



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Identificación y evaluación de epítomos B conservados en antígenos de  
*Rhipicephalus sanguineus*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

**Presenta**

MVZ Gilberto Reyes de Luna

**Codirigido por**

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Dra. Alma Rossana Tamayo Sosa

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Dra. Alma Rossana Tamayo Sosa

Secretario

Dra. Consuelo Almazán García

Vocal

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Suplente

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.

Diciembre 2019.

México

## RESUMEN

La garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) es probablemente la especie de garrapata más ampliamente distribuida en el mundo, su estrecha relación con perros domésticos ha facilitado su propagación a las regiones más cálidas del mundo, así como contacto con el ser humano. Debido a la resistencia a garrapaticidas, impacto al medio ambiente y salud pública, es requerido una nueva alternativa sustentable para el control de *R. sanguineus*. En este trabajo se identificaron epítomos B conservados y expuestos en las proteínas Rs86, RsSubolesina y RsVDAC. Se obtuvo la secuencia predicha de las proteínas del banco de genes. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple para cada proteína para identificar secuencias conservadas. Adicionalmente se realizó un análisis bioinformático para predecir: Presencia de péptido señal, estructuras secundarias, regiones transmembranales y finalmente un análisis bioinformático de antigenicidad y predicción de epítomos B en la región extracelular de las proteínas. Se seleccionaron de 2 a 4 péptidos conteniendo epítomos B conservados de cada proteína y se sintetizaron químicamente en forma de MAP's 8 (Multiple Antigen Peptide 8). Este estudio evaluó una mezcla de péptidos sintéticos con características de epítomos B conservados de tres proteínas recombinantes, Rs86, RsSubolesina y RsVDAC como antígenos en vacuna contra *R. sanguineus*. Se utilizaron 8 conejos de la raza Nueva Zelanda divididos en 2 grupos; el grupo testigo recibió PBS y adyuvante, el grupo tratamiento recibió PBS, adyuvante y una mezcla con 100 µg de cada péptido elegido. Todos los animales fueron inmunizados los días 0, 21, 36 y 121. Se tomaron muestras de sangre antes de cada inmunización y al término del experimento. Después de la cuarta inmunización se determinó la producción de anticuerpos contra las tres proteínas usando la técnica de ELISA indirecta, utilizando la dilución 1:500 los resultados se evaluaron por medio de una prueba de ANOVA con una significancia del 95%. Posteriormente los conejos de los dos grupos fueron infestados con larvas de *R. sanguineus*. El porcentaje de reducción de larvas del grupo tratamiento fue del 10.86% comparado con el grupo control. Se logró amplificar el gen parcial de RsVDAC de 4 aislados mexicanos correspondientes a los estados de Guerrero, Yucatan, Baja California y Morelos, teniendo una identidad mayor del 98% entre las secuencias. Se pudo comprobar que al menos uno de los tres péptidos elegidos de RsVDAC se encuentra en una región conservada con características de Péptido B. Como objetivo adicional el presente estudio se inició para proporcionar nueva información sobre la filogeografía de *R. sanguineus* en regiones de México, la metodología, resultados y conclusiones del objetivo se muestran en el apartado de anexos de esta tesis.

**Palabras clave:** Rs86, Subolesina, VDAC, epítomo, *R. sanguineus*, candidato vacunal, DNA.

## SUMMARY

The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), is probably the most widely distributed tick species in the world and its close association with domestic dogs has facilitated its spread throughout the warmer regions of the world, as well as contact with the human being. Because of tick resistance, the impact of acaricides on environment and public health, a new sustainable alternative is required for the control of *R. sanguineus*. In this research work conserved and exposed B-cell epitopes in the proteins Rs86, RsSubolesina and RsVDAC were identified. The predicted sequence of the proteins was obtained from the GenBank. Subsequently a multiple alignment for each protein was performed to identify conserved sequences. Additionally, a bioinformatic analysis was performed to predict: presence of signal peptide, secondary structure for each protein, transmembrane regions and finally a bioinformatic analysis of antigenicity and B-cell epitope prediction in the extracellular region of each protein. From 2 to 4 peptides per protein containing conserved B-cell epitopes were selected and they were chemically synthesized as MAP's 8 (Multiple Antigen Peptide 8). This study evaluated a mixture of synthetic peptides with characteristics of conserved B epitopes from three recombinant proteins, Rs86, RsVDAC and RsSubolesin like antigens in a vaccine against *R. sanguineus*. Eight New Zealand 4 months age rabbits divided in 2 groups of 4 animals each were used and treated as follows: Negative control received PBS/adjuvant, treatment group received PBS/Adjuvant + a mixture with 100 µg of each peptide chosen. Each animal was immunized at days 0, 21, 36 and 121. Blood samples were obtained before each immunization and at the end of the experiment. After the fourth immunization, the production of antibodies against three proteins was determined using the indirect ELISA technique, using dilutions of 1:500 and the results were evaluated by means of an ANOVA test with a significance of 95%. Subsequently the rabbits of the two groups were infested with larvae *R. sanguineus*. The larval reduction percentage of the treatment group was 10.86% compared to the control group. The partial RsVDAC gene of 4 Mexican isolates corresponding to Guerrero, Yucatan, Baja California and Morelos states was amplified, having an identity greater than 98% between the sequences. It was found that at least one of the three RsVDAC peptides chosen is in a conserved region with Peptide B characteristics. As an additional objective the present study was initiated to provide new information on the phylogeography of *R. sanguineus* in regions of Mexico. The methodology, results and conclusions of this objective are shown in the annexes section of this thesis.

**Keywords:** Rs86, Subolesin, VDAC, epitope, *R. sanguineus*, vaccine candidate, DNA.

## DEDICATORIA

A mis padres María Esperanza De Luna Santiago y Melquiades Reyes Godínez, que incansables nunca dejan de trabajar esperando progresar día con día. Los amo, gracias Dios mío por dejarlos compartir otro logro más.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitir cursar otro programa como lo es la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable en la Facultad de Ciencias Naturales.

Al programa de posgrado de Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable por apoyarme con beca de inscripción, así como a la Dra. Araceli Aguilera Barreyro quien fue durante mi Maestría Directora del programa.

A mi padre académico el Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por confiar de nueva cuenta en mí para la creación de este proyecto, por la asesoría y los consejos que siempre fueron y serán bien recibidos.

A la Dra. Consuelo Almazán García que me abrió las puertas de su casa en Francia y me asesoró en cada momento. Gracias por ser la conexión entre ANSES y la UAQ. Cada uno de los consejos y guía fueron muy bien recibidos.

Al Dr. Ladislav Simo y al Dr. Alejandro Cabezas por brindarme su apoyo y amistad en la Escuela Nacional de Veterinaria de Alfort, Francia. Así como a la Dra. Sarah BONNET por darme mi carta de invitación para realizar la estancia en UMR-BIPAR.

A los miembros de mi comité evaluador Codirector Dra. Alma Rossana Tamayo Sosa, Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón y Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú.

A MSPAS Yesenia Contreras Magallanes por su ayuda y compañía en la etapa experimental de mi trabajo.

A MSPAS Reyna Idaly Ortega Sánchez por su gran ayuda durante el periodo de inmunización y manejo de conejos.

A mis compañeros de Maestría y Laboratorio Dr. Mario Hidalgo Ruiz, IAZ Rodrigo Alejandro Sánchez López, M. C. Diego Josimar Hernández Silva, M. C. María Martina Esperanza Pérez Soria e IAZ Andrea Ruiz Campos.

Al CONACYT por el financiamiento del presente proyecto.

# ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Taxonomía	3
2.2 Acercamiento a los linajes de <i>R. sanguineus</i>	5
2.3 Distribución de <i>R. sanguineus</i>	7
2.4 Ciclo de vida	10
2.5 Patogenia y patología	13
2.6 Vector de transmisión	14
2.7 Control y tratamiento	16
2.7.1 Control farmacológico	16
2.7.2 Control del ambiente	16
2.7.3 Control biológico	17
2.8 Respuesta inmunitaria contra garrapatas	17
2.9 Antígenos contra <i>R. sanguineus</i>	18
2.10 Proteínas candidatas de <i>R. sanguineus</i>	19
2.10.1 Proteína VDAC	19
2.10.2 Proteína Rs86	23
2.10.3 Proteína Subolesina	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos específicos	29

<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
6.1 Localización geográfica	30
6.2 Material Biológico	30
6.3 Obtención de la secuencia de aminoácidos de los genes VDAC, Rs86 y Subolesina de <i>R. sanguineus</i>	31
6.4 Análisis de conservación de las proteínas predichas	31
6.5 Análisis <i>in silico</i> de la estructura secundaria de las proteínas	31
6.6 Predicción y selección de epítomos B conservados	32
6.7 Generación de Anticuerpos contra los péptidos sintéticos	35
6.8 Infestación con larvas de <i>R. sanguineus</i>	35
6.9 Determinación del título de anticuerpos por ELISA indirecto	37
6.10 Análisis estadístico	38
6.10.1 ELISA Indirecta	38
6.11 Recolección de garrapatas <i>R. sanguineus</i>	39
6.12 Extracción de DNA	39
6.13 Diseño de iniciadores para amplificar el gen VDAC	40
6.14 Amplificación del gen RsVDAC	40
6.15 Purificación del producto de PCR para secuenciación	42
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
7.1 Obtención de la secuencia de aminoácidos de los genes VDAC, Rs86 y Subolesina de <i>R. sanguineus</i>	47
7.2 Análisis <i>in silico</i> de la estructura secundaria de las proteínas, predicción y selección de epítomos B conservados	49
7.2.1 Proteína Rs86	52
7.2.2 Proteína VDAC	54
7.2.3 Proteína Subolesina	55
7.3 ELISA indirecta	58
7.3.1 Péptidos de la proteína VDAC	58
7.3.2 Péptidos de la proteína Rs86	60
7.3.3 Péptidos de la proteína Subolesina	61
7.4 Efecto de la vacunación sobre las larvas de <i>R. sanguineus</i>	63
7.5 Amplificación del gen RsVDAC	69

7.5.1 Recolección de garrapatas <i>R. sanguineus</i>	69
7.5.2 Extracción de DNA de <i>R. sanguineus</i>	70
7.5.3 Amplificación del gen RsVDAC de los distintos aislados de la República Mexicana	70
7.5.4 Alineamiento de la proteína RsVDAC de aislados mexicanos de <i>R. sanguineus</i>	71
VIII. CONCLUSIONES	73
IX. LITERATURA CITADA	74
X. ANEXOS	81

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Taxonomía de <i>R. sanguineus</i>	3
2	Identificación de Péptidos que contienen epítomos B conservados	34
3	Calendario de inmunización e infestación de conejos	36
4	Par de iniciadores empleados en la amplificación del gen VDAC	40
5	Condiciones de la PCR para la amplificación de VDAC	42
6	Número de acceso de los genes estudio	47
7	Eficacia de diferentes candidatos vacunales	65
8	Valores de absorbancia del DNA de <i>R. sanguineus</i>	70
9	Cuadro de identidad de nucleótidos del gen RsVDAC	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Libro GENERA CRUSTACEORUM ET INSECTORUM	4
2	Relaciones filogenéticas de <i>R. sanguineus</i>	6
3	Mapa de la distribución mundial de <i>R. sanguineus</i>	7
4	Distribución de <i>R. sanguineus</i> en Europa	8
5	Distribución de especies de garrapatas colectadas en México	9
6	Ciclo de vida de <i>R. sanguineus</i>	10
7	Ovoposición de <i>R. sanguineus</i>	11
8	Perro altamente infestado por <i>R. sanguineus</i>	14
9	Conejo con una cámara de alimentación	37
10	Termociclado para la amplificación de VDAC	41
11	Ilustración de los pasos de Unión de DNA	44
12	Ilustración de los pasos de lavado de la muestra	45
13	Ilustración de los pasos de Elusión del DNA	45
14	Análisis de predicción de péptido señal de la proteína VDAC	49
15	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína VDAC	50
16	Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína VDAC	51
17	Análisis de predicción de péptido señal en la proteína Rs86	52
18	Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína Rs86	53
19	Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales de la proteína Rs86	54
20	Análisis de predicción de péptido señal en la proteína Subolesina	55
21	Análisis de regiones hidrofóbicas de la proteína Subolesina	56
22	Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína Subolesina	57
23	ELISA indirecta de los péptidos VDAC	59
24	ELISA indirecta de los péptidos Rs86	60
25	ELISA indirecta de los péptidos Subolesina	62
26	Gráfica que indica la cantidad de larvas vivas después de la recolección	63
27	Formula que representa el porcentaje de reducción de Larvas repletas	64
28	Efecto de los péptidos B anti RsVDAC, Rs86 y RsSubolesina	68
29	Distribución geográfica de la recolección de <i>R. sanguineus</i>	69
30	Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen RsVDAC	71

# I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas de la familia ixodidae son el grupo más importante de vectores de patógenos dentro del Filo Artrópoda (Hoogstraal, 1985). Debido a su importancia para la salud pública y veterinaria, la garrapata café del perro *R. sanguineus* es una de las garrapatas más estudiadas. De hecho, un buen número de estudios sobre su biología y ecología se han llevado a cabo en muchas partes del mundo (Dantas-Torres, 2010).

Es una especie monotrófica, esta garrapata puede alimentarse de otros huéspedes (por ejemplo, seres humanos), que no pertenecen a su cadena trófica natural. Esto quiere decir que *R. sanguineus* puede adoptar diferentes estrategias de supervivencia, como le sea necesario (Dantas-Torres, 2010).

*R. sanguineus* es una garrapata de tres hospedadores; es decir, cada etapa activa de desarrollo (larva, ninfa y adulto) sólo se alimenta una vez y su muda se produce en el medio ambiente (Koch, 1982a). Por otro lado, es la garrapata con mayor distribución en el mundo, incluso teniendo en cuenta que muchas garrapatas actualmente identificadas como *R. sanguineus* en realidad podría representar a otras especies estrechamente relacionadas (por ejemplo, *Rhipicephalus turanicus*) (Dantas-Torres, 2010).

Las enfermedades transmitidas por garrapatas afectan a muchos perros y gatos en América del Norte cada año, siendo muchas de estas enfermedades zoonóticas; estas enfermedades bacterianas transmitidas por garrapatas incluyen rickettsiosis, borreliosis, erliquiosis, y anaplasmosis. La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas se define como una enfermedad infecciosa aguda, potencialmente mortal causada por la bacteria *Rickettsia rickettsii*, que es transmitida principalmente por *R. sanguineus*. Por lo tanto, las garrapatas son responsables del mantenimiento y transmisión de muchos patógenos que afectan a los animales domésticos y los seres humanos. (Shaw *et al.*, 2001; Jongejan & Uilenberg, 2004).

Existe una gran variedad de medicamentos para el control de la infestación por garrapatas. Pero estas drogas causan daño al medio ambiente, así como

contaminación a los alimentos y resistencia parasitaria. Hasta el momento, el control de *R. sanguineus* se ha limitado al uso de productos químicos en diferentes presentaciones (Spot-On formulaciones, collares impregnados, shampoo, sprays, jabones y polvos) utilizando acaricidas como piretroides, organofosforados, formamidinas y fenilpirazoles, sin tener resultados satisfactorios. Esta falta de eficacia se atribuye principalmente al alto porcentaje (95%) de garrapatas fuera del hospedador y a la aparición de cepas resistentes resultado del repetido e intenso uso de acaricidas, que también contribuyen a la contaminación del medio ambiente (Perez-Perez *et al.*, 2010; Rodríguez-Mallon *et al.*, 2012).

La vacunación es considerada una alternativa eficiente, ambientalmente segura, económica y sustentable para el control de ectoparásitos. La factibilidad del uso de antígenos producidos por técnicas de DNA recombinante para este propósito ha sido demostrada con vacunas comerciales basados en Bm86 contra *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*). La identificación de antígenos protectores novedosos es el paso limitante en el aumento de la eficacia de estas vacunas (Rodríguez-Mallon *et al.*, 2012).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Taxonomía

*R. sanguineus* sensu stricto (s.s.) (Cuadro 1) fue originalmente descrita en 1806 como *Ixodes sanguineus* (Latreille, 1806). Latreille, 1806 en su libro *Genera Crustaceorum et Insectorum* (Figura 1) la describió como sigue: “*Sanguineus, punctatus, postice lineolis tribus impressus; dorso antico macula nulla thoracica, distincta*”; esto es, “sangre roja, punteada, posteriormente con tres líneas impresas; no hay lugar torácico distinto anterodorsalmente” (Dantas-Torres, 2014).

Cuadro 1. Taxonomía de *R. sanguineus* (Latreille, 1806).

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Superorden	Parasitiformes
Orden	Ixódida
Familia	Ixodidae
Género	<i>Rhipicephalus</i>
Especie	<i>sanguineus</i>

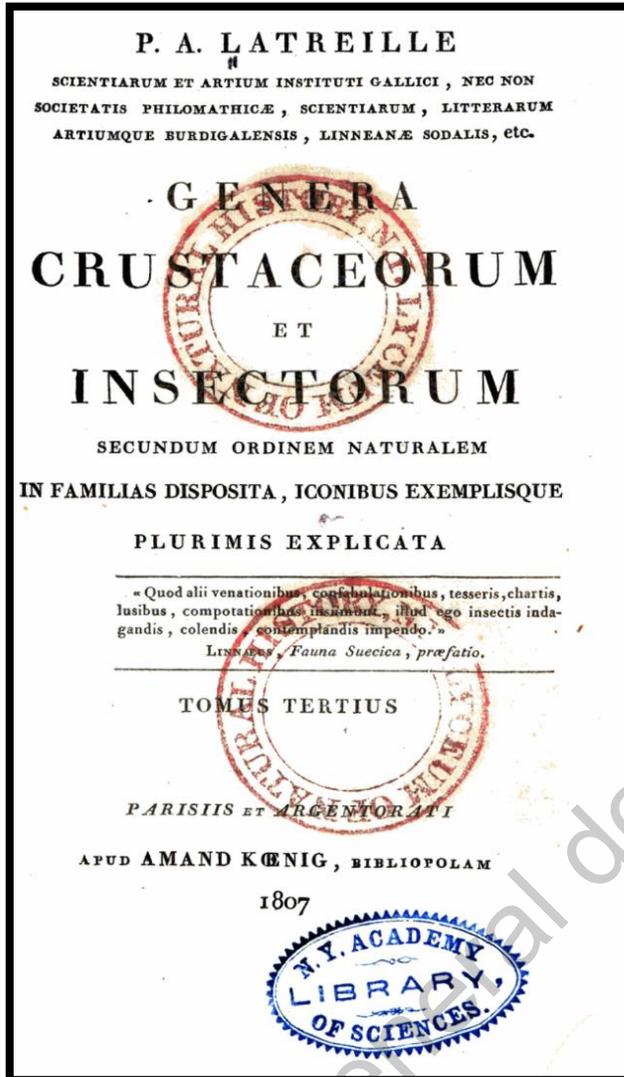


Figura 1. Libro GENERA CRUSTACEORUM ET INSECTORUM dónde se describe por primera vez a *R. sanguineus* (Latreille, 1806).

## 2.2 Acercamiento a los linajes de *R. sanguineus*

A pesar del alto interés del complejo *R. sanguineus* (Ixodidae) la identificación taxonómica y la relación sistemática de las especies siguen siendo problemáticas. Muchos factores son responsables de esta aparente confusión. En particular, no hay una descripción confiable de *R. sanguineus* sensu stricto (Latreille) y el tipo de espécimen se pierde. Además, la variabilidad morfológica en el complejo es alta, lo que hace difícil determinar los límites estrictos entre las especies (Hekimoglu *et al.*, 2016).

La mayoría de la información molecular sobre *R. sanguineus* proviene de las regiones mitocondriales 16S y 12S de DNA ribosomal (rDNA). Un resultado importante obtenido de estos estudios es la existencia de dos linajes distintos dentro de *R. sanguineus* s.l.: un linaje templado de América del Sur/Europa Occidental; y un linaje tropical Sudamericano/Africano. El grupo tropical está representado por recolectados en países como Brasil, Tailandia; Cuba, Colombia, Mozambique, y el grupo de clima templado incluye garrapatas de España, Francia, Italia, Alemania y Argentina (Dantas-Torres *et al.*, 2013).

Un árbol filogenético concatenando las secuencias mitocondriales rDNA de los genes 12S y 16S revelaron un patrón de ramificación similar. La mayoría de las muestras analizadas de *R. sanguineus* s.l. son separadas filogenéticamente en dos clados (Figura 2). Las garrapatas de Asia, África, Oceanía y los trópicos estadounidenses forman el clado tropical. Los clados templados de *R. sanguineus* s.l. fueron representados por muestras colectadas en Europa, USA-Norte América y Argentina-Sudamérica. (Zemtsova *et al.*, 2016).

Zemtsova *et al.*, 2016 muestran un mapa con la distribución de cada clado de *R. sanguineus* s.l. y su correlación con la temperatura promedio anual cercana a la superficie demostró que las muestras del linaje tropical se encuentran en áreas con temperatura promedio anual cercana a la superficie entre 20 y 30°C, mientras que las muestras pertenecientes al linaje templado se encuentran en áreas con temperatura promedio anual cercano a la superficie entre 10 y 20°C.

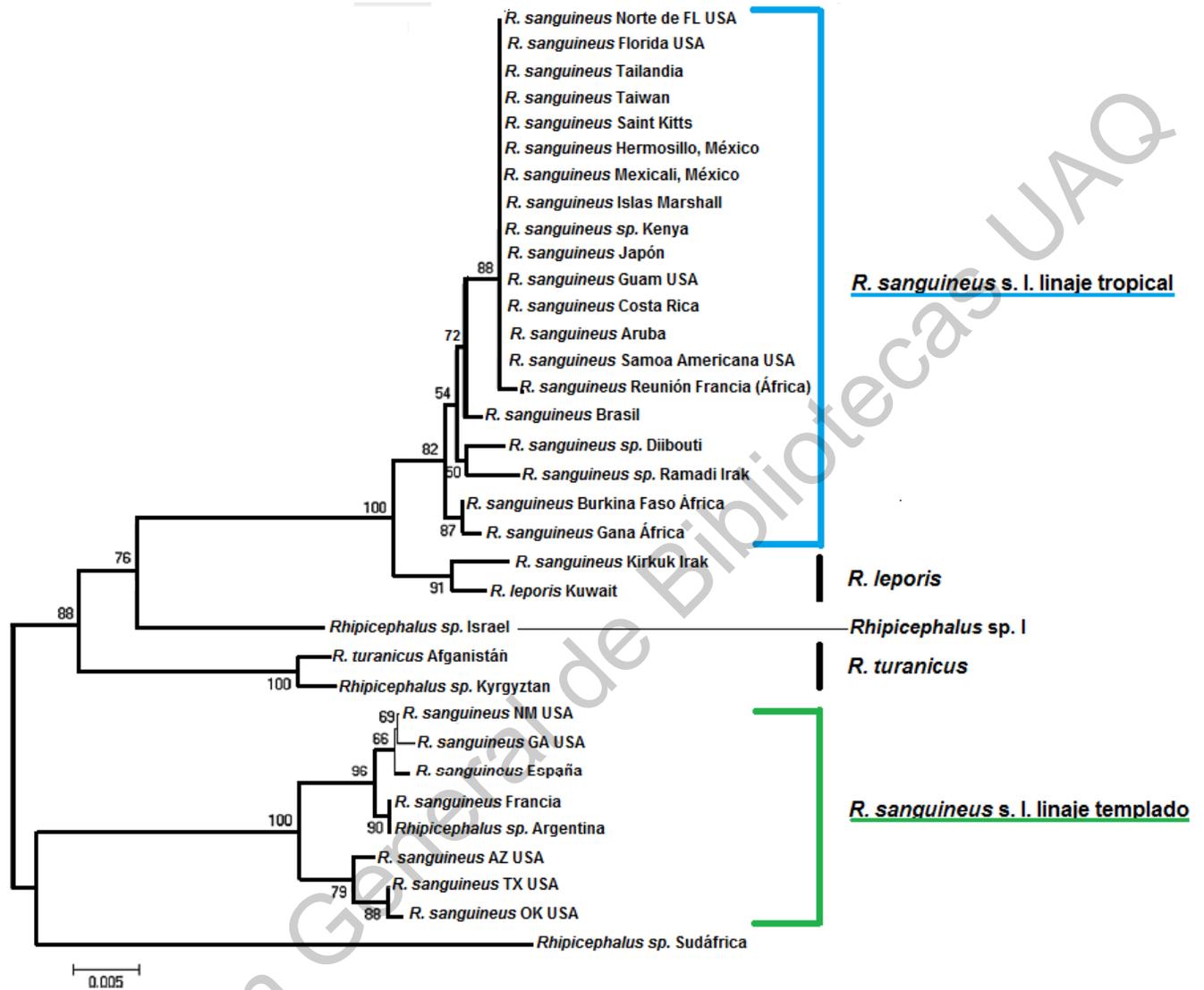


Figura 2. Relaciones filogenéticas de *R. sanguineus* s.l. inferido a partir de rDNA 12S y 16S (Modificado de Zemtsova *et al.*, 2016).

### 2.3 Distribución de *R. sanguineus*

*R. sanguineus* es la garrapata con mayor distribución en el mundo (Figura 3), incluso teniendo en cuenta que muchas garrapatas actualmente identificadas como *R. sanguineus* en realidad podría representar a otras especies estrechamente relacionadas (por ejemplo, *Rhipicephalus turanicus*) (Dantas-Torres, 2010).



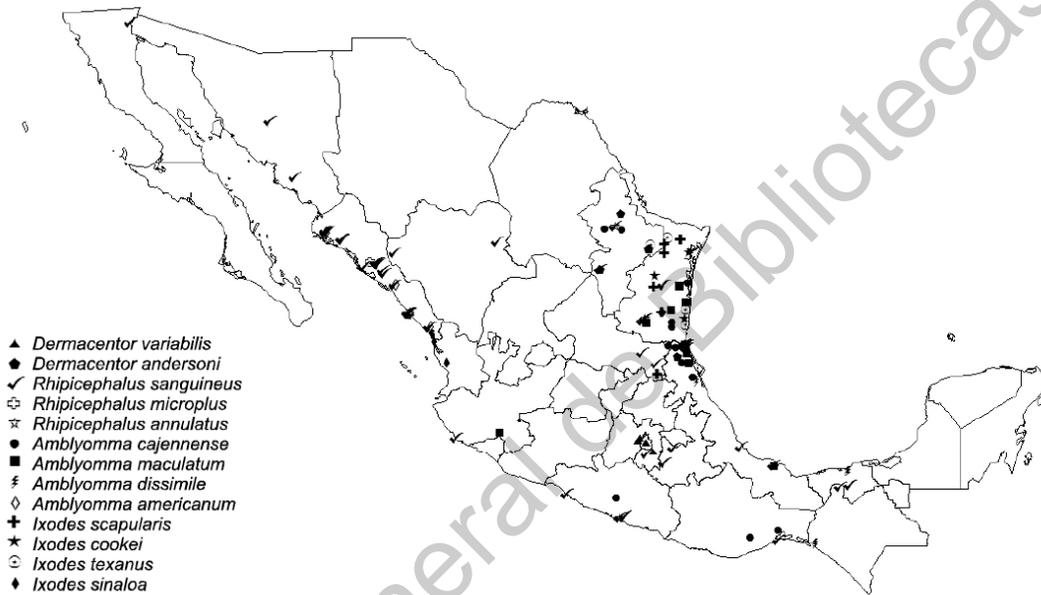
Figura 3. Aislados de *R. sanguineus* en diferentes partes del mundo, disponibles a través de la red GBIF (Tomado de EOL, 2016).

Las garrapatas son endémicas en casi toda Europa, con biología y distribución geográfica distinta. La figura 4 indica la distribución principal de *R. sanguineus* en Europa (ESCCAP, 2015).



**Figura 4. Distribución de *R. sanguineus* en Europa. Esta especie es principalmente una garrapata del sur de Europa. Debajo de la línea roja indica donde se presenta con mayor frecuencia (Tomado de ESCCAP, 2015).**

Sosa-Gutierrez *et al.*, (2010) recolectaron un total de 1,107 garrapatas de 22 estados de la República Mexicana (Figura 5), incluidas 16 especies pertenecientes a seis géneros. Se recogieron de parques eco-turísticos, vegetación, animales domésticos y salvajes. Se encontró que *R. sanguineus* fue la garrapata más frecuente recolectada, representando más del 52.2% de todas las garrapatas examinadas en todas las regiones de México.



**Figura 5. Distribución de especies de garrapatas colectadas en México (Tomado de Sosa-Gutierrez *et al.*, 2016).**

## 2.4 Ciclo de vida

*R. sanguineus* es una garrapata de tres hospedadores; es decir, cada etapa activa de desarrollo (larva, ninfa y adulto) sólo se alimenta una vez y su muda se produce en el medio ambiente (Figura 6).

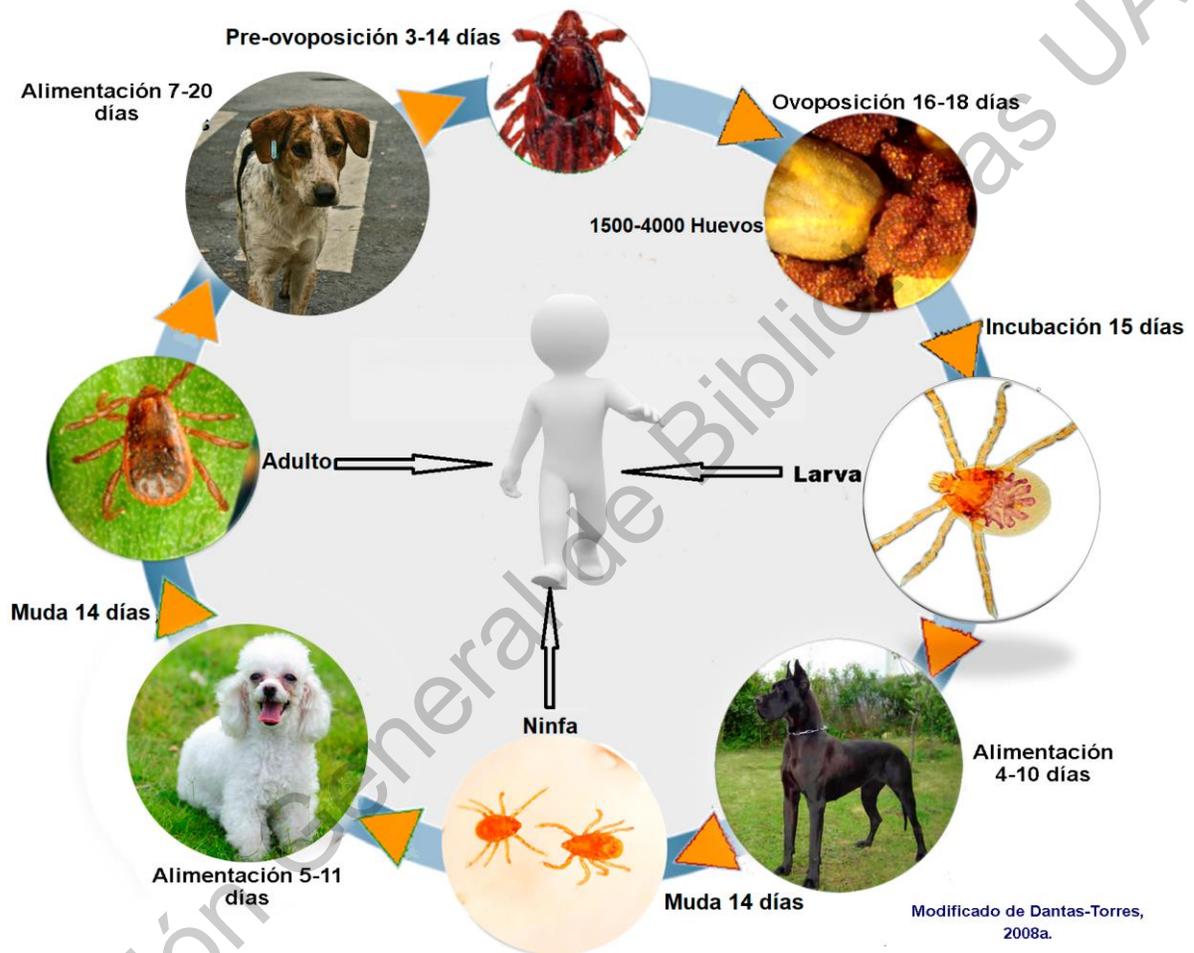


Figura 6. Ciclo de vida de *R. sanguineus*. Adaptado de Dantas-Torres, 2008a.

Las hembras adultas de *R. sanguineus* se alimentan del hospedador de 5 a 21 días. Una vez que se haya completado la repleción, se desprende y luego cae fuera del huésped para digerir su comida de sangre y poner sus huevos en un lugar protegido. La ovoposición es precedida de un periodo de pre-ovoposición que va desde tres a catorce días. La duración media de la ovoposición es de 16-18 días (Dantas-Torres, 2008a). Las hembras de *R. sanguineus* por lo general ovopositan unos 4,000 huevos, pero pueden poner hasta 7,273 huevos (Figura 7) (Koch, 1982a).



**Figura 7. Ovoposición de *R. sanguineus*. A: Hembras ponen huevos en condiciones de laboratorio (temperatura de 26°C, humedad relativa 80%). B: Primer plano de la imagen anterior, que muestra en detalle los huevos recién puestos (Tomado de Dantas-Torres, 2010).**

La temperatura óptima para la ovoposición en *R. sanguineus* es de 20 a 30 °C. Después de que la hembra acaba de poner sus huevos, muere. Los huevos son depositados en lugares tales como grietas y hendiduras, con frecuencia en un nivel alto del suelo. Es interesante observar que la hembra generalmente pone sus huevos cerca de la zona de descanso del hospedero o un lugar que éste utiliza para dormir; esto es probablemente un comportamiento estratégico, ya que hace más

fácil para las larvas encontrar al hospedero, inmediatamente después de la eclosión (Dantas-Torres, 2008a).

El periodo de ovoposición puede durar varias semanas y el número de huevos puestos por cada hembra está directamente correlacionado con su peso y la duración del periodo de ovoposición (Dantas-Torres, 2010). El periodo de incubación de huevos oscila entre 6 y 23 días (Koch, 1982b; Jittapalapong *et al.*, 2000).

Después de la incubación, las larvas eclosionan y después de que su cutícula endurezca, inmediatamente empiezan a buscar hospedero. Las larvas se alimentan durante tres a 10 días, antes de dejar el hospedador para transformarse en ninfas (Dantas-Torres, 2008a).

El periodo de muda de las larvas oscila entre cinco y 15 días. Las ninfas se parecen a los adultos en forma y se alimentan durante 11 días antes de dejar el hospedador para convertirse en adultos. El periodo de la ninfa oscila entre nueve y 47 días (Nuttall, 1915). Las larvas de *R. sanguineus* no alimentadas pueden sobrevivir durante aproximadamente ocho meses, mientras que las ninfas y los adultos pueden sobrevivir hasta seis y 19 meses, respectivamente (Goddard, 1987).

## 2.5 Patogenia y patología

Una vez en el perro, *R. sanguineus* utiliza sus quelíceros para perforar la piel del hospedador y luego inserta su hipostoma en la epidermis del hospedador, en ocasiones alcanza las capas superiores de la dermis. Durante la unión, la garrapata segrega una sustancia similar al cemento, que forma un cono en la superficie de la epidermis que se extiende hasta el estrato córneo. Los perros no aparecen estar irritados por la infestación de garrapatas y las alteraciones macroscópicas locales se limitaron a engrosamiento de la piel en las áreas donde las garrapatas completaron la alimentación una cerca de la otra (Szabó & Bechara, 1999).

Los vasos sanguíneos son lacerados y se produce una hemorragia, creando una piscina de alimentación, de la cual la garrapata succiona la sangre y otros fluidos (Mans & Neitz, 2004).

La pérdida de sangre en infestaciones graves y bajo algunas circunstancias, puede desencadenar anemia. La herida producida por la picadura de la garrapata puede infectarse o se pueden formar microabscesos como reacción a las piezas bucales de la garrapata, cuando ésta se extrae de forma incorrecta y parte de las piezas quedan incluidas en la piel del hospedador. Se pueden observar signos clínicos compatibles con las manifestaciones de los procesos cuyos agentes patógenos han transmitido. La mayor importancia que tienen las garrapatas es su papel como vector de agentes patógenos que causan una gran variedad de enfermedades (ESCCAP, 2015).

*R. sanguineus* puede adherirse en todas partes del perro, pero la cabeza (sobre todo los oídos), espacios interdigitales, espalda, región inguinal y axilar se encuentran entre sus sitios de unión preferidas (Koch, 1982a) (Figura 8).



Figura 8. Perro altamente infestado por *R. sanguineus* (Tomado de Dantas-Torres, 2008b).

## 2.6 Vector de transmisión

Las enfermedades transmitidas por garrapatas afectan a muchos perros y gatos en América del Norte cada año y muchas de estas enfermedades son zoonóticas. Estas enfermedades bacterianas transmitidas por garrapatas incluyen la borreliosis, rickettsiosis, erliquiosis, y anaplasmosis. Por lo tanto, las garrapatas son responsables del mantenimiento y transmisión de muchos patógenos que afectan a los animales domésticos y los seres humanos, incluyendo varias especies de bacterias, helmintos, protozoarios y virus (Shaw *et al.*, 2001; Jongejan & Uilenberg, 2004).

La rickettsiosis canina es una infección causada por *Rickettsia rickettsii* y es transmitida principalmente por *Dermacentor variabilis* y *D. andersoni* (Shaw *et al.*,

2001) con la reciente implicación de *R. sanguineus* como vector en Arizona (Greene, 2012).

Babesiosis canina ha sido reconocida en Brasil desde principios del siglo XX. El único vector comprobado de *Babesia vogeli* en Brazil es *R. sanguineus* (Dantas-Torres, 2008b).

Hepatozoonosis canina fue diagnosticada en Brazil en los años 70s, esta enfermedad es causada por *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae). Los perros se infectan mediante la ingestión de garrapatas contaminadas de oocistos maduros de *H. canis*. *R. sanguineus* que es un vector conocido de *H. canis* en el viejo mundo, podría jugar un papel importante en la transmisión de este patógeno en Brasil (Dantas-Torres, 2008b).

Erlichiosis monocítica canina es causada mediante *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), que es transmitida por *R. sanguineus*. El riesgo de infección por *E. canis* de perros que viven en casas es mayor a los que viven en los departamentos. Los estudios cero-epidemiológicos revelaron que los perros adultos machos son más propensos a presentar anticuerpos contra *E. canis*, particularmente aquellos infestados por garrapatas (Dantas-Torres, 2008b).

La anaplasmosis canina es causada mediante *Anaplasma platys* el vector sospechoso de este agente es *R. sanguineus*. Normalmente los perros infectados con *Anaplasma platys* ellos muestran solo trombocitopenia, pero no se observan eventos hemorrágicos. El diagnóstico de laboratorio está basado en la observación de inclusiones en plaquetas de *Anaplasma platys* en frotis de sangre periférica con métodos de tinción hematológicos ordinarios (Dantas-Torres, 2008b).

Hemobartonelosis canina es causada mediante *Mycoplasma haemocanis* (antes llamada *Haemobartonella canis*) que se transmite por *R. sanguineus*. Los signos clínicos de la enfermedad son mucosas pálidas, pérdida de peso, anorexia y fiebre. El diagnóstico de la infección está basado en frotis de sangre teñidos mediante tinción hematológica ordinaria (Dantas-Torres, 2008b).

## **2.7 Control y tratamiento**

Al pensar en el control de las garrapatas, se debe tomar en cuenta que sólo el 5% de las garrapatas están en el perro; el remanente (95%) está en el ambiente. Por lo tanto, la eliminación efectiva de las poblaciones de garrapatas requerirá de una estrategia de control integral, dirigido a la población canina, así como al medio ambiente. Una estrategia de control integral significa que se utilicen todas las herramientas tecnológicas y de gestión apropiadas, proporcionando una disminución efectiva de las poblaciones de una manera rentable. Este enfoque incluye el uso de estrategias químicas y no químicas (Por ejemplo, manejo del ambiente y las vacunas) (Dantas-Torres, 2008a).

### **2.7.1 Control farmacológico**

Existe una gran variedad de medicamentos para el control de la infestación por garrapatas. Pero estas drogas causan daño al medio ambiente, así como contaminación a los alimentos y resistencia parasitaria. Hasta el momento, el control de *R. sanguineus* se ha limitado al uso de productos químicos en diferentes presentaciones (Spot-On formulaciones, collares impregnados, shampoo, sprays, jabones y polvos) utilizando acaricidas como piretroides, organofosforados, formamidinas y fenilpirazoles, sin tener resultados satisfactorios. Esta falta de eficacia se atribuye principalmente al alto porcentaje (95%) de garrapatas fuera del hospedador y a la aparición de cepas resistentes resultado del repetido e intenso uso de acaricidas, que también contribuyen a la contaminación del medio ambiente (Perez-Perez *et al.*, 2010; Rodríguez-Mallon *et al.*, 2012).

### **2.7.2 Control del ambiente**

Los procedimientos no químicos para el control de las garrapatas deben aplicarse junto con los métodos de control químico. El cambio de hábitat es muy importante en el control de garrapatas *R. sanguineus*. Las grietas y cuevas deben ser selladas y el pasto, así como la hierba deben mantenerse corto. En casas muy infestadas, las garrapatas se ven comúnmente arrastrándose por paredes, cortinas,

ventanas y puertas, y debajo de los muebles. En este tipo de situación, puede ser necesaria la aplicación residual de acaricidas en interiores (Dantas-Torres, 2008a).

### **2.7.3 Control biológico**

Como las garrapatas tienen muchos enemigos naturales (por ejemplo, bacterias, hongos y nematodos), su control biológico parece ser factible (Samish *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el uso de hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, pueden tener potencial para controlar poblaciones de ciertas especies de garrapatas, incluyendo *R. sanguineus* (Kirkland *et al.*, 2004; Samish *et al.*, 2004). Un estudio reciente demostró que las formulaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* fueron perjudiciales para las ninfas alimentadas y para los adultos alimentados de *R. sanguineus* (Reis *et al.*, 2005). Después de la selección de cepas entomopatógenas apropiadas, el mayor desafío es idear estrategias de producción para llevarlas a un uso práctico (Samish *et al.*, 2004).

### **2.8 Respuesta inmunitaria contra garrapatas**

La exposición del hospedero a sustancias extrañas (antígenos) originadas de los artrópodos (generalmente ectoparásitos), provoca en él una respuesta que en muchos casos es de naturaleza inmunológica. Las manifestaciones de esta respuesta pueden ser de tipo humoral (anticuerpos), celular (células sensibilizadas, linfocinas, células citotóxicas) o ambas. Cabe señalar que en general, los antígenos que logran llegar al bazo, estimulan una respuesta humoral, mientras que los que permanecen en la piel, como es el caso de los antígenos de muchos ectoparásitos, tienden a inducir respuestas de tipo celular (Barriga, 1981), entre las que sobresalen reacciones de tipo hipersensibilidad cutánea basofílica (HCB) o de Jones-Mote (Dvorak *et al.*, 1970; Notomo *et al.*, 1980).

Los estudios sobre la respuesta inmune en las infestaciones por artrópodos en vertebrados señalan en su gran mayoría, manifestaciones de inmunidad humoral (anticuerpos, hipersensibilidades tipos I y III) y poco o casi nada de aquellas de inmunidad de tipo celular (Ackerman *et al.*, 1981). Esto se puede deber, en parte, a

que relativamente es más fácil determinar anticuerpos (in vivo o in vitro) que linfocinas o células citotóxicas. Además, hay otros informes en el sentido de que algunas especies de vertebrados son capaces de adquirir resistencia inmune contra algunos artrópodos (por ejemplo, las garrapatas: *Hypoderma lineatum* e *H. bovis* (Baron *et al.*, 1986), mientras que este fenómeno no se ha podido demostrar en otros vertebrados (por ejemplo, los perros contra los ácaros *Demodex canis*) (Miller *et al.*, 1979).

Las reacciones de hipersensibilidad o alergia a antígenos de artrópodos varían ampliamente entre las especies de huéspedes, entre los individuos de una misma especie y entre las especies de artrópodos involucrados. La dermatitis es una de las manifestaciones más comunes en el hombre y en menor escala en los animales. De estos últimos, los perros, gatos y caballos parecen ser las víctimas más frecuentes, posiblemente debido a que están más estrechamente asociados con el hombre y, por lo tanto, reciben mayor atención que otras especies (Nelson *et al.*, 1977).

Generalmente hay dos tipos de hipersensibilidad hacia antígenos de artrópodos hematófagos, caracterizadas por reacciones inmediatas y tardías. Estos estados de reactividad pueden ocurrir separados o juntos. Un estado de relativa "no-respuesta" también ocurre frecuentemente y por lo general se manifiesta tiempo después de ocurrir las reacciones de hipersensibilidad a la exposición continua a antígenos de artrópodos hematófagos, sobre todo a aquellos que se alimentan directamente de los vasos sanguíneos (solenófagos) como son mosquitos, chinches y pulgas entre otros (Benjamin *et al.*, 1980).

## **2.9 Antígenos contra *Rhipicephalus sanguineus***

Perez-Perez *et al.*, 2010 investigaron la eficacia del antígeno Bm86 sobre el potencial biótico de *R. sanguineus*. Perros domésticos fueron vacunados con Bm86 y desafiados con los tres estadios de la garrapata *R. sanguineus*. El efecto de la vacunación fue evaluado mediante la determinación de parámetros biológicos incluyendo la tasa de rendimiento de larvas, ninfas y adultas hembras. Las tasas de

recolección de larvas, ninfas y hembras adultas alimentadas en perros vacunados fueron significativas ( $p < 0.05$ ) reducidas en un 38%, 29% y 31% respectivamente, comparados con los controles no vacunados.

La proteína P0 es esencial para ensamblar la subunidad ribosomal 60s. Rodríguez-Mallon *et al.*, 2012 identificaron una secuencia inmunogénica de la proteína ribosomal P0 de *Rhipicephalus sp.* La eficacia de 20 aminoácidos de péptidos sintéticos de esa secuencia fue probada como vacuna contra *R. sanguineus* en inmunización con conejos. Se observó una notable disminución en la viabilidad de las ninfas recién mudadas de larvas alimentadas en conejos vacunados. El número de adultos y el número de huevos eclosionados se redujeron significativamente, con una eficacia general del 90%.

Un estudio reciente describió la proteína ATAQ, un homólogo Bm86 putativo con alta similitud en estructuras primarias y secundarias. A pesar de los experimentos con RNAi mostrando un fenotipo muy débil para Bm86 y ATAQ, Bm86 causó una fuerte protección cuando se usó como antígeno (Nijhof *et al.*, 2006). Este estudio tuvo como objetivo encontrar un péptido antigénico de la proteína ATAQ de *R. microplus* descrito en GenBank usando un enfoque de vacunología inversa y caracterizar la respuesta inmune contra dicho péptido. En los resultados se reportó una eficiencia de reducción en los parámetros del ciclo de vida general del 47% para *R. sanguineus* (Rangel *et al.*, 2016).

## **2.10 Proteínas candidatas de *R. sanguineus***

### **2.10.1 Proteína VDAC**

La mitocondria tiene un importante papel en la apoptosis, a través de la permeabilidad de la membrana, que permiten la liberación de moléculas que activan la apoptosis, tal como el citocromo C (Kroemer *et al.*, 2007). Algunos patógenos pueden inducir o inhibir la permeabilidad de la membrana mitocondrial, que se entiende como un regulador potencial del proceso apoptótico. El canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) es una proteína que se encuentra en la membrana mitocondrial externa y permite el flujo de pequeñas moléculas dentro del espacio de

la membrana mitocondrial. Esto también participa en las complejas interacciones que regulan el metabolismo y la apoptosis celular (Roman *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2007).

En la apoptosis, una cascada de enzimas cisteína proteasa, caspasas, capaz de escindir proteínas dirigidas, se activa, posteriormente llevando a la muerte celular organizada. Defectos en la regulación de la apoptosis a menudo se asocian con enfermedades y resistencia a los medicamentos, así como con la capacidad de las células para evadir la apoptosis, un sello distintivo del cáncer. Dos vías separadas que conducen a la activación de la caspasa se han caracterizado y se conocen como las vías intrínseca y extrínseca. La apoptosis mediada por mitocondrias se produce a través de la vía intrínseca, que se inicia en respuesta a diferentes estímulos, que incluyen niveles altos de  $Ca^{2+}$  citoplasmático, especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de proteínas de la familia pro-apoptótica Bcl-2 o daño por UV. La vía apoptótica extrínseca se activa a través de receptores de muerte que pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ) y puede inducir la activación de la vía intrínseca a través de la escisión dependiente de caspasa 8 de Bid y la translocación de su forma truncada a la mitocondria. Por lo tanto, las señales apoptóticas iniciadas por los receptores de la muerte se pueden vincular a la apoptosis mediada por mitocondria. Las mitocondrias contienen un arsenal de factores apoptogénicos, que normalmente residen en el espacio intermembranal, como Cito c, factor de inducción de apoptosis (FIA), y endonucleasa G. Durante la transducción de una señal apoptótica en la célula, una alteración en la permeabilidad de la mitocondria ocurre, facilitando la liberación de las proteínas apoptogénicas, que participan en los procesos complejos que finalmente resultan en la muerte celular (Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012).

Se han propuesto varios modelos en competencia para la liberación de factores apoptogénicos. Algunos modelos sugieren que la liberación implica exclusivamente un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MME) debido a la formación de un canal lo suficientemente grande como para permitir la liberación de proteínas, como Cito c. Otros modelos proponen que

la liberación es resultado de la interrupción de la integridad de la MME. Brevemente, estos modelos incluyen: (1) hinchazón de la matriz osmótica causada por el cierre de VDAC, que conduce a la ruptura de MME y la liberación no específica de proteínas intermembranales en el citosol; (2) el poro de transición de la permeabilidad (PTP) un complejo formado de poros de gran conductancia, formado en respuesta a la sobreproducción de ROS o  $\text{Ca}^{2+}$  se sobrecarga con apertura sostenida que causa la muerte celular; (3) Bax, una proteína proapoptótica, que se oligomerizan para formar un canal de conducción Cito c en la MME; (4) Bax y Bak se oligomerizan para formar poros después de su activación por tBid; (5) hetero-oligómeros compuestos de VDAC y Bax se forman; (6) liberación de Cito c a través del canal inductor de apoptosis mitocondrial, un canal MME supramolecular de alta conductancia; (7) se forma un canal lipídico en la OMM mediante una ceramida auto ensamblada, y los homo-oligómeros VDAC 1 se forman en la inducción de la apoptosis. En apoyo a este modelo, recientemente se demostró que la inducción de apoptosis se correlaciona con un aumento en la oligomerización de VDAC 1 (hasta 20 veces). Debe señalarse que, sin embargo, que se informó que las isoformas VDAC son prescindibles para la apertura del PTP inducida por el estrés oxidativo y  $\text{Ca}^{2+}$  (Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012).

Las porinas VDAC fueron identificadas inicialmente en la membrana externa de la mitocondria (Sortago & Moran, 1993). Son canales con un peso molecular de 30-35 kDa, y han sido encontrados en plantas, hongos, bacterias, protozoarios y el humano, en donde ellos están involucrados en procesos de apoptosis. El canal de VDAC es una proteína integral de membrana, que consiste en un polipéptido que tiene regiones alternadas de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, formando de 13 a 19 cadenas transmembranales  $\beta$  compuestas por una sola hélice  $\alpha$  en el extremo amino. Esta conformación proporciona un medio para separar un ambiente apolar de uno polar, formando un barril que es insertado en la membrana que forma el poro. Humanos, así como ratas y ratones, tienen 3

diferentes tipos de genes VDAC que codifican diferentes isoformas expresadas en diferentes tejidos (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015).

La ubicación de VDAC 1 en el MME la convierte en un punto de anclaje funcional para las moléculas que interactúan con las mitocondrias. VDAC 1 muestra los sitios de unión para la glicerol quinasa, la hexocinasa y la creatina quinasa. La creatina quinasa mitocondrial (CKMt), en su estado octamérico, interactúa con VDAC 1 y causa una afinidad disminuida con HK y Bax. VDAC también forma complejos con otras proteínas, como la tubulina, actina y gelsolina, así como proteínas apoptosis-reguladoras tales como los miembros de la familia Bcl-2 (Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012).

Las células cancerosas se caracterizan por una alta tasa de glucólisis, lo que lleva a mejorar la generación de lactato que se produce incluso en presencia de oxígeno (glucólisis aeróbica). Este fenómeno se conoce como el "efecto Warburg". HK cataliza el primer paso de la glucólisis, es decir, la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato (G-6-P). En muchos cánceres, incluyendo colon, próstata, linfoma, glioma, adenomas gástricos, carcinomas y cánceres de mama, la notable propensión de las células malignas a la actividad de alta glucólisis depende con frecuencia de la marcada sobreexpresión de HK-I y / o HK-II. De las cuatro isoenzimas de HK de mamíferos, HK-I y HK-II son capaces de unirse a la MME, específicamente a VDAC. Al unirse a VDAC HK tiene acceso al ATP mitocondrial para la fosforilación de la glucosa. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los niveles elevados de HK unida a mitocondria en células cancerosas también protegen contra la muerte celular mediada por mitocondria. La sobreexpresión de HK en varias líneas celulares suprimió la liberación de Cito c inducida por STS y la apoptosis, mientras que la unión de HK-II a las mitocondrias inhibió la liberación de Cito c inducida por Bax y la apoptosis. La evidencia acumulada indica que HK-I media su efecto antiapoptótico interactuando directamente con VDAC1. HK-I y VDAC fueron co-inmunoprecipitados, y HK-I interactuó directamente con VDAC reconstituido en bicapa para inducir el cierre del canal de una manera que se invierte por G-6-P. Además, los estudios de mutagénesis revelaron que una mutación única

en VDAC1 evitó la protección mediada por HK-I contra la apoptosis y el cierre del canal, mientras que el VDAC1 truncado en el extremo N perdió su capacidad de enlace HK-I (Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012).

Se mostró que varios reactivos interactúan con VDAC y modifican su actividad de canal al aumentar la probabilidad de cierre de la proteína, disminuyendo así la conductancia del canal. La modificación de la actividad de VDAC mediante fosforilación también fue reportada. A bajos niveles del voltaje (10 mV) el canal es estable en un estado abierto de larga duración, mientras que en estados positivos o negativos altos (40 mV), VDAC presenta múltiples subestados con selectividad y permeabilidad iónicas diferentes. En estado abierto, VDAC conduce selectivamente pequeños iones y aniones, glutamato, ATP, acetilcolina y dopamina. Se han propuesto diversos reactivos como Ca<sup>2+</sup>, ATP, glutamato, NADH y varias proteínas han sido propuestas en la interacción con VDAC para modular su actividad de canal (Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012).

### **2.10.2 Proteína Rs86**

Investigadores australianos aislaron una glicoproteína de 89 kDa denominada Bm86. Tiene un punto isoeléctrico de 5.1 a 5.6 y una afinidad a la lectina de germen de Trigo. Microgramos de este antígeno son capaces de inducir una protección efectiva en el ganado contra el parásito, como lo demuestra la baja supervivencia de las garrapatas en el ganado vacunado y la reducción del peso en la repleción y ovoposición. El antisuero del Antígeno reacciona con la superficie de las células de digestión en el intestino de la garrapata. Como resultado de la reacción con el anticuerpo, la actividad endocítica (que es un paso crítico en la digestión de sangre en la garrapata) se inhibe de manera fuerte y rápida (Willadsen et al., 1989).

Se sabe que Bm86 es una glicoproteína unida a la membrana expresada principalmente en la superficie del tracto digestivo de las garrapatas *R. microplus*. Su expresión se limita a unos pocos sitios en la membrana celular digestiva, en las microvellosidades expuestas a la luz intestinal (Rand et al., 1989).

Bm86 recombinante es la base de las vacunas comerciales Tick GARD y Gavac TM (Rodríguez *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 2007). Varias vacunas han sido desarrolladas con la formulación de esta proteína (Rand *et al.*, 1989; Rodríguez *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 1999; Patarroyo *et al.*, 2002).

Sin embargo, se encontraron porcentajes variables de eficacia frente a cepas de *R. microplus* en diferentes localizaciones geográficas, lo que puede deberse a variaciones alélicas naturales en el gen Bm86 (de la Fuente & Kocan, 2007). Una diferencia del 3,4% en la secuencia de Bm86 entre diferentes cepas podría ser suficiente para causar una respuesta inmune ineficiente contra las cepas (García-García *et al.*, 1999). El porcentaje de eficacia de Tick GARD y Gavac TM en una prueba de paro con un aislado regional de *R. microplus* fue de 46,4% y 49,2%, respectivamente (Andreotti, 2006).

Hay una diferencia en Bm86: los sitios hidrófobos de CG (cepa de Campo Grande) tienen el potencial de interferir con la unión de anticuerpos, lo que puede explicar la baja eficacia de Gavac TM para prevenir la infestación de garrapatas en la región de Campo Grande (Andreotti, 2006).

La lisis de las células digestivas del intestino medio mediadas por anticuerpos anti-Bm86 durante la alimentación de la garrapata se produce en garrapatas que se alimentan de bovinos Bm86 vacunados, lo que da lugar a una fuga de la harina de sangre en el hemocele de la garrapata (Agbede *et al.*, 1987).

Además, se ha demostrado que esta proteína contiene varios dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) que pueden estar implicados en la coagulación de la sangre y el crecimiento celular (Kempt *et al.*, 1989).

### 2.10.3 Proteína Subolesina

Subolesina (SUB) es un antígeno protector bien caracterizado en muchas garrapatas y, por lo tanto, es potencialmente útil en el desarrollo de una vacuna de amplio espectro (Pengyun *et al.*, 2016). Funciona como un factor de transcripción que regula la expresión génica, que afecta a múltiples procesos celulares, como la respuesta inmune innata de la garrapata, la alimentación, la reproducción y el desarrollo (Manzano-Román, Díaz-Martín, Oleaga, Siles-Lucas & Pérez-Sánchez, 2012; Yonghong *et al.*, 2014; Sultana, Patel, Sonenshine & Neelakanta, 2015; Pengyun *et al.*, 2016).

Las interacciones de proteínas intermedias como Subolesina con NF- $\kappa$ B y otras proteínas reguladoras se unen al DNA y remodelan la cromatina para regular la expresión génica de la transducción de señales y los genes de respuesta inmune innata y los reguladores transcripcionales. Esta amplia función de Subolesina como factor de transcripción explica el profundo efecto de la eliminación de genes por RNAi en la fisiología de las garrapatas y los insectos, así como en el desarrollo y la expresión de genes en las garrapatas. Subolesina es funcionalmente importante para la inmunidad innata de artrópodos y, al menos en las garrapatas, para el desarrollo y la función de los tejidos y para la infección y multiplicación de patógenos.

Subolesina es un antígeno protector de garrapatas que se descubrió recientemente en *Ixodes scapularis* y demostró por RNAi y ensayos de inmunización ser una proteína que protege a los hospederos contra las infestaciones de garrapatas, reduce la supervivencia de las garrapatas y la reproducción, causa degeneración del intestino, glándula salival, tejidos reproductivos y embriones. Se demostró que la subolesina de la garrapata es una proteína intracelular evolutiva conservada en organismos vertebrados e invertebrados (Canales *et al.*, 2009).

La vacunación con subolesina recombinante ejerce un control eficaz de las infestaciones de garrapatas al reducir el número de garrapatas, el peso y la

ovoposición; así como las enfermedades transmitidas por garrapatas (Manzano-Román, Díaz-Martín, Oleaga & Pérez-Sánchez, 2015).

Los ensayos de inmunización usando subolesina de garrapata recombinante demostraron eficacia protectora contra las infestaciones de garrapatas y redujeron la capacidad vectorial de las garrapatas (Shakya, Kumar, Nagar, de la Fuente & Ghosh, 2014; Pengyun *et al.*, 2016).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

### III. JUSTIFICACIÓN

*R. sanguineus* es una garrapata cosmopolita, siendo de gran importancia como vector de varias enfermedades bacterianas. Esta garrapata es responsable del mantenimiento y transmisión de muchos patógenos que afectan a animales domésticos (caninos principalmente) y seres humanos. La rickettsiosis canina es una infección causada por *Rickettsia rickettsii* (patógeno zoonótico) y es transmitida principalmente por *R. sanguineus*. En México durante las décadas de 1930 a 1950 se identificó a *R. sanguineus* como vector principal de los casos de Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (en Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Sinaloa y Sonora).

El control de las garrapatas mediante la vacunación evitaría contaminación y la selección de garrapatas resistentes a los fármacos que resultan de aplicaciones repetidas de acaricidas. Las vacunas también podrían diseñarse para incluir múltiples antígenos de garrapatas que pueden dirigirse a una amplia gama de especies. Hoy en día se cuentan con varias estrategias para el diseño de vacunas, este estudio propone métodos informáticos para la identificación de péptidos B de tres proteínas que ya han demostrado ser candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas contra garrapatas, es por ello con el fin de obtener métodos alternativos de control sustentable se evaluó la eficacia de péptidos B recombinantes de VDAC, Rs86 y Subolesina para la reducción del potencial biótico de *R. sanguineus* en conejos como modelo experimental.

#### IV. HIPÓTESIS

Las larvas de *R. sanguineus* disminuyen su capacidad de supervivencia al ser alimentadas con anticuerpos de conejos contra epítomos B conservados de las proteínas Rs86, VDAC y Subolesina.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Identificar y evaluar epítomos B conservados de las proteínas Rs86, VDAC y Subolesina de *R. sanguineus*.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Obtener péptidos sintéticos con epítomos B conservados del gen Rs86, VDAC y Subolesina.
2. Generar anticuerpos de conejos contra los péptidos sintéticos.
3. Evaluar la supervivencia *R. sanguineus* alimentadas con los anticuerpos generados.
4. Obtener la secuencia predicha del gen VDAC de *R. sanguineus* de cepas mexicanas.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Localización geográfica

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas y en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria, en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Así como en el área canícula (ARCUN); instalaciones de Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, del municipio del Marqués que se localiza entre los 20° 42' 40.7" de latitud norte y los 100° 15' 28.9" de longitud oeste.

### 6.2 Material Biológico

En el experimento donde se estudió el efecto de inmunización con Péptidos B en larvas de garrapata, se trabajó con dos grupos de 5 conejos de la raza Nueva Zelanda de 4 meses de edad. Los animales del grupo control fueron inoculados con adyuvante/PBS 1X pH 7.4, los animales del grupo estudio fueron inoculados con 100 µg de cada péptido/adyuvante y los dos grupos fueron infestados con larvas de garrapata.

La infestación de los dos grupos se realizó con larvas *R. sanguineus* de una muestra de campo de Tepic Nayarit. Para ello se incubaron hembras repletas de *R. sanguineus* obtenidas de un perro infestado. Las larvas, al momento de la infestación tenían 1 mes de edad.

### **6.3 Obtención de la secuencia de aminoácidos de los genes VDAC, Rs86 y Subolesina de *R. sanguineus*.**

Se realizó una búsqueda de los genes VDAC, Rs86 y Subolesina de *R. sanguineus* en la base de datos del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

A las secuencias nucleotídicas obtenidas de la base de datos se les realizó un análisis de búsqueda de marco de lectura abierto u ORF (Open Reading Frame) mediante el algoritmo bioinformático ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) el programa devuelve el rango de ORF así como la traducción de la proteína. De esta manera se obtuvo la secuencia de aminoácidos de los genes detectados en el GenBank.

### **6.4 Análisis de conservación de las proteínas predichas**

Para evaluar el grado de conservación de las secuencias proteicas se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de VDAC, Rs86 y Subolesina. Para ello se utilizó el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) en la página web del European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

### **6.5 Análisis *in silico* de la estructura secundaria de las proteínas**

Cada proteína se sometió a un análisis bioinformático de estructura secundaria para predecir:

Péptido señal utilizando la herramienta SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al., 2011).

Dominios funcionales utilizando la herramienta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Schultz et al., 1998).

Regiones hidrofóbicas utilizando la herramienta ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) (Kyte and Doolittle, 1982).

Regiones transmembranales utilizando la herramienta TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Sonnhammer *et al.*, 1998).

## 6.6 Predicción y selección de epítomos B conservados

La predicción de epítomos B de cada proteína se realizó con diferentes programas bioinformáticos y algoritmos que identifican secuencias con características potenciales de un epítopo B. La selección fue hecha de regiones extramembranales, con las siguientes características dependiendo el programa:

- ✓ Programa Bcepred ([http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/bcepred\\_submission.html](http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/bcepred_submission.html)) que predijo hidrofiliidad, accesibilidad y antigenicidad. Los epítomos elegidos fueron los que arrojaron un valor de predicción >0.80.
- ✓ Programa ABCpred (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>) que predijo epítomos de células B en una secuencia de antígeno, utilizando una red neuronal artificial. Los epítomos elegidos fueron los que arrojaron un valor de predicción >1.
- ✓ Programa Immune Epitope Database and Analysis Resource ([https://www.iedb.org/home\\_v3.php](https://www.iedb.org/home_v3.php)) que una de sus herramientas nos predice epítomos de células B lineales en función de las características de la secuencia del antígeno estudio utilizando escalas de aminoácidos y HMM. Los epítomos elegidos fueron los que arrojaron un valor de predicción >1.

- ✓ Programa Emboss Antigenic (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>) que realizó un análisis de sitios antigénicos mediante el método de Kolaskar y Tongaonkar para predecir determinantes antigénicos. Los epítomos elegidos fueron los que arrojaron un valor de predicción >1.100.

Los epítomos B seleccionados tienen como característica el haber sido predichos por al menos 5 algoritmos, descritos anteriormente. La selección también se basó en el criterio de conservación de secuencias ya que los epítomos B de cada proteína tienen la misma secuencia entre cepas.

Los péptidos se sintetizaron en Shanghai China en la empresa GL Biochem. La síntesis química fue elaborada en un sistema de MAPS'8 (Multiple Antigenic Peptide System), que consiste en generar secuencias en octámeros ramificados para brindar una mayor inmunogenicidad.

La cantidad de péptidos sintetizados por proteína se muestra en el Cuadro número 2.

**Cuadro 2. Identificación de Péptidos que contienen epítomos B conservados.**

<b>Proteína</b>	<b>No. de Péptidos</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>
<b>Rs86</b>	4	Rs86-1	DDM-YYN-AAE-KHC-EYK-STC-KTK-ECS-YGR
		Rs86-2	NKG-QIC-VYE-NEK-ANC-QCP-PGT-VAG-QAG-CT
		Rs86-3	CVY-KDQ-KAE-CKC-PEG-T
		Rs86-4	KVV-CEC-PMR-QHL-VND-EC
<b>VDAC</b>	3	VDAC-1	NFA-PQT-GKK-SGA-LKA-AYK
		VDAC-2	TNV-NDG-QEF-AGS-VFQ-RVN-PQL-QTG-VQL
		VDAC-3	LDC-KST-THT-GVE-FNV
<b>Subolesina</b>	2	Subolesin-1	DPS-PFG-DVP-PKL-TSE-EI
		Subolesin-2	KER-ESK-IRE-EYD-HVL-STK-LAE-Q

## 6.7 Generación de Anticuerpos contra los péptidos sintéticos

La inmunización se llevó a cabo en el área canícula (ARCUN); instalaciones de Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, del municipio del Marqués Querétaro. Se utilizaron conejos de la raza Nueva Zelanda de 4 meses de edad. Los conejos se mantuvieron en jaulas (un conejo por jaula) con agua y alimento *ad libitum*.

Los conejos fueron distribuidos en dos grupos de 4 animales. La dosis que se utilizó para inmunizar el grupo tratamiento fue de 1ml que contenía 100 µg de cada péptido (diluidos en 100 µl de PBS cada uno) / 900 µl de PBS y 100 µl de adyuvante Montanide ISA 50V (Seppic ®, Francia). Los conejos del grupo tratamiento se inmunizaron con la mezcla de los 9 péptidos

Los animales del grupo control se inocularon con adyuvante Montanide ISA 50V (Seppic ®, Francia) y PBS 1x pH 7.4 estéril en una relación 50:50, la dosis que se utilizó fue de 1ml por animal.

La inoculación se realizó vía subcutánea depositando la dosis en dos sitios cercanos a un ganglio linfático, entre las dos escápulas, utilizando una jeringa de 3ml con aguja de calibre 22. El calendario de inmunización se muestra en el cuadro 3.

## 6.8 Infestación con larvas de *R. sanguineus*

A cada conejo se le colocó una cámara de alimentación en una de sus orejas, para ello se rasuró la parte dorsal de la oreja dónde se encontró la mayor cantidad de pelo. La cámara de alimentación se fijó a la base de la oreja con tres suturas y pegamento quirúrgico. Para evitar que los conejos maltrataran la cámara con sus garras a cada uno se le colocó un collar isabelino del número 1 (Figura 9). En la punta de cada cámara de alimentación se diseñó una jareta por la cual se liberaron 250 larvas de *R. sanguineus* 7 días después de la cuarta inmunización. En el cuadro 3 se detallan los días en que se llevó a cabo la infestación y la recolección de las garrapatas.

La colecta de garrapatas se realizó en los días 3-4 post-infestación. Se colectaron las garrapatas que habían terminado de alimentarse en cada conejo, se identificó cada muestra con el número del animal, grupo y fecha de colecta. Las garrapatas se transportaron al laboratorio de Microbiología de la FCN de la UAQ donde se lavaron con benzal al 10%, se secaron y se colocaron en una caja de Petri rotuladas según el conejo y el grupo perteneciente. Se introdujeron en una incubadora en condiciones de 12h de luz y 12h de oscuridad por día, a una temperatura de 22-25°C y una humedad relativa de 95% hasta su muda a Ninfas.

**Cuadro 3. Calendario de inmunización e infestación de conejos.**

<b>Día</b>	<b>No. De Inmunización</b>	<b>Actividad</b>	<b>Fecha</b>
<b>4 días pre-inmunización</b>	-	Toma de sangre pre-inmunización	08-October-2017
<b>0</b>	1		12-October-2017
<b>21</b>	2	Toma de sangre	02-Noviembre-2017
<b>36</b>	3	Toma de sangre	17-Noviembre-2017
<b>46</b>	-	Toma de sangre ELISA INDIRECTA	27-Noviembre-2017
<b>121</b>	4		10-Febrero-2018
<b>128</b>	-	Toma de muestra	17-Febrero-2018
<b>130</b>	-	Infestación de los conejos	19-Febrero-2018
<b>133</b>	-	Primera colecta de larvas repletas	22-febrero-2018
<b>134</b>	-	Segunda colecta de larvas repletas	23-Febrero-2018



**Figura 9.** Conejo con una cámara de alimentación en oreja derecha, se observa la jareta en la punta de la tela y el collar isabelino que protege el sistema.

### **6.9 Determinación del título de anticuerpos por ELISA indirecto**

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular o en su defecto de la vena marginal de la oreja,

La placa de Elisa se dividió en tres secciones correspondientes a cada proteína, en una sección por triplicado se mezcló por pocillo 10  $\mu\text{g}$  de cada péptido de la proteína Rs86, en la segunda sección se mezcló por pocillo 10  $\mu\text{g}$  de cada péptido de la proteína VDAC y por último en la tercera sección se mezcló por pocillo 10  $\mu\text{g}$  de cada péptido de la proteína Subolesina. La mezcla se realizó en buffer carbonatos pH 9.6 (carbonato de sodio y bicarbonato de sodio 50 mM) y se dejó incubar la placa toda la noche a una temperatura de 4°C y después de la incubación las placas se lavaron tres veces con PBS Tween 0.5% pH 7.2. El bloqueo de la placa se realizó con 200  $\mu\text{l}$  de leche descremada al 5% en PBS Tween 0.5% y se dejó incubar sin movimiento 1 h a 37°C, después las placas se sometieron a tres lavados con la solución de lavado. El suero fue diluido a 1:500 en PBS Tween 0.5%

pH 7.2. Se colocó el suero en la placa y se incubó por 1h a 37°C, posteriormente las placas se lavaron tres veces con solución de lavado, después se añadió el anticuerpo secundario (Peroxidasa Affini Pure Goat Anti Rabbit IgG H+L ®) en una dilución de 1:5000 en PBS Tween 0.5% pH 7.2 y se dejaron en incubación por 1h a 37°C, posteriormente se realizaron tres lavados más con la solución de lavado y se añadió el sustrato dihidrocloruro de o-fenilendiamina en buffer citrato (ácido cítrico 0.1 M, fosfato de sodio dibásico 0.2 M y 4 µl de peróxido de hidrogeno al 30%). La microplaca fue leída en un lector iMark Microplate Absorbance Reader ®, BIO-RAD en un rango de lectura de 450 nm.

## 6.10 Análisis estadístico

### 6.10.1 ELISA INDIRECTA

El punto de corte se determinó con la suma de la media más tres desviaciones estándar, posteriormente se graficó el punto de corte y los valores correspondientes a los sueros pre-inmunización y cuarta inmunización de cada animal, se evaluó la dilución 1 :500.

Para comparar los resultados de la determinación del título de anticuerpos por ELISA indirecto se realizó un ANOVA ( $p < 0.05$ ) para comparaciones múltiples entre el grupo vacunado y el grupo testigo respectivamente. Ambas pruebas se corrieron con el programa SPSS 24.

Los resultados fueron evaluados estadísticamente utilizando la prueba de *t-student* para varianzas desiguales ( $p < 0.05$ ) para comparar los resultados del número de larvas repletas entre el grupo vacunado y el grupo control.

**El efecto sobre el número de larvas repletas** =  $100 [1 - (NGV/NGC)]$ , donde NGV es el número de garrapatas repletas en el grupo vacunado y NGC es el número de garrapatas repletas en el grupo testigo (Casquero *et al.*, 2013).

### 6.11 Recolección de garrapatas *R. sanguineus*

Las garrapatas fueron recolectadas de perros infestados en los siguientes estados de la República Mexicana.

- ✓ Querétaro
- ✓ Baja California Norte
- ✓ Nayarit
- ✓ Guerrero
- ✓ Morelos
- ✓ Yucatán

### 6.12 Extracción de DNA

Un cuarto de garrapata *R. sanguineus* previamente congelada en hielo seco se maceró con ayuda de un pistilo dentro de un tubo de 1.5ml. El protocolo de extracción de DNA se realizó según el kit "Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences). Se adicionaron 20 microlitros de proteinasa K al fondo del tubo de microcentrífuga de 1.5ml. Posteriormente se agregaron 180 microlitros de buffer ATL al tubo, después de ello se agregó 200 microlitros de buffer RBC. Con la ayuda del mismo pistilo se mezcló perfectamente la muestra hasta obtener una mezcla homogénea. La muestra se incubó a 50°C durante tres horas con agitación intermitente usando un homogenizador oscilatorio tipo Vortex de alta velocidad para ayudar a la lisis. Brevemente se centrifugó la mezcla para llevar la muestra al fondo del tubo. El sobrenadante del lisado se cargó en el centro de un tubo nuevo de 1.5ml. Se adicionaron 200 microlitros de buffer ATL dentro del tubo y se mezcló inmediatamente con la mano. Posteriormente se agregó 200 microlitros de etanol absoluto dentro del tubo mezclándolo inmediatamente. La muestra se incubó a 70°C durante 10 minutos. Se ensambló una mini-columna en el tubo colector. Se cargó toda la muestra dentro de la mini-columna. La mezcla se centrifugó a 8,000 x g durante un minuto, el líquido se desechó del tubo colector y este cuidadosamente se colocó de nuevo la columna. En seguida se agregó 500 microlitros de buffer AW1 a la columna y se centrifugó a 8,000 x g durante un minuto. Después se adicionaron 500 microlitros del buffer de lavado AW2 a la columna y se

centrifugó a 8,000 x g durante 1 minuto. Enseguida se volvió a centrifugar la muestra, pero ahora a 12,000 x g durante 1 minuto. En este paso se tiró el tubo colector, así como el líquido de desecho. Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml nuevo libre de nucleasas. Posteriormente, se adicionaron 100 microlitros de buffer de elución tipo AE en el centro de la columna. La columna se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 11,000 x g durante un minuto. De nueva cuenta se adicionaron 100 microlitros de buffer de elución tipo AE en el centro de la columna. Se centrifugó a 11,000 x g durante otro minuto. El DNA purificado se cuantificó en un espectrofotómetro tipo Nanodrop y posteriormente se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 6.13 Diseño de iniciadores para amplificar el gen VDAC

Dentro del laboratorio de Inmunología y Vacunas Iván Corona desarrolló iniciadores específicos para amplificar parte del gen VDAC de la garrapata *R. microplus* los cuales fueron utilizados.

**Cuadro 4. Par de iniciadores empleados en la amplificación del gen VDAC.**

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Dirección	Posición
<b>F_VDAC</b>	5'-GCT GAA TTC AAG AAC TAC CAC TTC GGC G-3'	Sentido	1-26
<b>R_VDAC</b>	5'-CAC ACG AAC GTC AAC GAC TCT AGA ACA A-3'	Antisentido	463-486

### 6.14 Amplificación del gen RsVDAC

Usando el DNA que se extrajo se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para el gen de estudio con el DNA de las diferentes cepas, para ello se diseñó un protocolo de termociclado con condiciones específicas al gen según las características químicas de cada iniciador.

A continuación, se muestra el protocolo de termociclado:

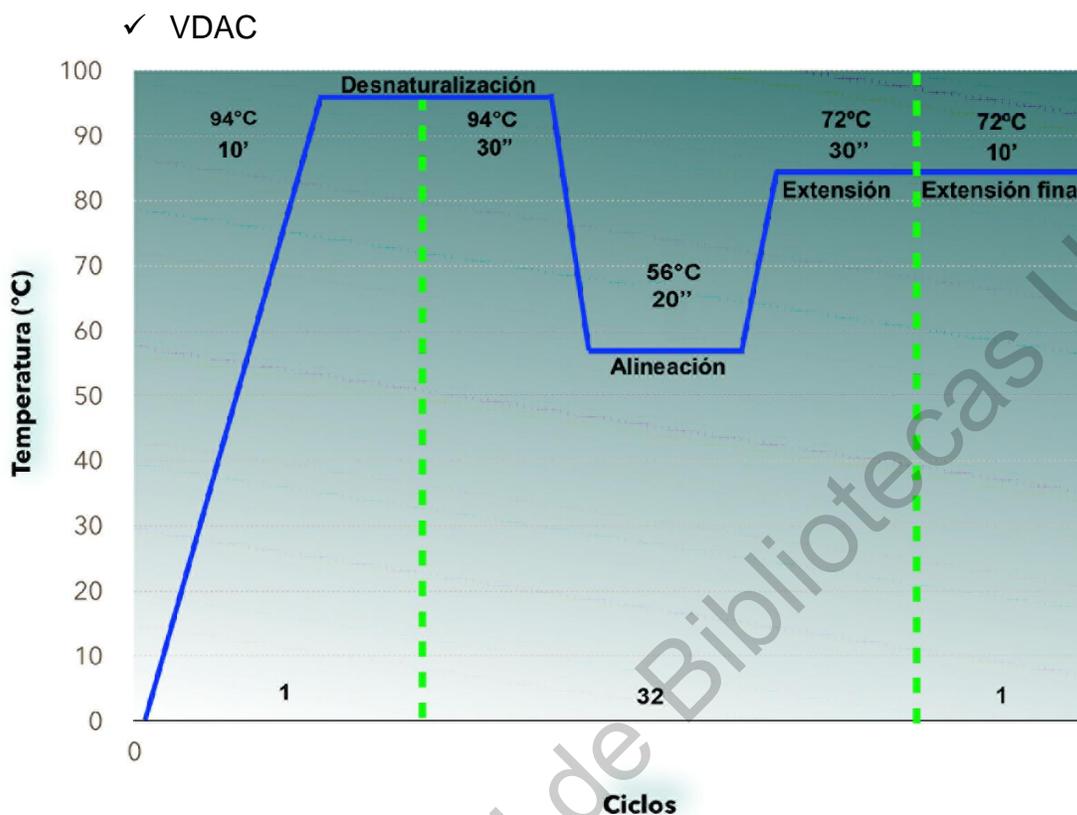


Figura 10. Termociclado para la amplificación de VDAC con los iniciadores F\_VDAC/ R\_VDAC.

La PCR comienza con una desnaturalización inicial del DNA a 94°C durante 10 minutos, posterior a esto comienzan 32 ciclos constituidos por tres fases cada ciclo: una fase de desnaturalización de DNA a 94°C durante 30 segundos, seguido con una fase de alineación de los iniciadores (F\_VDAC/ R\_VDAC) a 56°C durante 20 segundos, después de la alineación el ciclo termina con una fase de extensión a 72°C durante 30 segundos. Una vez culminados los 32 ciclos la reacción de la PCR finaliza con una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos (Figura 10).

La preparación de la mezcla de PCR para cada reacción fue constituida como se muestra a continuación en el Cuadro 5.

**Cuadro 5. Condiciones de la PCR para la amplificación de VDAC.**

Reactivo	Inicial	Final	Cantidad en $\mu$ l
Buffer Master Mix	2.5 X	1 X	12.5 $\mu$ l
Iniciador F_VDAC	20 $\mu$ mol	0.8 $\mu$ mol	1 $\mu$ l
Iniciador R_VDAC	20 $\mu$ mol	0.8 $\mu$ mol	1 $\mu$ l
DNA Querétaro	34 ng/ $\mu$ l	1.3 ng	1 $\mu$ l
DNA Guerrero	97 ng/ $\mu$ l	3.88 ng	1 $\mu$ l
DNA Morelos	182 ng/ $\mu$ l	7.3 ng	1 $\mu$ l
DNA Nayarit	41 ng/ $\mu$ l	1.6 ng	1 $\mu$ l
DNA Yucatán	85 ng/ $\mu$ l	3.4 ng	1 $\mu$ l
DNA Baja California	109 ng/ $\mu$ l	4.3 ng	1 $\mu$ l
H2O		cbp* 25 $\mu$ l	9.5 $\mu$ l
<b>Volumen Total</b>			25 $\mu$ l

\*cbp: Cuanto baste para

\*DNA: Cada estado de la Republica representa una reacción individual.

El control negativo tuvo las mismas condiciones para la PCR solo que no se le agregó DNA, la reacción se completó con H2O.

### 6.15 Purificación del producto de PCR para secuenciación

Para la purificación del producto de PCR de cada una de las muestras de campo se realizó un PCR punto final que consiste en la amplificación del gen VDAC de *R. sanguineus* utilizando las siguientes secuencias de oligonucleótidos: sentido GCT GAA TTC AAG AAC TAC CAC TTC GGC G y antisentido CAC ACG AAC GTC AAC GAC TCT AGA ACA A que amplifican un producto de 583 pb. Se prepararon dos reacciones de 50  $\mu$ l por muestra para al final obtener 100  $\mu$ l de volumen final agregando 60 ng de templado y usando los oligonucleótidos a una concentración de 20  $\mu$ M bajo las condiciones térmicas de 94°C por 10 minutos, seguido de 32 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos en un Thermal Cycler Dual S100 de BIO-

RAD. Para verificar el resultado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en condiciones de 80 V durante 50 minutos.

Empleando el protocolo de Wizard® Genomic DNA Purification Kit obtuvimos un producto purificado libre de oligonucleótidos y moléculas que pueden interferir en la secuenciación. Seguimos la siguiente secuencia por muestra:

### **Unión de DNA**

1. Se utilizó una Mini columna Wizard® para cada muestra. Se retiró y separó el émbolo de una jeringa desechable de 3 ml. Se conectó el barril de jeringa a la extensión Luer-Lok® de cada mini columna. Se insertó la punta del conjunto Minicolumn / Syringe Barrel en el colector de vacío.
2. Se añadió 1 ml de resina de limpieza Wizard® DNA a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La muestra se añadió (100µl del producto de PCR) a la resina de limpieza (cerré el tubo) y se mezcló con la mano varias veces.
3. Con la pipeta se mezcló el DNA de Wizard® DNA Clean-Up en el barril de jeringa. El émbolo se insertó en la jeringa lentamente y se empujó suavemente la suspensión en la mini columna con el émbolo de la jeringa (Figura 11).

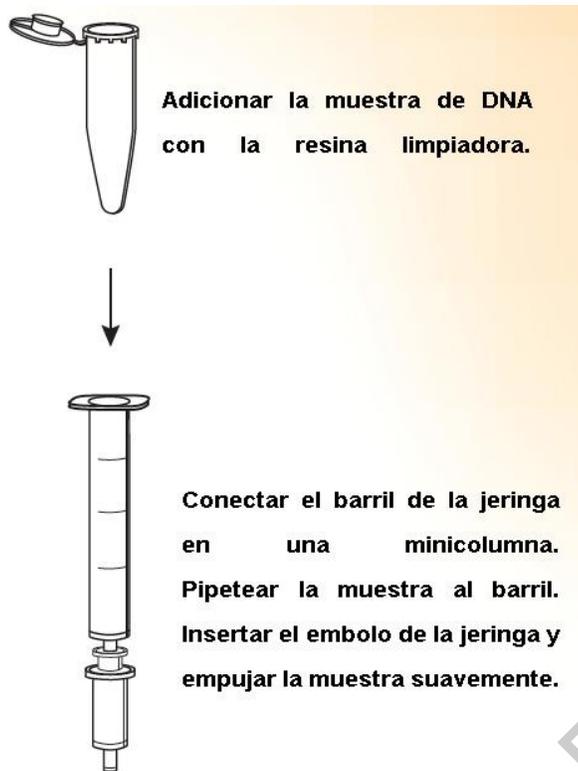


Figura 11. Ilustración de los pasos de Unión de DNA.

### Lavado

4. Se quitó la jeringa de la mini columna y se retiró el émbolo de la jeringa. Se volvió a colocar el barril de jeringa en la mini columna. Se añadieron 2ml de isopropanol al 80% en la jeringa. Se insertó el émbolo y se empujó la solución a través de la mini columna.
5. Se retiró el barril de jeringa y se transfirió la mini columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se centrifugó la Mini columna a máxima velocidad ( $10.000 \times g$ ) en una microcentrífuga durante 2 minutos para secar la resina (Figura 12).

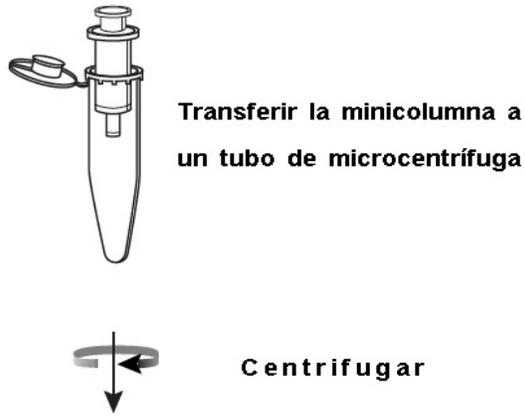


Figura 12. Ilustración de los pasos de lavado de la muestra.

### Elusión

6. Se transfirió la mini columna a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se aplicaron 250  $\mu$ l de agua precalentada (65-70 °C) o buffer TE a la mini columna y se esperó 1 minuto. Se centrifugó la Mini columna a velocidad máxima (10.000 x g) para eluir el DNA pegado (Figura 13).
7. Se retiró y desechó la Mini columna. El ADN purificado se almacenó en el tubo de microcentrífuga a -20°C.

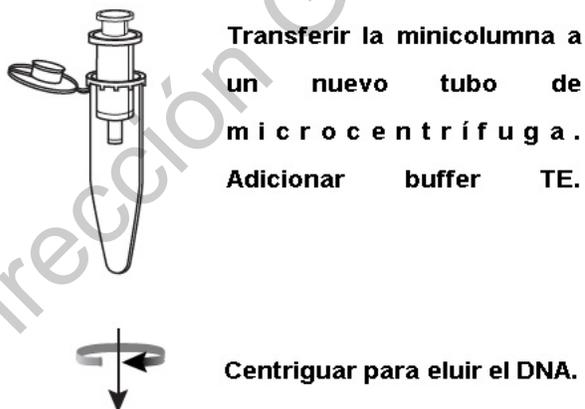


Figura 13. Ilustración de los pasos de Elusión del DNA.

Para secuenciar los amplicones ya purificados fue necesario cuantificar la concentración de DNA. La cantidad que se utilizó para secuenciar fue de 100 ng/ $\mu$ l. Las muestras fueron enviadas a la unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla. El servicio de secuenciación fue llevado a cabo por el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems, en un PCR y en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados y ensamblados utilizando el Software Bio Edit Sequence Alignment Editor® para finalmente obtener las secuencias de los genes.

Para predecir la secuencia de aminoácidos de cada gen se utilizó el programa ORFfinder de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Obtención de la secuencia de aminoácidos de los genes VDAC, Rs86 y Subolesina de *R. sanguineus*.

Se trabajo con todas las secuencias de *R. sanguineus* reportadas de cada uno de los genes, el único gen que no tiene reporte de la especie es VDAC por ello se utilizaron los registros que hay en el GenBak los cuales fueron tres y se agregó uno extra que fue proporcionado por el laboratorio LINVAS.

En el cuadro 6 se muestra el número de acceso de la secuencia de nucleótidos de los genes con los que se trabajó, extraídas de la base de datos del GenBank.

**Cuadro 6. Número de acceso de los genes estudio.**

Gen	Número de acceso
VDAC	>GU994210.1- <i>Rhipicephalus microplus</i> . México
	>BK007268.1- <i>Amblyomma variegatum</i> . USA
	Sin registro- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Guerrero, México
Rs86	>DQ201646.1- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . USA
	>KP087924.1- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . Habana, Cuba
	>EF222203.1- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . USA
Subolesina	>JX193845.1- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . España
	>DQ159968.1- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> . USA

Las secuencias de aminoácidos predichas de cada proteína corresponden a las reportadas en las bases de datos. El resultado del alineamiento múltiple de cada proteína permitió identificar regiones conservadas de las cuales se eligieron los péptidos B.

Aquí se muestra en color verde la secuencia de aminoácidos que se mantiene conservada en cada proteína:

## VDAC

>GU994210.1

```
MAPPICYADL GKQARDL FNKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGTSLNDTGKVNASLETKYKVPEYGLTL  
KEKWNNTDNTLS TEICSEEKLRGLKVAFHANFAPQTGKKS GALKAAYKFDNVHLNGDVDLGPPGFLVHGA  
AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLHTNVNDGQEFAGSVFQRVNPLQQTGVQLAWI  
AGTNATRFGLGCV
```

Esta proteína según el alineamiento resultó tener una identidad del 92.82% entre las tres especies comparadas, esto nos lleva a hipotetizar que si comparamos las secuencias de una misma especie en este caso de *R. sanguineus* de cepas mexicanas obtendremos un mayor porcentaje de identidad.

## Rs86

>KP087924.1

```
MRGIALFVAAVSLIGGCAAQSSVCSDFGNEFCGNAVCEVVPGAEHDFVCKCPGDDMYNAAEKHCEYKSTCKT  
KECSYGRCAQISPRKAVCGCDGVDSLTRQCNIQGWYADECRRKGGTAKLRITDGF LGAKCDCGEWSVMDRNRK  
CVPTTCLRPLDTCRDLCEKNLLEKDSRCCQGWNSANCS TAPEEGSYCSPGNLKGKDGSCKDACSAGEITLVCK  
YGCKGSTKPMRAYECECQSGDEVAEDGITCKRVFYTGDCSDEQKKTCPSEYCLVVRKGVVCECPMRQHLVND  
ECTSDCVDDKCHENFTECGVYMSKQNCYCPWRTRKPLPNVSI NECVLNEYYYTVSFTPNISLDSRSCDSYAAR  
VLDAIRTSIGNDVFKVEILNCTHDIKARLIASKPLSKHVIKRLQACEHPVDDLCLMYPKLPKKGSAIEEEE  
NLCDSILKTQENGYKQNKCVKVDNFFWFQCADGYRAVDEITRGLRRSVCEAGVSCSAKEQLECANKGQICV  
YENKANCQCPPGTAVAGQAGCTARTTCNPKI IRECDHKKKCVYKDQKAECKCPEGTIDDGDGCSI E PAKEPC  
SEYEVGKCRSKGQS CVTENGGKPVCKEISDATTAAATTKAKDKDQEEFCSEEDSGTCRSSGQRCVMEYGKPVCK  
KISDATTAAATTTTAKAKDKDQDRGKSSA
```

La proteína Rs86 resultó tener una identidad del 85.45% entre las secuencias comparadas. De las tres proteínas a analizar esta fue la que tuvo mayor porcentaje de variación entre aminoácidos.

Las cepas alineadas son de Estados Unidos y Cuba, son las únicas secuencias reportadas en el banco de genes, así que se originan de entornos, condiciones climáticas y biodiversidad diferente que influyen significativamente en el alto porcentaje de variabilidad genética y en la aparición de garrapatas con nuevas variantes genéticas (Peconick *et al.*, 2008).

## Subolesina

>JX193845.1

```
MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAANIREEMRRLQ  
RRKQLCFQGTDPPECQPTSGLSSPVRRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESKIREEYDHVLS TKLAEQYDTF  
VKFTYDQIQKRFEGATPSYLS
```

De las tres proteínas la única que resultó tener un 100% de identidad fue Subolesina, es una proteína altamente conservada. El alineamiento se realizó con una cepa española y otra americana. La detección de péptidos B a partir de esta secuencia de aminoácidos no fue complicada ya que tuvimos un amplio margen de elección, identificando determinantes inmunogénicos de la secuencia probablemente sería eficiente controlar infestaciones con por *R. sanguineus* de diferentes cepas.

## 7.2 Análisis *in silico* de la estructura secundaria de las proteínas, predicción y selección de epítopos B conservados

### 7.2.1 Proteína VDAC

Utilizando el algoritmo SignalP 5.0 la proteína VDAC no mostró péptido señal lo que explica que no es una proteína de secreción (Figura 14).

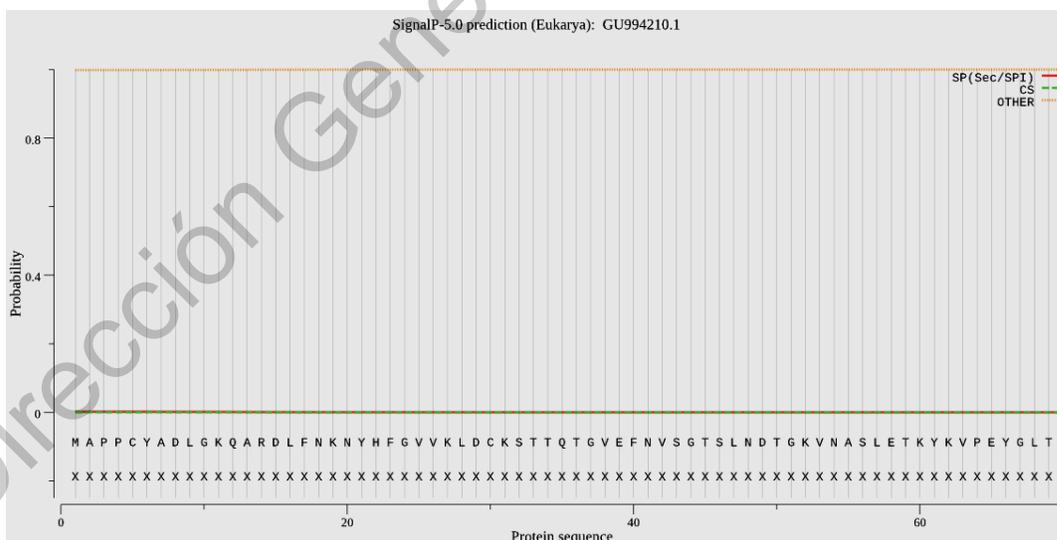
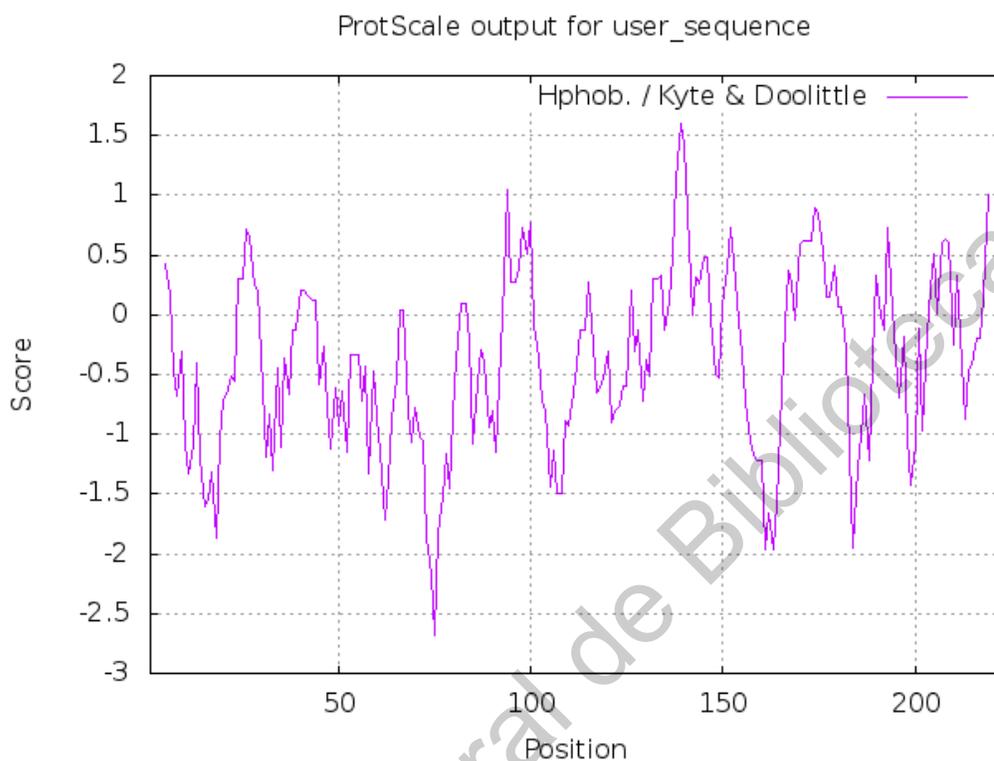


Figura 14. Análisis de predicción de péptido señal de la proteína VDAC con el programa SignalP 5.0

El análisis de hidrofobicidad con la herramienta bioinformática ProtScale no mostró regiones superiores a 1.6 que predican regiones hidrofóbicas en la proteína VDAC a lo largo de la secuencia (Figura 15).



**Figura 15. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas en la proteína VDAC con el programa ProtScale.**

Mediante el algoritmo TMHMM se identificó una región extracelular en toda la secuencia de aminoácidos de VDAC marcada en color rosa en la figura 16 y localizada entre los aminoácidos 1-223. El color rosa indica la región extracelular de la proteína.

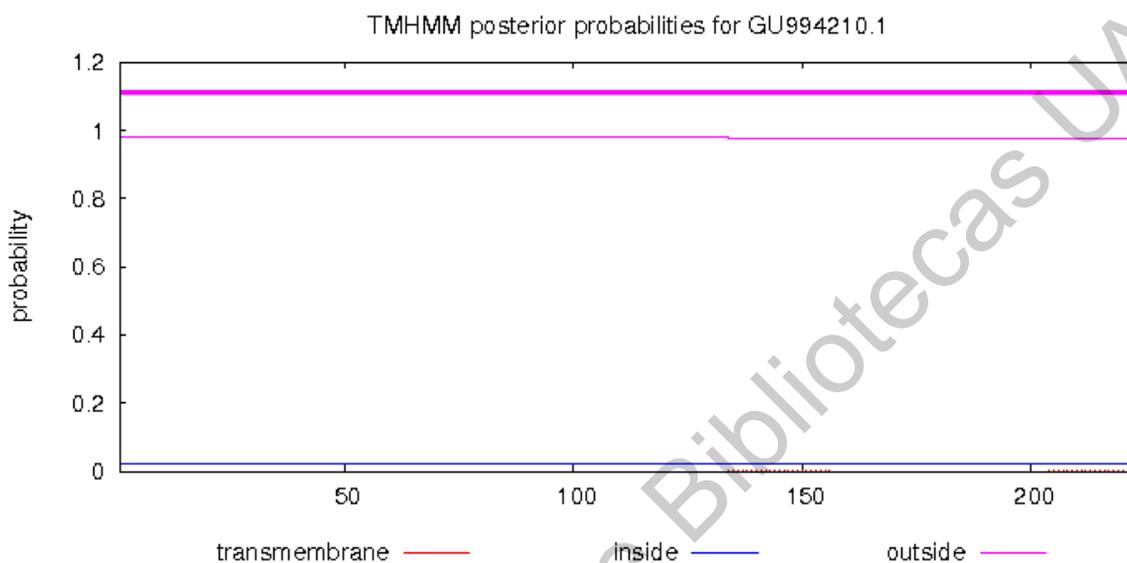


Figura 16. Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína VDAC con el programa TMHMM 2.0.

## 7.2.2 Proteína Rs86

Los resultados del análisis de la presencia de péptido señal mediante el algoritmo SignalP 5.0 indicaron la predicción de un sitio de corte de péptido señal para esta proteína entre los aminoácidos 19 y 20 (Figura 17).

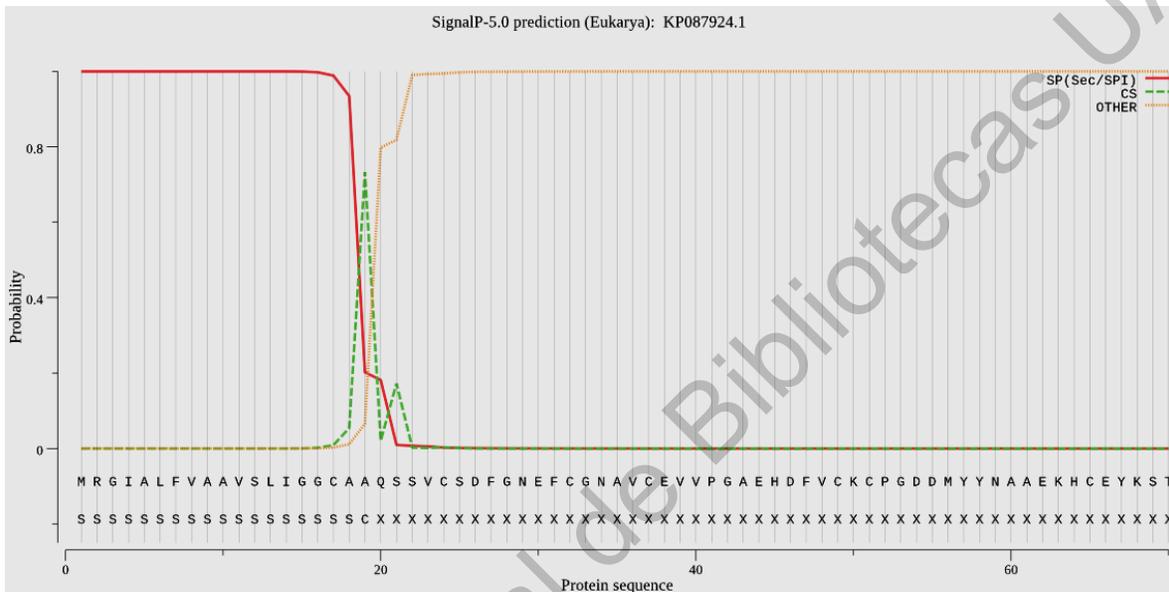
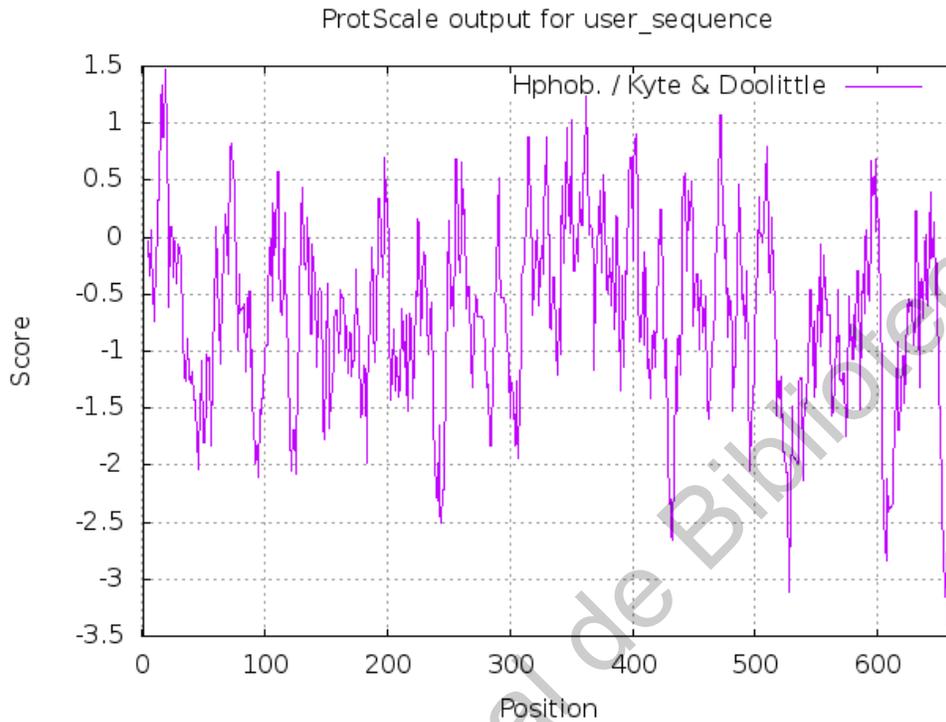


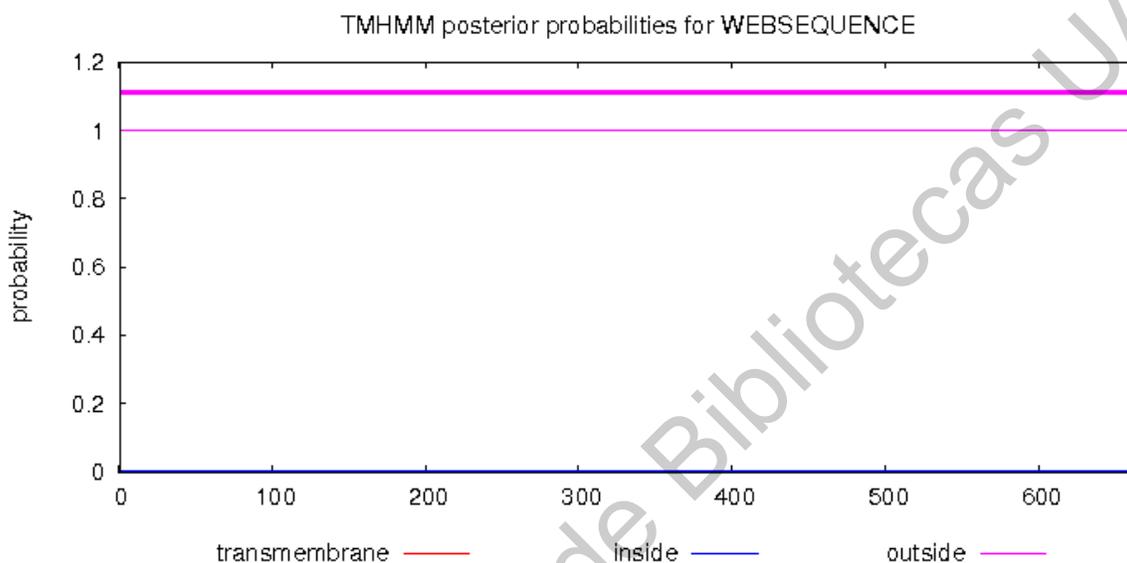
Figura 17. Análisis de predicción de péptido señal en la proteína Rs86 con el programa SignalP 5.0.

El análisis de hidrofobicidad con la herramienta bioinformática ProtScale no mostró regiones superiores a 1.6 que predican regiones hidrofóbicas en la proteína Rs86 a lo largo de la secuencia (Figura 18).



**Figura 18. Análisis de predicción de regiones hidrofóbicas de la proteína Rs86 con el programa ProtScale**

Mediante el algoritmo TMHMM se identificó una región extracelular en toda la secuencia de aminoácidos de Rs86 marcada en color rosa (Figura 19) localizada entre los aminoácidos 1-664. El color rosa indica la región extracelular de la proteína.



**Figura 19. Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales de la proteína Rs86 con el programa TMHMM 2.0.**



El análisis de hidrofobicidad con la herramienta bioinformática ProtScale no mostró regiones superiores a 1.6 que predicen regiones hidrofóbicas en la proteína Subolesina a lo largo de la secuencia (Figura 21).

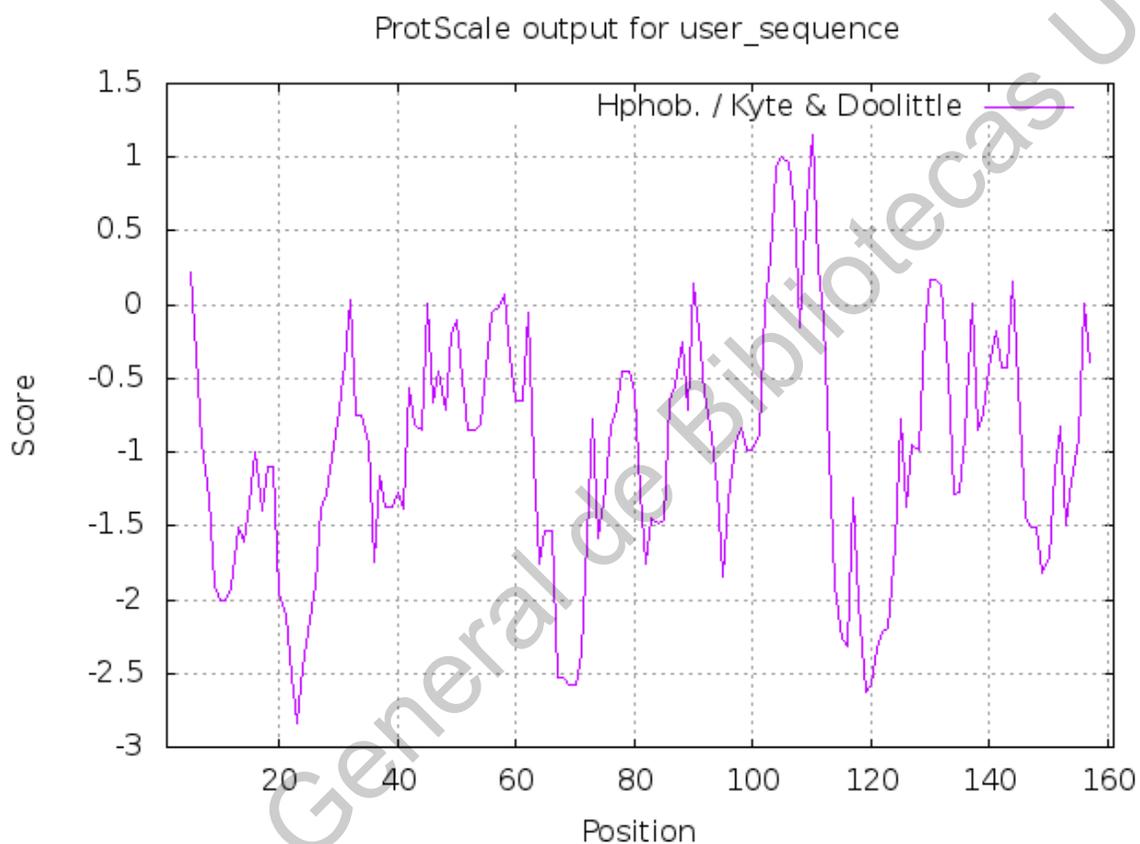
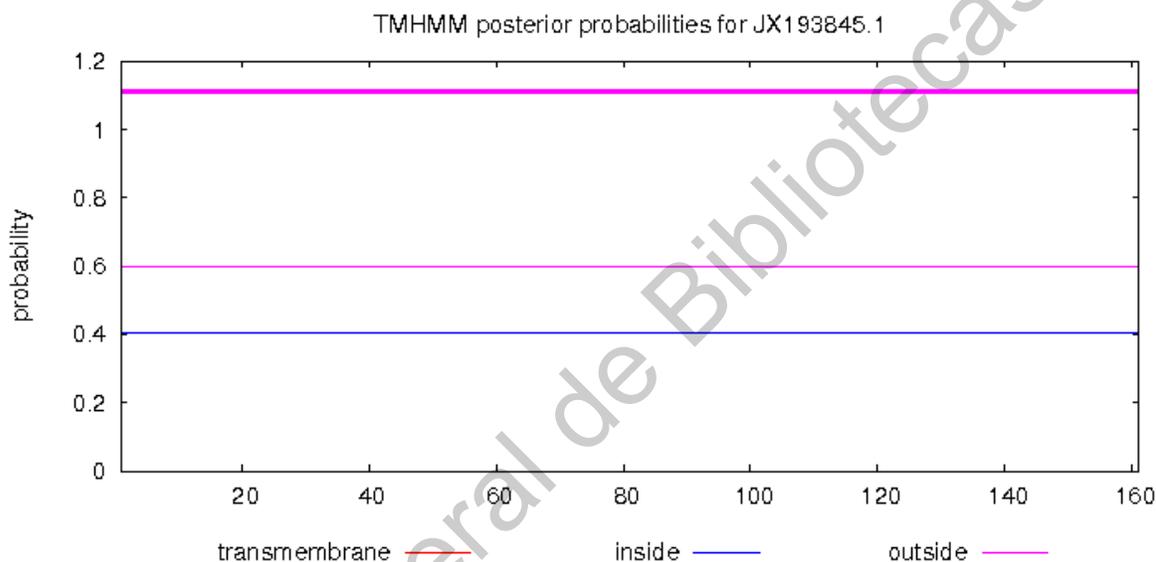


Figura 21. Análisis de regiones hidrofóbicas de la proteína Subolesina con el programa ProtScale.

Mediante el algoritmo TMHMM se identificó una región extracelular en toda la secuencia de aminoácidos de Subolesina marcada en color rosa (Figura 22) localizada entre los aminoácidos 1-160. El color rosa indica la región extracelular de la proteína.



**Figura 22. Análisis bioinformático de predicción de dominios transmembranales en la proteína Subolesina con el programa TMHMM 2.0.**

El análisis de predicción de péptido señal resultó ser positivo sólo en la proteína Rs86, mientras que para VDAC y Subolesina no hubo ninguna señal. Por ello en los estudios de hidrofobicidad y predicción de dominios transmembranales la región que corresponde al péptido señal fue eliminada para correr esos estudios.

Al análisis de hidrofobicidad identificamos sólo regiones hidrofílicas ya que ninguna de las tres secuencias sobrepasó el valor de 1.6 que predice regiones hidrofóbicas. En el tercer análisis, para identificar regiones extracelulares de las proteínas, fue necesario realizar la predicción de dominios transmembranales, en los cuales observamos que las secuencias estudio según el programa se

encuentran fuera de la membrana celular. Estas características son deseadas en nuestra búsqueda de Péptidos B ya que regiones hidrofílicas y expuestas a los anticuerpos serán fácilmente reconocidas.

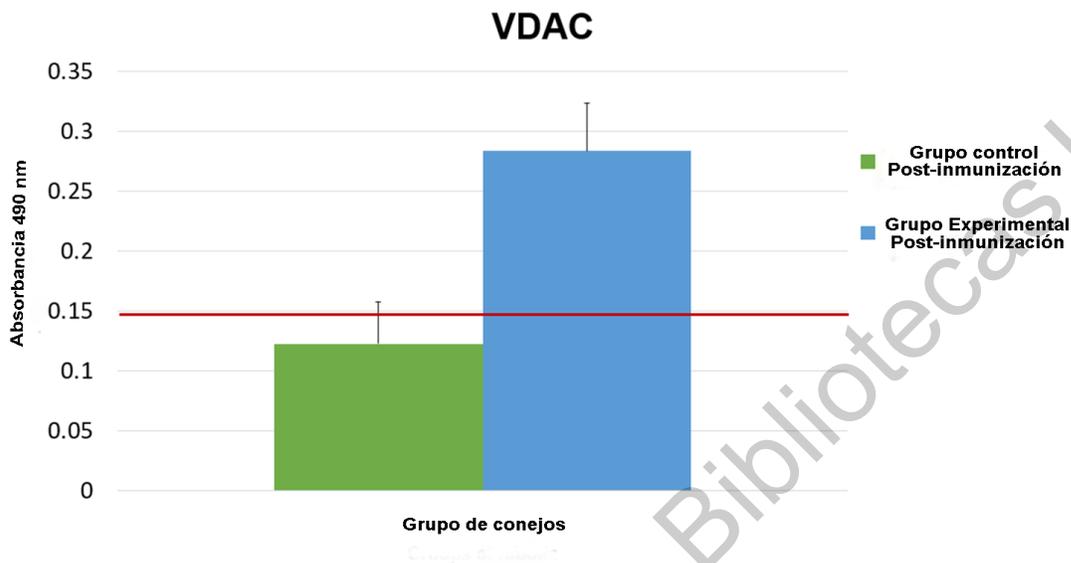
A partir de la secuencia de aminoácidos con características hidrofílicas, con regiones extracelulares y conservadas, se logró la predicción de los péptidos que contienen epítomos B lineales entre las distintas secuencias reportadas en la base de datos del GenBank. Los péptidos elegidos de cada proteína se muestran en el Cuadro 2. Hay que recordar que los péptidos B fueron predichos por al menos 5 algoritmos.

### **7.3 ELISA indirecta**

Para determinar el título de anticuerpos posterior a las cuatro inmunizaciones de los conejos se realizó una ELISA indirecta de los sueros tomados 7 días después de la última inmunización, se probó la dilución 1 :500. Se detalla a continuación las gráficas de cada animal correspondientes a cada uno de los grupos.

#### **7.3.1 Péptidos de la proteína VDAC**

En la figura 23 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1 :500 de los sueros post-inmunización del grupo control y grupo experimental inmunizados con la mezcla de los péptidos VDAC-1, VDAC-2 y VDAC-3 (100 µg de cada péptido), se puede observar que los sueros correspondientes a la post inmunización del grupo control no pasan el punto de corte, mientras que en los sueros de la última inmunización del grupo experimental se observa un incremento en el título de anticuerpos.



**Figura 23. ELISA indirecta de los péptidos VDAC. Dilución 1:500 de los sueros post cuarta inmunización.**

Como se observa en la gráfica en la cuarta inmunización se logró detectar buena presencia de anticuerpos, estos resultados son similares a los estudios realizados por López A. y Ortega R. quienes utilizaron la proteína completa en la inmunización de bovinos, esos antecedentes son los únicos que hacen referencia al uso de VDAC como candidato vacunal. Con ello comprobamos que la inmunogenicidad de la mezcla de los tres péptidos fue efectiva para generar una respuesta humoral en el sistema inmune de los conejos. Hay que tomar en cuenta que nosotros utilizamos partes específicas de la proteína (Péptidos B) que fueron predichas mediante programas informáticos como epítomos B potenciales de regiones conservadas, lo que nos da mayor seguridad en la búsqueda de un buen candidato vacunal.

### 7.3.2 Péptidos de la proteína Rs86

En la figura 24 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1 :500 de los sueros post-inmunización del grupo control y grupo experimental inmunizados con la mezcla de los péptidos Rs86-1, Rs86-2, Rs86-3 y Rs86-4 (100 µg de cada péptido), se puede observar que los sueros correspondientes a la post inmunización del grupo control no pasan el punto de corte, mientras que en los sueros de la última inmunización del grupo experimental se observa un incremento en el título de anticuerpos.



Figura 24. ELISA indirecta de los péptidos Rs86. Dilución 1:500 de los sueros post cuarta inmunización.

Bm86 es de las proteínas más utilizadas como candidato vacunal gracias a su inmunogenicidad y eficacia contra *R. microplus*, se pudo obtener resultados similares a Canales *et al.*, 2009a donde utilizaron la vacuna GAVAC en la generación de anticuerpos contra la proteína recombinante Bm86.

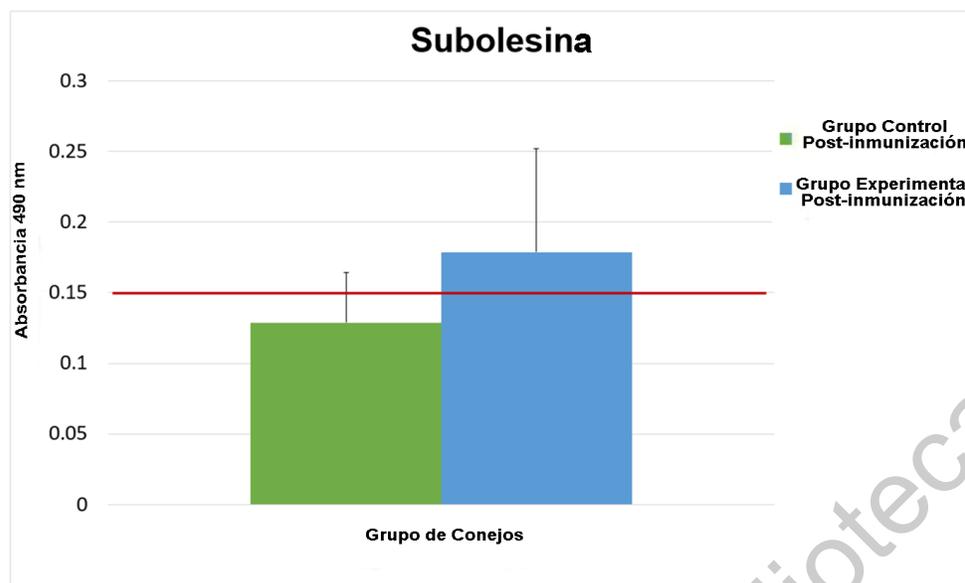
Un artículo donde utilizaron péptidos sintéticos de Bm86 fue publicado por Patarroyo *et al.*, 2002, ellos eligieron de forma similar a nosotros 3 péptidos predichos por programas informáticos como secuencias con potencial

inmunogénico, en la dinámica de generación de anticuerpos IgG en bovinos contra los péptidos también observaron el mayor incremento después de la tercer inmunización que corresponde con los resultados mostrados en la figura 24 dónde también obtuvimos incremento de anticuerpos específicos contra los péptidos Rs86 una semana después de la última inmunización. Cabe destacar que en este trabajo citado los péptidos no correspondían a una secuencia de aminoácidos conservada. Adicional a ello su selección de péptidos B no explica por cuantos algoritmos fueron predichos.

Por otra parte, los resultados de este estudio proveen una evidencia de la eficacia de los péptidos B de Rs86 en la generación de anticuerpos IgG específicos detectado en conejos, esta capacidad inmunogénica de Bm86 ha sido documentada también por Perez-Perez *et al.*, 2009; Rodríguez-Mallon *et al.*, 2013 & Ruiz *et al.*, 2006, sólo que estos autores utilizan la proteína recombinante completa.

### **7.3.3 Péptidos de la proteína Subolesina**

En la figura 24 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1 :500 de los sueros post-inmunización del grupo control y grupo experimental inmunizados con la mezcla de los péptidos Subolesin-1 y Subolesin-2 (100 µg de cada péptido), se puede observar que los sueros correspondientes a la post inmunización del grupo control no pasan el punto de corte, mientras que en los sueros de la última inmunización del grupo experimental se observa un incremento en el título de anticuerpos.



**Figura 25. ELISA indirecta de los péptidos Subolesina. Dilución 1:500 de los sueros post cuarta inmunización.**

Los péptidos de la proteína subolesina resultaron ser buenos inmunógenos ya que estimularon al sistema inmunológico del conejo para la generación y aumento del título de anticuerpos comparado con el grupo control. Los resultados coinciden con lo reportado por Almazán *et al.*, 2005 & Almazán *et al.*, 2009 donde utilizan la proteína recombinante subolesina para generar anticuerpos en borregos y bovinos respectivamente, sólo que ellos utilizaron la proteína completa para la inmunización.

Resultados similares se pueden comparar con lo reportado por Canales *et al.*, 2009a; Almazán *et al.*, 2011 & Moreno-Cid *et al.*, 2012 quienes lograron generar anticuerpos en perros, ratones y bovinos. Lo que sugiere que esta proteína tiene el mismo efecto inmunológico en diferentes especies de mamíferos.

Estos resultados siguen demostrando que Subolesina es un fuerte candidato vacunal para estudios serios de control de vectores como lo es *R. sanguineus*.

#### 7.4 Efecto de la vacunación sobre las larvas de *R. sanguineus*

De acuerdo con los porcentajes de reducción de *R. sanguineus* obtenidos para cada grupo después de las inmunizaciones podemos notar que los resultados difieren numéricamente entre grupos (Figura 26). A pesar de la diferencia numérica, según la prueba de *t*-student ( $p < 0.05$ ) los resultados no muestran diferencias significativas entre grupos.

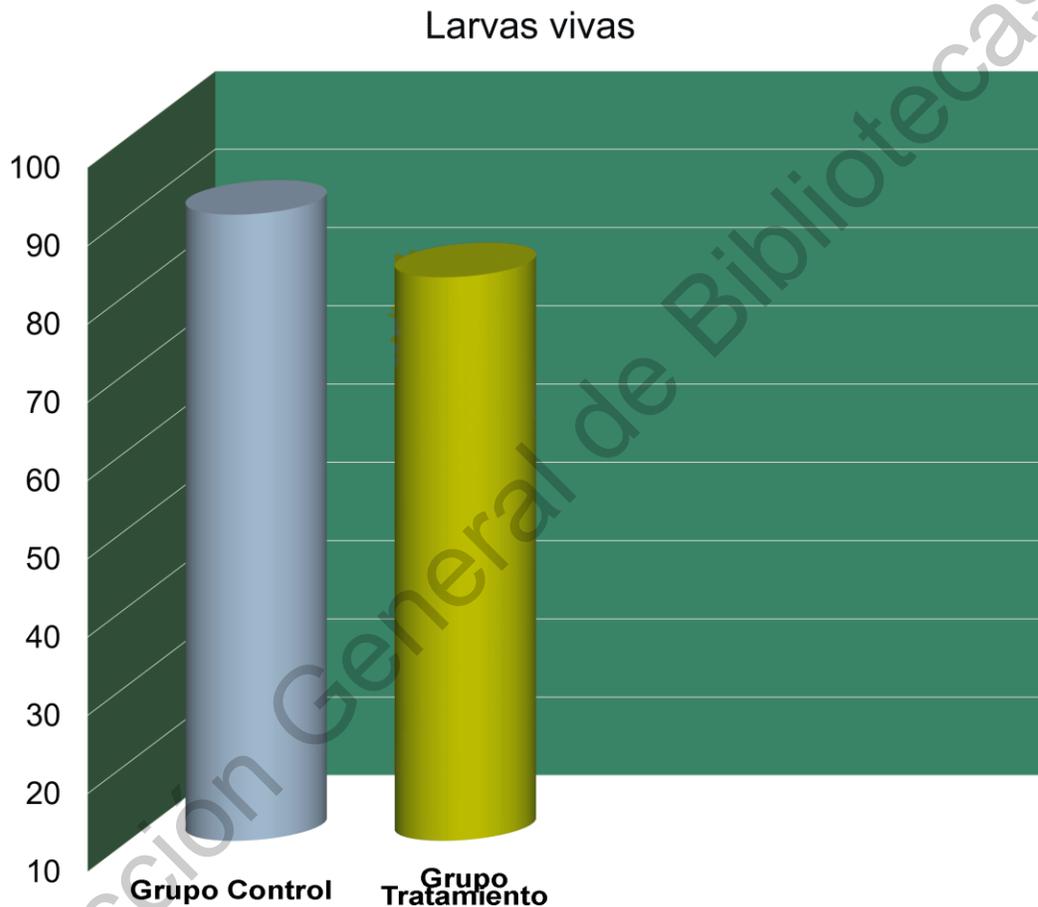


Figura 26. Gráfica que indica la cantidad de larvas vivas después de la recolección.

Como se observa en la Figura 27 el porcentaje de reducción del grupo tratamiento fue del 10.86% comparado con el grupo control donde sólo se inoculó adyuvante.

$$\begin{aligned}\% \text{ de reducción de garrapatas} &= \left[ 1 - \left( \frac{82}{90} \right) \right] 100 \\ &= 10.86\%\end{aligned}$$

**Figura 27. Formula que representa el porcentaje de reducción de Larvas repletas.**

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rodríguez-Mallon *et al.*, 2012 quienes utilizaron la proteína P0 como inmunógeno en los tres estadios de *R. sanguineus*, en su trabajo el rendimiento de las larvas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. A pesar de ello lograron un 90% en la eficacia de la vacuna contra *R. sanguineus*.

Por otro lado, Perez-Perez *et al.*, 2010 obtuvo una reducción del 38% en rendimiento de larvas, pero en sus resultados finales la eficacia de la vacuna oscilo entre el 32.86% de efectividad de la vacuna. Cabe mencionar que ellos utilizaron la proteína Bm86 recombinante como candidato vacunal.

En otro estudio, Canales *et al.*, 2009c, utilizó un ortólogo de subolesina obtenido de *Aedes albopictus* como candidato vacunal contra *R. sanguineus*, ellos obtuvieron un rendimiento de larvas de un 23.6% comparado con un 43.6% del grupo control, pero sucedió el mismo fenómeno que obtuvo Perez-Perez *et al.*, 2010, ya que la eficacia total de la vacuna fue del 13%, donde observamos que no hay correlación entre el rendimiento de larvas y la eficacia de la vacuna total.

En el cuadro 7 se muestran los resultados encontrados en otros trabajos en los cuales determinaron la eficacia de la vacuna de candidatos vacunales de *R. sanguineus*. La mayoría de ellos lograron medir el impacto en número, peso de hembras repletas, ovoposición y fertilidad. Estudios que en el presente trabajo no se realizaron.

**Cuadro 7. Eficacia de diferentes candidatos vacunales.**

Inmunógeno	Especie	Dosis	DT	DW	DO	DF	E	Referencia
<b>ATAQ</b>	Conejos	100µg- IM	55.6 %	-13.5%	-20.3%	-20.3%	47%	Rangel <i>et al.</i> , 2016
<b>P0</b>	Conejos	250µg- Subc	38%	8%	3%	12%	90.25%	Rodríguez- Mallon <i>et al.</i> , 2012
<b>Bm86</b>	Caninos	50µg- IM		40%	40%	46.4%	32.6%	Perez- Perez <i>et al.</i> , 2010
<b>Subolesina ortóloga</b>	Caninos	100 µg	-	-	-	-	13%	Canales <i>et al.</i> , 2009c
<b>Glutation S- transferasa</b>	Conejos	200µg- Subc	0%	0.79%	-5.54%	3.85%	0%	Sabadin <i>et al.</i> , 2017

DT: Efecto en el número de hembras repletas, DW: Efecto en el peso de hembras repletas, DO: Efecto en la ovoposición, DF: Efecto en la fertilidad de los huevos y E: Eficacia de la vacuna.

Existieron dos detalles importantes que pudieron influir en el bajo porcentaje de reducción de larvas repletas, uno de ellos fue la longevidad de un mes de las larvas utilizadas en el experimento, algunos autores explican que en unos cuantos días de eclosionadas las larvas buscan inmediatamente al hospedero para poder alimentarse (Dantas-Torres, 2007). El siguiente punto fue una enfermedad de vías respiratorias altas que afectó a los dos grupos de conejos 10 días antes de la infestación, por lo que fueron tratados con Enrofloxacin y meloxicam a dosis según su peso. Las larvas pudieron haber ingerido estos medicamentos e influir en la mortalidad en los dos grupos, pero esta influencia por el momento se desconoce.

En la Figura 28 se muestra un efecto interesante de la vacuna, ya que se puede observar a las larvas repletas del tercer día de alimentación del grupo control y el grupo tratamiento. Si prestamos atención en primera instancia a las larvas del grupo control se observa un evidente aumento del tamaño de las garrapatas por la cantidad de sangre ingerida en los tres días de alimentación con respecto al grupo tratamiento. Sobre la oreja del grupo tratado se perciben varias larvas muertas, secas, con un déficit de tamaño, pero que lograron alimentarse del conejo inmunizado. Es posible explicar este fenómeno mediante la función de cada proteína, ya que nosotros elegimos péptidos B con características inmunogénicas de cada una de ellas, pretendiendo bloquear su funcionalidad con anticuerpos específicos.

Posiblemente el efecto de los anticuerpos contra RsVDAC tuvieron efecto en el intestino y otros tejidos de la garrapata. Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012 demostró que esta proteína se localiza en el intestino medio de *R. microplus*. Sumado a ello, en este trabajo se logró amplificar *R. sanguineus* de varios aislados de la república mexicana. En estudios realizados por Reyna Ortega y colaboradores obtuvieron una reducción de hembras repletas de *R. microplus* del 37.45%. Con estos antecedentes hipotetizamos que RsVDAC se localiza en el mismo lugar que BmVDAC y los anticuerpos tuvieron el mismo efecto.

Esta descrito que el efecto de la vacunación con Subolesina impacta en la reproducción de la garrapata, pero en estudios como el realizado por Almazán *et al.*, 2005 describen que Subolesina retrasa la repleción de las garrapatas que completaron la alimentación en ovejas, estos resultados justifican un papel importante de esta proteína en el crecimiento y desarrollo de la garrapata como se observa en la Figura 28.

Los mecanismos exactos por los cuales los anticuerpos anti RsSubolesina afectan la infestación del vector y la fertilidad aún son desconocidas, pero puede incluir la reducción de la actividad biológica de RsSubolesina mediante la interacción de los anticuerpos con los epítomos conservados (Moreno-Cid *et al.*, 2012)

Según los estudios realizados por (de la Fuente *et al*, 2006), Subolesina parece estar involucrada en la modulación de ingestión de sangre y reproducción de la garrapata. El silenciamiento de la expresión de esta proteína con RNA de interferencia afectó el desarrollo intestinal y glándulas salivales. Estos resultados pueden explicar el efecto observado en la Figura 28, dónde las larvas no pudieron completar su alimentación y repleción.

La respuesta del huésped a la vacunación con antígenos Bm86 resulta en la lisis de células epiteliales del intestino de garrapata a través de anticuerpos anti-Bm86 con la posible participación del complemento y otros mecanismos efectores que resultan en una reducción de la supervivencia, el peso y la fertilidad de la garrapata, fenómenos que suman a la explicación de lo observado en la alimentación de las larvas en el grupo tratamiento, grupo que fue inmunizado con 4 péptidos B anti Rs86.

La identificación de candidatos vacunales potenciales (Proteínas recombinantes) para el control de *R. sanguineus* en perros se vuelve un factor determinante para el desarrollo de vacunas, pero con las nuevas tecnologías en biología molecular, bioinformática, inmunología y ciencias afines se podrá formular una vacuna con alta eficiencia. Otro punto a destacar en este trabajo es la combinación de diferentes antígenos, donde la generación de anticuerpos no solo tiene un blanco sino tres de ellos, bloqueando diferentes funciones fisiológicas importantes de la garrapata.

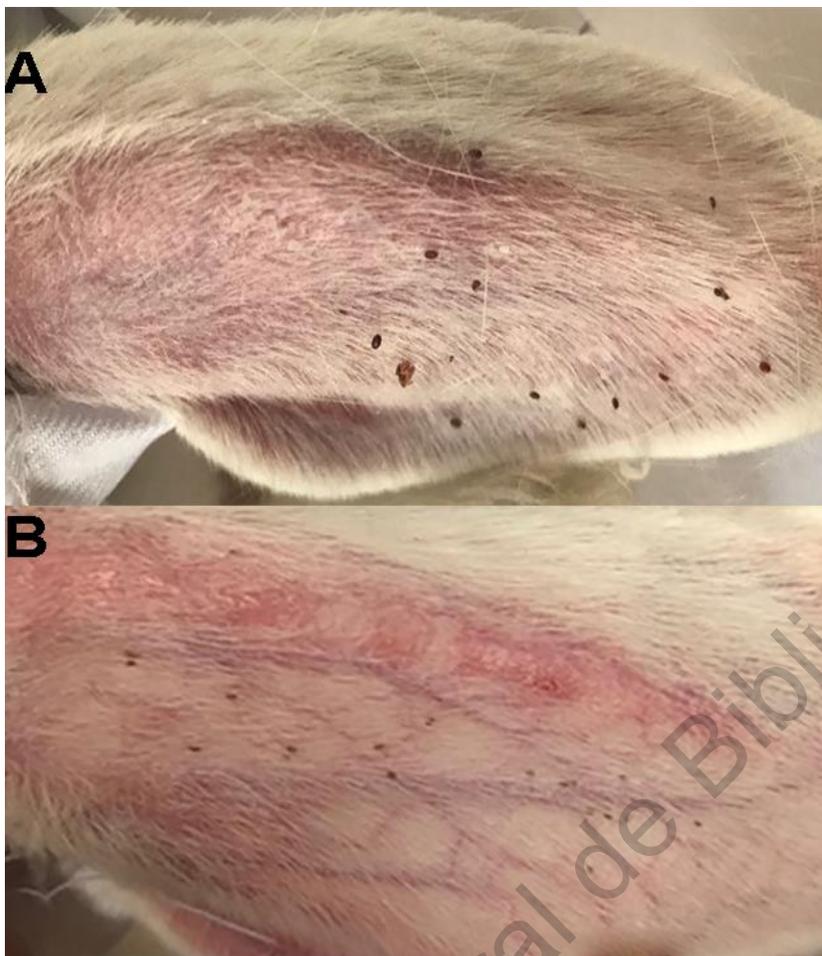


Figura 28. Efecto de los péptidos B anti RsVDAC, Rs86 y RsSubolesina en la alimentación y repleción de larvas de *R. sanguineus*. (A) Larvas repletas de tres días de alimentación en el grupo control. (B) Larvas muestras durante la alimentación que no lograron repletar en el grupo tratamiento.

## 7.5 Amplificación del gen RsVDAC

### 7.5.1 Recolección de garrapatas *R. sanguineus*

Se recolectaron garrapatas de perros infestados de los siguientes estados de la República Mexicana.

- ✓ Querétaro (Jalpan de Serra)
- ✓ Baja California (Mexicali)
- ✓ Nayarit (Tepic)
- ✓ Guerrero (Pungarabato)
- ✓ Morelos (Cuernavaca)
- ✓ Yucatán (Rio Lagartos)



Figura 29. Distribución geográfica de la recolección de *R. sanguineus*.

### 7.5.2 Extracción de DNA de *R. sanguineus*

El DNA cuantificado en el espectrofotómetro tipo Nanodrop obtuvo los siguientes coeficientes de absorbancia 260/280 así como sus concentraciones en ng/ $\mu$ l (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valores de absorbancia del DNA de *R. sanguineus* de diferentes cepas de México.

Estado de la República Mexicana	Coficiente de absorbancia 260/280	Concentración (ng/ $\mu$ l)
Querétaro	2.01	40
Baja California	1.98	109
Nayarit	1.6	41
Guerrero	2.03	97
Morelos	2.07	181.6
Yucatán	1.55	85

### 7.5.3 Amplificación del gen RsVDAC de los distintos aislados de la República Mexicana

Por medio de la técnica PCR punto final se obtuvo un amplicon de 583 pb que corresponde al tamaño esperado para el gen RsVDAC de cada uno de las muestras de campo de *R. sanguineus* (Figura 30). En la imagen del gel no se observan inespecificidades en cada una de las 6 muestras. El control negativo no tuvo ninguna amplificación lo cual nos indica que la técnica de PCR es totalmente confiable para deducir que los amplicones corresponden al gen RsVDAC.

Posterior a la amplificación se enviaron las muestras purificadas al secuenciador antes descrito. Dos de las muestras correspondientes a los estados de Nayarit y Querétaro no se secuenciaron correctamente por problemas internos del secuenciador. Sólo trabajamos con las secuencias de Baja California, Guerrero, Morelos y Yucatán.

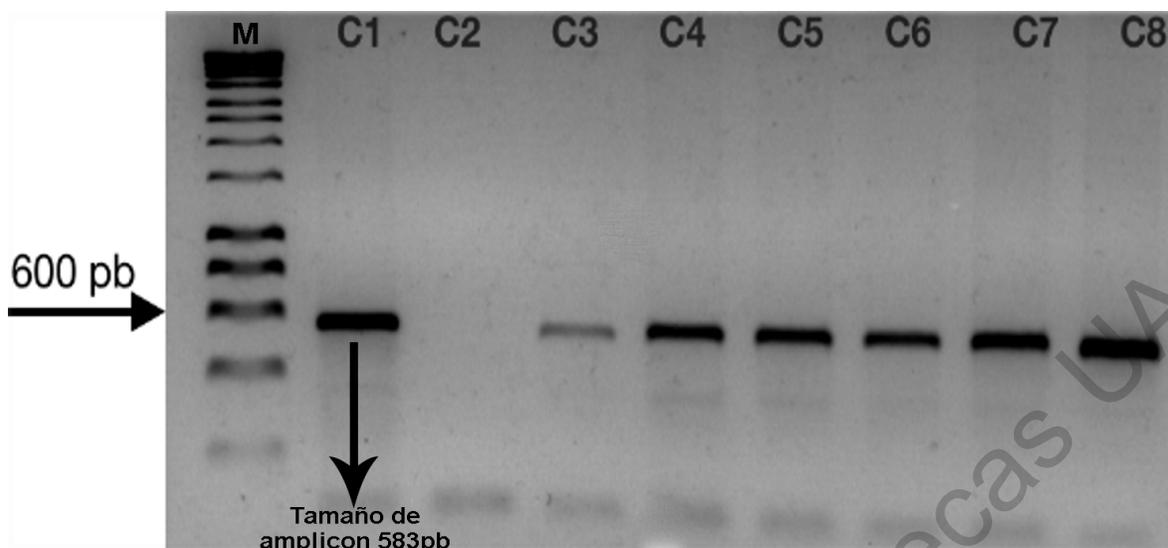


Figura 30. Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen RsVDAC. M: Marcador de tamaño molecular (100pb), C1: Control positivo. C2: Control negativo. C3: DNA de Querétaro. C4: DNA de Guerrero. C5: DNA de Morelos. C6: DNA de Nayarit. C7: DNA de Yucatán. C8: DNA de Baja California.

#### 7.5.4 Alineamiento de la proteína RsVDAC de aislados mexicanos de *R. sanguineus*

Una vez editadas las secuencias, realizamos un alineamiento múltiple, donde obtuvimos un alto porcentaje de identidad entre las secuencias mostradas en el cuadro 9.

Cuadro 9. Cuadro de identidad de nucleótidos del gen RsVDAC entre las muestras de Guerrero, Yucatán, Baja California y Morelos.

	Yucatán	Baja California	Morelos
Guerrero	98.10%	98.13%	98.06%
Yucatán		100%	100%
Baja California			100%

Se observa un porcentaje de identidad del 98% de la muestra de Guerrero con respecto a las demás, por otra parte, se aprecia una identidad del 100% entre las muestras de Yucatán, Baja California y Morelos.

Posterior a ello nos dimos a la tarea de identificar las secuencias conservadas de las 4 secuencias teniendo como resultado lo siguiente:

```
>R.san_VDAC  
MGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTTHTGVEFNVSGTSLNDTGKVNASLETKYKVPEYGLT  
LKEKWNTDNTLSTEICTEEKLARGCKVAFHANFAPQTGKKSGALKAAAYKLENVHLNGDVGL  
GPPGPVVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVG YQAGDFVLHTNVNDGQEFAG  
SVFQRVNPQLQTGVQLAWTAGTNATREFGLGCVASLG
```

En la secuencia anterior se observa una secuencia de aminoácidos sombreado con color azul de RsVDAC que corresponde a la secuencia conservada entre las 4 muestras de campo (Guerrero, Baja California, Yucatán y Morelos). En la misma secuencia conservada se puede resaltar una secuencia (subrayada y en negrita) de aminoácidos que muestra uno de los tres péptidos B identificados que se utilizaron en la inmunización de los conejos. Con toda esta información pudimos comprobar que al menos uno de los tres péptidos elegidos se encuentra en una región conservada con características de un potencial Péptido B predicho por varios programas informáticos.

## VIII. CONCLUSIONES

En este estudio se logró la identificación de secuencias conservadas de Rs86, Subolesina y VDAC con características de epítomos B de *R. sanguineus*. Los péptidos de cada proteína resultaron ser inmunogénicos ya que desde la primera inmunización se detectó la producción de anticuerpos evaluado mediante la técnica de ELISA indirecta.

Los resultados obtenidos en este primer trabajo de inmunización con los antígenos Rs86, RsSubolesina y RsVDAC mostraron una reducción general del 10.86% en larvas de *R. sanguineus*. Este es el primer estudio donde se evaluó la combinación de tres antígenos utilizando epítomos B conservados para el control de larvas de *R. sanguineus* en conejos, sin embargo, se requiere de más ensayos involucrando a ninfas y adultas para identificar la eficacia total sobre esta garrapata.

En este estudio se logró la amplificación parcial del gen RsVDAC a partir de producto de PCR de cuatro cepas mexicanas donde comprobamos que uno de los péptidos elegidos se encuentra en regiones conservadas por lo que se puede considerar como un potencial antígeno vacunal. Este tipo de vacunas de última generación en un futuro deberán ser seriamente consideradas en el cuadro de vacunación básica de caninos que se encuentren en zonas endémicas de *R. sanguineus* para disminuir la infestación y evitar la transmisión de patógenos a los caninos e indirectamente a los humanos por zoonosis.

## IX. LITERATURA CITADA

- Abdullah, H.A.M., El-Molla, A., Salib, F.A., Allam, N.A. T, Ghazy, A.A. & Abdel-Shafy, S. 2016. Morphological and molecular identification of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari:Ixodidae) vectors of Rickettsioses in Egypt. *Veterinary World*. 9: 1087-1101.
- Almazán, C., Kocan, K.M., Blouin, E.F. & José de la Fuente. 2005. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*. 23: 5294-5298.
- Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F. & José de la Fuente. 2009. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res*. 106: 471-479.
- Almazán, C., Moreno-Cantú, O., Moreno-Cid, J.A., Galindo, R.C., Canales, M., Villar, M & José de la Fuente. 2011. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*. 30: 265-272.
- Canales, M., Naranjo, V., Almazán, C., Molina, R., Tsuruta S. A., Szabó, M. P. J., Manzano-Roman, R., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, K. M., Jiménez, M. I., Lucientes, J., Villar, M. & de la Fuente, J. 2009a. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. *Parasitol Res*. 105:97-111.
- Canales, M., Almazán, C., Naranjo, V., Jongejan, F & José de la Fuente. 2009b. Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology*. 9:29.
- Canales, M., Naranjo, V., Almazán, C., Molina, R., Tsuruta, S. A., Szabó, M. P. J., Manzano-Roman, R., Lastra, P. J. M., Kocan, M. K., Jiménez, I. M., Lucientes,

J., Villar, M. & José de la Fuente. 2009b. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. *Parasitol Res.* 105: 97-111.

Casquero, C. R., Andreotti, R., Valério, G. M., Rangel, A. A. & Leitao, A. 2013. Calculation of the efficacy of vaccines against tick infestations on cattle. *Bras. Parasitol. Vet.* 22: 571-578.

Dantas-Torres, F. 2008a. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol.* 152: 173-185.

Dantas-Torres, F. 2008b. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors.* 1: 25.

Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the Brown tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites and Vectors.* 3: 26.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A. & Otranto, D. 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds. 6 :213.

Dantas-Torres, F., Otranto, D. 2014. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* groups ticks. *Veterinary Parasitology.*

Da Costa, M., Pinheiro-Silva, R., Antunes, S., Moreno-Cid, J. A., Custódio, A., Villar, M., Silveira, H., de la Fuente, J. & Domingos, A. 2014. Mosquito Akirin as a potential antigen for malaria control. 13:470.

de la Fuente, J., Almazán C., Naranjo V., Blouin, E. F., Meyer J. M. & Kocan, K. M. 2006. Autocidal control of ticks by silencing of a single gene by RNA interference. 344: 332-338.

eOL (Encyclopedia of Life). SA. *Rhipicephalus sanguineus* Brown Dog Tick. URL: <http://www.eol.org/pages/410950/maps>. Consultado el 28 de Octubre del 2016.

European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP). SA. Control of Ectoparasites in Dogs and Cats. URL: <http://www.esccap.org/guidelines-maps/>.

Consultado el 12 de octubre de 2016.

Gen Bak (Banco de Genes). 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Consultado el 10 de Enero del 2017.

Goddard, J. 1987. Ticks of Medical Importance Occurring in the Western Hemisphere. USAF School of Aerospace Medicine, Texas.

Greene, C. E. 2012. Infectious diseases of the dog and cat. Elsevier. Fourth Edition. St. Louis Missouri. USA. Págs. 445-448.

Hekimoglu, O., Saglam, I. K., Özer, N. & Estrada-Peña. 2016. New Molecular data shed light on the global phylogeny and species limits of the *Rhipicephalus sanguineus* complex. 7: 798-807.

Hoogstraal H. 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. Vet Parasitol. 24: 135-238.

Integrated DNA Technologies (IDT). 2017. Oligo Analyzer 3.1. Consultado el 13 de Marzo del 2017.

Jittapalapong, S., Stich, R.W., Gordon, J.C., Wittum, T.E. & Barriga, O.O. 2000. Performance of Female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Fed on Dogs Exposed to Multiple Infestations or Immunization with Tick Salivary Gland or Midgut Tissues. J. Med. Entomol. 37: 601-611.

Jongejan, F. & Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. Vet Parasitol. 129: 3-14.

Kirkland, B.H., Westwood, G.S. & Keyhani, N.O. 2004. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. J. Med. Entomol. 41: 705-711.

Koch, H.G. 1982a. Seasonal incidence and attachment sites of ticks (Acari: Ixodidae) on domestic dogs in southeastern Oklahoma and northwestern Arkansas, USA. J. Med. Entomol. 19: 293-298.

- Koch, H.G. 1982b. Oviposition of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 583-586.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87: 99-163.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. 1982. A simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Lodish, H. Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. & Matsudaira, P. 2008. *Molecular cell Biology*. Sexta edición. W.H. Freeman and Company. USA. P. 351.
- Mans, B.J. & Neitz, A.W. 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem Mol Biol.* 34: 1-17.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A. & Pérez-Sánchez, R. 2015. Identification of protective linear B-cell epitopes on the subolesin/akirin orthologues of *Ornithodoros* spp. soft ticks. *Vaccine.* 33: 1046-1055.
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Oleaga, A., Siles-Lucas, M. & Pérez-Sánchez, R. 2012. Subolesin/akirin orthologs from *Ornithodoros* spp. soft ticks: Cloning, RNAi gene silencing and protective effect of the recombinant proteins. *Vet Parasitol.* 185: 248-259.
- Moreno-Cid, J.A., de la Lastra, J.M.P., Villar, M., Jiménez, M., Pinal, R., Estrada-Peña, A., Molina, R., Lucientes, J., Gortázar, C. & José de la Fuente. 2012. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine.* XXX-XXX.
- Nuttall, G.H.F. 1915. Observations on the biology of Ixodidae. *Parasitology.* 7: 408-456.
- Peconick, A.P., Sossai, S., Girão, F.A., Rodrigues, M.Q.R.B., Souza e Silva, C.H., Guzman Q, F., Patarroyo, A.M., Vargas, M.I. & Patarroyo J.H. 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Experimental Parasitology.* 119: 37-43.

- Pengyun, L., Yongzhi, Z., Yingfang, Y., Jie, C., Houshuang, Z., Haiyan, G., Guoqing, L. & Jinlin Z. 2016. RNA interference and the vaccine effect of a subolesin homolog from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Exp Appl Acarol.* 68: 113-126.
- Perez-Perez, D., Bechara, G.H., Manchado, R. Z., Andrade, G. M., del Vecchio, R.E.M., Pedroso, M.S., Hernández, M.V. & Farnós, O. 2010. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol.* 167: 321-326.
- Rangel, A. A., Pereira, F., Casquero, R., Valério, M. & Andreotti R. 2016. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Vet Parasitol.* 221: 30-38.
- Reis, R.C., Melo, D.R., Perinotto, W.M. & Bittencourt, V.R. 2005. Patogenicidade in vitro de formulacoes fúngicas sobre ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Vet Parasitol.* 14: 101-105.
- 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.* 7: 669.
- Rodríguez-Mallon, A., Fernández, E., Encinosa, P. E., Bello, Y., Méndez-Pérez, L., Ruiz, C. L., Pérez, D., González, M., Garay, H., Reyes, O., Méndez, L. & Estrada, P. M. 2012. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine.* 30: 1782-1789.
- Ruiz, L.M., Orduz, S., López, E.D., Guzmán, F., Patarroyo, M.E. & Armengol G. 2006. Immune response in mice and cattle after immunization with a *Boophilus microplus* DNA vaccine containing bm86 gene. *Vet Parasitol.* 144: 138-145.
- Samish, M., Ginsberg, H. & Glazer, I. 2004. Biological control of ticks. *Parasitology.* 129: 389-403.

- Shakya, M., Kumar, B., Nagar, G., de la Fuente, J. & Ghosh, S. 2014. Subolesin: A candidate vaccine antigen for the control of cattle tick infestations in Indian situation. *Vaccine*. 32: 3488-3494.
- Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J. & Breitschwerdt, E.B. 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol*. 17: 74-80.
- Shoshan-Barmatz, V. & Ben-Hail, D. 2012. VDAC, a multi-funtional mitochondrial protein as a pharmacological target. *Mitochondrion*. 12: 24-34.
- Sonnhammer, E. L. L., Heijne, G. V. & Krogh, A. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *ISMB-98 Proceedings*.
- Sosa-Gutierrez, G. C., Vargas-Sandoval, M., Torres, J. & Gordillo-Pérez. 2016. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico. *J Vet Sci*. 17: 353-360.
- Sultana, H., Patel, U., Sonenshine, D, & Neelakanta, G. 2015. Identification and comparative analysis of subolesin/akirin ortholog from *Ornithodoros turicata* ticks. *Parasites & vectors*. 8: 132-140.
- Szabó, M.P.J. & Bechara, G. H. 1999. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick-feeding site on dogs and guinea pigs. *Exp Appl Acarol*. 23: 915-928.
- Szabó, M.P.J., Mangold, A.J., João, C.F., Bechara, G.H. & Guglielmone, A.A. 2005. Biological and DNA evidence of two disimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet Parasitol*. 130: 131-140.
- The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). 2017. Clustal Omega. <http://www.ebi.ac.uk>. Consultado el 11 de Febrero del 2017.
- Yonghong, H., Hua, Z., Jincheng, Z., Duo, W., Dongming, L., Tiantian, Z., Shujie, Y. & Jingze, L. 2014. Gene Cloning, Expression and Immunogenicity of the
- Zemtsova, G. E., Apanaskevich, D. A., Reeves, W. K., Hahn, M., Snellgrove, A., & Levin,

M. L. 2016. Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and its relationships with climatic factors. *Exp Appl Acarol.* 69: 191-203.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## X. ANEXOS

### Anexo 1. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas

#### VDAC

##### 1.- >GU994210.1- *Rhipicephalus microplus*. México

ATGGCTCCTCCGTGCTACGCAGACTTGGGCAAGCAGGCTCGCGACCTGTTCAACAAGAAGTACCCTTGG  
GCGTCGTGAAGCTCGACTGCAAGTCGACCACCCAGACGGGCGTTCGAGTTCAACGTGAGCGGCACCAGCCT  
CAATGACACCCGGCAAGGTGAACGCCTCGCTCGAGACCAAGTACAAGGTTCCCGAGTACGGGCTCACGCTC  
AAGGAAAAATGGAACACCCGACAACACGCTCTCGACCGAGATCTGCAGCGAGGAGAAGCTCGGCGCGGCC  
TCAAAGTCGCCTTCCACGCCAACTTCGCACCCCGAGACTGGCAAGAAGTCGGGAGCCCTGAAGGCGGCCTA  
CAAGTTCGACAACGTGCACCTGAACGGCGACGTGCACCTGGGACCTCCGGGTCCACTCGTGCACGGTGCG  
GCCGTGCTCCACTACCAGGGCTGGCTCGCCGGCGGGCAGGTCTCGTTTCGACACCACCAAGAACCAGGCTGA  
GCAAGACAAACTTCGCCGTGGGTTTCCAGGCCGGCGACTTCGTAAGTGCACACGAACGTCAACGACGGCCA  
GGAGTTTCCGGGTCCGTGTTTCAACGGGTGAACCCGAGTTGCAGACGGGAGTCCAGCTGGCCTGGACC  
GCTGGCACGAACCGACCCGATTTCGGCCTGGGTTGCGTCTACGACCTCGACATGGAGACCTCGGTTTCGCG  
CGAAGGTGAACAACCTCTGGTCAGATCGGGCTCGGGTTTCACGCACCGCTGAGACCCGGGCATCAGCCTGAC  
CCTCTCCACCATGCTGGACGGCAAGAAGTTCACCCAGGGAGGACACAAG

>GU994210.1

MAPPYADLGKQARDLNFKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGLNDTGKVNASLETKYKVPYGLTTL  
KEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSALKAAYKFDNVHLNGDVDLGGPPLVHGA  
AVLHYQGWLAGGQVVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLHTNVNDGQEFAGSVFQRVNPLQQTGVQLAWT  
AGTNATRFGLGCVYDLDMETSVRAKVNNSGQIGLGFTHRLRPGISLTLSTMLDGKNFNQGGHK

##### 2.- >BK007268.1- *Amblyomma variegatum*. USA

ATGGCCCCACCGTGCTACGCCGACTTGGGCAAGCAGGCACGCGACCTCTTCAACAAGAAGTACCCTTTCG  
GCGTCGTGAAGCTCGACTGCAAGTCGACCACCCAGACGGGCGTTCGAGTTCAATGTGAGTGGCACCAGCCT  
CAATGACACCCGGCAAGGTGAATGCCTCGCTCGAGACCAAGTATAAGGTCCCGAGTACGGGCTTACGTTT  
AAGGAGAAATGGAATACAGACAACACACTTGCCACGGAAATTTGCTCCGAGGAGAAGCTGGCGCGGGGCC  
TCAAGGTAGCCTTCCACGCCAACTTCGCGCCGACGACGGGCAAGAAGTCGGGCGCTCTGCGGACTGCTTA  
CAAGCTGGAAAACGTGCACCTCAACGGTGACGTGCACCTCGGCCCTCCCGCCCCATCGCGCACGGCGCC  
GCGGTGCTCCACTACCAGGGCTGGCTCGCAGGCGGGCAGGTCTCCTTCGACACCACCAAGAATCGGCTGA  
GCAGGACGAACCTTCGCCGTTGGCTTCCAGGCGGGCGACTTTGCTGTCCACACCAACGTGAACGACGGCCA  
GGAAGTCGCCGGCTCCGTGTTCCAGCGGGTGAACCCGCAACTGCAGACCGGTGTGCAGCTGGCGTGGACG  
GCCGGCACCAATGCGACGCGCTTCCGGCCTGGGCTGCGTCTACGAGATGGACCAGGATACTTCCGGTGCGGC  
C

>BK007268.1

MAPPYADLGKQARDLNFKNYHFGVVKLDCKSTTQTGVEFNVSGLNDTGKVNASLETKYKVPYGLTF  
KEKWNTDNTLATEICSEEKLARGLKVAHFANFAPQTGKKSALRTAYKLENVHLNGDVDLGGPPIAHGA  
AVLHYQGWLAGGQVVSFDTTKNRLSRTNFVAVGFQAGDFAVHTNVNDGQEVAGSVFQRVNPLQQTGVQLAWT  
AGTNATRFGLGCVYEMDQDTSVRA

### 3.- Sin registro- *Rhipicephalus sanguineus*. Guerrero, México

CCCCAAGCTTGCTACGCAACCCAGGCCGAATCGGGTCGCGTTTCGTGCCAGCGGTCCAGGCCAGCTGGACTCC  
CGTCTGCAACTGCGGGTTCACCCGCTGAAACACGGACCCCGCGAACTCTTGCCCGTTCGTTGACGTTTCGTGTGC  
AGGACGAAGTCGCCCCGCTGGTAACCCACGGCGAAGTTTGTCTTGCTCAGTCGGTTCCTGGTTCGTGTGAAGG  
AGACCTGACCGCCGGCGAGCCAGCCCTGGTAGTGCAGCACGGCAGCCCCGTGCACGACCGGACCTGGAGGTCC  
CAGACCCACGTCTCCGTTCAAGTGGACGTTCTCGAGCTTGTAGGCCGCCTTCAGGGCTCCCGACTTCTTGCCC  
GTCTGGGGCGCGAAGTTGGCGTGGAAGGCGACTTTACAGCCGCGTGCAGGCTTCTCCTCCGTGCAGATCTCGG  
TCGAGAGCGTGTATCGGTGTTCCACTTCTCCTTGAGCGTCAGGCCGACTCGGGAACCTTGTACTTGGTCTC  
CAGCGAGGCGTTCACCTTGCCGGTGTCAATTGAGGCTGGTGCCGCTCACGTTGAATTCGACGCCCGTATGGGTG  
GTCGACTTGCAGTCGAGTTTGCAGACGCCGAAGTGGTAGTTCTTGTGAACAGGTCGCGAGCCTGCTTGCCCA  
AGTCTGCGTTGCACGGGGATCCGCGA

>Guerrero, México

MGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTHTGVEFNVSGTSLNDTGKVNASLETKYKVPYGLTLKEKWNTDNTLS  
TEICTEEKLARGCKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKLENVHLNGDVGPPGPVHVHGAAVLHYQGWLAGGQV  
SFDTTKNRLSKTNFAVGYQAGDFVLHTNVNDGQEFAGSVFQVRVNPQLQTVGQLAWTAGTNATRFGLGCVASLG

### Rs86

#### 1.- >DQ201646.1- *Rhipicephalus sanguineus*. USA

GACGCGATAAAGACCAGTATCGGAAGCGAAGTTTTTAAAGTTGAGATACTGAAGTGCACAGAGGACATTA  
AAGCAAGGCTCATAGCATCGAAACCGCTGTCAAAGCACGTGCTCAAGAGGCTTCAGGCGTGCAGCATCC  
TGTCGGTGACCTGTGCATGCTGTATCCGAAGTTGCCGATCAAGAAAGGTTCTGCAACAGAAATCGAAGAA  
GAGAACCTTTGCGACAGTATCCTCAAGACGCAGGAAAATGGATACAAGGTCAGAACAAGTGCCTCAAGG  
TCGATAACTTTTTCTGGTTCCAGTGCCTGACGGTTATAGAGCAGTTGACGAGATCGAACGAGGTGCCT  
ACGCCGCTCCGTGTG

>DQ201646.1

DAIKTSIGSEVFKVEILNCTEDIKARLIASKPLSKHVLKRLQACEHPVGDLCMLYPKLPKIKKGSATEIEE  
ENLCDSILKTQENGYKQNKCVKVDNFFWFQCADGYRAVDEIERGRLRRSV

#### 2.- >KP087924.1- *Rhipicephalus sanguineus*. Habana, Cuba

ATGCGTGGCATCGCTTTGTTTCGTCGCCGCTGTTTTCACTCATCGGAGGGTGCAGCACAATCATCTGTTTT  
GCTCTGACTTCGGGAACGAGTTCTGTGGCAACGCTGTATGCGAAGTGGTTCCTGGTGCAGAGCACGATTT  
CGTATGCAAAATGTCCGGGAGATGACATGTACTACAATGCTGCGGAAAAACATTGCGAATATAAAAGCACG  
TGCAAAACAAAAGAGTGCAGCTATGGAAGATGCGCACAAATTTCCCCGAGAAAAGCTGTCTGTGGCTGCG  
ATGGCGTGACTCTTTAACGCAAAGGTGCAACATTCAAGGTTGGTACGCTGACGAATGCCGAAGAAAGGG  
GGGAACGGCTAAGTTGCGTACGGATGGGTTTTCTTGGCGCAAAGTGCAGCTGCGGCGAATGGAGCGTGATG  
GACCGCAACAAAAGAAAGTGTGTCCCTACCACATGTCTACGTCCCGACTTGACCTGCAAAGACCTCTGCG  
AGAAAAACCTGCTTGAAAAGGATTCTCGATGCTGCCAGGGATGGAACCTTGCAAACCTGTTCAACGGCTCC  
TGAAGAAGGCAGTTATTGCTCTCCTGGTAACCTAAAAGGCAAGGACGGAAGTTGTAAAGATGCTTGCAAGT  
GCGAAAGAAGGTACGCTTGTCTGCAAGTATGGATGCAAGGGGTCAACCAAGCCGATGAGGGCATAACGAGT  
CGCAGTGCCAAATCTGGCGATGAAGTCTGCTGAAGATGGAATTACCTGCAAACGTTCCGTACACAGGCGA  
CTGCAGTGACGAGCAGAAAAAGACCTGCCGTCGAAGCAATACTGCCTTGTGAGGAAGGAAAGGTTGGTG  
TGTGAGTGCCCGATGCGTCAGCATCTAGTGAATGACGAGTGCACAAGTGAATTGCGTCGACGACAAATGCC  
ACGAAAACTTTACGGAATGTGGCGTCTATATGTCGAAACAAAACCTGCTATTGTCCATGGAGAACAAGGAA  
GCCGCTCCCAAACGCTCCATCAACGAATGCGTACTGAACGAGTATTACTATAACGGTGTCAATCACCCCG  
AACATCTCACTCGATTCTCGCAGCTGCGACTCGTATGCGGCCCGTGTCTGGACGCGATAAGGACCAGTA  
TCGGAACGATGTTTTTAAAGTTGAGATACTGAACTGCACACATGACATTAAGCAAGGCTCATAGCGTC  
GAAACCGCTGTCAAAGCACGTGATCAAGAGGCTTCAAGCGTGCAGCATCCTGTGATGACCTGTGCATG  
CTGTATCCGAAGTTGCCGATCAAGAAAGGCTCTGCAACAGAAATCGAAGAAGAGAACCTTTGCGACAGTA

TCCTCAAGACGCAGGAAAATGGATACAAGGGTCAGAACAAGTGCCTCAAGGTCGATAACTTTTTCTGGTT  
CCAGTGCCTGATGGTTACAGAGCAGTTGATGAGATCACACGAGGTCGCCTACGCCCTCCGTGTGCGAA  
GCTGGAGTCTCCTGCAGCGCTAAAGAACAGTTGGAATGTGCTAACAAAGGACAAATATGTGTCTACGAAA  
ATGAAAAAGCGAATTGCCAATGCCCTCCAGGCACTGTGCTGGGCAAGCTGGTTGCACTGCCCCGTACAAC  
ATGCAACCCTAAAGAGATACGAGAATGCCAGGACCACAAGCGGAAAATGCGTATATAAAGACCAAAAAGCT  
GAATGCAAGTGTCCCGAAGGCACCATTGATGATGGTGACGGATGTTCTATTGAGCCTGCCAAAGAACCTT  
GCAGCGAATATGAAGTCGGTAAATGTGCAAGCAAAGGACAGAGTTGTGTAACGGAAAACGGAAAGCCTGT  
TTGTAAAGAAATCTCTGACGCAACAACAGCAGCGGCTGCAACAACGAAGGCGAAAGACAAGGATCAAGAA  
CCTTGCAGCGAAGAAGACAGCGGTACATGTGCAAGCAGTGGGCAGCGTTGTGTAATGGAATACGGAAAGC  
CTGTTTGTAAAAAATCTCTGACGCAACAACAGCAGCGACAACAACAACGAAGGCGAAAGACAAGGATCA  
AGATCGTGAAAGTCAAGTGCTTGA

>KP087924.1

MRGIALFVAAVSLIGGCAAQSSVCSDFGNEFCGNAVCEVVPGAEHDFVCKCPGDDMYNAAEKHCEYKST  
CKTKECSYGRCAQISPRKAVCGCDGVDSLQRCNIQGWYADECRRKGGTAKLRDGLGAKDCGGEWSVM  
DRNKRKCVPTTCLRPDLTCKDLCEKNLLEKDSRCCQGWNSANCSTAPEEGSYCSPGNLKGKDGSKDACS  
AKEGTLVCKYGCKGSKPMRAYECECQSGDEVAEDGITCKRVPYTGDCSDEQKKTCTRPSEYCLVRKGVV  
CECPMRQHLVNDICTSDCVDDKCHENFTECGVYMSKQNCYCPWRTRKPLPNVS INECVLNEYYYTVSFTP  
NISLDSRSCDSYAARVLDAIRTSIGNDFVFKVEILNCTHDIKARLIASKPLSKHVIKRLQACEHPVDDL  
LYPKLPIKKGSAIEEENLDCSILKTQENGYKQNKCVKVDNFFWFQCADGYRAVDEITRGLRRSVCE  
AGVSCSAKEQLECANKGQICVYENEKANCQCPPGTAVAGQAGCTARTTCNPKEIRECQDHRKRCVYKDKA  
ECKCPEGTIDDGDGCSIEPAKEPCSEYEVGKCRSKGQSCVTENGKPVCKEISDATTAAAATTKAKDKDQE  
PCSEEDSGTCRSSGQRCVMEYKGPVCKKISDATTAAATTTKAKDKDQDRGKSSA

### 3.- >EF222203.1- *Rhipicephalus sanguineus*. USA

AGAGCGCGGGTGGCATATGTGCGCCGCTTCAGCACCGGCCAGCAACAGGATCCGTGAAAGGTGTGGCAGCT  
GCGGTGGTTTCGACGCAGTGAAGATGCGTAGCCTCGCTTTGTTTCGTGCGCCGCTGTTTCACTCATCGGAGGG  
TGCGCAGCGCAGTCATCTGTTTGTCTGACTTCGGGAACGAGTTCTGTGCAACGCTGAATGCGAAGTGG  
TTTCTGGTGCAGAGCACGATTTTCGTATGCAGATGTCCGCGAGATGACATGTACTACAATGCTGCGGAAAA  
ACACTGCGAATATAAAAAGCACGTGCAAAAACAAAAGAGTGCAGCTATGGAAGATGCACAGAAATTTCCCCG  
AGCAAAGCTGTCTGTGCCTGCGATGGCGTGGACTCTCTAACGCTAAGGTGCACTATTCAAAATTTGGTACG  
CTGACGAATGCCGAAGAATGGGGGGAACGGCTAAGTTGCGTACGGATGGGTTTCTTGGCGCAAGGTGCGA  
CTGCGGCGAATGGAGCGCGATGGACCGCAACAAAAGCAAGCGTGTCCCTACCACATGTCTACGTCCCGAC  
TTGACCTGCAAATACCTCTGCGAGAACGACCTGCTTGAAAAGGATTCTCGATGCTGCCAGGGATGGAAT  
CTGCAAACTGTTTCAGCGCTCCTGAAGAAGGAGCTTATTGCTCTCCTGCTCACCTCAAAGGCAAGGACGG  
AAAGTGTCAAGATGCTTGCAGTGCAGAAAGACTACGTTTGTCTGCAAGCATGGATGCAAGAGGTTCAAGC  
AAGCCGATGAGGGCATAACGAATGCAGGTGCACATCTGACGATGAAGTCGCTGAAGATGGAATCACCTGCA  
AAGGTATTCCGTACACAGGCGGCTGCAGTGACGAGCAGAAAAAGACCTGCCGTCCAAGCGAAAACCTGCCT  
TTTGAAGAAGGAAAAAGTGGTGTGTGAGTGCCCGATGCGTCAGCATCTAGTGAATGACGAGTGCATAAGT  
GATTGCGTTCGACGACAAATGCCACGAAAACCTTTATGGAATGTGGCGTCTATATGTGGAACAAAACCTGCT  
ATTGTCCATGGAGAACAAGGAAGCCGCGCCAAACGCTTTCATCAACGAATGCGTACTGAACGAGTATTA  
CTATAAGGTGTCATTACCCCGAACATCTCACTCAATTCTGACAGCTGCGACTCGTATGCGGCCCGTGT  
CTGGACGCGATAAGGACCAGTATCGGAAGCGAAGTTTTTAAAGTTGAGATACTGAACTGCACAGAGGACA  
TTAAAGCAAGGCTCATAGCATCGAAACCGCTGTCAAAGCAGTGTCAAGAGGCTTCAGGCGTGCAGCA  
TCCTGTGCGGTGACCTGTGCATGCTGTATCCGAAGTTGCCGATCAAGAAAGGTTCTGCAACAGAAATCGAA  
GAAGAGAACCTTTGCGACAGTATCCTCAAGACGCAGGAAAATGGATACAAGGGTCAGAACAAGTGCCTCA  
AGGTCGATAACTTTTTCTGGTTCCAGTGCGCTGACGGTTACAGAGCAGTTGACGAGATCGAACGAGGTCG  
CCTACGCCGCTCCGTGTGTGTAGCTGGTCTCTCCTGCAGCGATAAAGAGCAGTTGGAATGTGTTAACAAA  
GGACAAATATGTGTCTACGAAAACGAAAAGCGAATTGCCAATGCCACCAGGCACTGTGCTGGGCAAG  
CTGGTTGCACTGCCCCGTACAACATGCAACCCTAAAGAGGTTGCGAGAATGCCAGGACCAGAAGCGGGAATG  
CGTCTATAAAGACCAAAAAGCAGAGTGAAGTGTCTGAAAGGCACTGTTGATGATGGTGACGGATGTTCT  
GCCGAAGAATCTTGCAGCGAAGATGAAATCGGTAAATGTGCAAGCAAAGGACAGCGTTGTGTCTATGAAA  
ACGGAAGCCTGTTTGTAAAGAAATCTCTGACGCAACAACAGCAACAACACTACAACAACGAAAGCGAAAGA

CAAGAATCAAAATCCTGGAAAGTCAAGTGCTGCCGCAATCTCAGCTACATGGCTCTTGTGCTGATCGCA  
GCTACTTCAGTTGCCGCCGCATAGTTGTAAGGAAGATGTGCGAGCTTGAATATACGGGAAGGTTTGCAAAT  
GTATATAATAACGCGCTTACATCGAACACCAAGCTTGGCCCTTGAATATATAAAATTGCGCGCGGGTATT  
CGCTATAACCACACGGATGTATCGTTTTGGAAATAACGGGAGACGGACGTGAAAGAGGTTTTCTAGTCTG  
AGAACATAAGGAAAAACATGTTCTCCTGTCTGACTCATGTGAAATAAAATTAGTTGGGTCTAAA

>EF222203.1

MRSIALFVAAVSLIGGCAAQSSVCSDFGNEFCRNAECEVVSgaeHDFVCRCPRDDMYNAAEKHCEYKST  
CKTKECSYGRCTEISPSKAVCACDGVDSLTLRCTIQNWYADECRRMGGTAKLRDGFGLGARCDCGEWSAM  
DRNKSkrvPTTCLRPDLTCKYLcENDLLEKDSRCCQGWNSANCSAAPEEGSYCSPGHLKKGDKGKQDACS  
AKEATFVCKHGKCRSSKPMRAYECRCTSDEVAEDGITCKGIPYTGGSDEQKKTCRPSENCLLKKEKVV  
CECPMRQHLVNDICISDCVDDKCHENFMCEGVYMWKQNCYCPWRTRKPRPNVFINECVLNEYYYTVSFTP  
NISLNSDSCDSYAARVLDAIRTSIGSEVFKVEILNCTEDIKARLIASKPLSKHVLKRLQACEHPVGDLCM  
LYPKLPIKKSATEIEEENLcDSILKTQENGYKGQNKCVKVDNFFWFQCADGYRAVDEIERGLRRSVCV  
AGLSCSDKEQLECVNKGQICVYENEKANCQCPPGTVAGQAGCTARTTCNPKEVRECQDQKRECVYKDQKA  
ECKCPEGTVDDGDGCSAEEScSEDEIGKCRSKGQRcVMENgKPVCKEISDATTATTTTTKAKDKNQNPgK  
SSAAAI SATWLLLLLIAATSVAAA

## Subolesina

### 1.- >JX193845.1- *Rhipicephalus sanguineus*. España

ATGGCTTGTGCGACATTAAAGCGGACACATGACTGGGACCCGCTGCACAGTCCGAGTGGCCGATCACCGA  
AGCGACGCCGATGTATGCCTCTGTCCCCACCTCCAACAAGGGCGCACCAGATCGATCCCTCGCCCTTCGG  
AGACGTGCCACCAAAGTTGACTTCAGAGGAGATAGCAGCCAACATCCGCGAGGAGATGCGACGGCTACAA  
CGGCGCAAGCAGCTCTGTTTTCCAGGGCACCGACCCTGAATGCCAGCCGACCAGTGGCCTCTCGTCAACGG  
TGCGTCCGAGACCAGCCCTGTTTACGTTCCGCCAGGTTGGGCTCATTTGCGAACGGATGATGAAGGAGCG  
AGAGAGCAAGATACGGGAGGAGTACGACCACGTGCTATCCACCAAGCTTGCAGAACAGTACGACACGTTT  
GTTAAGTTTACCTACGACCAAATTCAGAAGCGGTTTTGAGGGTGCTACGCCAGCTATTTGTCTGTA

>JX193845.1

MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAANIREEMRRLQ  
RRKQLCFQGTDPecQPTSGLSSPVRRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESKIREEYDHVLSSTKLAEQYDTF  
VKFTYDQIQKRFEGATPSYLS

### 2.- >DQ159968.1- *Rhipicephalus sanguineus*. USA

ATGGCTTGTGCGACATTAAAGCGGACACACGACTGGGACCCGCTGCACAGTCCGAGTGGCCGATCACCGA  
AGCGACGCCGATGTATGCCTCTGTCCCCACCTCCAACAAGGGCGCACCAGATCGATCCCTCGCCCTTCGG  
AGACGTGCCACCAAAGTTGACTTCAGAGGAGATAGCAGCCAACATCCGCGAGGAGATGCGACGGCTACAA  
CGGCGCAAGCAGCTCTGTTTTCCAGGGCACCGACCCTGAATGCCAGCCGACCAGTGGCCTCTCGTCAACGG  
TGCGTCCGAGACCAGCCCTGTTTACGTTCCGCCAGGTTGGGCTCATTTGCGAACGGATGATGAAGGAGCG  
AGAGAGCAAGATACGGGAGGAGTACGACCACGTGCTTTCCACCAAGCTTGCAGAACAGTACGACACGTTT  
GTTAAGTTTACCTACGACCAAATTCAGAAGCGGTTTTGAGGGTGCTACGCCAGCTATTTGTCTGTA

>DQ159968.1

MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAANIREEMRRLQ  
RRKQLCFQGTDPecQPTSGLSSPVRRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESKIREEYDHVLSSTKLAEQYDTF  
VKFTYDQIQKRFEGATPSYLS



```

EF222203.1      KEVRECQDQKRECVYKDQKAECKCPEGTVDDGDGCSAE---ESCSEDEIGKCRSKGQRCV 597
                **:*****:***:*****:*****:***** * * * * * :***** **
KP087924.1      TENGKPVCKEISDATTAATAATTKAKDKDQEPCESEDSGTCRSSGQRCVMEYGKPVCKKIS 660
EF222203.1      MENGKPVCKEISDATTTATTTTKAKDKNQNP GKSSAAAI SAT---WLLLL-----IA 646
                *****:***:*****:*** * . . . : . . : : * :
KP087924.1      DATTAATTTTKAKDKDQDRGKSSA 684
EF222203.1      ATSVAAA----- 653
                :*.**:

```

**Subolesina**

```

JX193845.1      MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA 60
DQ159968.1      MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA 60
                *****
JX193845.1      NIREEMRRLQRRKQLCFQGTDEPCQPTSGLSSPVRRDQPLFTFRQVGLICERMKRESK 120
DQ159968.1      NIREEMRRLQRRKQLCFQGTDEPCQPTSGLSSPVRRDQPLFTFRQVGLICERMKRESK 120
                *****
JX193845.1      IREEYDHVLS TKLAEQYDTFVKFTYDQIQKRFEGATPSYLS 161
DQ159968.1      IREEYDHVLS TKLAEQYDTFVKFTYDQIQKRFEGATPSYLS 161
                *****

```

**Anexo 3. Alineamiento del gen RsVDAC de aislados mexicanos de *R. sanguineus***

```

Gro      MGKQARDLFNKNYHFGVVKLDCKSTHTGVEFVNSGTSLN DTGKVNASLETKYKVPEYGL 60
Yucatán -----METKYKVPEYGL 12
Mexicali -----METKYKVPEYGL 12
Morelos  -----METKYKVPEYGL 12
                :*****
Gro      TLKEKWNTDNTLSTEICTEEKLARGCKVAFHANFAPQTGKKSGALKAA YKLENVHLNGDV 120
Yucatán TLKEKWNTDNTLSTEICTEEKLARGCKVAFHANFAPQTGKKSGALKAA YKLENVHLNGDV 72
Mexicali TLKEKWNTDNTLSTEICTEEKLARGCKVAFHANFAPQTGKKSGALKAA YKLENVHLNGDV 72
Morelos  TLKEKWNTDNTLSTEICTEEKLARGCKVAFHANFAPQTGKKSGALKAA YKLENVHLNGDV 72
                *****
Gro      GLGPPGPVVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVG YQAGDFVLHTNVNDGQE 180
Yucatán DLGPPGPVVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKN----- 105
Mexicali DLGPPGPVVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTTKNRL----- 107
Morelos  DLGPPGPVVHGA AVLHYQGWL AGGQVSFDTT----- 103
                .*****
Gro      FAGSVFQRVNPQLQ TGVQLAWTAGTNATRFGLGCVASLG 219
Yucatán ----- 105
Mexicali ----- 107
Morelos  ----- 103

```

#### Anexo 4. Objetivo adicional

- Determinar el linaje de *R. sanguineus* de cepas mexicanas mediante el análisis parcial de los genes mitocondriales 12s rDNA y 16s rDNA.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Amplificación de los genes mitocondriales 12S y 16S

Utilizando el DNA que se extrajo de las diferentes cepas se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para amplificar los dos genes, para ello se diseñó un protocolo de termociclado con condiciones específicas al gen según las características químicas de cada iniciador. Los iniciadores utilizados se muestran en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Dos pares de iniciadores empleados en la amplificación de los genes 12S y 16S (Szabó *et al*, 2005; Abdullah *et al*, 2016).**

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Dirección
<b>12S_F</b>	5'-AAA CTA GGA TTA GAT ACC CTA TTA TTT TAG-3'	Sentido
<b>12S_R</b>	5'-CTA TGT AAC GAC TTA TCT TAA TAA AGA GTG-3'	Antisentido
<b>16S_F</b>	5'-TTA AAT TGC TGT RGT ATT-3'	Sentido
<b>16S_R</b>	5'-CCG GTC TGA ACT CAS AWC-3'	Antisentido

Se realizó PCR punto final para amplificar el gen 12S a partir de DNA genómico con las secuencias de oligonucleótidos mostrados en el cuadro 6 que amplifican un producto de 400 pb. Se prepararon reacciones de 25 µl agregando 100 ng de templado y utilizando los oligonucleótidos a una concentración de 20 µM bajo condiciones térmicas de 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por un minuto, 59°C por un minuto, 72°C por un minuto y la extensión final a 72°C por 10 minutos en un Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Para

verificar el resultado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.6% en condiciones de 100 V durante 75 minutos.

Para amplificar el gen 16S a partir del DNA genómico extraído de las diferentes cepas de la República Mexicana se utilizaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos: oligonucleótido sentido 5'-TTA AAT TGC TGT RGT ATT-3' y oligonucleótido antisentido 5'-CCG GTC TGA ACT CAS AWC-3' que amplifica un fragmento de 455 pb. También se prepararon reacciones de 25  $\mu$ l agregando 100 ng de cada templado y utilizando los oligonucleótidos a una concentración de 20  $\mu$ M bajo condiciones térmicas de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por un minuto, 45°C por un minuto, 72°C por un minuto y la extensión final a 72°C por 10 minutos en un Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Para verificar el resultado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.6% en condiciones de 100 V durante 75 minutos.

#### **Extracción de DNA de geles de agarosa**

Se prepararon geles de agarosa al 1.6% para cargar un total de 20  $\mu$ l del producto de PCR obtenido de cada cepa de los genes 12S y 16S en condiciones de 100 V durante 75 minutos. Con una navaja de bisturí cortamos las bandas correspondientes a los fragmentos de cada gen y seguimos el protocolo de PCR clean-up Gel extraction Nucleo Spin® Gel de la empresa MACHEREY-NAGEL sin ninguna modificación a los pasos.

Para secuenciar los amplicones ya purificados fue necesario cuantificar la concentración de DNA. La cantidad que se utilizó para secuenciar fue de 100 ng/ $\mu$ l. Las muestras fueron enviadas a la compañía Eurofins Genomics. El servicio de secuenciación fue llevado a cabo en un secuenciador Illumina HiSeq 2500 / MiSeq.

Los resultados de la secuenciación fueron analizados y ensamblados utilizando el Software Bio Edit Sequence Alignment Editor® para finalmente obtener las secuencias de los genes editados.

Posterior a ello se realizó un alineamiento con las secuencias editadas comparándolas con secuencias de los genes 12s y 16s de regiones que ya han sido clasificadas como templadas o tropicales, para poder comprobar a que linaje de *R. sanguineus* pertenece las cepas mexicanas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Amplificación de los genes mitocondriales 12S y 16S

Por medio de la técnica PCR punto final se obtuvo un amplicon de 400 pb que corresponde al tamaño esperado para el gen mitocondrial 12s de cada uno de las muestras de campo de *R. sanguineus* (Figura 1, 2). En las imágenes del gel no se observan inespecificidades en cada una de las muestras. El control negativo no tuvo ninguna amplificación lo cual nos indica que la técnica de PCR es totalmente confiable para deducir que los amplicones corresponden al gen mitocondrial 12s.

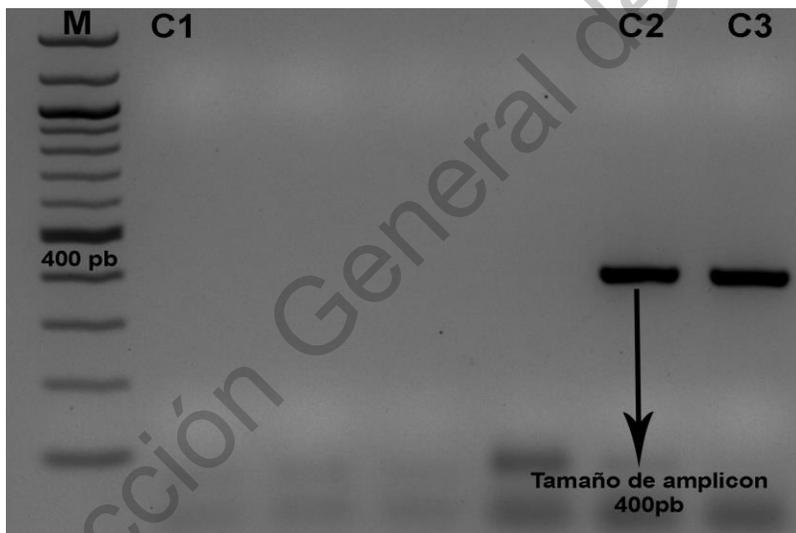
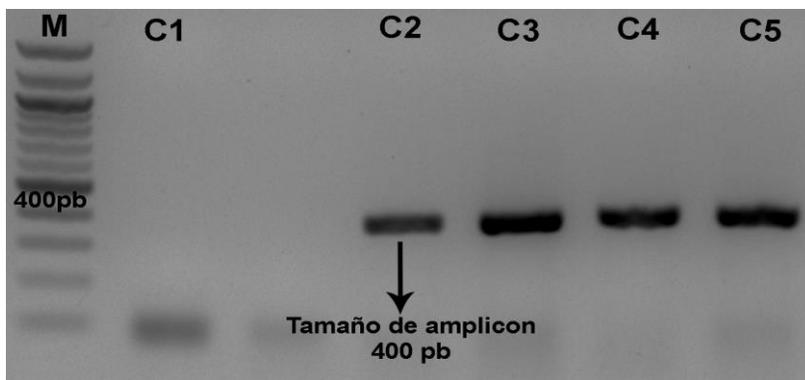
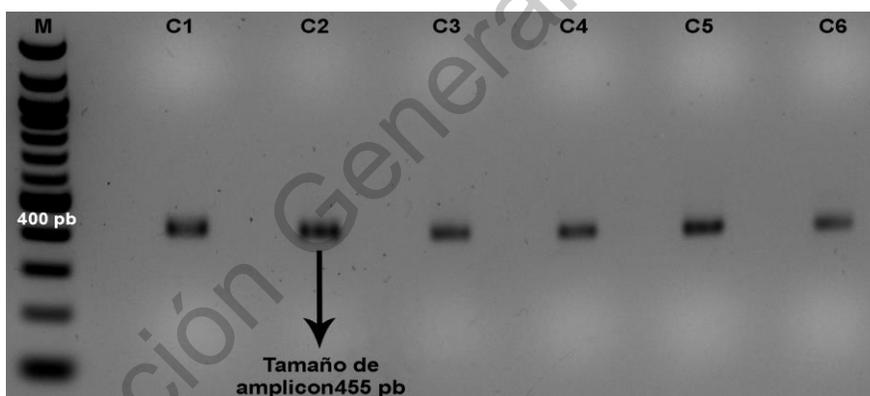


Figura 1. Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen 12s. M: Marcador de tamaño molecular (100pb). C1: Control negativo. C2: DNA de Nayarit. C3: DNA de Yucatán.



**Figura 2. Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen 12s.**  
**M:** Marcador de tamaño molecular (100pb). **C1:** Control negativo.  
**C2:** DNA de Querétaro. **C3:** DNA de Guerrero. **C4:** DNA de Baja California. **C5:** DNA de Morelos.

Por medio de la técnica PCR punto final se obtuvo un amplicon de 455 pb que corresponde al tamaño esperado para el gen mitocondrial 16s de cada uno de las muestras de campo de *R. sanguineus* (Figura 3). La imagen corresponde al DNA purificado de cada estado de la república, es por ello que al fondo de cada carril no se observan los oligonucleótidos formando dímeros.



**Figura 3. Electroforesis de gel de agarosa al 1% para el gen 16s.**  
**M:** Marcador de tamaño molecular (100pb). **C1:** DNA de Querétaro **C2:**  
**C3:** DNA Baja California **C4:** DNA de Guerrero. **C5:** DNA de Yucatán. **C6:**  
**C6:** DNA de Morelos. **C6:** DNA de Nayarit.

## Alineamiento de las secuencias mitocondriales del gen 12s y 16s de aislados mexicanos de *R. sanguineus*

Una vez editadas las secuencias, realizamos un alineamiento múltiple, donde obtuvimos un alto porcentaje de identidad entre las secuencias del 100%.

>Gen 12s Cepas mexicanas

```
TAAACTAGGG AATTGATACC CTATTATTTT AGAGCTTAAC ATTGTAAGTA AATAATAATT  
ATGAAAGCAA AAAATTATGG CGGTATTTTA AGCTTTTCAG AGGAATTTGC TCTTTAATGG  
ATAAACACCC AAAATCTTAC TTAGATTTGT GATTTCAATT TGTATACCAC TATTAACAAC  
ATTTATAACT TTAATTGTTT AAATTTACAA AACTAAAATA TATTAAGTCA AGGTGCAGTA  
AAAATTTAAG GATGAAGTGA ATTACATTAC TTTTATAGTGA GATAAGTTTA TAACAATATT  
TAGGATTTGA AAGTAAAATT AAAATAGGAT GTTAATTTGA ATTAAGCTCT AAAATATGTA  
CATATCGCCC GTCACTCTTT ATTAAGATAA GCGTTACATA GAA
```

>Gen 16s Cepas mexicanas

```
TTTTAAATTG CTGTAGTATT TTGACTATAC AAAGGTATTG AAATAAGATT TTAATTGAAT  
GCTAAGAGAA TGGAAGTCCA GAAAAAACT TTTTTTAAAT TAAAAATTGA AGTTTTTTTA  
ATTTGTGCAG AAACAATTAT TTATATTTAA GACAAGAAGA CCCTATGAAT TTATTAAATT  
TTTATTTAAT ATGTAATTAC TATTAGAAAA ATTTTGGCTG GGGCGGCTAG AAAATATTAT  
GAACTTTTTA AAAATAAAAT GATCCATTAT TAATGATTTT ATGTAAATA CTCTAGGGAT  
AACAGCGTTA TATTTTTTGA TAGATCATAT TGACAAAAAA GTTTCGAC TCGATGTTGG  
ATTAGGATAC TTTTTTAATG AAGATATTAA AAAAAGAAGT TTGTTCAACT TTTAATTTCC  
TACATGATCT GAGTTCAGAC CGGAAAA
```

En las secuencias anteriores se observa una secuencia de nucleótidos en color verde que corresponde a la secuencia conservada entre las 7 muestras de campo de los dos genes estudio (Querétaro, Guerrero, Baja California, Nayarit, Yucatán, Morelos y Coahuila sólo en el gen 12s).

Al realizar una alineación entre la secuencia 12s mexicana comparada con una secuencia 12s clasificada como tropical (Locus KX383867) encontramos una identidad del 97.5%. Caso contrario resulto compararla con una secuencia clasificada como templada (Locus AF133056) donde la identidad fue del 91%. Con estos resultados podemos clasificar a *R. sanguineus* del territorio mexicano dentro del clado tropical siguiendo como ejemplo el árbol filogenético diseñado por Leal *et al.*, 2017.

De la misma forma al realizar la alineación entre la secuencia 16s mexicana comparada con una secuencia 16s clasificada como tropical (Locus JX997390)

encontramos una identidad del 99.5%. Caso contrario resulto compararla con una secuencia clasificada como templada (Locus JQ362409) donde la identidad fue del 91.8%.

### CONCLUSIONES

Los análisis individuales de este objetivo con los genes mitocondriales 12s rDNA y 16s rDNA corroboran los resultados obtenidos por los autores: Leal et al., 2017; Dantas-Torres et al., 2017 y Zemtsova et al., 2016, quienes clasifican a *R. sanguineus* en dos grupos diferentes: Tropical y templado. Como resultado de alineamientos de las secuencias con los genes mitocondriales 12s rDNA y 16s rDNA de cepas mexicanas con secuencias ya clasificadas concluimos que las cepas encontradas en el territorio nacional de *R. sanguineus* pertenecen al clado tropical.