

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

María Martina Esperanza Pérez Soria¹

Diego Josimar Hernández Silva¹

Juan Mosqueda¹

¹ Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales. Querétaro, Querétaro

Autor para correspondencia: Juan Mosqueda, E-mail: joel.mosqueda@uaq.mx

Resumen

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

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

Omega para determinar el grado de similitud. Finalmente, se realizó un análisis con el programa MEGAX64 para determinar la relación filogenética de cada aislado.

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

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

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

Palabras clave: garrapatas; *Rhipicephalus microplus*; antígenos; variabilidad antigénica; vacuna

Abstract

Introduction: *Rhipicephalus microplus* ticks are hematophagous ectoparasites that economically impact livestock industry worldwide. Acaricides have been an effective control strategy, but generate resistance to chemical compounds and environmental pollution. An alternative to counteract the chemical adverse effects is the vaccination usage, which is effective, environmentally friendly and unexpensive. However, still anti-tick vaccines present variable efficacy due to possible differences in aminoacid sequences within tick antigens from

geografically distinct isolates. The aim of this work was to analyze the variability of two vaccine antigens: BmVDAC (Voltage Dependent Anion Channel) and Subolesin from *R. microplus* isolates from different states of Mexico.

Methods: Two proteins were selected based on its efficacy as protective antigens: BmVDAC and Subolesin. *R. microplus* ticks was collected from different states of Mexico. Isolation of both DNA and RNA was performed to amplify *bmvdac* and *subolesin* respectively. Predicted amino acid sequences were obtained. A BLAST analysis was carried out to confirm the identity within sequences and determine similarity by an alignment using Clustal Omega. Finally, to determine the phylogenetic relationship of each isolate an analysis by MEGAX64 software was performed.

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

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

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

Keywords: ticks; *Rhipicephalus microplus*; antigen; antigenic variability; vaccine

Recibido en: 29/04/2019

Aceptado en: 05/07/2019

Introducción

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

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

La infestación por garrapata *R. microplus* afecta negativamente la productividad del ganado, transmite enfermedades tales como la babesiosis y la anaplasmosis (Jonsson, 2006). Las pérdidas económicas anuales en la industria ganadera son estimadas entre veintidós a treinta billones de dólares (Tabor *et al.*, 2016), las cuales son resultado de la actividad directa en la alimentación de las garrapatas en su hospedero y del costo que ocasiona controlar tanto a las garrapatas como a las enfermedades producidas por los patógenos que ellas transmiten (Manjunathachar *et al.*, 2014).

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

En los años noventa aparecieron comercialmente las vacunas contra la garrapata del ganado (Kaewmongkol *et al.*, 2015). Estas vacunas están basadas en la forma recombinante del antígeno oculto Bm86 del intestino de *R. microplus* (García-García *et al.*, 1998). Sin embargo, la eficacia de esta vacuna varía de acuerdo a los aislados existentes en las diferentes zonas geográficas (de la Fuente *et al.*, 2007), lo cual puede ser debido a variaciones alélicas en el gen *bm86* (De La Fuente y Kocan, 2006) (Sossai *et al.*, 2005). Una diferencia del 3.4% en la secuencia de Bm86 entre las diferentes cepas puede ser suficiente para causar una respuesta inmune ineficiente (García-García *et al.*, 1999). Se sugiere que existe una correlación inversa entre la eficacia de la vacuna y la variación del locus de *bm86* (Freeman *et al.*, 2010). Todo esto sugiere que un candidato vacunal debe ser conservado en su secuencia de aminoácidos entre distintas cepas o aislados para poder ser eficaz.

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

Método

Selección de proteínas de *R. microplus*

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

Colección de garrapatas *R. microplus* de México

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

Diseño de iniciadores

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

Amplificación de los genes en los diferentes aislados

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

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

La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 minutos seguida de 34 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos,

alineamiento de 56°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto y el paso final de extensión a 72°C por 5 minutos.

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

Obtención de secuencias consenso, alineamiento múltiple y análisis bioinformático

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

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

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

Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos fueron costruídos basados en el Método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) utilizando el programa MEGAX64 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software) (Tamura *et al.*, 2013). Para evaluar la confiabilidad de las topologías del árbol inferidas, los análisis se realizaron utilizando el método estadístico Bootstrap con 10000 réplicas (Felsenstein, 1985). Para *bmvdac* se utilizó como grupo externo a *Ixodes scapularis* con número de acceso de GenBank XP_002408065.1 y *Amblyomma variegatum* con número de acceso BK007268.1. Para *subolesina* se utilizó como grupo externo a *Ixodes ricinus* con número de acceso de GenBank ABA62325.1. y *Amblyomma cajennense* con número de acceso AGI44599.1.

Resultados

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

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

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

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

anteriormente (Almazán *et al.*, 2010). De ese fragmento fueron amplificados 438 pares de bases que corresponden al 99.3% de la secuencia utilizada como referencia.

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

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

QUERETARO	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD
NAYARIT	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD
JALISCO	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD
GUERRERO	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD
TABASCO	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD
TAMAULIPAS	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD
CHIAPAS	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD
SINALOA	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD
GU994210.1	YKVPEYGLTLKEKWNTDNTLSTEICSEEKLARGLKVAFHANFAPQTGKKSALKAAAYKFD

QUERETARO	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
NAYARIT	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
JALISCO	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
GUERRERO	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
TABASCO	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
TAMAULIPAS	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
CHIAPAS	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
SINALOA	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH
GU994210.1	NVHLNGDVDLGGPPLVHGA AVLHYQGWLAGGQVSFDTTKNRLSKTNFAVGFQAGDFVLH

QUERETARO	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG
NAYARIT	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG
JALISCO	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG
GUERRERO	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG
TABASCO	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG
TAMAULIPAS	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG
CHIAPAS	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG
SINALOA	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG
GU994210.1	TNVNDGQEFAGSVFQRVNPQLQTVQLAWTAGTNATRFGLGCYDLDMETSVRAKVNNSG

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

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

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

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

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

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

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

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

```

SINALOA      MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA
CHIAPAS      MACALTKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA
NAYARIT      MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA
ABA62328.1   MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA
QUERÉTARO    MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA
TAMAULIPAS   MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA
VERACRUZ     MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA
YACATÁN      MACATLKRTHDWDPLHSPSGRSPKRRRCMPLSPPPTRAHQIDPSPFGDVPPKLTSEEIAA
*****:*****

SINALOA      NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESK
CHIAPAS      NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESK
NAYARIT      NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESK
ABA62328.1   NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESK
QUERÉTARO    NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESK
TAMAULIPAS   NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESK
VERACRUZ     NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESK
YACATÁN      NIREEMRRLQRRKQLCFQGADPESQHTSGLSSPVHRDQPLFTFRQVGLICERMMKERESK
*****

SINALOA      IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKF----
CHIAPAS      IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
NAYARIT      IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
ABA62328.1   IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
QUERÉTARO    IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
TAMAULIPAS   IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
VERACRUZ     IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKFTYDQ
YACATÁN      IREEYDHVLSTKLAEQYDTFVKF----
*****

```

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

Además, se observó un porcentaje promedio de identidad del 99.87% y similitud del 100% entre las secuencias de aminoácidos. De las ocho secuencias, siete de ellas presentaron porcentaje de identidad del 99.91%, mientras que para la secuencia de Nayarit el porcentaje fue de 99.39% (Tabla 4 y 5). La variabilidad promedio observada entre las secuencias de aminoácidos fue del 0.13%.

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

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

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

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

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

potencial para ser considerados como candidatos vacunales para el control de la garrapata *R. microplus* en México.

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

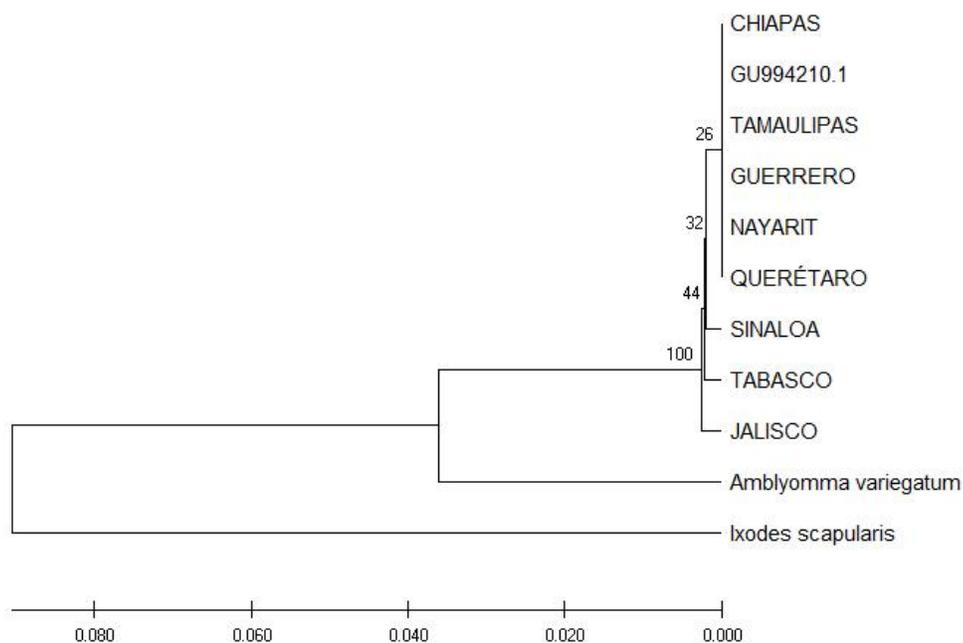


Fig. 3. Relación filogenética de los aislados de *R. microplus* para el gen *bmvdac*. El árbol filogenético fue construido utilizando el método UPGMA. Al lado izquierdo del nodo se encuentra el porcentaje de soporte del método Bootstrap utilizando 10000 réplicas.

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

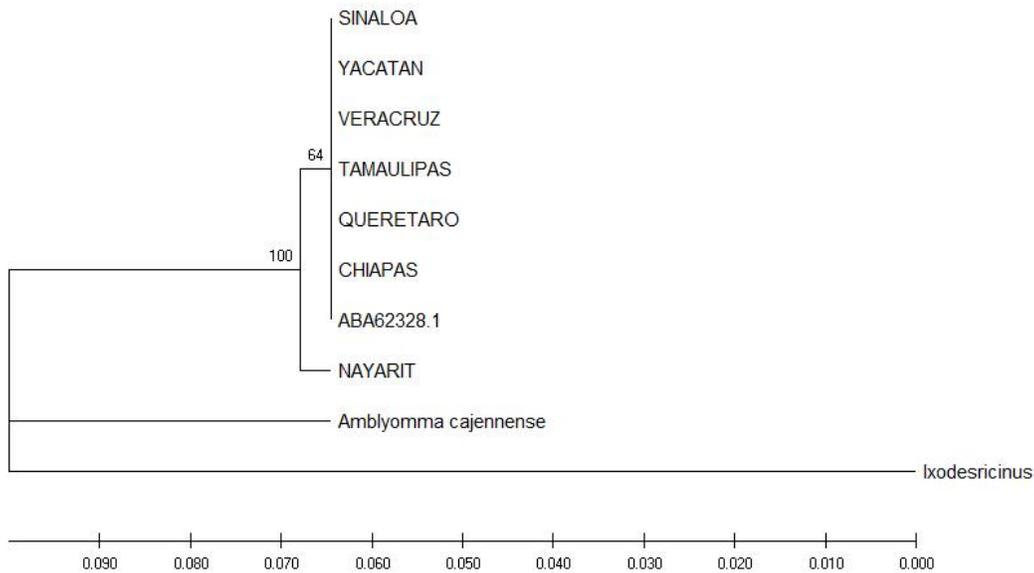


Fig. 1. Relación filogenética de los aislados de *R. microplus* para el gen *subolesina*. El árbol filogenético fue construido utilizando el método UPGMA. Al lado izquierdo del nodo se encuentra el porcentaje de soporte del método Bootstrap utilizando 10000 réplicas.

Discusión y Conclusiones

Este reporte representa la primera investigación de la caracterización de la variabilidad alélica para para los genes *bmvdc* y *subolesina*, dos antígenos vacunales contra *R. microplus* entre

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

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

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

Considerando la baja variabilidad alélica presentada entre las secuencias de los aislados de *R. microplus* de los diferentes estados de México, se concluye que tanto BmVDAC como Subolesina son antígenos que presentan secuencias altamente conservadas en aislados de México,

por lo que pueden ser considerados como potenciales candidatos vacunales de acuerdo a lo reportado por Freeman *et al.*, 2010, donde sugiere que existe una correlación inversa entre la eficacia de la vacuna y la variación del locus; por lo tanto, esta información es relevante para la selección de antígenos empleados en las vacunas contra garrapatas *R. microplus*. Se sugiere la realización de evaluaciones *in vivo* para determinar su efectividad como inmunógenos.

Agradecimientos

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

Referencias

- Abbas, Rao Z., Muhammad Arfan Zaman, Douglas D. Colwell, John Gilleard, y Zafar Iqbal. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology* 203 (1–2): 6-20.
- Almazán, Consuelo, Rodolfo Lagunes, Margarita Villar, Mario Canales, Rodrigo Rosario-Cruz, Frans Jongejan, y José de la Fuente. (2010). Identification and Characterization of Rhipicephalus (Boophilus) Microplus Candidate Protective Antigens for the Control of Cattle Tick Infestations. *Parasitology Research* 106 (2): 471-79.
- Antunes, Sandra, Octavio Merino, Juan Mosqueda, Juan A. Moreno-Cid, Lesley Bell-Sakyi, Renos Fragkoudis, Sabine Weisheit, *et al.* (2014). Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasites & Vectors* 7: 42.
- De La Fuente, J., y K. M. Kocan. (2006). Strategies for Development of Vaccines for Control of Ixodid Tick Species. *Parasite Immunology* 28 (7): 275-83.
- Felsenstein, Joseph. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* 125 (1): 1-15.
- Freeman, Jeanne M., Ronald B. Davey, Lowell S. Kappmeyer, Diane M. Kammlah, y Pia U. Olafson. (2010). Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasites & Vectors* 3: 101.
- Fuente, José de la, Consuelo Almazán, Mario Canales, José Manuel Pérez de la Lastra, Katherine M. Kocan, y Peter Willadsen. (2007). A Ten-Year Review of Commercial Vaccine

Performance for Control of Tick Infestations on Cattle. *Animal Health Research Reviews* 8 (1): 23-28.

Fuente, José de la, y Katherine M. Kocan. (2003). Advances in the Identification and Characterization of Protective Antigens for Recombinant Vaccines against Tick Infestations. *Expert Review of Vaccines* 2 (4): 583-93.

Fuente, José de la, Christine Maritz-Olivier, Victoria Naranjo, Patricia Ayoubi, Ard M. Nijhof, Consuelo Almazán, Mario Canales, *et al.* (2008). Evidence of the Role of Tick Subolesin in Gene Expression. *BMC Genomics* 9: 372.

García-García, J. C., I. L. Gonzalez, D. M. González, M. Valdés, L. Méndez, J. Lamberti, B. D'Agostino, *et al.* (1999). Sequence Variations in the *Boophilus Microplus* Bm86 Locus and Implications for Immunoprotection in Cattle Vaccinated with This Antigen. *Experimental & Applied Acarology* 23 (11): 883-95.

García-García, J. C., A. Soto, F. Nigro, M. Mazza, M. Joglar, M. Hechevarría, J. Lamberti, y J. de la Fuente. (1998). Adjuvant and Immunostimulating Properties of the Recombinant Bm86 Protein Expressed in *Pichia Pastoris*. *Vaccine* 16 (9-10): 1053-55.

Graf, J. F., R. Gogolewski, N. Leach-Bing, G. A. Sabatini, M. B. Molento, E. L. Bordin, y G. J. Arantes. (2004). Tick Control: An Industry Point of View. *Parasitology* 129 Suppl: S427-442.

Jonsson, N. N. (2006). The Productivity Effects of Cattle Tick (*Boophilus Microplus*) Infestation on Cattle, with Particular Reference to *Bos Indicus* Cattle and Their Crosses. *Veterinary Parasitology* 137 (1-2): 1-10.

Kaewmongkol, S., G. Kaewmongkol, N. Inthong, N. Lakkitjaroen, T. Sirinarumitr, C. M. Berry, N. N. Jonsson, R. W. Stich, y S. Jittapalapong. (2015). Variation among Bm86 Sequences in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *Microplus* Ticks Collected from Cattle across Thailand. *Experimental & Applied Acarology* 66 (2): 247-56.

Manjunathachar, Haranahalli Vasanthachar, Buddhi Chandrasekaran Saravanan, Manickam Kesavan, Kumaragurubaran Karthik, Prakashkumar Rathod, Marappan Gopi, Paramasivam Tamilmahan, y Bharemaru Lingaraju Balaraju. (2014). Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4 (Supplement 2): S770-79.

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