

## Análisis molecular de un polipéptido de la proteína RmS-17 para el desarrollo de un antígeno vacunal contra garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México

### Molecular analysis of a polypeptide of the RmS-17 protein for the development of a vaccine against *Rhipicephalus microplus* ticks in Mexico

Nayely Teresa Martínez-Maza<sup>1</sup> ,  
Rubén Hernández-Ortiz<sup>2</sup> ,  
Uriel Mauricio Valdez-  
Espinoza<sup>2</sup> ,  
Edgar Castro-Saines<sup>2</sup> ,  
Hugo Aguilar-Díaz<sup>2</sup> ,  
Rodolfo Lagunes-  
Quintanilla<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000, CP. 04510. Ciudad de México, México.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla 8534, Col. Progreso, CP. 62550. Jiutepec, Morelos, México.

\*Autor de correspondencia:  
rodolfo.lagunes@gmail.com

#### Artículo científico

Recibido: 04 de abril 2020

Aceptado: 05 de noviembre 2020

**Como citar:** Martínez-Maza NT, Hernández-Ortiz R, Valdez-Espinoza UM, Castro-Saines E, Aguilar-Díaz H, Lagunes-Quintanilla R (2020) Análisis molecular de un polipéptido de la proteína RmS-17 para el desarrollo de un antígeno vacunal contra garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 7(3): e2537. DOI: 10.19136/era.a7n3.2537

**RESUMEN.** El objetivo del trabajo fue analizar un polipéptido derivado de la proteína RmS-17 en cepas y aislados de garrapatas *Rhipicephalus microplus* de México. Se realizó un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos con el fin de seleccionar una región que constó de 145 aminoácidos. Posteriormente, se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para lograr la amplificación del fragmento de interés en cada una de las cepas y aislados de garrapatas en estudio, obteniendo un amplicón de 435 bp. Los productos obtenidos fueron clonados en el vector comercial pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> y los plásmidos transformados en células competente de *E. coli* TOP10<sup>®</sup>. Se seleccionaron clonas positivas con fines de secuenciación. Los resultados mostraron un 99.08% de identidad para la cepa de referencia “Media Joya” con respecto a la cepa previamente reportada en Brasil (KC990116.1). En relación a las secuencias de las cepas “Vargas”, “Híbrido”, “Huastecas” y de los aislados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Morelos y Guerrero se observó un 100% de identidad y similitud. Estos resultados demuestran un elevado grado de conservación en la secuencia que codifica para el polipéptido RmS-17 y sugiere ser una propuesta para llevar a cabo el desarrollo de un antígeno vacunal que coadyuve en el control de infestaciones por garrapatas *R. microplus* en distintas zonas geográficas de México.

**Palabras clave:** Garrapatas, inmunógeno, México, *R. microplus*, RmS-17.

**ABSTRACT.** The aim of this work was to analyze a RmS-17 polypeptide from *Rhipicephalus microplus* strains and isolates from different states of Mexico. *in silico* analysis of the amino acid sequence was performed in order to select a region of 145 amino acids. Subsequently, a pair of specific oligonucleotides was designed to amplify the fragment of interest in each strain and isolate, obtaining a 435 bp amplicon. The products were cloned into the pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> vector and the plasmids transformed into the competent *E. coli* TOP10<sup>®</sup> cells. Positive clones were selected for sequencing purposes. The results showed an identity percentage of 99.08% for the reference strain “Media Joya” with respect to the previously reported strain in Brazil (KC990116.1). The strains “Vargas”, “Hybrid”, “Huastecas” and the isolates from Campeche, Chiapas, Hidalgo, Morelos and Guerrero an identity and similarity percentage of 100% was observed. These results demonstrate a high degree of conservation in the sequence of the RmS-17 polypeptide and suggests that it is appropriate to carry out the development of an immunogen that will be useful to control *R. microplus* infestations in several geographical areas of Mexico.

**Key words:** Ticks, immunogen, Mexico, *R. microplus*, RmS-17.

## INTRODUCCIÓN

Las infestaciones por garrapatas en la ganadería bovina mexicana, son un problema que conlleva a múltiples situaciones de merma en la producción. La especie más importante es *Rhipicephalus microplus*, la cual genera pérdidas económicas tangibles (Rodríguez-Vivas et al. 2017), tanto por sus efectos asociados a depreciación de pieles, pérdidas de peso, disminución en la producción láctea, anemias, así como por la transmisión de patógenos causantes de babesiosis y anaplasmosis (de la Fuente y Kocan 2006). Actualmente, se han implementado diversas estrategias de control; siendo el control químico el más utilizado por su alto porcentaje de letalidad y efectividad para reducir el número de garrapatas sobre los animales (Ostfeld et al. 2006). Sin embargo, la mayor desventaja de este control radica en la generación de cepas multiresistentes a prácticamente todas las familias químicas disponibles en el mercado (Rodríguez-Vivas et al. 2018), haciendo necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de control como pueden ser las vacunas anti-garrapatas; las cuales han demostrado un efecto protector cuando son aplicadas dentro de un programa integrado de control (de la Fuente y Kocan 2003). En la actualidad existen vacunas comerciales basadas en la proteína recombinante Bm86 para el control de la garrapata *R. microplus*. El uso de estas vacunas representa una alternativa debido a que disminuyen los parámetros reproductivos de las garrapatas, afectando con ello la progenie; además de bloquear la transmisión de patógenos a sus hospedadores (Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias 2020). No obstante, presentan ciertas limitaciones al observarse una disminución en la eficacia del antígeno Bm86 cuando es aplicado a bovinos infestados con cepas de garrapatas *R. microplus* de distintas regiones geográficas, lo cual está asociado a polimorfismos en la secuencia del gen codificador (García-García et al. 1999).

En la búsqueda de nuevos candidatos a vacunas se han caracterizado diversas proteínas secretadas y/o localizadas en glándula salival, cemento, intestino medio y ovarios de las garrapatas

(Mulenga et al. 2001, de la Fuente y Kocan 2003, 2006, Canales et al. 2009, Dai et al. 2009, Almazan et al. 2010, Seixas et al. 2012, Tirloni et al. 2016), dentro de las cuales se encuentran las Serpinas; proteínas de entre 350 y 500 residuos de aminoácidos con pesos moleculares que varían de 40 a 60 kDa y con estructuras similares identificadas en un principio por su capacidad de inhibir la proteasa serina (Gettins 2002). Cuentan con sitios conservados y presentan funciones importantes en el sistema inmune, respuesta inflamatoria, fibrinólisis y coagulación sanguínea de las garrapatas (Ye et al. 2001). En las garrapatas se han caracterizado diversas Serpinas como la HLS1 de *Haemaphysalis longicornis* (Immamura et al. 2005), RaS-1, RaS-2 y RaS4 en *Rhipicephalus appendiculatus* (Immamura et al. 2006), AAS27 en *Amblyomma americanum*, entre otras. En garrapatas *R. microplus* se han identificado 22 diferentes Serpinas (Tirloni et al. 2014, Rodríguez-Valle et al. 2015), las cuales cumplen con ciertas funciones dentro de la fisiología de la garrapata. Una de ellas, la Serpina 17 (RmS-17) presenta características que sugieren podría ser un candidato vacunal debido a su localización en órganos vitales como glándula salival, intestino medio, ovarios y exoesqueleto; además de participar en funciones importantes en la inhibición de la coagulación sanguínea y la modulación de la inhibición de la respuesta inflamatoria del hospedador. Al respecto Tirloni et al. (2016), realizaron un ensayo en el cual aplicaron la proteína recombinante RmS-17 en conejos con la finalidad de obtener suero policlonal y posteriormente incubarlo con quimiotripsina y la Serpina diana. El resultado fue la disminución de la función inhibitoria de la Serpina, lo cual se traduce en que los anticuerpos bloquean esta función durante la alimentación de la garrapata, interfiriendo en la modulación y el desarrollo.

Recientemente, las herramientas bioinformáticas han sido de gran utilidad para analizar secuencias de aminoácidos de proteínas de interés, identificando regiones o péptidos conservados que puedan actuar como posibles candidatos potenciales a antígenos vacunales (Crompton et al. 2010). Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo es llevar a cabo un análisis

sis molecular de un polipéptido de la proteína RmS-17 en cepas y aislados nacionales de garrapatas *R. microplus*, lo que permitirá el desarrollo de un antígeno vacunal con mínima variabilidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la secuencia de aminoácidos de la proteína RmS-17 reportada en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (AHC98668.1) para llevar a cabo el análisis *in silico* mediante diferentes algoritmos bioinformáticos. Para realizar los análisis de la estructura secundaria, se buscaron regiones hidrofóbicas utilizando la herramienta Protscale, regiones transmembranales con TMHMM, presencia de péptido señal mediante SignalP 4.1, sitios de glicosilación con NetNGlyc 1.0 y la búsqueda de dominios funcionales haciendo uso de los programas Pfam y SMART. La predicción de epítomos de células B se llevó a cabo con diferentes algoritmos, buscando dentro de la secuencia de aminoácidos características de un epítomo B como: Hidrofilicidad (Antigenic Plot), Antigenicidad (EMBOSS Antigenic) y epítomos lineales (Bepipred 2.0 y BCELL/IEDB *Analysis Resource*). La predicción de la estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo utilizando los programas I-Tasser, SWISS-MODEL y Phyre2 haciendo modelaje por homología. Los modelos se obtuvieron del RCSB: *Protein Data Bank* (RCSB PDB) y fueron analizados con el programa Chimera para predecir la mejor estructura. Una vez localizada la secuencia de interés se diseñaron oligonucleótidos específicos mediante el programa OligoAnalyzer para su síntesis. La representación del polipéptido derivado de la proteína RmS-17 se llevó a cabo mediante el programa Protter. Como material biológico se utilizaron garrapatas *R. microplus* hembras repletas de la cepa de referencia denominada "Media Joya", cepa "Híbrido" (cruzamiento de la cepa "Media Joya" y "Canoas"); ambas provenientes de Tapalpa, Jalisco, México y cepa "Huastecas" (cepa con antecedentes de resistencia a ivermectina) proveniente de Aldama, Tamaulipas; las cuales se encuentran establecidas en

el CENID-SAI, INIFAP y forman parte del germoplasma del Instituto. Además, se utilizó la cepa "Vargas" proveniente de Aldama, Tamaulipas y diferentes aislados colectados en los municipios de La Candelaria, Campeche; Pijijiapan, Chiapas; Xochicoatlán, Hidalgo; Lolotla, Hidalgo; Jonacatepec, Morelos; Tepalcingo, Morelos y Juan Ranulfo Escudero, Guerrero.

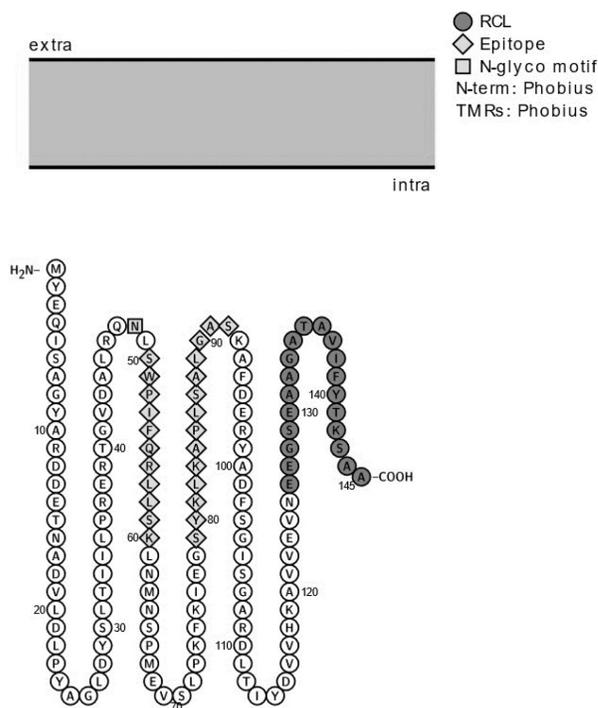
Se llevó a cabo la disección de cinco garrapatas hembras repletas por cepa o aislado (glándula salival, intestino y ovarios), realizando un corte de forma longitudinal dorsal con ayuda de un bisturí y un microscopio estereoscópico. Posteriormente, se hicieron lavados con PBS 1X frío, con el fin de eliminar la mayor cantidad de sangre presente. La extracción de RNA total se realizó mediante el método de Trizol<sup>®</sup>. El RNA obtenido se utilizó para la síntesis de DNA complementario (cDNA), mediante la técnica denominada RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Transcriptasa Reversa), el cual sirvió como plantilla en las reacciones de amplificación. La reacción de PCR punto final se llevó a cabo en tubos de microcentrífuga de pared delgada bajo el siguiente protocolo: 1X PCR buffer, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM de dNTPs, 2 U/μL de platinum Taq polimerasa (Invitrogen<sup>™</sup> Platinum<sup>™</sup> Taq DNA Polymerase), 2 μM de oligonucleótidos y 100 ng de cDNA, en un volumen final de 25 μL. Posteriormente, los amplicones obtenidos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris, Borato, EDTA) para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados por comparación con un marcador molecular de 1 Kb y visualizados por exposición UV en un transiluminador Gel Logic 1500 (*Imaging System*). La clonación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando el vector optimizado para secuenciación pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA), realizando una reacción de ligación y la subsecuente transformación en células competentes TOP10<sup>®</sup> de *Escherichia coli*. Se seleccionaron cinco colonias recombinantes de cada muestra para realizar los ensayos de PCR de colonia y confirmar aquellas clonas que incorporaron el inserto. La extracción y purificación de plásmidos se llevó a cabo

por el método de lisis alcalina y fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), mediante el método Sanger. Con los resultados obtenidos se realizaron secuencias consenso para cada una de las cepas y aislados a evaluar. Se llevó a cabo un análisis de alineamiento múltiple con los programas CLUSTAL W, UGENE y MUSCLE utilizando métodos progresivos e iterativos con el fin de comparar los resultados y determinar el mejor alineamiento. La calidad de los alineamientos se analizó con el programa GeneDoc calculando la suma de pares y LogOdds. Finalmente, se generó una matriz de sustitución para determinar el grado de identidad/similitud que existía entre las secuencias que codifican para el polipéptido RmS-17 de las diferentes cepas y aislados de garrapatas, a través del servidor SIAS diseñado por la Universidad Complutense de Madrid.

## RESULTADOS

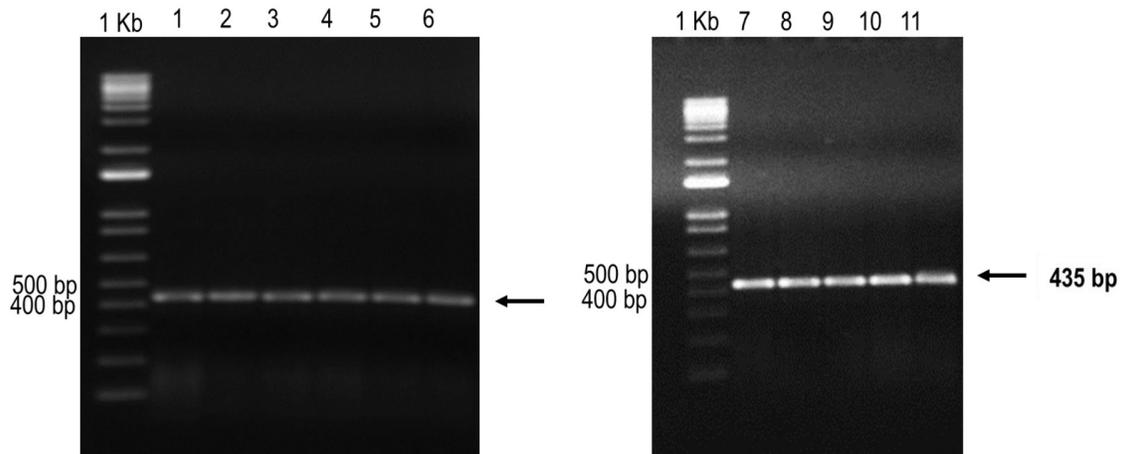
Se seleccionó un polipéptido derivado de la proteína RmS-17, el cual está constituido por 145 aminoácidos equivalente a 435 bp; localizado entre los residuos 215 y 359. Dentro la secuencia de interés se localiza el sitio central reactivo (RCL), el cual le brinda especificidad a las Serpinas frente a la proteasa blanco para realizar su función inhibitoria, además de tener la característica de ser conservado en la familia de las Serpinas. El polipéptido seleccionado carece de péptido señal y región transmembranal demostrando que se trata de un fragmento intracelular. También se predijo dentro del polipéptido una región hidrofóbica con una puntuación superior a 1.6. Se localizó un sitio de glicosilación en el residuo 48 con un punto de corte de 0.5. La predicción de regiones antigénicas y epítomos lineales de células B, sugiere que existen dos epítomos B predichos por tres de cuatro programas utilizados, con un índice de inmunidad superior a 0.8% y una longitud entre 10 a 16 aminoácidos; indicativo de alta inmunogenicidad. Con respecto a la topología, posición y localización de los epítomos

predichos, se analizó por homología con la estructura cristalizada de la Serpina 2 de *Ixodes ricinus* con un 47.06% de identidad, sugiriendo que el polipéptido está constituido por cuatro hélices alfa, siete láminas beta y una amplia proporción de giros aleatorios. En la Figura 1, se resumen las principales características de interés predichas en el polipéptido derivado de la proteína RmS-17.



**Figura 1:** Representación del polipéptido derivado de la proteína RmS-17. El diseño fue personalizado en el programa Potter, donde se resumen las principales características de interés predichas. El cuadrado representa el sitio de N-glicosilación (residuo 48), los rombos indican los epítomos lineales de células B (residuos 50-60, 79-92) y los círculos sombreados muestran el sitio central reactivo (RCL) (residuos 126-145).

Se logró la amplificación del fragmento de interés, obteniendo un amplicón de 435 bp para las diferentes muestras de *R. microplus* en estudio (Figura 2). Al realizar el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas, se observaron cuatro mutaciones silenciosas a nivel de nucleótidos en la cepa “Media Joya” con respecto a la cepa “Porto Alegre” previamente reportada en Brasil. Las cepas “Vargas”, “Híbrido” y “Huastecas”, así como los aislados de La Candelaria, Cam., Pijijapan, Chis., Xochicoatlán y



**Figura 2.** Amplificación del fragmento de RmS-17 a partir de cepas y aislados mexicanos. Los carriles 1 - 11 muestran los amplicones de Jalisco, Tamaulipas, Morelos, Hidalgo, Campeche, Guerrero y Chiapas con un tamaño equivalente a 435 bp. Gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X.

Lolotla, Hgo., Tepalcingo y Jonacatepec, Mor., y Juan Ranulfo Escudero, Gro. no presentaron ninguna mutación. En cuanto al análisis de las secuencias a nivel de aminoácidos se observó una identidad de 100% (Figura 3). Por otra parte, en la matriz de sustitución de observó un 99.08% de identidad en la secuencia que corresponde a la cepa “Media Joya” con respecto a las demás cepas y aislados en estudio. Las secuencias de las cepas “Vargas”, “Híbrido” y “Huastecas”, además de los aislados de Campeche, Chiapas, Hidalgo, Morelos y Guerrero presentaron un 100% de identidad y similitud comparadas con la cepa previamente reportada (Tabla 1).

## DISCUSIÓN

El estudio de las vacunas contra garrapatas ha sido explorado desde los años 80's hasta la fecha. Se han descubierto y caracterizado un número importante de posibles candidatos vacunales con ciertas aproximaciones en cuanto a su nivel de eficacia (Lagunes-Quintanilla y Bautista-Garfias 2020). En el presente trabajo, utilizando herramientas de bioinformática se diseñó un polipéptido derivado de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus*, considerando ciertas características de interés con la finalidad de estimular una respuesta inmune específica protectora. Dentro del polipéptido se consideró

la incorporación del RCL, el cual le permite a las Serpinas llevar a cabo su función inhibitoria (Gettins 2002, Bhowmick y Han 2020), la presencia de dos epítomos lineales de células B, ausencia de regiones transmembranales y que al menos contuviera un sitio de N-glicosilación el cual podría incrementar la activación de las células T; debido a que las acciones anti-garrapatas de tipo Th1/Th2 tienen un valor protector atribuido a las clases/subclases de anticuerpos, de acuerdo con su capacidad activadora del complemento, siendo más potente las activadas por inmunoglobulinas de tipo IgG derivadas de respuestas tipo Th1 (Mossman y Coffman 1989). Además, los linfocitos T junto con otras células contribuyen a la activación y diferenciación de linfocitos B, los cuales producen anticuerpos circulantes que reaccionan contra garrapatas (Willadsen 1980, Whelen y Wikel 1993). Recientemente, se han propuesto distintas metodologías para el diseño y selección de antígenos vacunales en diferentes modelos de investigación; la inmunoinformática, que se basa en la aplicación de algoritmos ha servido de base para predecir aquellas regiones, péptidos o epítomos que generen una inmunogenicidad adecuada y que disminuyan en gran medida los ensayos experimentales en la búsqueda de antígenos vacunales (Merino-Charrez et al. 2019). Este tipo de estrategia se ha llevado a cabo en otros modelos de investigación como *Babesia* spp. y *Plas-*

Porto Alegre, Brasil	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Media Joya, Tapalpa, Jal.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Vargas, Aldama, Tam.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Huastecas, Aldama, Tam.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Híbrido, Tapalpa, Jal.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Jonacatepec, Mor.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Tepalcingo, Mor.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Xochicoatlán, Hgo.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Lolotla, Hgo.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
La Candelaria, Cam.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Juan R. Escudero, Gro.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
Pijijapan, Chis.	MYEQISAGYARDDDETADVLDLDPYAGLDYSLTIILPRERTGVDALRQNLSPWIFQRLLSK
	*****
Porto Alegre, Brasil	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Media Joya, Tapalpa, Jal.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Vargas, Aldama, Tam.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Huastecas, Aldama, Tam.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Híbrido, Tapalpa, Jal.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Jonacatepec, Mor.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Tepalcingo, Mor.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Xochicoatlán, Hgo.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Lolotla, Hgo.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
La Candelaria, Cam.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Juan R. Escudero, Gro.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
Pijijapan, Chis.	LNMNSPMEVSLPKFKIEGSYKLGKAPLSALGASKAFDERYADFGISGARDLTIYDVVHKA
	*****
Porto Alegre, Brasil	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Media Joya, Tapalpa, Jal.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Vargas, Aldama, Tam.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Huastecas, Aldama, Tam.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Híbrido, Tapalpa, Jal.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Jonacatepec, Mor.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Tepalcingo, Mor.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Xochicoatlán, Hgo.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Lolotla, Hgo.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
La Candelaria, Cam.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Juan R. Escudero, Gro.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
Pijijapan, Chis.	WEVNEEGSEAAGATAVIFYTKSAA
	*****

**Figura 3.** Alineamiento múltiple de las secuencias de Jalisco, Tamaulipas, Morelos, Hidalgo, Campeche, Guerrero, Chiapas y la cepa previamente reportada en Brasil (AHC98668.1). Los asteriscos muestran las regiones conservadas de las diferentes secuencias del polipéptido RmS-17 mediante el programa GeneDoc.

**Tabla 1.** Matriz de identidad/similitud para las secuencias del polipéptido RmS-17. El número por encima de la diagonal representa el porcentaje de identidad y por debajo de la diagonal representa el porcentaje de similitud.

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

*modium falciparum*, estimulando una respuesta inmune innata y adaptativa efectiva frente a los parásitos (Mahajan et al. 2010).

El polipéptido seleccionado se localiza intracelularmente, sugiriendo que este no podría tener una interacción con los anticuerpos específicos que circulan en la hemolinfa; sin embargo, se ha demostrado en estudios previos la capacidad de los anticuerpos para atravesar la membrana y llegar hasta su sitio blanco, así como se ha dilucidado con diversas proteínas intracelulares: glutatión S transferasa (Parizi et al. 2011), factor de elongación Ef1a, Ubiquitina (Almazán et al. 2012), proteína ribosomal P0 (Rodríguez-Mallon et al. 2015), Suboleina (de la Fuente et al. 2011, Merino et al. 2011, Bensaci et al. 2012, Antunes et al. 2014, Lagunes et al. 2016). Actualmente, se sabe que las garrapatas presentan la característica de llevar a cabo la digestión de manera intracelular lenta, debido a la presencia de una membrana semipermeable denominada membrana peritrófica localizada en el intestino (Willadsen 2001) y que los anticuerpos protectores inhiben el proceso de endocitosis, mientras los enterocitos son lisados a través del complemento, lo que da lugar a que el material ingerido pase a la hemolinfa (Willadsen 1997, Bhowmick y Han 2020). Esto sugiere que los anticuerpos producidos por el polipéptido RmS-17 podrían atravesar la membrana e inhibir funciones importantes en el desarrollo y la alimentación de la garrapata *R. microplus*. En asociación con los resultados obtenidos, se presume que la región seleccionada podría generar una respuesta inmune eficiente. No obstante, es necesario llevar a cabo los ensayos de inmunización en modelos *in vivo* con la finalidad de evaluar la eficacia del antígeno en contra de garrapatas *R. microplus*.

Actualmente, las únicas vacunas comerciales disponibles en el mercado se basan en la proteína Bm86. Sin embargo, en estudios realizados previamente se reportó que una diferencia mayor al 2.8% en la secuencia de aminoácidos es suficiente para causar una respuesta inmune variable frente a la vacunación (García-García et al. 1999, Freeman et al. 2010). Por lo cual, se requiere el desarrollo de vacunas contra garrapatas que tengan la capacidad

de generar protección en diferentes zonas geográficas, es decir, que sean antígenos conservados. En el presente estudio, al realizar los alineamientos de las secuencias del polipéptido RmS-17 únicamente en la cepa “Media Joya” se identificaron cuatro mutaciones silenciosas a nivel de nucleótidos, infiriendo cero sustituciones a nivel de aminoácidos; con un 99.08% de identidad y 100% de similitud comparado con la secuencia reportada en Brasil. Así mismo, en las secuencias de las cepas “Híbrido”, “Vargas” y “Huastecas” y en los aislados de La Candelaria, Cam., Pijijiapan, Chis., Xochicoatlán y Lolotla, Hgo., Tepalcingo y Jonacatepec, Mor., y Juan Ranulfo Escudero, Gro. no se observaron mutaciones, indicando que las secuencias del noreste, centro, occidente y sureste de México son altamente conservadas. Los hallazgos encontrados en esta investigación, se podrían correlacionar con los análisis filogenéticos obtenidos por Tirloni et al. (2014), donde se infiere un elevado nivel de homología. Adicionalmente, se presume que la familia de las Serpinas al ser proteínas ortólogas presentan funciones similares como la inhibición de la tripsina, catepsina G, quimotripsina, plasmina y factor XIa (Tirloni et al. 2016). Por lo cual, de manera prospectiva será conveniente evaluar el potencial del polipéptido RmS17 con la finalidad de observar si la inmunización podría bloquear la actividad inhibitoria de la proteasa durante la alimentación de garrapatas e interferir con las funciones moduladoras de las Serpinas.

## CONCLUSIONES

En la presente investigación se analizó un polipéptido derivado de la proteína RmS-17, el cual no presenta variaciones en la secuencia de aminoácidos. Estos hallazgos demostraron un elevado grado de conservación entre las poblaciones de garrapatas *R. microplus* de México y Brasil. Además, las secuencias del polipéptido RmS-17 son altamente conservadas en diferentes regiones de México, sugiriendo que estas secuencias son ortólogas y que el desarrollo de un antígeno vacunal es factible para reducir las infestaciones por garrapatas *R. microplus* en el país.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones

Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), a través del proyecto N° SIGI: 10533234452; por el apoyo financiero para llevar a cabo esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, de la Fuente J (2010) Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research* 106: 471-479.
- Almazán C, Moreno-Cantú O, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Canales M, Villar M, de la Fuente J (2012) Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine* 30: 265-272.
- Antunes S, Merino O, Mosqueda J, Moreno-Cid JA, Bell-Sakyi L, Fragkoudis R, Weisheit S, Pérez de la Lastra JM, Alberdi P, Domingos A, de la Fuente J (2014) Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasites and Vectors* 7: 42. DOI: 10.1186/1756-3305-7-42
- Bensaci M, Bhattacharya D, Clark R, Hu LT (2012) Oral vaccination with vaccinia virus expressing the tick antigen subolesin inhibits tick feeding and transmission of *Borrelia burgdorferi*. *Vaccine* 30: 6040-6046.
- Bhowmick B, Han Q (2020) Understanding tick biology and its implications in anti-tick and transmission blocking vaccines against tick-borne pathogens. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 319. DOI: 10.3389/fvets.2020.00319
- Canales M, Almazán C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J (2009) Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology* 9: 29. DOI: 10.1186/1472-6750-9-29
- Crompton D, Kayala A, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE, Molina DM, Burk CR, Waisberg M, Jasinskas A, Tan X, Doumbo S, Doumtabe D, Kone Y, Narum DL, Liang X, Doumbo OK, Miller LH, Doolan DL, Baldi P, Felgner PL, Pierce SK (2010) A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum* before and after a malaria season by protein microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 6958-6963.
- Dai J, Wang P, Adusumilli S, Booth CJ, Narasimhan S, Anguita J, Fikrig E (2009) Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host & Microbe* 6: 482-492.
- de la Fuente J, Kocan KM (2003) Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Vaccine* 4: 583-593.
- de la Fuente J, Kocan KM (2006) Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* 28: 275-283.
- de la Fuente J, Moreno-Cid JA, Canales M, Villar M, de la Lastra JM, Kocan KM, Galindo RC, Almazán C, Blouin EF (2011) Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Veterinary Parasitology* 181: 17-22.
- Freeman JM, Davey RB, Kappmeyer LS, Kammlah DM, Olafson PU (2010) Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasites and Vectors* 3: 101. DOI: 10.1186/1756-3305-3-101

- García-García JC, Gonzalez IL, Gonzalez DM, Valdés M, Méndez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni D, Fragoso H, Ortiz M, Rodríguez M, de La Fuente, J (1999) Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Experimental Applied Acarology* 23: 883-895.
- Gettins P (2002) Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chemical Reviews* 102: 4751-4803.
- Imamura S, da Silva Vaz Junior I, Sugino M, Ohashi K, Onuma K (2005) A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 23: 1301-1311.
- Imamura S, Namangala B, Tajima T, Tembob ME, Yasuda J, Ohashi K, Onuma M (2006) Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine* 24: 2230-2237.
- Lagunes R, Domínguez D, Quiroz H, Martínez M, Rosario R (2016) Potential effects on *Rhipicephalus microplus* tick larvae fed on calves immunized with a Subolesin peptide predicted by epitope analysis. *Tropical Biomedicine* 33: 726-738.
- Lagunes-Quintanilla R, Bautista-Garfias CR (2020) El control inmunológico: Una alternativa contra garrapatas del ganado bovino. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 7: e2263. DOI: 10.19136/era.a7n1.2263
- Mahajan B, Berzofsky JA, Boykins RA, Majam V, Zheng H, Chattopadhyay R, de la Vega P, Moch JK, Haynes JD, Belyakov IM, Nakhasi HL, Kumar S (2010) Multiple antigen peptide vaccines against *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and Immunity* 78: 4613-4624.
- Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid JA, Galindo RC, de la Fuente J (2011) Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine* 29: 8575-8579.
- Merino-Charrez JO, Gómez-Romero N, Barrera-Molina I, Lagunes-Quintanilla RE (2019) Análisis in silico del gen subolesina como posible vacuna contra garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 6: 129-136.
- Mossman TR, Coffman H (1989) TH1 and TH2 cells: differential patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review Immunology* 7: 145-173.
- Mulenga A, Sugino M, Nakajima M, Sugimoto C, Onuma M (2001) Tick-Encoded Serine Proteinase Inhibitors (Serpins); Potencial target antigens for tick vaccine development. *The Journal of Veterinary Medical Science* 63: 1063-1069.
- Ostfeld RS, Price A, Hornbostel V, Benjamin M, Keesing F (2006) Controlling ticks and tick-borne zoonoses with biological and chemical agents. *BioScience* 56: 383-394.
- Parizi LF, Utiumi KU, Imamura S, Onuma M, Ohashi K, Masuda A, da Silva Vaz I Jr (2011) Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Experimental Parasitology* 127: 113-118.
- Rodríguez-Mallon A, Encinosa PE, Méndez-Pérez L, Bello Y, Rodríguez-Fernandez R, Garay H, Cabrales A, Méndez L, Borroto C, Estrada MP (2015) High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 6: 530-537.
- Rodríguez-Valle M, Xu T, Kurscheid S, Lew-Tabor AE (2015) *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterization assessment. *Parasites and Vectors* 7: 1-9.

- Rodríguez-Vivas R, Grisi L, Pérez de León A, Humberto Silva H, Torres-Acosta J, Fragoso, Romero SD, Rosario CR, Saldierna F, García DC (2017) Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8: 61-74.
- Rodríguez-Vivas R, Jonsson N, Bhushan C (2018) Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research* 117: 2-29.
- Seixas A, Oliveir P, Termignonia C, Logullo C, Itabajaraa M, da Silva Vaz I Jr (2012) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148: 149-156.
- Tirloni L, Seixas A, Mulenga A, da Silva Vaz I Jr, Termignoni C (2014) A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Experimental Parasitology* 137: 25-34.
- Tirloni L, Kwon KT, Loner CM, Ali A, Seixas A, Termignoni, C, Mulenga A, da Silva Vaz I Jr (2016) The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Molecular Biology* 71: 12-28.
- Ye S, Cech A, Belmares R, Bergstrom R, Tong T, Corey D, Kanost Michael R, Goldsmith EJ (2001) The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nature Structural Biology* 8: 979-983.
- Whelen AC, Wikel SK (1993) Acquired resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni* mediated by humoral factors. *The Journal of Parasitology* 79: 908-912.
- Willadsen P (1997). Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology* 71: 209-222.
- Willadsen P (1980) Immunity to ticks. *Advances in Parasitology* 18: 293-313.
- Willadsen P (2001) The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology* 10: 353-368.