAYARIT	99.31%	99.31%	100%					
QUERÉTARO	100%	100%	99.31%	100%				
TAMAULIPAS	100%	100%	99.31%	100%	100%			
VERACRUZ	100%	100%	99.31%	100%	100%	100%		
SINALOA	100%	100%	99.30%	100%	100%	100%	100%	
YUCATÁN	100%	100%	99.30%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 7. Porcentajes de similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *subolesina*. Se utilizó el programa SIAS, Secuences Identites and Similarities.

AISLADOS	ABA62328.1	CHIAPAS	NAYARIT	QUERÉTARO	TAMAULIPAS	VERACRUZ	SINALOA	YUCATÁN
ABA62328.1	100%							
CHIAPAS	100%	100%						
NAYARIT	100%	100%	100%					
QUERÉTARO	100%	100%	100%	100%				
TAMAULIPAS	100%	100%	100%	100%	100%			
VERACRUZ	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
SINALOA	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
YUCATÁN	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Para *voraxina* el mapa bioinformático nos muestra el resumen de las características de interés con que cuenta esta secuencia, lo cual puede observarse en la figura 9.

AFQ98381.1 voraxin alpha-like protein, partial [Rhipicephalus microplus]

10 20 30 40 50 60
MLIAKDLMQS **GGGNKTYCIS** INLAVLKFTT NAGSLSFANS SHCDESEDEVA YSELCQMSNA
70 80 90 100 110 120
VHVYDMNWMT **ASLKASRKLY** TFEKAEMLLS KVLFLKAWFP **SLCVAAFHAE LDTVGEACP**
130
QSEQYARLLS VRKGLP

Figura 9. Mapa de la secuencia de *voraxina*. En color amarillo indica el codón de inicio y el codón de paro. En color rojo se presenta los iniciadores. En negro remarcado representa los péptidos seleccionados. No presenta péptido señal ni hélice transmembranal y no presenta dominios.

El alineamiento múltiple de *voraxina* se realizó con cinco secuencias de diferente origen más la secuencia de referencia AFQ98381.1, las secuencias corresponden a los aislados provenientes de Nayarit, Querétaro, Sinaloa, la cepa Minitas-Texas de Estados Unidos y la cepa Media Joya, Figura 10. Se observó un porcentaje promedio de 98.69 para identidad y un 96.73% para similitud, entre las diferentes secuencias de aminoácidos. Las secuencias de los cuatro aislados mexicanos presentan una identidad y similitud del 100%, mientras que la cepa de Estados Unidos presenta identidad y similitud del 97.82% (Tabla 8).

```

TEXAS          GSLSFANSSHCDESEDEVAYSELQCISNAVHVYDMNWMTASLKTSRKLYTFEKAEMLLSKV
AFQ98381.1    GSLSFANSSHCDESEDEVAYSELQMSNAVHVYDMNWMTASLKASRKLYTFEKAEMLLSKV
MEDIAJOYA     GSLSFANSSHCDESEDEVAYSELQMNNAVHVYDMNWMTASLKASRKLYTFEKAEMLLSKV
NAYARIT       GSLSFANSSHCDESEDEVAYSELQMNNAVHVYDMNWMTASLKASRKLYTFEKAEMLLSKV
QUERETARO     GSLSFANSSHCDESEDEVAYSELQMNNAVHVYDMNWMTASLKASRKLYTFEKAEMLLSKV
SINALOA       GSLSFANSSHCDESEDEVAYSELQMNNAVHVYDMNWMTASLKASRKLYTFEKAEMLLSKV
*****:.******:*****

TEXAS          LFLKAWFPLCVAAFHAELDTVDGEACPQSEQ
AFQ98381.1    LFLKAWFPLCVAAFHAELDTVDGEACPQSEQ
MEDIAJOYA     LFLKAWFPLCVAAFHAELDTVDGEACPQSEQ
NAYARIT       LFLKAWFPLCVAAFHAELDTVDGEACPQSEQ
QUERETARO     LFLKAWFPLCVAAFHAELDTVDGEACPQSEQ
SINALOA       LFLKAWFPLCVAAFHAELDTVDGEACPQSEQ
*****

```

Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *voraxina* de los aislados de Nayarit, Querétaro, Sinaloa, la cepa Minutas-Texas de Estados Unidos y la cepa Media Joya y la cepa de referencia AFQ98381.1. En amarillo se encuentran marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para este gen. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

Tabla 8. Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes México y de Estados Unidos para *voraxina*. Se utilizó el programa SIAS, Secuencias Identites and Similarities.

AISLADOS	AFQ98381.1	MEDIA JOYA	NAYARIT	QUERÉTARO	SINALOA	TEXAS
AFQ98381.1	100%					
MEDIA JOYA	98.91%	100%				
NAYARIT	98.91%	100%	100%			
QUERÉTARO	98.91%	100%	100%	100%		
SINALOA	98.91%	100%	100%	100%	100%	
TEXAS	97.82%	96.73%	96.73%	96.73%	96.73%	100%

Para *bm86* y *bm95* el mapa bioinformático nos muestra el resumen de las características de interés con que cuenta esta secuencia, lo cual puede observarse en las figuras 11 y 12.

ADQ19690.1 Bm86 glycoprotein [*Rhipicephalus microplus*]

10 20 30 40 50 60
 MRGIALFVAA VSLIVECTAE SS **ICSDFGNE** **FCRNAECEVV** **PGAEDNFVCK** **CPRDNMYFNA**
 70 80 90 100 110 120
AEKQCEYKDT CK**TRECSYGR** CVESNPS**KGS** **CVCEASDDL**T LQCKIKNDFA TDCRNRGGTA
 130 140 150 160 170 180
 KLRTDGFIGA TCDCGEWGAM NKTTRNCVPT TCLRPDLTCK DLCEKNLLQR DSRCCQGWNT
 190 200 210 220 230 240
 ANCSAAPPAD SYCSPGSPKG PDGQCKNA**CR** **TKEAGFVCKH** **GCRSTDKAYE** **CTCPSGSTVA**
 250 260 270 280 290 300
EDGITCKSIS **YTVSCTVEQK** **QTCRPTEDCR** **VQKGTVLCEC** **PWNQHLVGD**T **CI**SDCVDKKC
 310 320 330 340 350 360
 HEEFMDCGVY MNRQSCYCPW KSRKPGPNVN INECLLNEY YTVSFTPNIS FDS DHCKRYE
 370 380 390 400 410 420
 DRVLEAIRS **IGKEVFKVEI** **LNCT**QDIKAR LIAEKPLSKY VLRKLQACEH PIGEWCMMP
 430 440 450 460 470 480
 KLLVKNSAT EIEEENLCDS LLKNQEAA YK GQNKCVKVDN LFWFQCADGY TTTYEM**TRGR**
 490 500 510 520 530 540
LRRSVCKAGV **SCNENEQ**LEC ANKGQICVYE **NGKANCQPP** **DTKPGEIG**CI **ERTTCNPKEI**
 550 560 570 580 590 600
QECQDKKLEC VYKNHKAECK CPDDHECSRE PAKDSCSEED NGKCQSSGQR CVMENGNVAVC
 610 620 630 640 650
 KEKSDATTAS TTTTKAKDKD PDPEKSSAAA VSATGLLLLL AATSVTAAS**L**

Figura 11. Mapa de la secuencia *bm86*. En color amarillo indica el codón de inicio y el codón de paro. En color rojo se presenta los iniciadores. En color verde se presentan cuatro dominios. En negro remarcado representa los péptidos seleccionados. No presenta péptido señal ni hélice transmembranal.

AAD38381.2 Bm95 protein [*Rhipicephalus microplus*]

```

      10           20           30           40           50           60
MRGIALFVAA VSLIVEGTAÆ SS ICSDFGNE FCRNAECEVV PGAEDDFVCK CPRDNMYFNA

      70           80           90           100          110          120
AEKQCEYKDT CKTRECSYGR CVESNPSKGS CVCERSDDLTLQCKIKNDYA TDCRNRGGTA

     130          140          150          160          170          180
KLRTDGFIGA TCDCGEWGAM NKTTRNCVPT TCLRPDLTCK DLCEKNLLQR DSRCCQGWNT

     190          200          210          220          230          240
ANCSAAPPAD SYCSPGSPKG PDGQCKNCR TKEAGFVCKH GCRSTDKAYE CTCPSGSTVA

     250          260          270          280          290          300
EDGITCKSIS YTVSCTVEQK QTCRPTEDCR VQKGTVLCEC PWNQHVLGDT CISDCVDDKKC

     310          320          330          340          350          360
HEEFMDCGVY MNRQSCYCPW KSRKPGPNVN INERLLNEY YTVSFTPNIS FSDDHCKRYE

     370          380          390          400          410          420
DRVLGAIRTS IGKEVFKVEI LNCTQDIKAR LIAEKPLSKY VLRKLQACEH PIGEWCMMP

     430          440          450          460          470          480
KLLIKNSAT EIEEENLCDS LLKNQEAAVK GQNKCVKVDN LFWFQCADGY TTTYEMTRGR

     490          500          510          520          530          540
LRRSVCKAGV SCNENEQLEC ANKGQICVYE NGKANCQCPP DTKPGEIGCI ERTTCNPKEI

     550          560
QECQDKKLEC VYKNHKAECK CPDDHECSR

```

Figura 12. Mapa de la secuencia de *bm95*. En color amarillo indica el codón de inicio y el codón de paro. El color azul representa el péptido señal. En color rojo se presenta los iniciadores. En negro remarcado representa los péptidos seleccionados. En verde se representan los cuatro dominios. No presenta hélice transmembranal.

La información utilizada para el alineamiento múltiple para *bm86* y *bm95* es la misma, debido a que el segmento secuenciado coincide para ambos. Para el alineamiento se utilizó el aislado proveniente de Tamaulipas, la secuencia de la cepa Media Joya obtenida del transcriptoma de *R. microplus* y la cepa de referencia ADQ19690.1, (Figura 13). El porcentaje promedio de identidad fue del 99.39%,

mientras que para la similitud el porcentaje fue del 99.59%, como se observa en la tabla 9.



Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de los genes *bm86* y *bm95* de los aislados de Tamaulipas, Media Joya y la cepa de referencia ADQ19690.1. En amarillo se encuentran marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para estos genes. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

Tabla 9. Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados para *bm86* y *bm95*. Se utilizó el programa SIAS, Secuencias Identites and Similarities.

AISLADOS	TAMAULIPAS	MEDIAJOYA	ADQ19690.1
TAMAULIPAS	100%		
MEDIA JOYA	99.09%	100%	
ADQ19690.1	100%	99.09%	100%

Para *bmvdac* el mapa bioinformático nos muestra el resumen de las características de interés con que cuenta esta secuencia, lo cual puede observarse en la figura 14.

ADT82652.1mitochondrial voltage dependent anion-selective channel, partial [*Rhipicephalus microplus*]



Figura 14. Secuencia de aminoácidos que conforman la secuencia de *bmvdac* utilizada como cepa de referencia, en color amarillo se indica la ubicación del codón de inicio y de paro, el color rojo indica la ubicación de los iniciadores sentido y antisentido, en color verde está indicando el dominio E7CF11. En negro remarcado se presentan los péptidos seleccionados. No existe péptido señal y no hay hélice transmembranal.

Para el alineamiento múltiple de *bmvdac*, se analizaron ocho aislados de *R. microplus* además de la secuencia de referencia reportada en GenBank (Figura 15). En donde se observan las zonas conservadas entre las diferentes secuencias, los aislados que presentan diferencias en este alineamiento son, Jalisco, Tabasco, Sinaloa, Nayarit y Chiapas, las cuales presentan solamente un aminoácido diferente.

```

QUERETARO      MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
NAYARIT        MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
JALISCO        MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVGLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
GUERRERO       MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
TABASCO        MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
TAMAULIPAS    MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
CHIAPAS        MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
SINALOA        MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
GU994210.1    MAPPCYADLGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGETSLNDTGKVNASLETK
*****

QUERETARO      YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
NAYARIT        YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
JALISCO        YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
GUERRERO       YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
TABASCO        YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
TAMAULIPAS    YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
CHIAPAS        YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
SINALOA        YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
GU994210.1    YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSGALKAAAYKFD
*****

QUERETARO      NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
NAYARIT        NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
JALISCO        NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
GUERRERO       NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
TABASCO        NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
TAMAULIPAS    NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
CHIAPAS        NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
SINALOA        NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
GU994210.1    NVHLNGDVDLGGPPGFLVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
*****

QUERETARO      TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
NAYARIT        TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
JALISCO        TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
GUERRERO       TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
TABASCO        TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
TAMAULIPAS    TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
CHIAPAS        TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
SINALOA        TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
GU994210.1    TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQOTGVQLAWTAGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSG
*****

QUERETARO      QIGLGFTHRLRPGI
NAYARIT        QIGLGFTHRLRPGI
JALISCO        QIGLGFTHRLRPGI
GUERRERO       QIGLGFTHRLRPGI
TABASCO        QIGLGFTHRLRPGI
TAMAULIPAS    QIGLGFTHRLRPGI
CHIAPAS        QIGLGFTHRLRPGI
SINALOA        QIGLGFTHRLRPGI
GU994210.1    QIGLGFTHRLRPGI
*****

```

Figura 15. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *bmvdc* de los aislados de Jalisco, Tabasco, Chiapas, Nayarit, Querétaro, Tamaulipas, Guerrero, Sinaloa y la cepa de referencia GU994210.1. En amarillo están marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para este gen. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

En promedio se observa un porcentaje del 99.79% de identidad y similitud entre las nueve secuencias de *bmvdc*. En seis de las nueve secuencias utilizadas provenientes de las diferentes zonas geográficas de México, se observó un porcentaje tanto de identidad como de similitud del 99.87 % en las secuencias de aminoácidos de Chiapas, Nayarit, Media Joya, Querétaro, Tamaulipas y Guerrero. En las secuencias provenientes de Jalisco, Tabasco y Sinaloa presentaron el

99.56% en identidad y similitud. En promedio se observa un porcentaje de variabilidad de 0.21% entre las secuencias de *bmvdac*, como se indica en tabla 10.

Tabla 10. Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *bmvdac*. Se utilizó el programa SIAS, Secuencias Identites and Similarities.

AISLADOS	QUERÉTARO	NAYARIT	JALISCO	GUERRERO	TABASCO	TAMAULIPAS	CHIAPAS	SINALOA	GU994210.1.
QUERÉTARO	100%								
NAYARIT	100%	100%							
JALISCO	99.60%	99.60%	100%						
GUERRERO	100%	100%	99.60%	100%					
TABASCO	99.60%	99.60%	99.21%	99.60%	100%				
TAMAULIPAS	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%			
CHIAPAS	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%	100%		
SINALOA	99.60%	99.60%	99.21%	99.60%	99.21%	99.60%	99.60%	100%	
GU994210.1.	100%	100%	99.60%	100%	99.60%	100%	100%	99.60%	100%

Para *Serpina* el mapa bioinformático nos muestra el resumen de las características de interés con que cuenta esta secuencia, lo cual puede observarse en la figura 16.

AHC98662.1 serine protease inhibitor 11 RmS11 [*Rhipicephalus microplus*]

10 20 30 40 50 60
 MAVNQLRDSV LNFAVIILYQK LPPEGRDRRN IFFSPFSISA ALSMALGGAR NPTAEELQTV
 70 80 90 100 110 120
 LRVPDDVQIH RIFSDFPSKL KSYAADVKLR IANRMYCEQT FPVLASYLSL LRDSYGATIE
 130 140 150 160 170 180
 SVDFKGDREA VRLQANAVK ERETEYKIKDL LGGGSVNAGT TLILINAIYF KQLMASQFKP
 190 200 210 220 230 240
 DATRPSDFHL DSKSKKKVEN MFRKDRISTA RQQLDVEAL EITTYQNKTS MVILAPDVE
 250 260 270 280 290 300
 SLKLEERLT ASKLSALLN LGGFADVELY LPEKLEQVI SLKEVLENG IDEFSSIAL
 310 320 330 340 350 360
 LQISEKTKL AASEVYKAF VEYNEECTEA AAATAVMMVA CCMSSLPPRY YKFIYDRPFM
 370 380
 FVIRSRDPL VLFMGSVDDI

Figura 16. Secuencia de aminoácidos que conforman la secuencia de *serpina* utilizada como cepa de referencia, en color amarillo se indica la ubicación del codón de inicio y de paro, el color rojo indica la ubicación de los iniciadores sentido y antisentido, en color verde está indicando el dominio SERPIN. En negro remarcado se presentan los péptidos seleccionados. No existe péptido señal y no hay hélice transmembranal.

En el alineamiento múltiple del gen *serpina* se utilizaron tres secuencias, una proveniente de Chiapas, la Media Joya obtenida del transcriptoma de *R. microplus*, así como la cepa de referencia AHC98662 (Figura 17). El porcentaje promedio de identidad fue del 98.21 y de similitud fue del 98.81%, como se aprecia en la tabla 11.

```

MEDIAJOYA      YCEQTFPVLASYLSLLRDSYGATIESVDFKGDHEAVRLQANAWVERETEYKIKDLLPGGS
AHC98662      YCEQTFPVLASYLSLLRDSYGATIESVDFKGDHEAVRLQANAWVERETEYKIKDLLPGGS
CHIAPAS       YCEQTFPVLASYLSLLRDSYGATIESVDFKGDHEAVRLQANAWVERETGYKIKDLLPGGS
*****
MEDIAJOYA      VNAGTTLILINAIYFKGLWASQFKPDATRPSPDFHLDKSKKKVEMMFHKDRYRTARCQEL
AHC98662      VNAGTTLILINAIYFKGLWASQFKPDATRPSPDFHLDKSKKKVEMMFHKDRYSTARCQEL
CHIAPAS       VNAGTTLILINAIYFKGLWASQFKPDATRPSPDFHLDKSKKKVEMMFHKDRYSTARCQEL
*****
MEDIAJOYA      DVEALEITYQGNKTSMVILRPNDVEGLSKLEERLTASKLASLLDNLCGFADVELYLPKFK
AHC98662      DVEALEITYQGNKTSMVILRPNDVEGLSKLEERLTASKLASLLDNLCGFADVELYLPKFK
CHIAPAS       DVEALEITYQGNKTSMVILRPNDVEGLSKLEERLTASKLASLLDNLCGFADVELYLPKFK
*****
MEDIAJOYA      LEQVVISLKEVLQEMGIKDFSSDADLSGISEKKKLAASEVVHKAFVEVNEEGTEAAAATA
AHC98662      LEQVVISLKEVLQEMGIKDFSSDADLSGISEKKKLAASEVVHKAFVEVNEEGTEAAAATA
CHIAPAS       LEQVVISLKEVLQEMGIKDFSSDADLSGISEKKKLAASEVVHKAFVEVNEEGTEAAAATA
***.*****:***:*****:*****
MEDIAJOYA      VMMVACCMSSLPPRTYKFI VDRP
AHC98662      VMMVACCMSSLPPRTYKFI VDRP
CHIAPAS       VMMVACCMSSLPPRTYKFI VDRC
*****

```

Figura 17. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *serpina* de los aislados de Media Joya, Chiapas y la cepa de referencia AHC98662. En amarillo están marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para este gen. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

Tabla 11. Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *serpina*. Se utilizó el programa SIAS, Secuencias Identites and Similarities.

AISLADOS	AHC98662_1	MEDIA JOYA	CHIAPAS
AHC98662_1	100%		
MEDIA JOYA	98.09%	100%	
CHIAPAS	99.23%	97.33%	100%

Para *chitinasa* el mapa bioinformático nos muestra el resumen de las características de interés con que cuenta esta secuencia, lo cual puede observarse en la figura 17.

JAC58962.1 chitinase_1 [Rhipicephalus microplus]

```

      10      20      30      40      50      60
MELIVLPLAL LLTCALGMPQ QNESGTTST TSPAASSAS ANATTARTGS GAHPGPAFVY
      70      80      90     100     110     120
CYYSAWANSR PHPANYGIKD VSGDLCTHVN FAYAGVNPQT WELKSEVPEF ERNRDLFKNE
     130     140     150     160     170     180
TAIKTQYPQL KTLISVGGWQ HETGIFSQMV ASADRRALFI ESVLLWMKEY NLDGVDMAWR
     190     200     210     220     230     240
FPGVSYRGGG PRDKENYASL IRELAGAFQG KDLLLTVVVP VADEFLLDPGY DVAEISKYVD
     250     260     270     280     290     300
WINAQAYDLR GTWNGVTDVH TPLFPRSIDL GSQATLNVKD GLARIVSEGA PKSKVVMGIA
     310     320     330     340     350     360
FFGRGFTLLD PQQHGLHALI NRDVPPHAGP FVRSSSEIFAY YEICLNKGN WKREFDDEGK
     370     380     390     400     410     420
CPVYYRQW IGYDDAVSIQ HKIDFLLQEG YRGVYVFENND LDDFRGFCGE PNILLKTIKN
      430
GLTEKNELDA RLNQKE

```

Figura 18. Secuencia de aminoácidos que conforman la secuencia de *chitinasa* utilizada como cepa de referencia, en color amarillo se indica la ubicación del codón de inicio y de paro, el color azul indica la presencia de péptido señal, el color rojo indica la ubicación de los iniciadores sentido y antisentido, en color verde está indicando el dominio Glyco 18. En negro remarcado se presentan los péptidos seleccionados. No hay hélice transmembranal.

En el alineamiento múltiple de *chitinasa* se utilizaron tres secuencias, una correspondiente al estado de Querétaro, la segunda fue la cepa Media Joya obtenida mediante el transcriptoma de *R. microplus* y la cepa de referencia JAC58962.1 (figura 19). Se observó un porcentaje promedio de identidad del 99.32 y similitud del 99.84 %, (Tabla 12 y 13).

MEDIAJOYA JAC58962.1 QUERÉTARO
PAPVVCYYSAWANSRPHANYGIKDVSGDLCTHVNFAYAGVNPQTWELKSEVPEFERNRD
PAPVVCYYSAWANSRPHANYGIKDVSGDLCTHVNFAYAGVNPQTWELKSEVPEFERNRD
PAPVVCYYSAWANSRPHANYGIKDVSGDLCTHVNFAYAGVNPQTWELKSEVPEFERNRD

MEDIAJOYA JAC58962.1 QUERÉTARO
LFKNFTAIKTQYPQLKTLLSVGGWQHETGIFSQMVASADRRALFIESVLLWMKEYNLDGV
LFKNFTAIKTQYPQLKTLLSVGGWQHETGIFSQMVASADRRALFIESVLLWMKEYNLDGV
LFKNFTAIKTQYPQLKTLLSVGGWQHETGIFSQMIASADRRALFIESVLLWMKEYNLDGV
*****:*****

MEDIAJOYA JAC58962.1 QUERÉTARO
DMAWRFPVSYRGGSPRDKENYASLIRELAGAFQGKDLVLTVVVPVSDEFDLPGYDVAEI
DMAWRFPVSYRGGSPRDKENYASLIRELAGAFQGKDLLTUVVVPVADEFDLPGYDVAEI
DMAWRFPVSYRGGSPRDKENYASLIRELAGAFQGKDLLTUVVVPVADEFDLPGYDVAEI
*****:*****:*****

MEDIAJOYA JAC58962.1 QUERÉTARO
SKYVDWINAQAYDLRGTWNGVTDVHTPLFPRSIDLGSQATLNVKDGLARIVSLGAPKSKV
SKYVDWINAQAYDLRGTWNGVTDVHTPLFPRSIDLGSQATLNVKDGLARIVSLGAPKSKV
SKYVDWINAQAYDLRGTWNGVTDVHTPLFPRSIDLGSQATLNVKDGLARIVSLGAPKSKV

MEDIAJOYA JAC58962.1 QUERÉTARO
VMGIAFFGRGFTLLDPQQHGLHALINRDVPPHAGPFVRSSEIFAYYEICLNKGN
VMGIAFFGRGFTLLDPQQHGLHALINRDVPPHAGPFVRSSEIFAYYEICLNKGN
VMGIAFFGRGFTLLDPQQHGLHALINRDVPPHAGPFVRSSEIFAYYEICLNKGN

Figura 19. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *chitinasa* de los aislados de Media Joya, Chiapas y la cepa de referencia JAC58962.1. En amarillo están marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para este gen. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

Tabla 12. Porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *chitinasa*. Se utilizó el programa SIAS, Secuencias Identites and Similarities.

AISLADOS	JAC58962.1	MEDIA JOYA	QUERÉTARO
JAC58962.1	100%		
MEDIA JOYA	99.32%	100%	
QUERÉTARO	99.66%	98.98%	100%

Tabla 13. Porcentajes de similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *chitinasa*. Se utilizó el programa SIAS, Secuencias Identites and Similarities.

AISLADOS	JAC58962.1	MEDIA JOYA	QUERÉTARO
JAC58962.1	100%		
MEDIA JOYA	99.66%	100%	
QUERÉTARO	100.00%	99.66%	100%

Para *glutación-s-transferasa* el mapa bioinformático nos muestra el resumen de las características de interés con que cuenta esta secuencia, lo cual puede observarse en la figura 20.

AAD15991.1 glutathione S-transferase [*Rhipicephalus microplus*]



Figura 19. Secuencia de aminoácidos que conforman la secuencia de *glutación-s-transferasa* utilizada como cepa de referencia, en color amarillo se indica la ubicación del codón de inicio y de paro, el color rojo indica la ubicación de los iniciadores sentido y antisentido, en color verde está indicando la presencia de dos dominios. En negro remarcado se presentan los péptidos seleccionados. No hay hélice transmembranal ni péptido señal.

En el alineamiento múltiple de *glutación-s-transferasa* con siete diferentes aislados provenientes de Tamaulipas, Chiapas, Querétaro, Nayarit, Sinaloa, Veracruz, Media Joya, más la cepa de referencia AAD15991.1 (Figura 21). El

porcentaje promedio observado en cuanto a similitud fue de 99.87, mientras que para la identidad el porcentaje promedio fue del 99.82, en ambos parámetros la única secuencia que presento variación fue la correspondiente a la cepa Media Joya con un 99.46%, el resto de las secuencias presentaron un 100% en identidad y similitud, (Tabla 14).

AAD15991.1	MAPVLGYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPPDFDRSSWLNEKTKLGLEFPNL
TAMAULIPAS	MAPVLGYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPPDFDRSSWLNEKTKLGLEFPNL
CHIAPAS	MAPVLGYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPPDFDRSSWLNEKTKLGLEFPNL
QUERÉTARO	MAPVLGYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPPDFDRSSWLNEKTKLGLEFPNL
NAYARIT	MAPVLGYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPPDFDRSSWLNEKTKLGLEFPNL
SINALOA	MAPVLGYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPPDFDRSSWLNEKTKLGLEFPNL
VERACRUZ	MAPVLGYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPPDFDRSSWLNEKTKLGLEFPNL
MEDIAJOYA	MAPVLGYWDIRGLAQPIRLLLAHVDAKVDDKRYTCGPPPDFDRSSWLNEKTKLGLEFPNL

AAD15991.1	PYYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLEGKTEAEKQQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDF
TAMAULIPAS	PYYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLEGKTEAEKQQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDF
CHIAPAS	PYYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLEGKTEAEKQQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDF
QUERÉTARO	PYYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLEGKTEAEKQQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDF
NAYARIT	PYYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLEGKTEAEKQQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDF
SINALOA	PYYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLEGKTEAEKQQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDF
VERACRUZ	PYYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLEGKTEAEKQQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDF
MEDIAJOYA	PYYIDGDVKLTQSMAILRYLARKHGLEGKTEAEKQQRVDVSEQQFADFRMNWVRLCYNPDF

AAD15991.1	EKLKGDYLNLPASLKAFFSDYLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILIFAPDCLKDFAN
TAMAULIPAS	EKLKGDYLNLPASLKAFFSDYLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILIFAPDCLKDFAN
CHIAPAS	EKLKGDYLNLPASLKAFFSDYLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILIFAPDCLKDFAN
QUERÉTARO	EKLKGDYLNLPASLKAFFSDYLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILIFAPDCLKDFAN
NAYARIT	EKLKGDYLNLPASLKAFFSDYLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILIFAPDCLKDFAN
SINALOA	EKLKGDYLNLPASLKAFFSDYLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILIFAPDCLKDFAN
VERACRUZ	EKLKGDYLNLPASLKAFFSDYLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILIFAPDCLKDFAN
MEDIAJOYA	EKLKGDYLNLPASLKAFFSDYLGTHKFFAGDNLTYVDFIAYEMLAQHILIFAPDCLKDFAN
	***** :
AAD15991.1	LKAFVDRIEALPHVAAAY
TAMAULIPAS	LKAFVDRIEALPHVAAAY
CHIAPAS	LKAFVDRIEALPHVAAAY
QUERÉTARO	LKAFVDRIEALPHVAAAY
NAYARIT	LKAFVDRIEALPHVAAAY
SINALOA	LKAFVDRIEALPHVAAAY
VERACRUZ	LKAFVDRIEALPHVAAAY
MEDIAJOYA	LKAFVDRIEALPHVAAAY

Figura 20. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *glutación-s-transferasa* de los aislados de Tamaulipas, Chiapas, Querétaro, Nayarit, Sinaloa, Veracruz, Media Joya y la cepa de referencia AAD15991.1. En amarillo están marcadas las regiones conservadas de las diferentes secuencias para este gen. Se utilizó el programa CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment.

Tabla 14. Porcentajes de identidad y similitud entre las secuencias de aminoácidos de los aislados provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana para *glutathion-s-transferasa*. Se utilizó el programa SIAS, Secuences Identites and Similarities.

AISLADOS	AAD15991.1	MEDIA JOYA TAMAULIPAS	CHIAPAS	QUERÉTARO	NAYARIT	SINALOA	VERACRUZ
AAD15991.1	100%						
MEDIA JOYA	99.49%	100%					
TAMAULIPAS	100%	99.49%	100%				
CHIAPAS	100%	99.49%	100%	100%			
QUERÉTARO	100%	99.49%	100%	100%	100%		
NAYARIT	100%	99.49%	100%	100%	100%	100%	
SINALOA	100%	99.49%	100%	100%	100%	100%	100%
VERACRUZ	100%	99.48%	100%	100%	100%	100%	100%

En total se obtuvieron las secuencias de 41 aislados con los diferentes genes utilizados en el presente proyecto de investigación. los cuales, al representar información generada por primera vez en México, serán una importante aportación para la base de datos del GenBank.

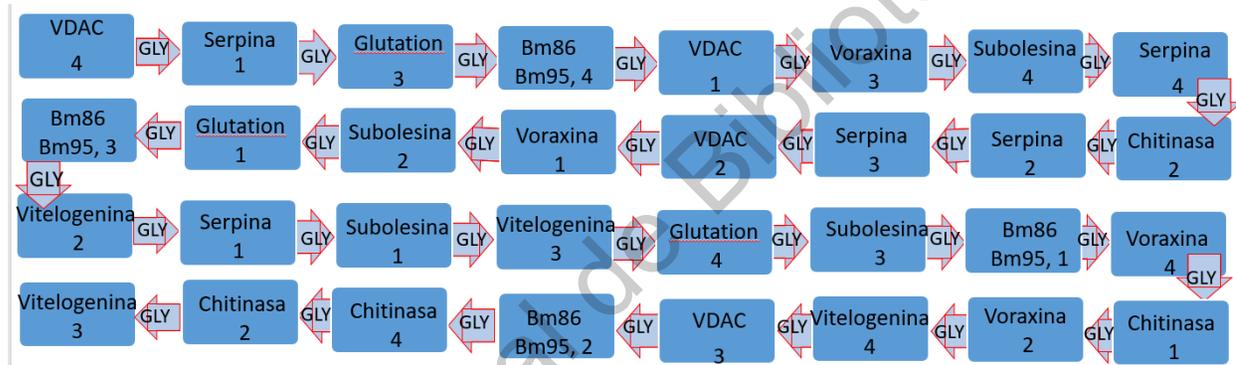
Los péptidos seleccionados fueron cuatro por proteína, sin embargo, para Bm86 y Bm95 los péptidos son los mismos para ambos, debido a que la secuencia de donde se obtuvieron dichos péptidos comparten la misma identidad y similitud, razón por la cual se obtuvieron un total de 32 péptidos, los cuales pueden observarse en la tabla 15.

Tabla 15. Péptidos seleccionados

Nombre del péptido	Secuencia	Tamaño	Localización
BmVDAC 1	ASLETKYKVPEYGLTLKEK	19	55-73
BmVDAC 2	DNTLSTEICSEEKLARGL	18	77-94
BmVDAC 3	GALKAAYKFDNVHLNGDVDL	20	111-130
BmVDAC 4	HTNVNDGQEFAGSVFQRVNP	20	180-199
Bm86 y Bm95 1	AIRTSIGKEVFKVEILNCT	19	365-384
Bm86 y Bm95 2	TRGRLRRSVCKAGVSCNEN	23	477-495
Bm86 y Bm95 3	NGKANCQCPPDTKPGEIG	18	511-528
Bm86 y Bm95 4	RTTCNPKEIQECQDKK	16	532-547
Subolesina1	DWDPLHSPSGRSPKRRRCMP	20	11-30
Subolesina2	RAHQIDPSPFGDVPPKLT	18	37-54
Subolesina3	DPESQHTSGLSSPVHRDQP	19	81-99
Subolesina4	CERMMKERESKIREEYDH	18	110-128
Voraxina1	MQSGGGNKTYCISINL	16	9-23
Voraxina2	MNWMTASLKASRKLYTF	17	66-82
Voraxina 3	FPSLCVAAFHAELDTVDGEACP	21	99-120
Voraxina4	VDGEACPQSEQYARLL	16	114-120
Chitinasa1	CYYSANVANSRPHANYGIKDV	20	61-81
Chitinasa2	SADRRALFIESVLLWMKEYNLD	21	153-173
Chitinasa3	AYDLRGTWNGVTDVHPLFP	20	246-266
Chitinasa4	LKGNWKREFDDEGKCPYVYYR	20	348-368
Glutation-S- Transferasa1	ARKHGLEGKTEAEKQRVDVSE	21	81-91
Glutation-S- Transferasa2	DFIAYEMLAQHLIFAPDCLKD	21	157-177
Glutation-S- Transferasa3	FANLKAFVDRIEALPHVAAYL	21	178-198
Glutation-S- Transferasa4	AAYLKSDKCIKWPLNGDMAS	20	195-214
Vitelogenina1	NKTLVKHVLNVTLEGKHEGSL	21	29-49
Vitelogenina2	FVLTYNATKTVQQLKGLHAYD	21	130-150
Vitelogenina3	LYNATKTVQQLKGLHAYDATP	22	132-153
Vitelogenina4	QCLADQYAGNTVSYACRLATV	21	161-175
Serpina1	YLSLLRDSYGATIESVDFKGD	21	107-127
Serpina2	ERETEKIKDLLPGGSVNAGTT	22	140-161
Serpina3	FKPDATRPSDFHLDSKSKKKV	21	178-198
Serpina 4	TEAAAATAVMMVACCMSSLPPR	22	328-350

La proteína quimérica resultante de los diferentes análisis bioinformáticos se muestra en la tabla 16. Está compuesta por 32 péptidos y un total de 652 aminoácidos, la cual las características idóneas para ser utilizada como una vacuna multiantigénica y multiepitópica contra garrapatas *R. microplus*.

Tabla 16. Diseño de proteína quimérica para ser utilizada como vacuna multiantigénica y multiepitópica contra *R. microplus*.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo representa la primera investigación respecto a la caracterización de la variabilidad alélica entre aislados de *R. microplus* de diferentes estados de México para los genes *vitelogenina*, *subolesina*, *voraxina*, *bm86*, *bm95*, *bmvdac*, *serpina*, *chitinasa* y *glutación-s-transferasa*, considerados como antígenos vacunales contra la garrapata tropical del ganado. De acuerdo a lo reportado por Kaewmongkol *et al.* 2015, la variabilidad en la secuencia obtenida de la garrapata *R. microplus* para Bm86 es una posible explicación referente al rango de eficacia presentada en la vacuna contra este parásito, utilizando como antígeno la proteína recombinante Bm86. Debido a esto, para amplificar los nueve genes utilizados en la presente investigación, se seleccionaron aislados representativos de diferentes áreas geográficas de México, para de esta manera determinar la variabilidad entre las secuencias provenientes de diferentes estados del país.

Las secuencias obtenidas de los 41 aislados con los diferentes genes utilizados en el presente proyecto de investigación, representan información generada por primera vez en México y en el mundo, lo cual significa una importante aportación tanto para la base de datos del GenBank como para la integración de nuevos candidatos vacunales contra *R. microplus*.

De acuerdo a los datos publicados por García-García *et al.* 1999, la variabilidad superior al 3.4% entre las diferentes secuencias es suficiente para producir una respuesta inmune ineficiente, por lo que es importante destacar que la variabilidad entre las secuencias de aminoácidos de los aislados en el presente estudio fue el siguiente para los diferentes genes; para *vitelogenina* no se observó variabilidad, ya que las secuencias presentaron un 100% de identidad y similitud. Para *subolesina* se observa una variabilidad del 0.13%. Para *voraxina* se observa

el 1.31% de variabilidad en identidad y el 1.23% de variabilidad en similitud. Para *bm86* y *bm95* la variabilidad promedio fue de 0.67% respecto a la identidad y 0.41 para similitud. Para *bmvdac* se obtuvo una variabilidad de 0.21%. Para *serpina* se obtuvieron porcentajes promedio de identidad del 1.79 y 1.2 para similitud. Para *chitinasa* se obtuvo un 0.68% de identidad y un 0.16% para similitud, por último, para *glutación-s-transferasa* se obtuvo un promedio de 0.13% para identidad y un 0.12% para similitud y, por consiguiente, con este análisis se considera que *vitelogenina*, *subolesina*, *voraxina*, *bm86*, *bm95*, *bmvdac*, *serpina*, *chitinasa* y *glutación-s-transferasa* son antígenos que se encuentran conservados en secuencias definidas de las poblaciones de *R. microplus* de las diferentes zonas geográficas del país.

Considerando la baja variabilidad alélica presentada entre las secuencias de los aislados de *R. microplus* de los diferentes estados de México, se concluye que *vitelogenina*, *subolesina*, *voraxina*, *bm86*, *bm95*, *bmvdac*, *serpina*, *chitinasa* y *glutación-s-transferasa* utilizados en la presente investigación son antígenos que presentan secuencias altamente conservadas en aislados de México, por lo que pueden ser considerados como potenciales candidatos vacunales de acuerdo a lo reportado por Freeman et al. 2010, donde sugiere que existe una correlación inversa entre la eficacia de la vacuna y la variación del locus; por lo tanto, esta información es relevante para la selección de antígenos empleados en las vacunas contra garrapatas *R. microplus*. Se sugiere la realización de evaluaciones *in vivo* tanto de los péptidos en forma individual como en su conjunto como proteína quimérica integrada por los 32 péptidos, para determinar su efectividad como inmunógenos.

CAPITULO VIII

7.1 CONCLUSIONES GENERALES

Este reporte representa la primera investigación respecto al grado de conservación entre aislados de *R. microplus* de diferentes estados de México para cada uno de los genes utilizados, los cuales tienen la característica de ser antígenos vacunales contra garrapatas.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación demuestran que conocer la variabilidad alélica de las secuencias de los aislados de diferentes zonas geográficas es una excelente estrategia para ser utilizada al proyectar la inclusión de una vacuna para el control de la garrapata. El conocer el grado de conservación de las secuencias, es una herramienta de gran importancia para la toma de decisiones en el desarrollo de vacunas, y de esta manera lograr el desarrollo de antígenos vacunales que brinden una respuesta inmune óptima De acuerdo a lo reportado por Kaewmongkol *et al.* 2015. La posible explicación referente al rango de eficacia en las vacunas contra *R. microplus* elaboradas a partir de la proteína completa de Bm86 fue la variabilidad existente en la secuencia utilizada. De acuerdo a García-García *et al.* 1999, una variabilidad del 3.4% en la secuencia de Bm86 entre las diferentes cepas puede ser suficiente para ocasionar una respuesta inmune ineficiente. Esto sugiere que un candidato vacunal debe ser conservado en su secuencia de aminoácidos entre las distintas cepas o aislados para poder ser eficaz. Por lo que la información presentada en este trabajo de investigación es de gran relevancia para su utilización en el desarrollo exitoso de vacunas contra *R. microplus*. Por lo que es de suma importancia continuar con las investigaciones para la evaluación de los péptidos y de la proteína quimérica *in vivo*, para determinar su efectividad como inmunógenos.

CAPITULO IX

9.1 REFERENCIAS

- Abbas, R.Z., Zaman, M.A., Colwell, D.D., Gilleard, J., Iqbal, Z., 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. *Vet. Parasitol.* 203, 6–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- Agbede, R.I.S., Kemp, D.H., 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: Histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. *Int. J. Parasitol.* 16, 35–41. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(86\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0020-7519(86)90062-7)
- Aguirre, A. de A.R., Lobo, F.P., Cunha, R.C., Garcia, M.V., Andreotti, R., 2016. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Vet. Parasitol.* 221, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.032>
- Almazán, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., de la Fuente, J., 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21, 1492–1501.
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F., de la Fuente, J., 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol. Res.* 106, 471–479. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1689-1>
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A., 2008. Biology of ticks. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22, 195–215, v. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>
- Antunes, S., Merino, O., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Bell-Sakyi, L., Fragkoudis, R., Weisheit, S., Pérez de la Lastra, J.M., Alberdi, P., Domingos, A., de la Fuente, J., 2014a. Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasit. Vectors* 7, 42. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-42>
- Antunes, S., Merino, O., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Bell-Sakyi, L., Fragkoudis, R., Weisheit, S., Pérez de la Lastra, J.M., Alberdi, P., Domingos, A., de la Fuente, J., 2014b. Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasit. Vectors* 7, 42. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-42>
- Barrett, A.D.T., Stanberry, L.R., 2009. *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. Academic Press.

- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M., de la Fuente, J., 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine* 15, 414–422.
- Centers for Disease Control Parasites and Health, 2017. CDC - DPDx - Ticks [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html> (accessed 4.30.18).
- Chmelař, J., Kotál, J., Karim, S., Kopacek, P., Francischetti, I.M.B., Pedra, J.H.F., Kotsyfakis, M., 2016. Sialomes and Mialomes: A Systems-Biology View of Tick Tissues and Tick-Host Interactions. *Trends Parasitol.* 32, 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.10.002>
- Coons, L.B., Tarnowski, B., Ourth, D.D., 1982. *Rhipicephalus sanguineus*: Localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. *Exp. Parasitol.* 54, 331–339. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(82\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0014-4894(82)90042-X)
- da Silva Vaz, I., Moraes Martinez, R.H., Oliveira, A., Heck, A., Logullo, C., Gonzales, J.C., Dewes, H., Masuda, A., 1996. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet. Parasitol.* 62, 155–160. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00851-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00851-9)
- de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 23–28. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001193>
- De La Fuente, J., Kocan, K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 28, 275–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x>
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev. Vaccines* 2, 583–593. <https://doi.org/10.1586/14760584.2.4.583>
- de la Fuente, J., Maritz-Olivier, C., Naranjo, V., Ayoubi, P., Nijhof, A.M., Almazán, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Galindo, R.C., Blouin, E.F., Gortazar, C., Jongejan, F., Kocan, K.M., 2008. Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC Genomics* 9, 372. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-372>
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A., 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 183, 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.028>
- Fernández-Salas, Agustín, Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.Á., 2012. Resistance of *Rhipicephalus microplus* to amitraz and cypermethrin in tropical cattle farms in Veracruz, Mexico. *J. Parasitol.* 98, 1010–1014. <https://doi.org/10.1645/GE-3074.1>

- Freeman, J.M., Davey, R.B., Kappmeyer, L.S., Kammlah, D.M., Olafson, P.U., 2010. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasit. Vectors* 3, 101. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-101>
- García-García, J.C., Gonzalez, I.L., González, D.M., Valdés, M., Méndez, L., Lamberti, J., D'Agostino, B., Citroni, D., Fragoso, H., Ortiz, M., Rodríguez, M., de la Fuente, J., 1999. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp. Appl. Acarol.* 23, 883–895.
- García-García, J.C., Soto, A., Nigro, F., Mazza, M., Joglar, M., Hechevarría, M., Lamberti, J., de la Fuente, J., 1998. Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine* 16, 1053–1055.
- García-García, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., Rodríguez, M., Joglar, M., Machado, H., González, I.L., Valdés, M., Méndez, L., de la Fuente, J., 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 18, 2275–2287. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00548-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00548-4)
- Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L., Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129 Suppl, S427-442.
- Guerrero, Felix David, Lovis, L., Martins, J.R., 2012. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária Braz. J. Vet. Parasitol. Órgão Of. Colégio Bras. Parasitol. Veterinária* 21, 1–6.
- Guerrero, Felix D., Miller, R.J., Pérez de León, A.A., 2012. Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *Int. J. Parasitol.* 42, 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.04.003>
- Hajdusek, O., Almazán, C., Loosova, G., Villar, M., Canales, M., Grubhoffer, L., Kopacek, P., de la Fuente, J., 2010. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine* 28, 2993–2998. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.008>
- Imamura, S., Namangala, B., Tajima, T., Tembo, M.E., Yasuda, J., Ohashi, K., Onuma, M., 2006. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine* 24, 2230–2237. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.10.055>
- Jonsson, N.N., 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.* 137, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>
- Kaewmongkol, S., Kaewmongkol, G., Inthong, N., Lakkitjaroen, N., Sirinarumit, T., Berry, C.M., Jonsson, N.N., Stich, R.W., Jittapalapong, S., 2015. Variation among Bm86 sequences in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* ticks

- collected from cattle across Thailand. *Exp. Appl. Acarol.* 66, 247–256. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9897-0>
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Kumar, A., Garg, R., Yadav, C.L., Vatsya, S., Kumar, R.R., Sugumar, P., Chandran, D., Mangamoorig, L.N., Bedarkar, S.N., 2009. Immune responses against recombinant tick antigen, Bm95, for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in cattle. *Vet. Parasitol.* 165, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.030>
- Livestock in food security, 2011. *World Livestock*. URL <http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e00.htm> (accessed 8.9.16).
- Lovis, L., Reggi, J., Berggoetz, M., Betschart, B., Sager, H., 2013. Determination of Acaricide Resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Field Populations of Argentina, South Africa, and Australia with the Larval Tarsal Test. *J. Med. Entomol.* 50, 326–335. <https://doi.org/10.1603/ME12127>
- Manjunathachar, H.V., Saravanan, B.C., Kesavan, M., Karthik, K., Rathod, P., Gopi, M., Tamilmahan, P., Balaraju, B.L., 2014. Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4, S770–S779. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60725-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60725-8)
- Marisela Soares et al. .2016, n.d.
- Marquardt, W.C., 2005. *Biology of disease vectors*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Rosario-Cruz, R., Rodríguez, S., Domingos, A., de la Fuente, J., 2013. Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine* 31, 5889–5896. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.037>
- Mulenga, A., Kim, T.K., Ibelli, A.M.G., 2013. Deorphanization and target validation of cross-tick species conserved novel *Amblyomma americanum* tick saliva protein. *Int. J. Parasitol.* 43, 439–451. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.12.012>
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Onuma, M., 2000. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 2, 1353–1361.
- 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. *Infect. Immun.* 67, 1652–1658.
- Nijhof, A.M., Taoufik, A., de la Fuente, J., Kocan, K.M., de Vries, E., Jongejan, F., 2007. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and

- subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Int. J. Parasitol.* 37, 653–662. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.005>
- Nuttall, P.A., 1998. Displaced tick-parasite interactions at the host interface. *Parasitology* 116 Suppl, S65-72.
- Parizi, L.F., Githaka, N.W., Logullo, C., Konnai, S., Masuda, A., Ohashi, K., da Silva Vaz, I., 2012. The quest for a universal vaccine against ticks: cross-immunity insights. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 194, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.023>
- Parizi, L.F., Pohl, P.C., Masuda, A., Vaz, I. da S., 2009. New approaches toward anti-*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* tick vaccine. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária Braz. J. Vet. Parasitol. Órgão Of. Colégio Bras. Parasitol. Veterinária* 18, 1–7.
- Patarroyo, J.H., Portela, R.W., De Castro, R.O., Pimentel, J.C., Guzman, F., Patarroyo, M.E., Vargas, M.I., Prates, A.A., Mendes, M.A.D., 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 163–172.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server [WWW Document], n.d. URL <http://web.expasy.org/tagident/tagident-doc.html> (accessed 5.11.17).
- Prudencio, C.R., Marra, A.O.M., Cardoso, R., Goulart, L.R., 2010. Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Vet. Parasitol.* 172, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.012>
- Radulović, Ž.M., Kim, T.K., Porter, L.M., Sze, S.-H., Lewis, L., Mulenga, A., 2014. A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immuno-proteome. *BMC Genomics* 15, 518. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-518>
- Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., León-Ávila, G., Castañeda-Ortiz, E.J., Álvarez-Sánchez, M.E., Camacho, A.D., Ramos, A., Camacho-Nuez, M., 2015. BmVDAC upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 212, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.016>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., León, A.A.P. de, Villela, H.S., Torres-Acosta, J.F. de J., Sánchez, H.F., Salas, D.R., Cruz, R.R., Saldierna, F., Carrasco, D.G., 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. *Review. Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8, 61–74.
- Sangster, N.C., 2001. Managing parasiticide resistance. *Vet. Parasitol.* 98, 89–109.
- Schettters, T., Bishop, R., Crampton, M., Kopáček, P., Lew-Tabor, A., Maritz-Olivier, C., Miller, R., Mosqueda, J., Patarroyo, J., Rodriguez-Valle, M., Scoles, G.A., de la Fuente, J., 2016. Cattle tick vaccine researchers join forces in CATVAC. *Parasit. Vectors* 9, 105. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1386-8>

- Seixas, A., Oliveira, P., Termignoni, C., Logullo, C., Masuda, A., da Silva Vaz, I., 2012. Rhipicephalus (Boophilus) microplus embryo proteins as target for tick vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.011>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2016. Situación actual del control de la garrapata boophilus spp. gov.mx. URL <http://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp> (accessed 2.25.18).
- Shahein, Y., Abouelella, A., Hame, R., 2013. Glutathione S-Transferase Genes from Ticks, in: Radis-Baptista, G. (Ed.), *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications*. InTech.
- Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2013. *Biology of Ticks*. OUP USA.
- Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi, K., Onuma, M., 2003. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine* 21, 2844–2851.
- Taheri, M., Nabian, S., Ranjbar, M., Mazaheri Nezhad, R., Gerami Sadeghian, A., Sazmand, A., 2014. Study of vitellogenin in *Boophilus annulatus* tick larvae and its immunological aspects. *Trop. Biomed.* 31, 398–405.
- Tellam, R.L., Kemp, D., Riding, G., Briscoe, S., Smith, D., Sharp, P., Irving, D., Willadsen, P., 2002. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet. Parasitol.* 103, 141–156.
- Alan Bowman and Patricia Nutall. *Ticks Biology, Disease and Control* (2009).
- Tirloni, L., Reck, J., Terra, R.M.S., Martins, J.R., Mulenga, A., Sherman, N.E., Fox, J.W., Iii, J.R.Y., Termignoni, C., Pinto, A.F.M., Jr, I. da S.V., 2014. Proteomic Analysis of Cattle Tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Saliva: A Comparison between Partially and Fully Engorged Females. *PLOS ONE* 9, e94831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094831>
- Trimnell, A.R., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23, 4329–4341. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.03.041>
- Trimnell, A.R., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “concealed” antigens. *Vaccine* 20, 3560–3568.
- Tsuda, A., Mulenga, A., Sugimoto, C., Nakajima, M., Ohashi, K., Onuma, M., 2001. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. *Vaccine* 19, 4287–4296.
- Vétérinaires Sans Frontières International, 2016. *Tropical Animal Diseases and Veterinary Public Health: Joining forces to meet future global challenges* | VSF International.
- Walker, A.R., 2009a. Bowman A, Nuttall P: *Ticks: Biology, Disease and Control*. *Parasit. Vectors* 2, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-1>

- Weiss, B.L., Kaufman, W.R., 2004. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5874–5879. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307529101>
- Willadsen, P., 2008. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends Parasitol.* 24, 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.01.005>
- Willadsen, P., 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology* 129 Suppl, S367-387.

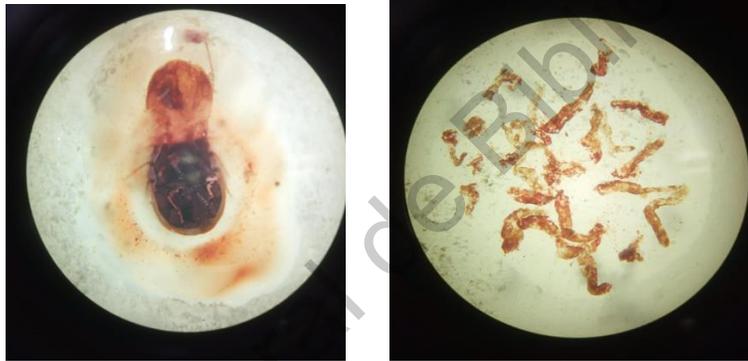
Dirección General de Bibliotecas UAQ

CAPITULO X

10.1 ANEXOS



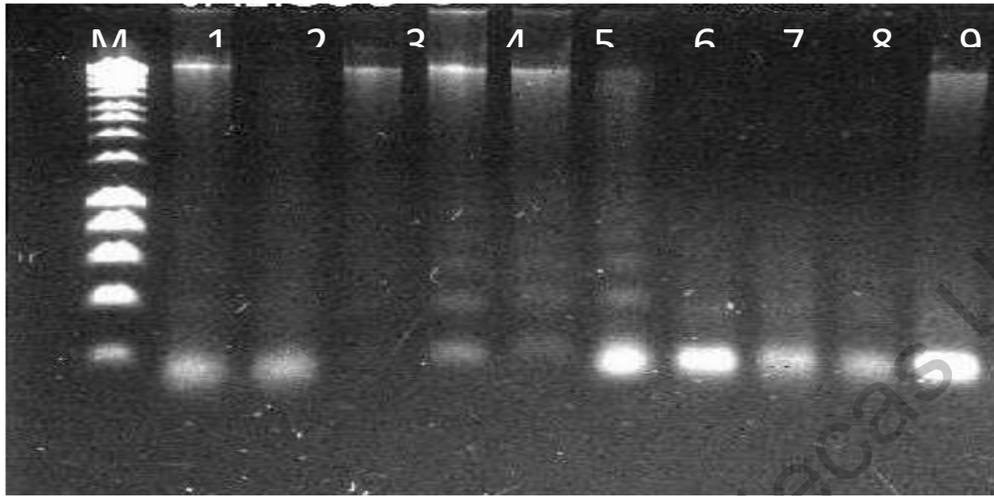
Figura 9 Garrapata *R. microplus* para disección.



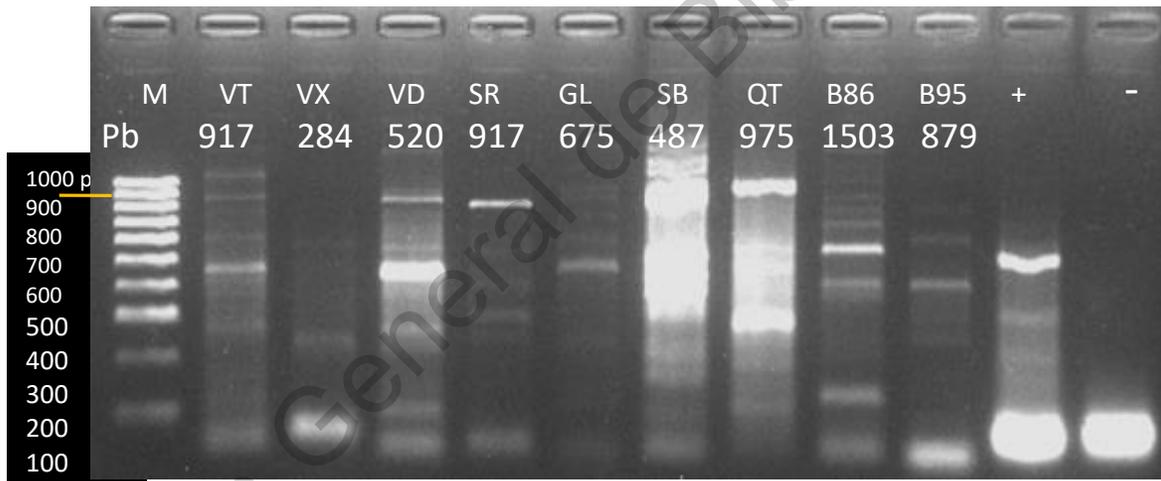
Disección de garrapata *R. microplus* para la extracción de intestino.



Extracción de ovarios de *R. microplus*.



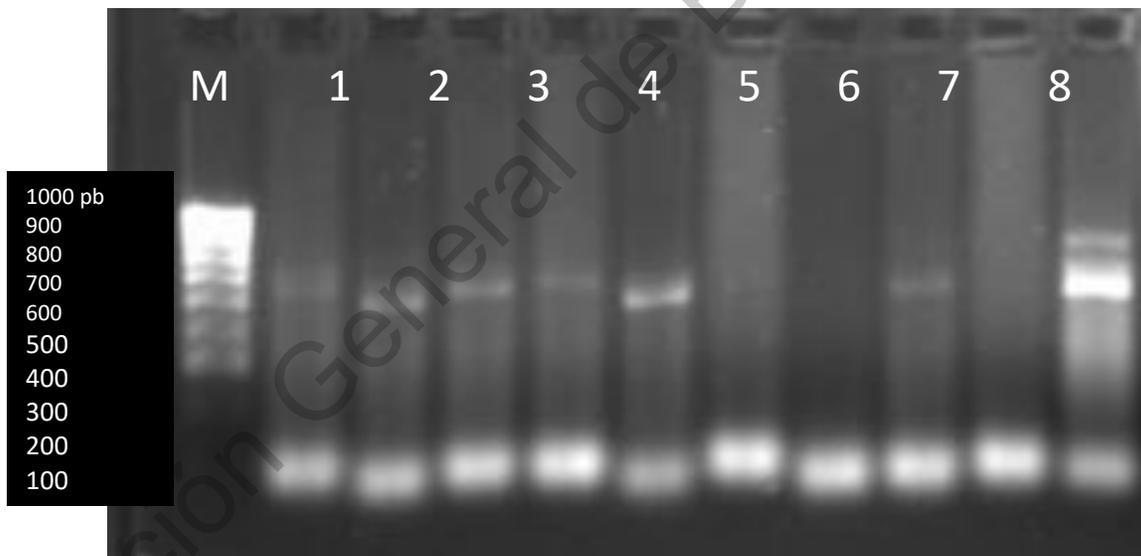
Gel de agarosa donde se observa el ADN obtenido de la extracción en *R. microplus* de las 10 diferentes cepas de México.



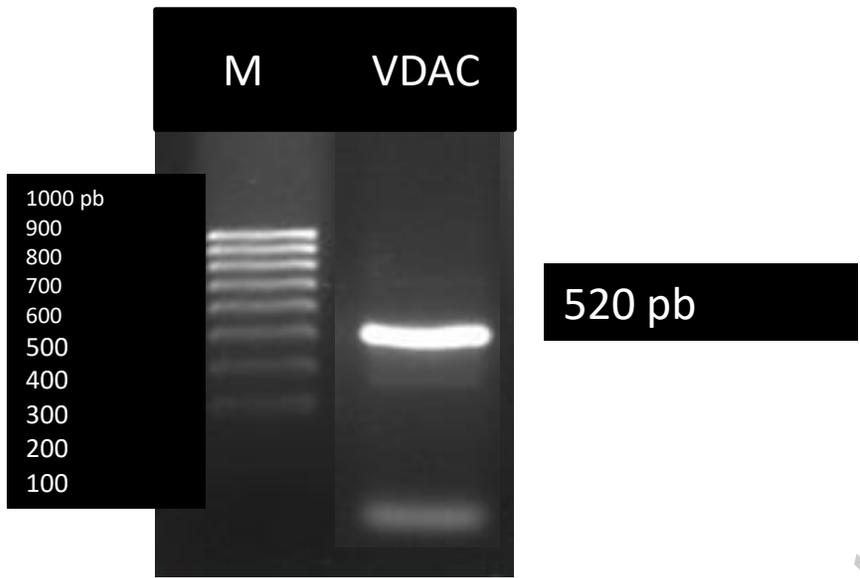
Amplificación de los diferentes genes. VT(*vitelogenina*), VX(*voravina*), VD(*VDAC*), SR(*serpina*), GL(*glutación*), SB(*subolesina*), QT(*chitinasa*), *bm86 ybBm95*.



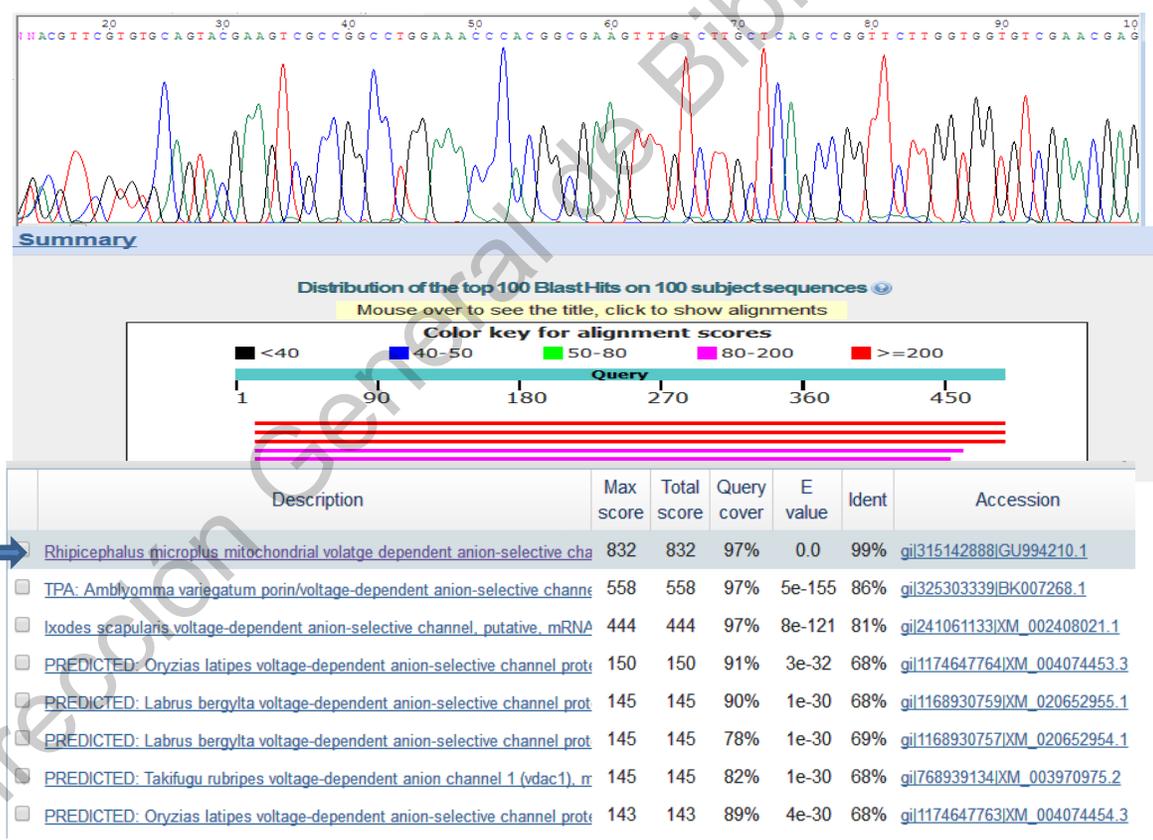
Estandarización de cada gen.



Amplificación de cada una de las 10 cepas con el gen *bmvdac*



Purificación de ADNc para secuenciación.



Resultados de la secuenciación de *bmvdac* con aislado Querétaro.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE GARRAPATA

- 1.-Colocar las garrapatas en un tubo de 1.5 ml
- 2.-Congelar las garrapatas
- 3.-Colocar nitrógeno líquido en un mortero, agregar las garrapatas y macerarlas
- 4.-Pasar las garrapatas macerada a un tubo de 1.5 ml
- 5.-Aragar 180 μ de buffer ATL
- 6.-Agregar 20 μ de proteinasa K
- 7.-Agregar 200 μ de RBC
- 8.-Homogenizar en vortex
- 9.-Incubar a 55°C durante al menos 3 horas o dejar toda la noche
- 10.-Homogenizar en vortex
- 11.-Centrifugar a 2500 rpm por 1 minuto
- 12.-Tomar el sobrenadante y pasarlo a un nuevo tubo
- 13.-Agregar 200 μ de buffer AL y homogenizar en vortex
- 14.-Incubar a 70°C por 10 minutos
- 15.-Agregar 200 μ ETOH grado biología molecular y mezclar por inversión
- 16.-Pasar por la columna
- 17.-Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, repetir hasta que pase todo el líquido
- 18.-Desechar tubo de colecta y colocar uno nuevo
- 19.-Agregar 500 μ de buffer AW1
- 20.-Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto

- 21.-Agregar 500 μ de buffer AW2
- 22.-Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto
- 23.-Centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto para secar la columna
- 24.-Poner tubo nuevo y agregar 100 μ de buffer AE
- 25.-Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto
- 26.-Antes de centrifugar, incubar a 38°C durante 5 minutos
- 27.-Agregar 5 μ de RNAsa, homogenizar e incubar a 38°C durante 5 minutos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ