



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

“DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO VACUNAL CONTRA GARRAPATAS PARA REDUCIR EL USO DE PESTICIDAS EN BOVINOS Y CONTRIBUIR AL SOSTENIMIENTO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN NUTRICIÓN**

**PRESENTA:
JESÚS ALEJANDRO LEYVA PÉREZ**

DIRECTOR:
Dr. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla
ASESORA INTERNA:
Dra. América Ivette Barrera Molina

SINODALES:
M. en C. Gabriela Añorve Valdez
Dra. Margarita de Lorena Ramos García
M. en C. Homero Hernández Salgado
Dr. Marcos Amed Salazar Blas
Dr. Raúl Dávila Delgado

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

“DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO VACUNAL CONTRA
GARRAPATAS PARA REDUCIR EL USO DE PESTICIDAS EN BOVINOS Y
CONTRIBUIR AL SOSTENIMIENTO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA”

TESIS

PRESENTA:
JESÚS ALEJANDRO LEYVA PÉREZ

Para obtener el Grado de:
LICENCIADO EN NUTRICIÓN

DIRECTOR:
Dr. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla
ASESORA INTERNA:
Dra. América Ivette Barrera Molina

SINODALES:
M. en C. Gabriela Añorve Valdez
Dra. Margarita de Lorena Ramos García
M. en C. Homero Hernández Salgado
Dr. Marcos Amed Salazar Blas
Dr. Raúl Dávila Delgado

CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE, 2022

DEDICATORIA

Dedico mi tesis de licenciatura a todas las personas que creen en mí...

En especial, a mi madre, ella ha sido fundamental en mi formación, siempre con su apoyo incondicional, brindándome consejos, paciencia y amor. Con mucho cariño para ti:

Eusebia Pérez Elías

A mi familia, que son parte esencial de mi vida, los quiero:

Nayelly, Estela, Marcelo, mi padawan Valeria y Tormenta.

A mi amigo de la carrera, que ha dejado el plano terrenal, siempre lleno de carisma y simpatía, hasta donde te encuentres:

Raúl Flores López †

Por último, y no menos importante, para todas las personas que han perdido la vida a causa de COVID-19, un duro golpe para la humanidad.

AGRADECIMIENTOS

Aprovechando este espacio, quiero agradecer en primer lugar al **Dr. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla**, por su dirección, la paciencia depositada en mí, su experiencia, el tiempo, compromiso y por todo el conocimiento compartido para la realización de este trabajo.

A la **Dra. América Ivette Barrera Molina** quien fungió como asesora interna en este proyecto.

A los miembros del jurado: **M. en C. Gabriela Añorve Valdez, Dra. Margarita de Lorena Ramos García, M. en C. Homero Hernández Salgado, Dr. Marcos Amed Salazar Blas y Dr. Raúl Dávila Delgado**. Por sus observaciones, sugerencias y contribuciones para el fortalecimiento de este documento de tesis.

Este trabajo de investigación fue financiado a través del proyecto titulado: “Diseño y producción de un antígeno vacunal contra garrapatas para reducir el uso de pesticidas en bovinos y contribuir al sostenimiento de la seguridad alimentaria”, con N° SIGI: 10533234452.

Agradezco también las facilidades prestadas por el Laboratorio de Artropodología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

RESUMEN

Con el fin de satisfacer los requerimientos nutricionales de la población humana, la industria ganadera ha intensificado su sistema de producción, implementando el uso de plaguicidas que prevengan o eviten infestaciones por garrapatas como *R. microplus*, sin embargo, esto conlleva riesgos asociados, al identificar residuos de estos productos químicos en alimentos derivados del ganado, los cuales se relacionan con daños en la salud, como el cáncer. El objetivo de este trabajo fue diseñar y producir un antígeno vacunal contra estos ectoparásitos. Se realizó un análisis *in silico* de la proteína RmS-17, con el fin de predecir la región más inmunogénica de la secuencia reportada en el GenBank (KC990116.1). Se identificaron dos epítomos de células B, una vez identificada la región de interés, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR de un fragmento de 435 pb. El producto de la amplificación fue clonado y expresado en el vector pET100/D-TOPO[®], y analizado mediante gel de acrilamida y Western blot, detectando un polipéptido de 23 kDa. Finalmente, se purificó mediante cromatografía de afinidad por medio de columnas Ni-NTA spin (Qiagen[®]) y se realizó la formulación, haciendo una emulsión con adyuvante comercial Montanide ISA 50 V2 (Seppic[®], París, France) para fines experimentales.

Palabras clave: plaguicidas, *R. microplus*, alimentos, análisis computacional.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Seguridad alimentaria	3
2.2 Inocuidad alimentaria.....	4
2.3 Dieta correcta	5
2.4 Importancia nutricional de la carne	6
2.5 Ganadería bovina en México.....	7
2.6 Generalidades de las garrapatas	7
2.7 <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
2.8 Importancia económica.....	11
2.9 Métodos de control.....	11
2.10 Resistencia de <i>R. microplus</i>	12
2.11 Control inmunológico	13
2.12 Bm86	14
2.13 Serpinas	15
2.14 Desarrollo de vacunas	16
2.15 Vacunología inversa	17
3 JUSTIFICACIÓN	18
4 HIPÓTESIS	19
5 OBJETIVOS	19

5.1 General.....	19
5.2 Específicos.....	19
6 METODOLOGÍA.....	20
6.1 Lugar de investigación.....	20
6.2 Cepa de referencia.....	20
6.3 Análisis <i>in silico</i> de la proteína RmS-17.....	20
6.4 Diseño de oligonucleótidos.....	22
6.5 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA.....	22
6.6 Amplificación mediante técnica de PCR.....	23
6.7 Clonación de RmS-17 en el vector pET100/D-TOPO®.....	24
6.8 Extracción de DNA plasmídico y secuenciación.....	26
6.9 Expresión del polipéptido recombinante RmS-17.....	26
6.10 Análisis de proteína SDS-PAGE.....	27
6.11 Western blot.....	28
6.12 Determinación de proteínas por método de Bradford.....	28
6.13 Purificación y formulación del antígeno vacunal.....	28
7 RESULTADOS.....	30
7.1 Selección de la región de interés de la proteína RmS-17 de la garrapata <i>R. microplus</i>	30
7.2 Análisis <i>in silico</i> del polipéptido proveniente de RmS-17.....	30
7.2.1 Predicción de péptido señal.....	30
7.2.2 Región transmembranal.....	31
7.2.3 Hidrofobicidad.....	32
7.2.4 Sitios de N-glicosilación.....	33

7.2.5 Epítomos lineales.....	34
7.2.6 Predicción de estructura secundaria y terciaria.....	34
7.2.7 Representacion gráfica del polipéptido RmS-17	36
7.3 Oligonucleótidos.....	37
7.4 Amplificación por PCR del gen de RmS-17.....	37
7.5 Clonas positivas.....	38
7.6 Análisis de proteínas.....	39
7.7 Western blot.	40
7.8 Purificación y formulación del antígeno vacunal	41
8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
9 CONCLUSIONES	47
10 PERSPECTIVAS	47
11 REFERENCIAS	48
12 ANEXOS	61

ABREVIATURAS

Anti-6His	Anticuerpo-cola de 6 Histidinas
µg/ml	Microgramos por litro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
°C	Grados Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
A	Adenina
RNA	Ácido ribonucleico
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	Gramo
G	Guanina
IBT	Instituto de Biotecnología
Kb	Kilo bases
Kg	Kilogramo
Km	Kilometro
kDa	Kilo Daltones
L	Litro
LB	Luria Bertani
LAC	D-Lactosa
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilotriacético
nm	Nanómetro
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
MPM	Marcador de peso molecular
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
RT-PCR	Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
s	Segundo
T	Timina
ton	Tonelada
u	Unidades
v	Volts
UV	Ultravioleta

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Programas utilizados para el análisis <i>in silico</i> .	21
2.	Condiciones de la PCR para realizar la amplificación del fragmento de interés del gen RmS-17.	24
3.	Condiciones de amplificación para el fragmento de interés del gen RmS-17.	24
4.	Reactivos para llevar a cabo la clonación del inserto en el vector.	25
5.	Epítomos predichos dentro de la secuencia del polipéptido RmS-17.	34
6.	Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen que codifica al polipéptido RmS-17 de <i>R. microplus</i> .	37

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ciclo biológico de <i>R. microplus</i> .	10
2.	Mapa del vector de expresión pET100/D-TOPO®.	25
3.	Representación gráfica del sitio de corte del péptido señal predicho del polipéptido RmS-17.	31
4.	Predicción de la región transmembranal del polipéptido derivado de la proteína RmS-17.	32
5.	Predicción de regiones hidrofóbicas del polipéptido RmS-17.	33
6.	Predicción de los sitios N-glicosilación del polipéptido RmS-17	33
7.	Predicción de la estructura secundaria del polipéptido RmS-17.	35
8.	Predicción de la estructura terciaria del polipéptido RmS-17.	35
9	Representación gráfica del polipéptido RmS-17.	36
10.	Amplificación del fragmento de interés de RmS-17 de la garrapata <i>R. microplus</i> .	38
11.	Clonas positivas.	39
12.	Expresión del polipéptido recombinante RmS-17.	40
13.	El anticuerpo anti-His detecta el polipéptido recombinante RmS-17 mediante inmunoelectrotransferencia.	41
14.	Antígeno vacunal a partir del polipéptido RmS-17.	42

1. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) «cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos, a fin de llevar una vida sana» (1).

La inocuidad de los alimentos es un punto clave para que exista seguridad alimentaria, es una parte fundamental del componente de utilización de los alimentos (2), y sin inocuidad no hay dieta correcta, ya que es un componente de esta. Una dieta correcta incluye alimentos de origen animal, los cuales aportan aminoácidos esenciales y micronutrientes (3).

La industria ganadera representa mundialmente el 40% del producto interno bruto agrícola y los productos de la ganadería proveen un tercio de la proteína que ingieren los humanos (4). En 2020, México tuvo una producción de 2,079,362 ton de ganado bovino y 12,553,800 L de leche bovina (5).

En la actualidad el ganado bovino es la especie más afectada por ectoparásitos como las garrapatas, lo cual se refleja en pérdidas económicas para el productor, como resultado de los efectos directos en la producción, problemas para comercializar animales infestados y por la transmisión de enfermedades (6,7).

Existe una gran distribución mundial de especies de garrapatas, de las cuales, hay una cantidad que afecta al ganado bovino en el continente americano, entre las más importantes está *R. microplus* (7).

Se ha establecido esencialmente el uso de compuestos químicos para el control de garrapatas, sin embargo, la ineficacia del control químico se relaciona con una mala aplicación, uso de procedimientos inadecuados, condiciones estacionales desfavorables o por el surgimiento de algún mecanismo de resistencia en poblaciones de *R. microplus*. Se requiere métodos alternativos de control, que actúen de acuerdo con las características de la cepa con resistencia (8), que sea inocuo para los animales, que no contamine carne ni leche y, por lo tanto, no genere un impacto ecológico negativo. El desarrollo de vacunas promete ser un método de control ideal para disminuir las poblaciones de garrapatas en zonas de alta incidencia (9).

2. ANTECEDENTES

2.1 Seguridad alimentaria

El derecho a la alimentación es un Derecho Humano, promulga el acceso continuo a los recursos que permiten producir, obtener o adquirir la cantidad adecuada de alimentos no solo para prever el hambre, sino incluso para garantizar salud y bienestar (10); un aspecto fundamental del derecho a la alimentación es la inocuidad de los alimentos, el cual involucra implementar medidas necesarias para impedir la contaminación de los productos alimenticios (11).

Brindar seguridad alimentaria a la población humana exige acciones contundentes para lograr cambiar el sistema, desde de la producción hasta la ingesta, proporcionando particular interés en la sostenibilidad, por lo cual, es preciso promover patrones de alimentación saludables, que tengan demostrado un bajo impacto ambiental y aumento en el índice de sostenibilidad (12).

Distintos organismos nacionales e internacionales en las últimas décadas han acusado y hecho notar la violación a los Derechos Humanos, y los delitos ambientales relacionados con la utilización excesiva de productos agroquímicos. En México se tiene conocimiento que existen alrededor de 183 plaguicidas altamente peligrosos que cuentan con autorización para su uso, aun cuando están prohibidos en otros países. Recientes estudios ponen en evidencia la presencia en suelo y agua de compuestos químicos, en particular, organoclorados y organofosforados (13). En el Estado de Veracruz, se encontraron altos niveles de plaguicidas

organoclorados en carne de bovino, siendo un potencial riesgo carcinogénico por su ingesta (14).

En contraste, el uso de biológicos como las vacunas veterinarias resultan ser un factor importante para garantizar la seguridad alimentaria, siendo una alternativa para prevenir enfermedades infecciosas que afectan a los animales y por consiguiente la producción de alimentos inocuos libres de pesticidas. Con el uso de vacunas se procura la salud pública, según la Organización Mundial de la Salud, de las enfermedades de origen animal que surgen, el 75 % tiene la capacidad de transmitirse al ser humano (15).

2.2 Inocuidad alimentaria

La FAO establece cuatro dimensiones básicas de la seguridad alimentaria: la disponibilidad física, el acceso económico y físico a los alimentos, la utilización de los alimentos y por último la estabilidad en el tiempo de las otras tres dimensiones (16). Dentro de la tercera dimensión, no basta con la disponibilidad y accesibilidad de los alimentos a las familias para garantizar una dieta correcta, la calidad e inocuidad de los alimentos son elementos que determinan el correcto aprovechamiento por el organismo (17).

A nivel mundial, la producción de alimentos ha ido cambiando debido a las exigencias del comercio, el cual genera demandas por parte de los consumidores que buscan productos inocuos, así mismo, organismos internacionales, la sociedad

y los gobiernos han mostrado su preocupación por la sostenibilidad económica, ambiental y social de los sistemas de producción (18).

El conjunto de acciones y medidas por el cual pasan los alimentos durante la producción, el almacenamiento, la distribución y la preparación, definen a la inocuidad, con el propósito de garantizar que su ingesta no sea una causa de riesgo a la salud. En años recientes se ha logrado avanzar en la sensibilización sobre la relevancia de la inocuidad abarcando por completo la cadena alimentaria, debido a que puede haber problemas originados en la producción primaria, y son transmitidas a otras fases como el procesamiento, el empaque, el transporte, la comercialización, incluso la preparación del producto y su consumo (19). Hay daños para la salud humana derivados de la ingesta de alimentos contaminados, como sufrir alguna lesión al momento de consumirlo, infecciones, entre otros, pueden ser causados por agentes químicos como plaguicidas, elementos físicos y biológicos por microorganismos (20).

2.3 Dieta correcta

La Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012 «Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria: Criterios para brindar orientación», establece que una dieta correcta es aquella que se caracteriza por cumplir los siguientes aspectos: completa, que integre todos los nutrimentos; equilibrada, que los distintos nutrimentos tengan una proporción adecuada entre ellos; inocua, que el consumo regular no involucre riesgos a la salud; suficiente, que satisfaga las necesidades de cada individuo, con el fin de tener una buena nutrición

y peso saludable; variada, que incorpore distintos alimentos de cada grupo de una comida a otra; adecuada, conforme a los gustos, aspectos culturales y economía, sin renunciar a las otras características. Existe una manera de agrupar los alimentos para fines de orientación alimentaria, identificados en tres grupos: 1. Verduras y frutas, 2. Cereales, 3. Leguminosas y alimentos de origen animal (3).

2.4 Importancia nutricional de la carne

La importancia del consumo de carne ha sido relacionada con la evolución del hombre (21). El valor de los alimentos de origen animal se encuentra en la característica de ser clasificado como una importante fuente de proteína, grasa, vitaminas, minerales y de aminoácidos esenciales que solo se obtienen a través de la dieta (21,22), con la peculiaridad de que estos elementos se logran encontrar de manera aislada en otros alimentos, la carne los aporta de manera simultánea (23).

El principal constituyente funcional y estructural de las células son las proteínas, que cumplen diversas funciones en el organismo, desde su labor catalítica, motilidad corporal, transporte, almacenamiento, regulación hormonal, hasta su función inmunológica (24).

En el año 2020, de los distintos tipos de carne que se producen en México, se encuentra en primer lugar la carne de ave, en seguida la de bovino y en tercer lugar la de cerdo (5).

2.5 Ganadería bovina en México

En México la ganadería es un sector muy importante, se le destinan alrededor de 109.8 millones de hectáreas, la producción pecuaria en México durante el 2019 respecto al ganado bovino fue de 12,275,865.174 L de leche, lo que representa \$79,597,268.691 millones de pesos, siendo los estados de Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua y Guanajuato los de mayor producción a nivel nacional; respecto al ganado en pie hubo una producción total equivalente a 3,699,672.769 ton, el valor de lo producido es \$131,968,192.701 millones de pesos, donde los estados con mayor producción fueron: Veracruz, Jalisco, San Luis Potosí, Chiapas y Sinaloa.

Por otra parte, la producción de carne en canal fue 2,027,634.252 ton, lo cual resulta en \$139,612,126.089 millones de pesos; los estados que encabezan la mayor producción son Veracruz, Jalisco, San Luis Potosí, Sinaloa y Chiapas, finalmente, la exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América representa una actividad importante para el país, ya que genera divisas por el orden de los 700 millones de dólares, equivalente a 1,293,335 cabezas de ganado (5).

2.6 Generalidades de las garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, que afectan anfibios, reptiles, aves, mamíferos, incluso animales domésticos y silvestres, durante su ciclo biológico pasa a través de cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto (25), a pesar

de que son cosmopolitas, se concentran particularmente en territorios tropicales y subtropicales del planeta (26).

Corresponden al orden *Ixodida*, el cual está compuesto por tres familias: *Ixodidae* conocidas también como garrapatas duras, ya que poseen un escudo quitinizado que abarca de forma parcial el dorso de las hembras y totalmente en machos, en la posición anterior se encuentra el gnatosoma y tienen dimorfismo sexual; *Argasidae*: llamadas garrapatas blandas, carecen de escudo dorsal, el gnatosoma se ubica ventralmente en ninfas y adultos, no es evidente el dimorfismo sexual (27); *Nuttalliellidae*: posee características morfológicas intermedias con las otras dos familias (28).

Existen diversas enfermedades que las garrapatas transmiten a humanos, entre las que están: parálisis por garrapata, fiebre por garrapatas de colorado, encefalitis transmitida por garrapatas, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, enfermedad de Lyme, entre otras. El periodo de incubación es menor a 10 días y la sintomatología en general se caracteriza por fiebre súbita, escalofríos, sudoración, cefalea, mialgias, artralgias, anorexia, náuseas y vómito, frecuentemente la fiebre es bifásica (29).

2.7 *Rhipicephalus microplus*

La garrapata *Boophilus microplus* descrita así en primera instancia por Canestrini 1888, después recategorizada como *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* pertenece a la familia *Ixodidae*, (phylum: *Arthropoda*, subphylum: *Chelicerata*, clase:

Arachnida, subclase: *Acari*, orden: *Ixodida*) (30), es conocida también como la «garrapata tropical» o la «garrapata común del ganado», actúa como vector de la anaplasmosis y babesiosis bovina, ocasionada por hemoparásitos *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (31).

R. microplus solo necesita de un hospedador para desarrollar su ciclo biológico (27), consta de dos fases, una de vida libre (también llamada no parasítica) y otra de forma parasitaria, el ciclo de vida libre inicia cuando la hembra repleta se desprende del hospedador y desciende al suelo, pasa por seis diferentes etapas: preoviposición, oviposición, postoviposición, incubación, eclosión y larva de vida libre; el ciclo de vida parasitario comienza justo después de que la larva ha elegido a un bovino como hospedador. Se mantienen cerca del sitio en que eclosionaron, después suben a la vegetación, esperando un hospedador susceptible, son atraídas por el dióxido de carbono, ya en el bovino, se adhieren preferentemente en sitios protegidos de la radiación solar, como: axila, parte interna de brazo y pierna, vientre, ubre, escroto e ingle, de igual manera se pueden localizar en cuello, hombro, papada, etc., la fase parasítica se puede dividir en tres estadios esencialmente: larva, ninfa y adulto (32) (Figura 1).

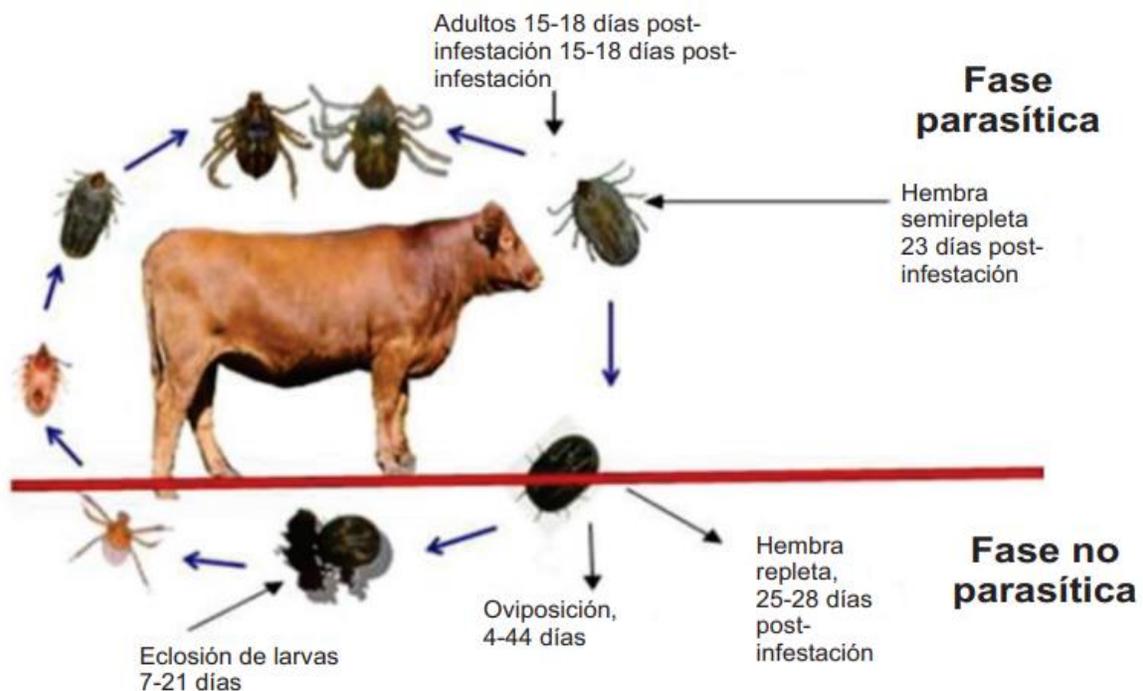


Figura 1. Ciclo biológico de *R. microplus*, la duración de la fase parasítica comprende un periodo de tiempo alrededor de 21-23 días y la fase de vida libre tiene una duración entre 90 y 120 días aproximadamente (Cantú-Covarrubias y García-Vázquez (33)).

En el territorio mexicano, el área libre del ectoparásito abarca 599,367.84 km², en otros términos, el 30.6 % del territorio nacional. Los Estados que los representan son: Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (con excepción de los municipios de Guadalupe y Calvo, y Morelos) y el Norte de Baja California Sur. En fase de erradicación están los municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; así como los municipios de la zona Desierto del Estado de Coahuila: Cuatrociénegas, Ocampo y Sierra Mojada, con un área de 67,472.76 km², correspondiente al 3.44% del territorio nacional. El resto del país comparte regiones en control y zonas libres naturales de garrapata *R.*

microplus, la cual comprende 1,292,407.02 km², que representa el 65.96% del territorio nacional (34).

2.8 Importancia económica

En la economía de México, la agricultura representa un sector de gran importancia, la cual se posiciona en séptimo lugar a nivel global, en términos de la cantidad de producción de ganado para fines comerciales (35).

Se estima que las pérdidas en la producción de leche ocasionadas por las garrapatas son de 90.24 L de leche por vaca en periodo de lactancia, lo que representa una pérdida económica en ganado lechero de México de \$68,878,694 millones de dólares. En ganado de carne, se estiman pérdidas por \$504,729,382 millones de dólares, por lo tanto, las pérdidas económicas totales debido a la garrapata *R. microplus* oscilan entre \$573,608,076 millones de dólares relacionada con la producción de leche y carne en México hasta el 2013 (36).

2.9 Métodos de control

Actualmente existen distintos métodos de control para lograr una disminución en las infestaciones por *R. microplus*, los cuales se basan en el uso de métodos químicos y no químicos.

El control químico tiene la acción de interrumpir el ciclo biológico de la garrapata a través del empleo de ixodicidas, a intervalos establecidos por la zona ecológica, especie a combatir o eficacia residual. En México hay más de 50 productos para el control de las poblaciones de garrapatas, divididos en seis grupos diferentes de

acuerdo con su mecanismo de acción (organofosforados, piretroides sintéticos, amitraz, fenilpirazolonas, reguladores del crecimiento y lactonas macrocíclicas) y su vía de administración puede ser por aspersión, inmersión, epicutánea y parenteral (37).

El uso indiscriminado de ixodicidas presenta algunas desventajas, entre las que destacan la contaminación de productos y subproductos de origen animal (bovino) y consecuencias al medio ambiente (38). Además, de la generación de poblaciones de garrapatas resistentes (39).

2.10 Resistencia de *R. microplus*

La resistencia a los insecticidas se define como el desarrollo de una habilidad en una cepa de insectos para tolerar dosis de tóxicos que resultarían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie (40).

El mecanismo de resistencia de las garrapatas se divide en: la insensibilidad del sitio de acción y metabólicas (41). El uso indiscriminado de un ixodicida produce una fuerte presión de selección que termina con los individuos que son más susceptibles y el ixodicida se convierte en el determinante más importante de selección (42).

Actualmente, en México existen poblaciones de garrapatas multirresistentes en zonas endémicas y zonas de alta densidad ganadera, haciendo prácticamente ineficaz el uso de ixodicidas. Por lo cual, se requiere la búsqueda de nuevas alternativas de control como es el uso de vacunas.

2.11 Control inmunológico

Las desventajas que ha mostrado el control químico a lo largo de las últimas décadas han hecho que se enfoque la atención en la investigación de nuevos métodos para el control de este ectoparásito. La vacunación contra las garrapatas como método inmunológico, logra inducir una respuesta en los animales, que favorece a mantener en control a estos parásitos. El objetivo de este método de control es obtener una mayor duración en la protección y esté exento de problemas de carácter ambiental en comparación con el uso de ixodicidas (43).

En el desarrollo de vacunas contra garrapatas se han investigado dos blancos antigénicos, el primero pertenece a los antígenos expuestos, los cuales comúnmente son péptidos o proteínas que se sintetizan en las glándulas salivales; son secretados en la saliva durante la adhesión y alimentación de la garrapata en el hospedador, produciendo una activación del sistema inmunológico con el fin de contrarrestar la infestación (44).

El segundo tipo de antígeno son los ocultos, estos usualmente se mantienen alejados de los mecanismos inmunológicos del hospedador (45), no tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune durante la adhesión y alimentación del ectoparásito, y son inmunogénicos cuando se utilizan como proteínas recombinantes y se inoculan al animal. El uso de vacunas con antígenos ocultos origina inmunoglobulinas específicas las cuales son ingeridas con la sangre, conforme se alimenta la garrapata. Al dirigirlos hacia algunos antígenos derivados del intestino, los anticuerpos interactúan con el antígeno oculto en la superficie de

este, produciendo el complejo de ataque a la membrana, ocasionando rompimiento de la pared intestinal, fuga de sangre hacia la cavidad corporal y la muerte (46).

2.12 Bm86

A finales de la década de 1980, en Australia se desarrolló el primer antígeno vacunal frente a la garrapata *R. microplus*, aislado de células epiteliales del intestino, clonado con tecnología recombinante y expresado en *E. coli*, (47), años después, en Cuba, utilizando el sistema de *Pichia pastori* esta proteína fue expresada, logrando obtener niveles altos de expresión y pureza, con resultados prometedores (48).

En la década de 1990 se comercializan dos vacunas contra *R. microplus*: TickGARD Plus® en Australia y Gavac® en Cuba, ambas basadas en un antígeno recombinante llamado Bm86. El antígeno Bm86 es una glicoproteína aislada de *R. microplus* que predomina en las células del intestino de la garrapata, el gen se expresa en los huevos a pocos días después de la oviposición, en larvas sin alimentarse y alimentadas, ninfas, machos y hembras adultas (49). Esta proteína es capaz de disminuir el peso, reducir la capacidad reproductiva y la oviposición de *R. microplus* (50). Los anticuerpos anti-Bm86 se agrupan en la superficie de las células epiteliales del intestino, interrumpen la endocitosis, provocando lisis celular y disminuyendo la capacidad reproductiva de las hembras repletas (51).

Andreotti en 2006, realizó un estudio controlado en Brasil, que consistió en inmunizar bovinos con las vacunas TickGARD Plus® y Gavac®, puso a prueba a los

animales utilizando la cepa brasileña Campo Grande de *R. microplus* y resultó una eficacia de 46.4 % y 49.2 %, respectivamente (52).

Sin embargo, una de las desventajas de estas vacunas es que una variación mayor al 2.8 % en la secuencia del locus de Bm86, ha demostrado ser la principal razón para que en ciertas poblaciones de garrapatas *R. microplus* la vacuna sea ineficaz. (53).

2.13 Serpinas

Las serpinas son una superfamilia de proteínas que contienen de 350-500 aminoácidos, tienen un peso molecular entre 40-60 kDa, cuentan con estructuras similares que fueron reconocidas en un principio por su inhibición de proteasa serina (54) y son altamente conservadas en *R. microplus* (55).

En garrapatas, las serpinas se encuentran implicadas en la regulación de endopeptidasas endógenas, coagulación de hemolinfa y activación de fenoloxidasa. La transcripción del gen de serpinas es superior en células de las glándulas salivales, lo cual le permite a la garrapata modular uno o varios mecanismos de defensa del hospedador (56). Alrededor de 22 serpinas son expresadas en *R. microplus* (57), entre estas se encuentra la serpina 17 (RmS-17), la cual se identificó en diferentes órganos, como: ovarios, intestino medio, glándulas salivales y la carcasa, presenta funciones importantes en la inhibición de la coagulación sanguínea durante la alimentación. En un estudio en el cual se realizó la incubación de quimiotripsina como proteasa diana, la serpina RmS-17 y suero policlonal anti-

RmS-17 (obtenido a través de la aplicación de una proteína recombinante de RmS-17 en conejos), resultó en el bloqueo de la función inhibitoria de la serpina, lo cual sugiere el potencial de esta proteína como candidato vacunal en contra de estos ectoparásitos (58).

2.14 Desarrollo de vacunas

Las vacunas desarrolladas para combatir ectoparásitos que afectan al ganado bovino en las unidades orientadas a la producción de carne y leche, se percibe como un método de control ideal, capaz de ser una alternativa viable para mejorar la salud animal, mitigar la resistencia a ixodíidas reduciendo su uso y contribuyendo a disminuir la contaminación ambiental y a la inocuidad de los alimentos (59).

El comienzo de la era genómica ha revolucionado la investigación en el desarrollo de vacunas contra garrapatas, con una gran diversidad de estudios enfocados a la identificación de nuevos antígenos blanco. El análisis informático ha favorecido este trabajo, ya que las herramientas bioinformáticas y la disposición de las bases de datos públicas, ha concentrado la información en una red sistematizada, por lo que es posible invertir el proceso de identificación de las proteínas antigénicas a una estrategia directa de vacunología inversa. El desarrollo de vacunas a partir de péptidos recombinantes y sintéticos, derivados del análisis *in silico* de las secuencias de genes, proporcionará un nuevo criterio y un mejor mecanismo de análisis para la optimización de antígenos existentes y el hallazgo de nuevas moléculas blanco contra las garrapatas (60).

2.15 Vacunología inversa

La vacunología inversa es una estrategia para encontrar nuevos candidatos inmunogénicos para el desarrollo de vacunas, siendo el punto de inicio la información genómica del organismo (61).

Esta metodología para el desarrollo de vacunas aprovecha la información del genoma del patógeno. La información del genoma proporciona a la vez un catálogo de los antígenos proteicos que el patógeno puede expresar en cualquier momento y, mediante un análisis informático se predice aquellos que tienen más probabilidades de ser candidatos a vacuna (62).

Siguiendo esta metodología se podrían diseñar vacunas recombinantes que incluyan los mejores epítomos codificados por el organismo y excluyan aquellos con bajo carácter inmunogénico (63).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de vacunas como método de control de garrapatas vislumbra ser la mejor opción para reducir las infestaciones de *R. microplus* presentes en zonas de importancia ganadera del país, evitando la generación de cepas resistentes, daños al medio ambiente y contaminación de productos derivados como leche y carne para garantizar la inocuidad alimentaria.

En este sentido, las serpinas prometen ser antígenos de interés para ser utilizados como vacuna, en concreto, la serpina RmS-17 fue caracterizada en garrapatas *R. microplus*, posee características de interés como el grado de conservación en diversas especies, localización en órganos vitales y su función dentro de la fisiología y biología de las garrapatas. por lo cual se requiere la utilización de herramientas biotecnológicas para el desarrollo de una vacuna recombinante con fines experimentales.

4. HIPÓTESIS

La región seleccionada del gen de RmS-17 presenta propiedades antigénicas para ser considerada como candidato vacunal contra garrapatas *R. microplus*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Diseñar y producir un antígeno vacunal contra garrapatas *R. microplus* para reducir el uso de pesticidas en bovinos destinados al consumo humano y contribuir al sostenimiento de la seguridad alimentaria

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar y seleccionar un fragmento de la proteína RmS-17 con características inmunogénicas mediante programas bioinformáticos.
2. Amplificar, clonar y secuenciar el fragmento de interés del gen RmS-17.
3. Expresar, purificar y emulsificar el antígeno vacunal derivado de la proteína RmS-17.

6. METODOLOGÍA

6.1 Lugar de investigación

El presente estudio se realizó en la Unidad de Artropodología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Km. 11.5 de la carretera federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso. C.P. 62550, Jiutepec, Morelos.

6.2 Cepa de referencia

Se utilizó la cepa de garrapatas denominada «Media Joya», perteneciente al germoplasma del CENID-SAI, INIFAP, la cual se mantiene en condiciones controladas desde el 2001. Esta cepa fue aislada en el municipio de Tapalpa, Jalisco, México.

6.3 Análisis *in silico* de la proteína RmS-17

Se llevó a cabo la búsqueda de las secuencias reportadas para la proteína RmS-17 obtenida en la base de datos de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), y se realizó el análisis *in silico* de la proteína RmS-17 con distintos programas bioinformáticos (cuadro 1). El análisis de alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con el programa CLUSTAL W disponible en el sitio

<http://www.genome.jp/tools/clustalw/> para identificar el grado de similitud y localización de zonas conservadas.

Posteriormente, la secuencia seleccionada se analizó mediante el algoritmo disponible en el software CLC Main Workbench 5.7, con el fin de predecir las regiones con mayor capacidad antigénica (64), hidrofobicidad utilizando el programa ProtScale (65) y localización de epítomos B lineales y conformacionales (66).

Se realizó la búsqueda de la presencia de péptido señal con el programa SignalP, regiones transmembranales mediante el programa TMHMM. Los sitios de N-glicosilación se obtuvieron con el servidor NetNGlyc. En la predicción de epítomos se utilizaron distintos programas como: Bcell, Bepipred 2.0, EMBOSS ANTIGENIC y Antigenicity Plot. La predicción de la estructura secundaria se hizo mediante los programas PSIPRED, Bepipred 2.0, Phyre 2 y I-TASSER, y para la estructura terciaria se usaron los programas Phyre 2, Swiss model y I-TASSER.

Una vez localizada la secuencia de interés se diseñaron oligonucleótidos específicos (67) para su síntesis.

Cuadro 1. Programas utilizados para el análisis *in silico*

Programa	Predicción
SignalP	Péptido señal
TMHMM	Región transmembranal
ProtScale	Hidrofobicidad
NetNGlyc 1.0	Sitios de N-glicosilación
Bcell	Análisis de epítomos
Bepipred 2.0	

EMBOSS ANTIGENIC Antigenicity Plot	
PSIPRED Phyre 2	Estructura secundaria
Phyre 2 Swiss model I-TASSER	Estructura terciaria
Primer 3	Diseño de oligonucleótidos
Protter	Representación de la proteína
Simulación de amplificación y electroforesis	SnapGene®

6.4 Diseño de oligonucleótidos

Con base en la identificación de la región de interés, se realizó el diseño de oligonucleótidos para el fragmento del gen que codifica para la proteína RmS-17 mediante el programa Primer 3.

En el anexo 1 se muestran las consideraciones que se tuvieron que realizar para el diseño de los oligonucleótidos específicos.

6.5 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de 100 mg de larvas de 15 días de edad sin alimentar de la cepa “Media Joya”, las cuales fueron pulverizadas en un mortero previamente congelado a -80°C. El aislamiento de RNA se realizó utilizando *TriReagent* (Sigma, St. Louis, Mo, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el precipitado final se resuspendió en 50µL de agua libre de nucleasas

(Sigma, St. Louis, Mo, EE. UU.). La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 5 µg de RNA total de larvas de garrapatas utilizando el kit RACE cDNA (Invitrogen, Carlsbad CA), mediante la técnica denominada RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction; Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), que permite obtener cDNA y utilizarlo como plantilla en las reacciones de amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos específicos.

6.6 Amplificación mediante técnica PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos de microcentrífuga de pared delgada usando reacciones de 25µl. Las condiciones finales se estandarizaron experimentalmente utilizando los oligonucleótidos, dNTP, MgCl₂, buffer para PCR, agua miliQ, enzima PFU Ultra y cDNA de larvas de garrapatas *R. microplus* (Cepa susceptible Media Joya) (cuadro 2) como templado para realizar la amplificación del fragmento de interés del gen RmS-17. Se utilizó un termociclador Biometra (Gottingen, Germany), se realizará mediante el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 95 °C por dos minutos, seguido de 35 ciclos (30 segundos a 94 °C de desnaturalización, un minuto a 59 °C de hibridación y un minuto de extensión a 72 °C), y una extensión final a 72 °C por diez minutos (cuadro 3).

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (FMC BioProducts, Rockland, ME) para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados por comparación con un marcador de peso molecular de DNA (1 Kb DNA Ladder, Promega) y visualizados por exposición en un transiluminador UV.

Cuadro 2. Condiciones de la PCR para realizar la amplificación del fragmento de interés del gen RmS-17.

	Concentración
Agua desionizada	Al aforo
Amortiguador PCR	10 X
Oligonucleótidos	0.2 Mm
PFU	2.5 u/MI
cDNA	100 ng
MgCl ₂	50 mM
dNTP	10 mM

Cuadro 3. Condiciones de amplificación para el fragmento de interés del gen RmS-17.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
	95 °C	2 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 s	35
Hibridación	59 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	
	72 °C	10 min	1
Pausa	4 °C		

6.7 Clonación de RmS-17 en el vector pET100/D-TOPO®

La clonación de los productos de PCR se llevó a cabo mediante la utilización del vector comercial pET100/D-TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA) (figura 2) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una reacción de ligación utilizando el producto de PCR previamente amplificado con el plásmido pET100/D-TOPO® (cuadro 4); enseguida se hizo la transformación en células competentes TOP10 de *E. coli*. Se seleccionaron 5 colonias y se verificó que las clonas contuvieran los

insertos mediante ensayos de PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos correspondientes para amplificar el fragmento de interés del gen RmS-17 y analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y visualizados por exposición en un transiluminador UV.

Cuadro 4. Reactivos para llevar a cabo la clonación del inserto en el vector.

	μL
Producto de PCR	4
Solución salina	1
pET100/D-TOPO	1
Total	6

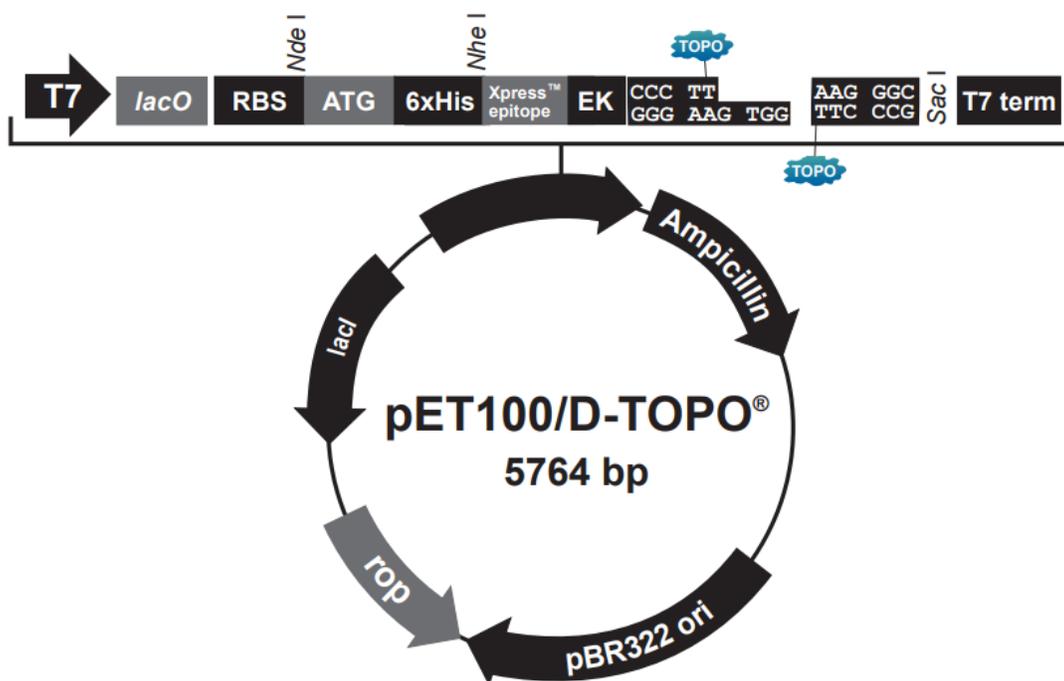


Figura 2. Mapa del vector de expresión pET100/D-TOPO®, en el cual se clonaron los productos amplificados por PCR del gen que codifica para el polipéptido RmS-17.

6.8 Extracción de DNA plasmídico y secuenciación

La extracción y purificación de DNA plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina utilizando el kit comercial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System®, siguiendo las indicaciones del fabricante con fines de secuenciación. Se mandaron a secuenciar 5 clonas positivas seleccionadas en los ensayos de PCR de colonia para confirmar que los resultados correspondieran con la secuencia de interés, para ello se realizó el alineamiento individual de cada secuencia proporcionada con la secuencia de interés mediante el programa CLUSTAL W disponible en el sitio <http://www.genome.jp/tools/clustalw/> y la búsqueda de las mismas para corroborar la existencia en el banco de genes mediante el software BLAST disponible en el sitio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> Las muestras fueron procesadas por la unidad de secuenciación del IBT/UNAM.

6.9 Expresión del polipéptido recombinante RmS-17

Se utilizaron 3 μ L de DNA (pET100-RmS17) para la transformación de células competentes BL21 Star (DE3). La mezcla se incubó por 30 minutos, posteriormente se procedió a realizar el choque térmico de la célula a 42°C por 30 segundos a baño maría, se recuperaron en 250 μ L de medio SOC, se incubaron en agitación a 200rpm y 37°C durante una hora y finalmente, se plaquearon en cajas Petri con medio Luria Bertani (LB) agar/ampicilina e incubadas toda la noche a 37°C. Se visualizaron las colonias bacterianas de las células BL21, se seleccionaron algunas clonas y se verificó que las clonas contuvieran los insertos mediante ensayos de

PCR de colonias utilizando los oligonucleótidos correspondientes para amplificar el fragmento de interés.

Para la expresión del polipéptido recombinante RmS-17, se utilizó IPTG como inductor, una vez que el represor ha sido inactivado, la RNA polimerasa de la célula puede transcribir la secuencia posterior al promotor y por lo tanto la secuencia de la clona pET100-RmS-17 para finalmente sintetizar el polipéptido recombinante. En el anexo 2 se detalla el procedimiento para la inducción del polipéptido recombinante.

6.10 Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE

Se reconstituyeron las pastillas celulares con el amortiguador de lisis SDS PAGE 1X (SDS 10%, 2 β Mercaptoetanol 10 mM, glicerol 100%, 0.2 M Tris-HCl 6.8, azul de bromofenol 0.05%) en una proporción de 1:1. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras se colocaron en baño María a 90°C durante 5 minutos. Posteriormente se analizaron en un gel SDS-PAGE al 15%, siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970). Es necesario agregar en el gel muestras control con la finalidad de demostrar confiabilidad en los resultados obtenidos y ayudando a identificar visualmente el polipéptido en estudio. Estos controles fueron cultivos de *E. coli* BL21 Star (DE3) en ausencia de inductor (IPTG). La tinción se llevó a cabo con azul de Coomassie durante 50 minutos, posteriormente fue desteñido con metanol durante 12 horas y se lavó con agua destilada. Se utilizó un marcador de peso molecular de proteínas (6–200 kDa) Broad Range, Bio-Rad.

6.11 Western blot

Después de correr el gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%, y se visualizaron las proteínas, se realizó una réplica de este gel que fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, utilizando un marcador de peso molecular preteñido Fermentas Page Regular™ durante 2 horas a 100 v. En el anexo 3 se describe el procedimiento del Western blot.

6.12 Determinación de proteínas por el método de Bradford

La determinación de concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford (68), previo a examinar las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm; se realizaron diluciones del reactivo de Bradford con BSA al 1% para obtener una curva de referencia, posteriormente se realizó la cuantificación de las muestras, agregando 2 μ L de muestra en 98 μ L de agua MiliQ y un ml de reactivo de Bradford en una cubeta del espectrofotómetro, se incubó 5 min en oscuridad y se realizó la lectura.

6.13 Purificación y formulación del antígeno vacunal

Los pellets celulares almacenados a -20°C, se recuperaron en 10 ml de PBS y se sonicaron (sonicador de pistón a 10 ciclos de 1 min) para liberar las proteínas. Una vez terminada la sonicación, se purificaron las proteínas mediante cromatografía de afinidad por medio de columnas Ni-NTA spin (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas columnas con afinidad a níquel contienen ligandos que retienen

las etiquetas de histidina con las que se marcó el fragmento de interés y por lo tanto el polipéptido recombinante.

Finalmente, el antígeno recombinante fue mezclado con adyuvante Montanide ISA 50 V2 (Seppic®, París, France) para fines experimentales.

7. RESULTADOS

7.1 Selección de la región de interés de la proteína RmS-17 de la garrapata *R. microplus*

Se realizó la búsqueda de la secuencia de la proteína RmS-17 en la base de datos de NCBI, con el número de acceso KC990116.1. Se eligió un fragmento a partir de la proteína RmS-17 (la cual está constituida por 391 aminoácidos), en la cual se encuentra el RCL, una secuencia de aminoácidos que se ha descrito como conservadas en la familia de las serpinas (57). La región de interés queda conformada por 145 aminoácidos, lo que equivale a 435 pb, definida entre los aminoácidos 215 y 359 de la proteína completa.

7.2 Análisis *in silico* del polipéptido proveniente de RmS-17

El análisis *in silico* del polipéptido RmS-17 se realizó con la secuencia de aminoácidos reportada en la base de datos del NCBI de la garrapata *R. microplus* de la cepa «Porto Alegre», Brasil, se utilizaron distintos programas bioinformáticos con el propósito de predecir propiedades fisicoquímicas, estructurales y regiones antigénicas que a continuación se describen.

7.2.1 Predicción del péptido señal

De acuerdo con el programa SignalP para la predicción del péptido señal, el cual emplea un *score* de 0.5, una región con un valor mayor a ese *score* indica la

presencia del péptido señal, en la figura 3 se puede observar la ausencia del péptido señal en la secuencia del polipéptido RmS-17.

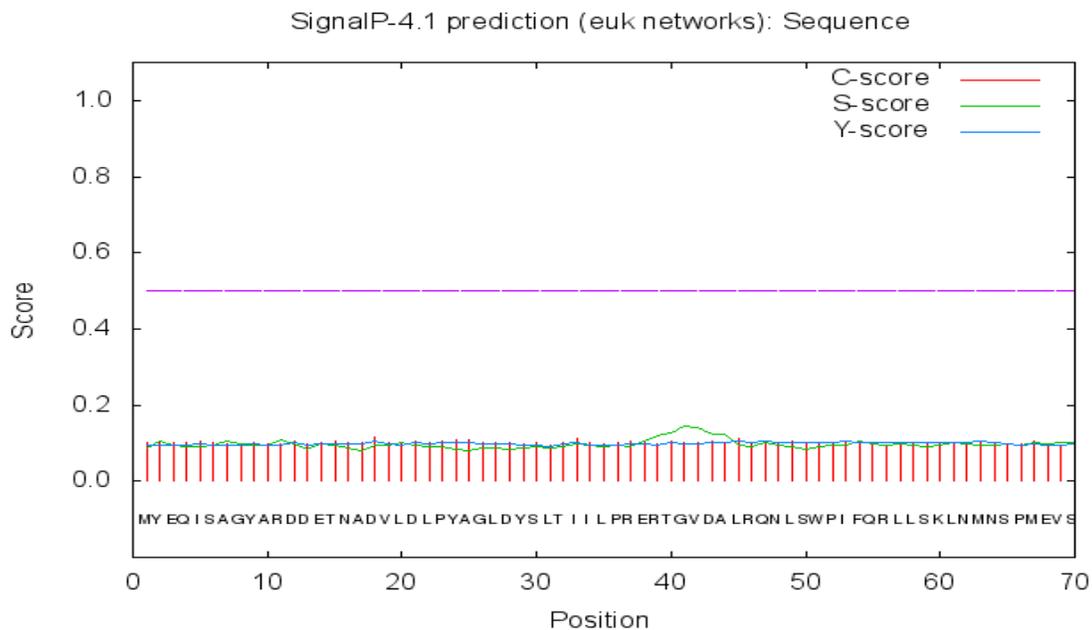


Figura 3. Representación gráfica del sitio de corte del péptido señal predicho del polipéptido RmS-17.

7.2.2 Región transmembranal

El resultado de la predicción de la región transmembranal se obtuvo utilizando el programa TMHMM basados en modelos ocultos de Markov, el análisis no muestra alguna región transmembranal en el polipéptido RmS-17 (figura 4), indicando que se trata de un polipéptido intracelular.

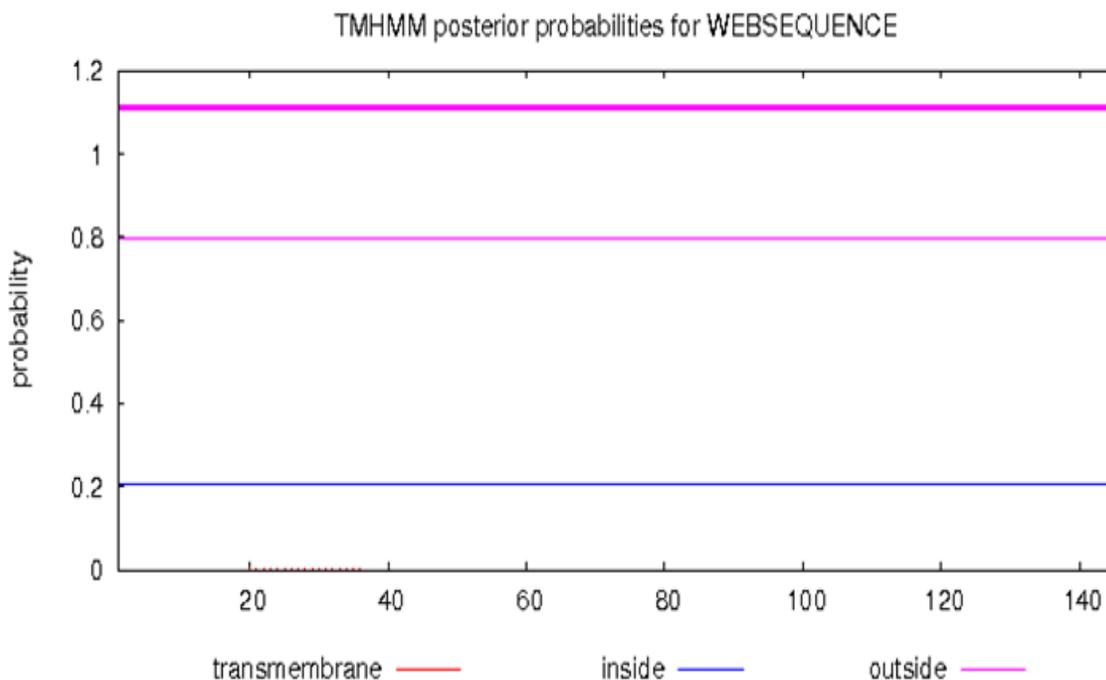


Figura 4. Predicción de la región transmembranal del polipéptido derivado de la proteína RmS-17.

7.2.3 Análisis de hidrofobicidad

A continuación, en la figura 5 se muestra el resultado del análisis de hidrofobicidad realizado con el programa ProtScale con el algoritmo de Kyte & Doolittle. El programa utiliza un punto de corte de 1.6, la región que se localice por encima de ese valor será considerada como hidrofóbica. El análisis reveló que el polipéptido RmS-17 posee una región hidrofóbica, los picos más altos se observan aproximadamente entre los aminoácidos 135-140.

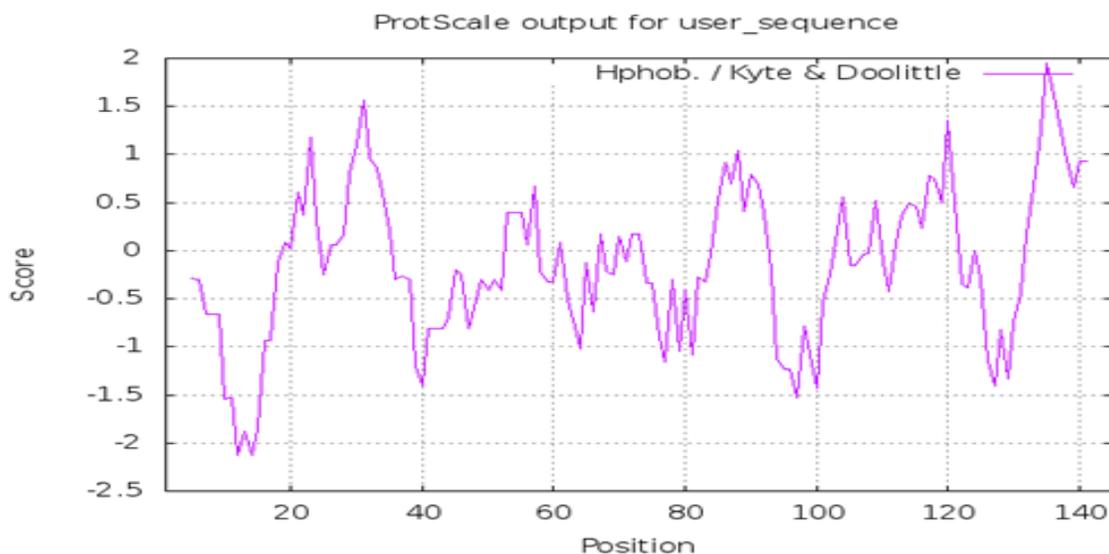


Figura 5. Predicción de regiones hidrofóbicas del polipéptido RmS-17 con el programa ProtScale.

7.2.4 Sitios de N-glicosilación

La predicción de los sitios de glicosilación llevado a cabo con el programa NetNGlyc, muestra una línea verde (sitio N-glicosilación) que es aquella región que se ubica por encima del sitio de corte (0.5), la predicción obtenida ubica un sitio con esta característica, esto en el aminoácido 48 (figura 6).

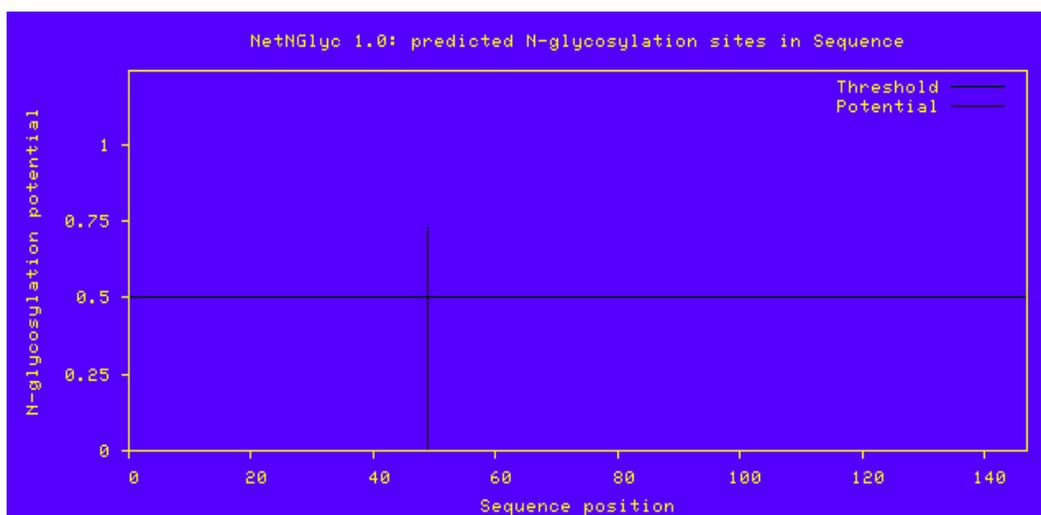


Figura 6. Predicción de los sitios N-glicosilación del polipéptido RmS-17.

7.2.5 Análisis de epítomos lineales

El análisis de epítomos lineales se realizó mediante los programas Bcell, Bepipred 2.0, EMBOSS ANTIGENIC y Antigenicity Plot. El criterio de selección para los epítomos se basó en la identificación en 3 de los 4 programas, de acuerdo con los resultados arrojados se predijeron dos péptidos como posibles epítomos en el polipéptido RmS-17 (cuadro 5), el primero está constituido por 11 aminoácidos (residuo 50-60) y el segundo por 14 aminoácidos (residuo 79-92).

Cuadro 5. Epítomos predichos dentro de la secuencia del polipéptido RmS-17.

n	Secuencia de aminoácidos	Longitud	Ubicación
1	SWPIFQRLLSK	11	50-60
2	SYKLNKAPLSALGAS	14	79-92

7.2.6 Predicción de estructura secundaria y terciaria

La predicción de la estructura secundaria y terciaria se obtuvo mediante los programas PSIPRED y SWISS-MODEL respectivamente, el resultado de la predicción de la estructura secundaria indica que el polipéptido RmS-17 está compuesto por 4 hélices alfa indicado con los cilindros de color rosa, 7 láminas beta señaladas con las flechas amarillas, así como secciones de giros aleatorios representados con las líneas de color negro (figura 7), en la predicción de la estructura terciaria las hélices alfa están representadas con el color azul, las láminas beta por el color verde y finalmente, los giros aleatorios con el color blanco (figura 8).

7.2.7 Representación gráfica del polipéptido RmS-17

De acuerdo con la descripción de las características predichas por los distintos programas, se realizó una representación gráfica del polipéptido RmS-17 (figura 9) utilizando el programa Protter, en el cual se pueden observar la secuencia de aminoácidos de color blanco, se aprecian los 2 epítomos representados con el color rojo, el sitio N-glicosilación señalado con el color azul, así como su ubicación intracelular y la ausencia de péptido señal.

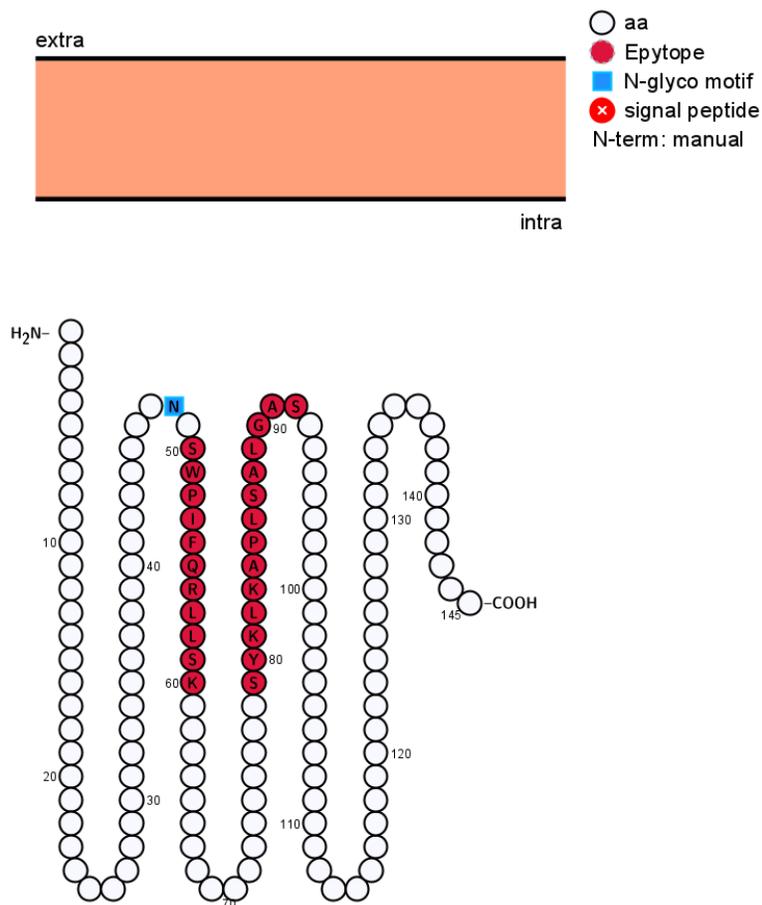


Figura 9. Representación gráfica del polipéptido RmS-17 mediante el programa Protter.

7.3 Oligonucleótidos

Se diseñaron un par de oligonucleótidos con el programa Primer 3, a partir de la secuencia completa del gen que codifica a la proteína RmS-17, para la amplificación del polipéptido de RmS-17, obteniendo como resultado un primer sentido con una longitud de 23 pb y un primer antisentido con 19 pb de longitud (cuadro 6).

Cuadro 6. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen que codifica al polipéptido RmS-17 de *R. microplus*.

Forward	CAC CAT GTA CGA ACA GAT CTC AG
Reverse	CTA CAC GAA GAG TGC AGC T

7.4 Amplificación por PCR del gen de RmS-17

Se realizó el ensayo de PCR empleando los oligonucleótidos que se determinaron a través del análisis *in silico* del gen de RmS-17, una vez realizada la amplificación por PCR, el producto fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 1 %. En la figura 10 se observa el producto de PCR con el tamaño esperado, se muestra la comparación de un gel de agarosa mostrando el amplicón de 435 pb con respecto a la simulación realizada en el programa SnapGene®.

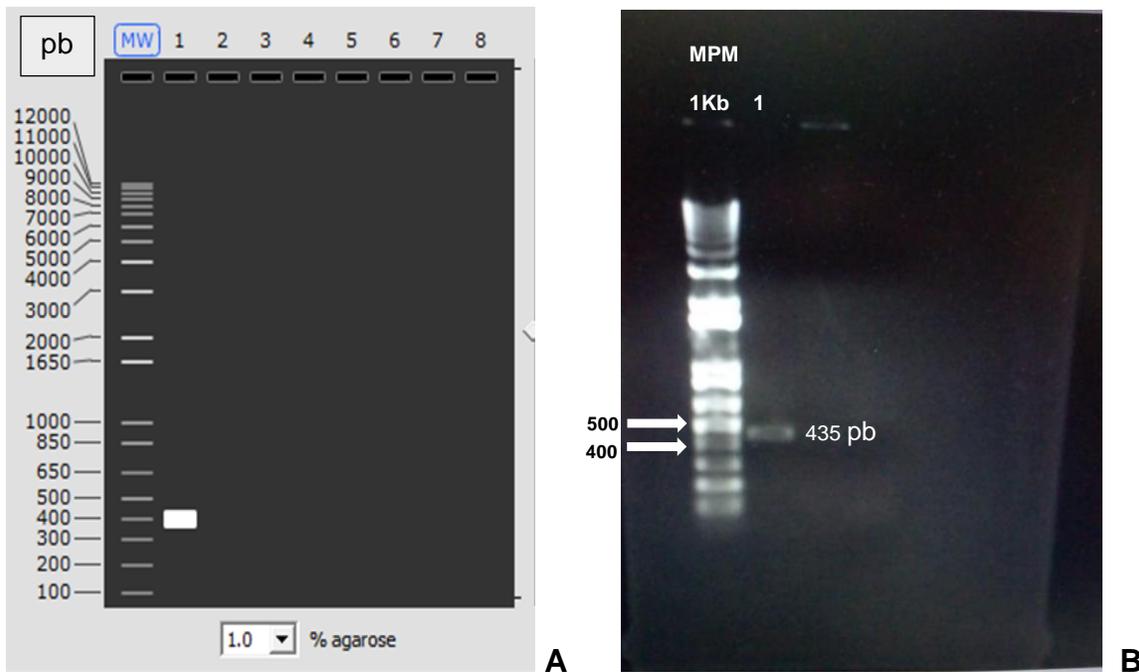


Figura 10. Amplificación del fragmento de interés de RmS-17 de la garrapata *R. microplus*. A) Simulación de la amplificación del gen de interés equivalente a 435 pb en el programa SnapGene®. B) Amplificación del fragmento de interés en la cepa «Media Joya», gel de agarosa al 1% con Buffer TBE 1X. Carril 1) Marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2) producto de PCR del fragmento del gen de RmS-17, con tamaño de 435 pb.

7.5 Obtención de clonas positivas

El producto de PCR fue clonado en el vector comercial pET100/D-TOPO®, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para verificar que la presencia del inserto en el vector, se seleccionaron algunas colonias recombinantes aleatoriamente para realizar un PCR de colonia y confirmar cuales eran las clonas positivas. Finalmente, las clonas positivas fueron visualizadas en ensayos de electroforesis en gel de agarosa al 1 % (figura 11). Los plásmidos purificados se

mandaron a secuenciar y los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa CLUSTAL W (datos no presentados).

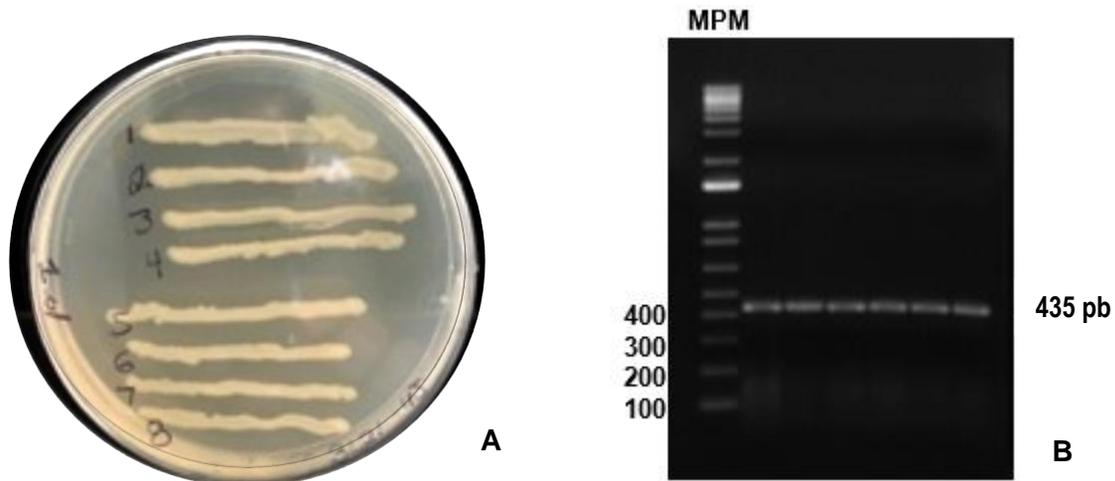


Figura 11. Clonas positivas en células BL21 corroborando el producto en el peso esperado (435 pb). A) Colonias recombinantes en agar LB + ampicilina. B) Clonas positivas visualizadas en gel de agarosa 1 %, MPM: marcador de peso molecular 1 Kb.

7.6 Análisis de proteínas mediante SDS-PAGE

Una vez obtenidas las clonas positivas se seleccionó una de ellas para los ensayos de inducción, se realizó la inducción de la síntesis del péptido recombinante con IPTG, y después los extractos de proteínas se analizaron en geles de acrilamida SDS-PAGE 15 %, en los cuales se visualizó el péptido inducido con un peso molecular aproximado de 23 kDa (figura 12).

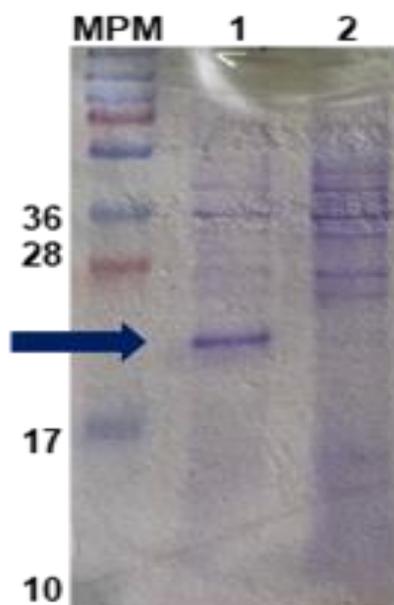


Figura 12. Expresión del polipéptido recombinante RmS-17. Gel SDS-PAGE 15%, carril 1 - lisado total de *E. coli* con el polipéptido recombinante inducido con IPTG; carril 2 - lisado total de *E. coli* con el polipéptido recombinante sin IPTG (control negativo).

7.7 Western blot

Una vez identificado el peso molecular del péptido, se realizó la inmunoelectrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para detectar el polipéptido recombinante RmS-17, utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la etiqueta de histidinas acoplado a fosfatasa alcalina y el uso del reactivo BCIP/NBT. El péptido identificado se muestra como una banda de color púrpura en la membrana de la nitrocelulosa correspondiente al peso molecular esperado de 23 kDa aproximadamente (figura 13).

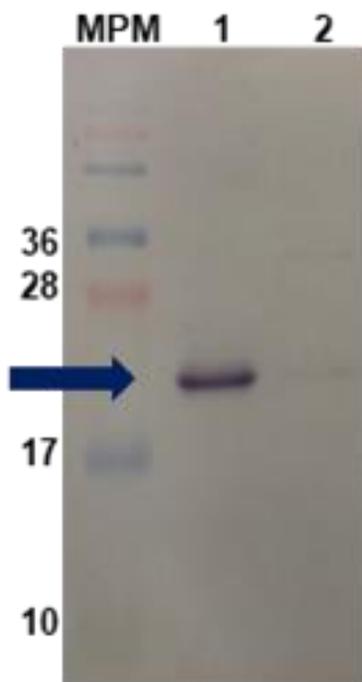


Figura 13. Western blot: carril 1 - polipéptido recombinante RmS-17; carril 2 - polipéptido recombinante sin inductor (control negativo). MPM - marcador de peso molecular. La flecha indica el peso molecular aproximado del polipéptido recombinante.

7.8 Purificación y formulación del antígeno vacunal

En seguida, que se confirmó la expresión del polipéptido recombinante RmS-17, se procedió a purificarlo mediante cromatografía de afinidad por medio de columnas Ni-NTA spin (Qiagen®), obteniendo una pureza estimada en 90 %.

Finalmente, se realizó la formulación del antígeno vacunal haciendo una emulsión 1:1 con adyuvante comercial Montanide ISA 50 V2 (Seppic®, París, France) para fines experimentales (figura 14).

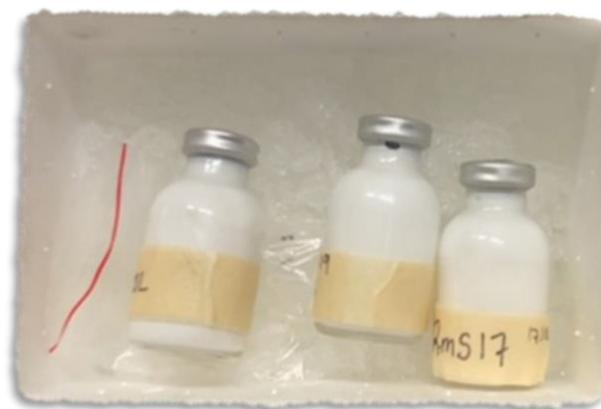


Figura 14. Antígeno vacunal a partir del polipéptido RmS-17.

8. DISCUSIÓN

Por años se ha llevado a cabo la búsqueda de nuevas alternativas para combatir a las garrapatas que afectan al ganado bovino, en la industria ganadera *R. microplus* representa al ectoparásito de mayor relevancia (69). Se ha estudiado un método químico natural contra garrapatas, basado en el uso de extractos de plantas, la eficacia de plantas como *Calea serrata* para el control de *R. microplus* y *R. sanguineus* muestra una reducción de la oviposición del 11 al 14 % y una mortalidad de 100 % en larvas (70), así mismo, se ha realizado una evaluación de la eficacia de distintos extractos metanólicos de plantas en larvas de *R. microplus*, obteniendo una eficacia entre 5 y 99 %, un 86 % en garrapatas adultas y un 91 % de reducción en la reproducción (71,72). El efecto acaricida de aceites de hojas como el orégano (*Lippia graveolens*), el romero (*Rosmarinus officinalis*) y bulbos de ajo (*Allium sativum*) ha sido estudiado y se ha encontrado una eficacia que va del 85 al 100 % frente a larvas de *R. microplus* (73). Hasta el momento, el resultado de los estudios realizados con extractos de plantas para combatir a *R. microplus* han sido favorables, no obstante, se necesita estudiar aspectos relacionados con los metabolitos secundarios y una evaluación de los metabolitos activos.

Por otro lado, el diseño de vacunas como método de control, se basa en antígenos específicos, debido a que originan protección inmunológica en los animales, causando afectaciones en funciones vitales de los artrópodos (74). Actualmente, las vacunas disponibles que se comercializan van dirigidas hacia los antígenos ocultos (75), algunas de las ventajas de usar vacunas como método de control son que

puede tener un efecto de mayor duración, no hay problemas de encontrar residuos en animales ni en sus derivados, la probabilidad de desarrollar resistencia frente a ellas es menor y su acción se ejerce sobre sitios específicos de las garrapatas (76).

Recientemente, se emplean distintas ramas de la bioinformática, entre ellas, la inmunoinformática, cuyo fundamento es la utilización de herramientas computacionales para el estudio de moléculas del sistema inmunológico, capaz de guiar los diseños experimentales para contestar las incógnitas en la inmunobiología y la vacunología (77). La predicción de epítomos lineales de células B podría lograr una disminución del trabajo experimental en la investigación de candidatos vacunales, como se ha realizado en otros modelos de investigación (78,79).

En la actualidad, se comercializan dos vacunas que se desarrollaron a partir del antígeno recombinante Bm86, pero su eficacia se ve limitada debido a los polimorfismos entre cepas de *R. microplus* (53). Martínez-Arzate y colaboradores (2019), realizaron un estudio donde se evaluó la secuencia de Bm86 en 10 distintos aislados de México, obteniendo un resultado de 3.1 - 7.4 % de polimorfismos entre las secuencias mexicanas y la cepa de garrapata *R. microplus* «Yeerongpilly» (80), se ha estimado que una variación mayor o igual a 2.8 % es suficiente para presentar una respuesta inmune ineficaz (53).

Por lo tanto, un ejemplo de la ineficacia de las vacunas contra garrapatas es la presencia de polimorfismos entre cepas de *R. microplus*; al respecto, Martínez-Maza y colaboradores (2020), realizaron el análisis molecular de un fragmento de la proteína RmS-17, en cepas y aislados de garrapatas de México, obteniendo un

resultado de 99.08 % de identidad para la cepa de referencia «Media Joya» con respecto a la cepa reportada en Brasil, así mismo, en el análisis de 3 cepas y 5 aislados de México, resultó un 100 % de identidad y similitud (81).

En el presente estudio se diseñó un polipéptido recombinante proveniente de la proteína RmS-17 (serpina 17) de la garrapata *R. microplus* de acuerdo con sus características de interés. Se realizó un análisis *in silico* del polipéptido RmS-17, se encontraron dos epítomos lineales de células B, lo cual sugiere que podría originar una respuesta inmune específica, así como se ha reportado en otros modelos de investigación como *Babesia* spp. y *Plasmodium falciparum*, donde han implementado este tipo de acciones, provocando una respuesta inmune innata y adaptativa efectora contra los parásitos (79,57). Adicionalmente, se ha reportado que, en proteínas de la membrana en el virus de la influenza, la presencia de un sitio de N-glicosilación podría aumentar la activación de células T (58), en el polipéptido RmS-17 se encontró un sitio con esta característica.

Un estudio hecho por Lagunes y colaboradores (2016), con el gen *subolesina*, en donde se analizó el gen *in silico* con el propósito de predecir la región más antigénica de su secuencia. Se seleccionó un polipéptido, fue sintetizado de manera recombinante y posteriormente emulsificado con adyuvante, para su ensayo de inmunización en bovinos frente a garrapatas *R. microplus*. El resultado demostró una reducción del número de garrapatas en un 79 % y una reducción del 30 % en la eclosión, el autor concluye que predecir la región más antigénica del gen posibilita

dirigir la respuesta inmune contra los epítomos descubiertos en la secuencia, aumentando de forma eficaz el control de infestaciones por *R. microplus* (82).

De acuerdo con los antecedentes reportados por Lagunes y colaboradores, el diseño del polipéptido recombinante RmS-17 vislumbra como posible candidato vacunal contra *R. microplus*, después de ser analizado *in silico* y haber encontrado péptidos predichos como epítomos dentro de la secuencia, así como el hallazgo de un sitio N-glicosilación y logrado la expresión del polipéptido recombinante utilizando la maquinaria biológica de *E. coli*, el peso molecular aproximado fue de 23 kDa, finalmente se realizó la emulsificación con adyuvante.

La importancia de trabajar con el polipéptido recombinante RmS-17 radica que en la garrapata *R. microplus*, se expresan 22 serpinas (57), entre estas, la serpina 17, la cual ha sido identificada en diferentes órganos y llevando a cabo funciones importantes en la biología de la garrapata (58); asociado a esto, presenta un alto grado de conservación entre las poblaciones de garrapatas *R. microplus* de México y Brasil y las secuencias del polipéptido RmS-17 recientemente reportadas son altamente conservadas en distintas regiones de México (81).

9. CONCLUSIONES

1. La utilización de herramientas bioinformáticas permitieron identificar propiedades antigénicas e inmunogénicas en el polipéptido RmS-17.
2. Se logró la expresión recombinante de un polipéptido de RmS-17, así como la formulación del antígeno vacunal, el cual podría ser útil para reducir las infestaciones por garrapatas *R. microplus*.

10. PERSPECTIVAS

Con la obtención del antígeno vacunal desarrollado, es necesario realizar pruebas *in vitro* e *in vivo* para evaluar la capacidad inmunogénica del polipéptido RmS-17 como método de control de la garrapata *R. microplus*.

11. REFERENCIAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Seguridad Alimentaria. Informe de políticas. Roma: FAO, 2006; 2
2. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. Washington, DC: Inocuidad de alimentos. [Citado enero 20, 2021]. Disponible en: <https://www.paho.org/es>
3. Diario Oficial de la Federación. NORMA Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. [Internet]. México: Secretaría de Gobernación, 2013 [Citado enero 20, 2021]. Disponible en: <http://www.dof.gob.mx>
4. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO [Internet]. Roma: 2007. Cambio climático y seguridad alimentaria: un documento marco. [Citado enero 20, 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org>
5. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). [Internet]. México: 2021. Anuario Estadístico de la Producción Ganadera. [Citado enero 20, 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap>
6. Rodríguez R, Rosado A, Basto G, García Z, Rosario R, Fragoso H. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. México. 2006. Publicación técnica N°4.

7. Hernández F. El manejo integrado en el control de garrapatas. Manual de ganadería doble propósito. Venezuela. 2005. pp.384 -391.
8. Bravo M, Coronado A, Henriquez H. Susceptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodicida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. Zootecnia Trop. 2008. pp. 41 -46.
9. León Clavijo MA, Hernández Rojas EC. Descripción de la proteína Bm86, polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. NOVA. 2012; 10(17).
10. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Directrices voluntarias en apoyo de la realización progresiva del derecho a una alimentación adecuada en el contexto de la seguridad alimentaria nacional. Roma: FAO.2005.
11. Comité de Derechos Económicos, Sociales y Culturales de la Organización de las Naciones Unidas. Observación General 12 (párr.10). El derecho a una alimentación adecuada (artículo 11). 1966.
12. Grosso G, Fresan U, Bes-Rastrollo M, Marventano S, Galvano F. Environmental Impact of Dietary Choices: Role of the Mediterranean and Other Dietary Patterns in an Italian Cohort. Int J Environ Res Public Health. 2020; 17(5).
13. Bejarano, F. (Coord..) et al. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A.C. (RAPAM),

CIAD, INIFAP, IPEN, PNUD, Red de Toxicología, RAP-AL, UAEM, UCCS.
2017

14. Pardío V, Martínez D, Flores A, Romero D, Suarez V, López K, et al. Human health risk of dietary intake of organochlorine pesticide residues in bovine meat and tissues from Veracruz, México. Food Chem. 2012. pp.1873-93.
15. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). [Internet]. México: 2020. Vacunas veterinarias, agentes activos en garantizar la seguridad alimentaria. [Citado julio 01 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura>
16. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. [Internet]. 2011. Una introducción a los conceptos básicos de la seguridad alimentaria. [Citado julio 02, 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org>
17. Bianchi E, Szpak C. Seguridad alimentaria y el derecho a la alimentación adecuada. 2016
18. Torrado A. Buenas prácticas agrícolas. Sistema de aseguramiento de la inocuidad de los alimentos. Colombia: ICA; 2005.
19. Minsalud. PYP publicación digital de educación para la salud. [Internet]. Colombia: Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Dirección de Promoción y Prevención. [Citado enero 21, 2021]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co>

20. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). [Internet]. México: 2016. Una definición clara de Inocuidad. [Citado enero 22, 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica>
21. Pereira P, Vicente F. Meat Nutritive Value and Human Health. En: Purslow, P. P. (Ed.). *New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics*. Elsevier. United Kingdom. 2017. pp. 465-477.
22. Scollan N, Hocquette J, Nuernberg K, Dannenberger D, Richardson I, Moloney A. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat science*. 2006. pp 17-33
23. Frank D, Oytam Y, Hughes J. Sensory Perceptions and New Consumer Attitudes to Meat. En: Purslow, P. P. (Ed.). *New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics*. Elsevier. Hampshire, United Kingdom. 2017. pp. 667-698.
24. Gil A (ed.): *Tratado de nutrición. Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Acción Médica. Madrid, 2005.
25. Parra M, Pelaez L, Segura F, Arcos J, Londoño J, Días E. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Publicación CORPOICA; 1999.
26. Cortés JA. Cambios en la distribución y abundancia de garrapatas y su relación con el calentamiento global. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2010. pp. 65-75.

27. Quiroz H. Ixodidos. En *Parasitología Veterinaria y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México DF: Editorial Limusa; 1990. pp. 767-802
28. Bedford G. *Nuttalliella namaqua*, a new genus and species of tick. *Parasitology*; 1931. pp. 230–232.
29. Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE (eds): *Tick-Borne Diseases of Humans*. Washington, ASM Press. 2005.
30. Barker S, Murrell A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*. 2004. pp. S15–S36.
31. Márquez D. Nuevas tendencias para el control de los parásitos de bovinos en Colombia. Una estrategia sostenible para el siglo XXI. CORPOICA, 2003.
32. Rodríguez Vivas RI, Ojeda Chi MM, Pérez Cogollo LC, Rosado Aguilar JA. Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. En: Quiroz Romero H, Figueroa Castillo JA, Ibarra Velarde F, López Arellano ME, editores. *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. México: AMPAVE; 2011. pp. 477-504
33. Cantú-Covarrubias A, García-Vázquez Z. Estrategias para el control integrado de garrapata (*Boophilus* spp.) en la producción de bovinos de carne en pastoreo en Tamaulipas. Folleto Técnico No. MX-0-310402-43-03-14-09-36. INIFAP-CIRNE- Campo experimental las Huastecas. Villa Cuauhtémoc, Tamaulipas. 2013.

34. Gob.mx [Internet]. México: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. [Citado julio 5, 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica>
35. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Ganadería bovina en América Latina: Escenarios 2008-2009 y tendencias del sector. Santiago de Chile. 2010.
36. Rodríguez Vivas RI, Grisi L, Pérez de León AA, Silva Villela H, Torres Acosta JF, Fragoso Sánchez H, et al. Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos de ganado bovino en México. Revisión. Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria. 2017. pp. 61-74.
37. Rodríguez Vivas RI, Arieta Román JR, Pérez Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA, Ramírez-Cruz GT, Basto-Estrella G. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. Archivos de Medicina Veterinaria. 2010. pp. 115-123.
38. George JE, Pound JM, Davey RB. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides, Parasitology. 2004. pp. S353–S366.
39. George JE. The Effects of Global Change on the Threat of Exotic Arthropods and Arthropod-borne Pathogens to Livestock in the United States. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008. pp. 249–254.

40. WHO (World Health Organization) Expert Committee on Insecticides. Seventh report, Geneva, World Health Organization. Technical Report Series No. 125. 1957.
41. Rodríguez Vivas RI, Hodgkinson JE, Trees AJ. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. Rev. mex. de cienc. pecuarias. 2012. pp. 9-24.
42. Alonso Díaz MA, Rodríguez Vivas R, Fragoso Sánchez F, Rosario Cruz R. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Archivos de Medicina Veterinaria. 2006. pp. 105-113.
43. Rodríguez Valle M. Respuesta inmunológica contra garrapatas. Biotecnología Aplicada. 2000. pp. 215-220
44. Brossard M, Wikel SK. Tick immunobiology. Parasitology. 2004. pp. S161–S176
45. Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with ‘concealed’ antigens for tick control. Parasitology Today. 1988. pp. 196–198
46. Rand KN, Moore T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Willadsen P, et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. pp. 9657–9661
47. Willadsen P, Mckenna RV, Riding GA. Isolation from the cattle ticks *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological

- response in the bovine host. *International Journal Parasitology*. 1988. pp. 183-189.
48. Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcón V. *et al*. High level expression of the B. microplus Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *Journal of Biotechnology*. 1994. pp. 135-146.
49. Nijhof AM, Balk JA, Postigo M, Jongejan F. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Molecular Biology*. 2009; 10: 112
50. Suárez-Pedroso M, Méndez-Mellor L, Valdéz M, de Moura-Souza R, Reis-Camargo AJ, Vargas NC. Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería cubana y en regiones de latino américa con la aplicación del inmunógeno Gavac® dentro de un programa de lucha integral. América Latina: CORPOICA-FAO. 2007.
51. Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology*. 1997. pp. 209-222
52. Andreotti R. Performance of two Bm86 antigen vaccine formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 2016. pp. 97-100.

53. García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*. 1999. pp. 2275-2287
54. Gettins P. Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chemical Reviews*. 2002. pp. 4751-4803
55. Ye S, Cech A, Belmares R, Bergstrom R, Tong Y, Corey D, et al. The structure of a Michaelis serpin–protease complex. *Nature Structural Biology*. 2001. pp. 979-983
56. Tirloni L, Seixas A, Mulega A, da Silva I, Termignoni C. A family proteasa inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Exp Parasitol*. 2014. pp. 25-34
57. Rodríguez-Valle, M, Xu T, Kurscheid S, Lew-Tabor AE. *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterization assessment. *Parasites and Vectors*. 2015. pp. 1-9
58. Tirloni L, Kwon KT, Loner CM, Ali A, Seixas A, Termignoni C, et al. The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Molecular Biology*. 2016. pp. 12-28

59. Prudencio CR, Marra AO, Cardoso R, Goulart LR. Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*. 2010. pp. 122-131
60. Domínguez García DI, Ortiz Estrada M, Torres Guzmán F, Rosario Cruz R. La genética reversa y el desarrollo de vacunas contra la garrapata del ganado vacuno *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Tlamati*. 2014. pp. 60-65
61. Aguirre AA, Lobo FP, Casquero-Cunha R, García MV, Andreotti R. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Veterinary Parasitology*. 2016. pp. 30-38.
62. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology*. 2000. pp. 445–450.
63. Criado MT, Sánchez S, Ferreirós CM. Vacunología clásica y nuevas tecnologías en el diseño de vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008. pp. 564-72
64. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett*. 1990. pp.172-174
65. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol*. 1982. pp. 105–132
66. Saha S, Raghava GPS. Prediction of Continuous B-cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. *Proteins*. 2006. pp. 40-48

67. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana press. 2000. pp. 365-386
68. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantities utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976. pp. 248-254
69. Sonenshine DE, Kocan KM, De la Fuente J. Tick control: further thoughts on a research agenda. Trends Parasitol. 2006. pp. 550-551
70. Sardá Ribeiro VL, Tiogo E, Bordignon SA, Goncalves K, Poser GV. Acaricidal properties of extraes from the aerial parts of *Hypericum polyanthemun* on the cattle tick *Boophilus microplus*. Veterinary Parasitology. 2007. pp. 199-203.
71. Rosado Aguilar JA, Aguilar Caballero A, Rodriguez Vivas RI, Borges Argaez R, Garcia Vazquez Z, Mendez Gonzalez M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). Veterinary Parasitology. 2010. pp. 299-303.
72. Rosado Aguilar JA, Aguilar Caballero AJ, Rodriguez Vivas RI, Borges Argaez R, García Vázquez Z, Méndez González M. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (acari: ixodidae) by larval immersion test. Tropical and Subtropical Agroecosystem. 2010. pp. 417-422.

73. Martinez Velazquez M, Rosario Cruz R, Castillo Herrera G, Flores Fernandez JM, Alvarez AH, Lugo Cervantes E. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 2011. pp. 822-827.
74. Willadsen P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*. 2001. pp. 353–368
75. Almazán C, Moreno-Cantú O, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Canales M, Villar M, et al. Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine*. 2012. pp. 265-272
76. de la Fuente J, Kocan KM. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Vaccine*. 2003. pp. 583-593.
77. Tomar N, De RK. Immunoinformatics: an integrated scenario. *Immunology*. 2010. pp. 153-168
78. Vaughan K, Greenbaurn J, Blythe M, Peters B, Sette A. Metaanalysis of all immune epitope data in the Flavivirus genus: inventory of current immune epitope data status in the context of virus immunity and immunopathology. *Viral Immunology*. 2010. pp. 259-284

79. Mahajan B, Berzofsky JA, Boykins RA, Majam V, Zheng H, Chattopadhyay R, et al. Multiple antigen peptide vaccines against *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and Immunity*. 2010. pp. 4613-4624
80. Martínez-Arzate SG, Sánchez-Bermúdez JC, Sotelo-Gómez S, Diaz-Albiter HM, Hegazy-Hassan W, Tenorio-Borroto E, et al. Genetic diversity of Bm86 sequences in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from Mexico: analysis of haplotype distribution patterns. *BMC genetics*. 2019; 20(1): 56
81. Martínez-Maza NT, Hernández-Ortiz R, Valdez-Espinoza UM, Castro-Saines E, Aguilar-Díaz H, Lagunes-Quintanilla R. 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*. 2020; 7(3): e2537
82. Lagunes R, Domínguez D, Quiroz H, Martínez M, Rosario R. Potential effects on *Rhipicephalus microplus* tick larvae fed on calves immunized with a Subolesin peptide predicted by epitope analysis. *Tropical Biomedicine*. 2016. pp. 726-738.

12. ANEXOS

Anexo 1. Consideraciones importantes para el diseño de oligonucleótidos específicos.

- 1) Que los oligonucleótidos sean complementarios a la secuencia de interés.
- 2) Evitar secuencias que pudieran formar estructuras secundarias por sí mismas, pues esto dificultaría la unión de los oligonucleótidos al DNA muestra y podría ocurrir una auto-complementariedad.
- 3) Diseñar oligonucleótidos con longitud de 20 a 24 bases para reducir al mínimo la posibilidad de hibridación en sitios secundarios en el vector o inserto.
- 4) Comprobar en las bases de datos que las secuencias de oligonucleótidos elegidas no se encontraran en algún otro lugar del genoma, lo que podría generar amplificaciones de regiones no deseadas.
- 5) Que los oligonucleótidos tengan un contenido de C/G entre 40 y 60%. Para oligonucleótidos con contenido menor al 50% de C/G, sería necesario incrementar la secuencia de estos para elevar la T_m sobre la temperatura de alineamiento.
- 6) Añadir al oligonucleótido sentido 4 bases (CACC) al principio, de esta manera el extremo saliente del vector (GTGG) invade el extremo 5' del producto de PCR, hibrida con las bases adicionales y estabiliza el producto de PCR en la dirección correcta.

Anexo 2. Procedimiento para la inducción del polipéptido recombinante con IPTG (1mM):

1. En un tubo Falcon de 50 ml, se dejó crecer la clona de pET100-RmS-17 en 5 ml de medio de cultivo líquido LB + ampicilina. Se incubó a 37°C a 200 rpm toda la noche.
2. Al día siguiente se verificó el crecimiento de las bacterias. El contenido del tubo fue transferido a un matraz con 50 ml de LB líquido/ampicilina en una relación 1:1000 y se incubó a 37°C, 200 rpm hasta que la densidad óptica fue de entre 0.5 y 0.7 A_{600} .
3. Una vez que el crecimiento del cultivo se encuentre entre estos rangos de densidad óptica, se agregó 100 μ L del inductor IPTG (1mM) al matraz que fungió como Inducido.
4. Se continuó la incubación con agitación durante cinco horas (37°C, 200 rpm) y transcurrido el tiempo se hizo una alícuota de un mililitro para realizar geles preliminares. El resto del cultivo fue centrifugado a 5000 rpm, por 10 minutos a 4°C.
5. El sobrenadante fue decantado y el pellet celular se mantuvo a -20°C. Finalmente, las muestras de proteína fueron analizadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%.

Anexo 3. Procedimiento del Western blot:

1. Una vez que se transfirieron las proteínas, la membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche al 5% y TBS-T (0.05%) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y después toda la noche a 4°C sin agitación.
2. A la mañana siguiente se realizó 5 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T (0.05%).
3. Posterior a los lavados se agregó el anticuerpo Anti-His (Invitrogen®) en una dilución 1:2000 en leche al 1%, TBS-T 0.1%. Se dejó incubar durante 3 horas en agitación a temperatura ambiente.
4. Después del tiempo de incubación se hicieron 5 lavados a la membrana de 5 minutos cada uno con TBS-T (0.05%).
5. Finalmente, después de los lavados se agregó 10mL de la solución de revelado, BCIP/NBT Alkaline Phosphatase™ y se dejó 15 minutos en agitación. Para detener la reacción se hicieron 2 lavados con agua destilada a intervalos de 10 minutos cada uno con agitación.

Cuernavaca, Morelos 28 de enero del 2022

VOTO APROBATORIO

MCS Jesica López Bucio Fabián
Directora de la Facultad de Nutrición- UAEM
Presente.

Como miembro del comité revisor, después de haber evaluado la tesis titulada “DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO VACUNAL CONTRA GARRAPATAS PARA REDUCIR EL USO DE PESTICIDAS EN BOVINOS Y CONTRIBUIR AL SOSTENIMIENTO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA” del alumno(a) JESÚS ALEJANDRO LEYVA PÉREZ, con número de matrícula 20161006200 considero que la tesis reúne los requisitos y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi VOTO APROBATORIO.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr. Marcos Amed Salazar Blas
masb@uaem.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARCOS AMED SALAZAR BLAS | Fecha:2022-02-01 10:10:42 | Firmante

iM1vRzuz70MaujCkLkVkiKEzHiFWB0e8ckH86gwANoclJP1Xm/seiC80/HQXoeasq3zJNK7Sq7aK4y3duB1pY+LOmg/0just5MjbMj1u21YYkPvtqAQJH86g/2DV/hRhqpT4uWinW1HvdATQTbyKkjpNbrtXgfw9TTb6Ocoed6DmoXoLx/SgKthjC3cSmmOp6ayjay/vCNdxt8mNw8BMvrucji6QYn6Q824A73x3CDIPwCADRyfcKCSzaNOM8Hxb5DSjBMFaZH5bxxGoW3U4pnlshLpnHMRLBSoo00uLo2rDPDbs/U3aBwopD+ZBPocQiGM9yDDfyycxeE397JPzQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[xvr4Q9SW8](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EzcRI2mUFXwiESjfUsHgSkoMEV58rHYf>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



Cuernavaca, Morelos a 28 de enero de 2022

MTRA. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABÍAN
DIRECTORA INTERINA DE LA
FACULTAD DE NUTRICIÓN
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que, en mi calidad de jurado para examen de grado del estudiante de la licenciatura en Nutrición **JESÚS ALEJANDRO LEYVA PÉREZ**), he leído y revisado la tesis titulada: “Diseño y producción de un antígeno vacunal contra garrapatas para reducir el uso de pesticidas en bovinos y contribuir al sostenimiento de la seguridad alimentaria”, y considero que ésta cubre con los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

M en C Gabriela Añorve Valdez
Profesora de Tiempo Completo B

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA AÑORVE VALDEZ | Fecha:2022-01-28 23:07:32 | Firmante

uaFNCJpjpHsmSpplqERwWI45e0gMS+4zujApr2Uwb9zB+EngoxPFC2Tiv8kV6ETwvdfTxSAY017EQo0V/7/Znz6bhAi+2ZKtqDnLcEGcdU8utxIHHwJvLw6LWEAAj8hJMBDmccZc/KJMEvE5mVnsUETZuq8EAwD0C6kzfbS0aGPCQSRqN0jTpngsJpnvOEezO/zYMQq9rC1x6Ke+MzWZ1Fb0SMMHagYB86r3YDKI4NbfZDdjaVSLrQuEw73EnhpkQPyehvkwT4JFKgaVzY/HDHcuLX+iNqSxTzTMhy/6ygmPmi48AQOGgAopkGrmR9c0bHivm1DAUcULnlsjT8Pw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



rBY7LVfd6

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/b1Mjqxre8anbE5iWoQlIijyOYuWbmpvYr>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN



Cuernavaca, Morelos 07 de febrero del 2022

Voto aprobatorio

MCS Jesica López Bucio Fabián
Directora de la Facultad de Nutrición
P R E S E N T E

Después de revisar la tesis del alumno **Jesús Alejandro Leyva Pérez**, con número de matrícula 20161006200. Cuyo título de investigación es “Diseño y Producción de un antígeno vacunal contra garrapatas para reducir el uso de pesticidas en bovinos y contribuir al sostenimiento de la seguridad alimentaria”. Considero que reúne todos los requisitos para ser presentada en el examen de grado, por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Saludos cordiales.

ATENTAMENTE:

Dra. Margarita de Lorena Ramos García



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARGARITA DE LORENA RAMOS GARCIA | Fecha:2022-02-10 09:52:50 | Firmante

CbLC/PEaUAbT41yaXnlyCM3r68lJ3o71vEbFknHAQHpbJ+cDQNsMsa7fopxIP5m9E8jt2kdkxbxO9RZd9A+ptlYEhEET4Jn3zPwUwpXCfPrqroELr1sF0H2HumyLYisIX3eRAR4G3/E5wyerZiiKyIPU4gtihB2eDlcUqZeyMnELKlziFC42WCpsni1mEueddKm89A1y6AuFP5ZXamlj8sScfi7LaSGMLR6rP3IR883e3ErEdz3E/hm/3V3bYXuECgLPB8zrYcGs1PPdgErkFR6Blzp7/Zx4q+pZFwccXJqhJ1QYrVWqeXvAjmghIN6X9BhMIGpyCoBC1/mmKd3afA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[PgAvpEqCr](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8Tim0EmflPWBfh7uEERSS3aKRCiIT244>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 02 febrero de 2022

Asunto: Voto aprobatorio.

MCS. JÉSICA LÓPEZ BUCIO FABIÁN
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado del (a) estudiante de Licenciatura en Nutrición Jesús Alejandro Leyva Pérez he leído y revisado la tesis titulada “Diseño y producción de un antígeno vacunal contra garrapatas para reducir el uso de pesticidas en bovinos y contribuir al sostenimiento de la seguridad alimentaria”, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

M en C. RAÚL DÁVILA DELGADO
Profesor
Facultad de Nutrición
Universidad Autónoma del Estado de Morelos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAUL DAVILA DELGADO | Fecha:2022-02-02 20:03:28 | Firmante

I9y+a4OOAoxiH2jVG/xAtfxv3Y+n3AX4OKXmM8qrYaHTw0zrsvFgtVAwME7dMqIjdAHMY0vlwtFojt5f1bcpnE3myWRGiEHX9QoFK2cMZ8/Z8aEcvuCYADZEdA1wU/cWb+rcozdw
DGiM06RyskbsycYum8sC/5PZAkrNR8eftpqNGUwIFYZcgapZ8IM2EJ11f49rtaCifxLZf/0KBEfp/c4YBiS9ILYGAWUkT1fy63vdEdRkpzD9WoGLq4QGWFYkvGUxI/EtAltUK/Urzqhw
ypwr0wqLz6YB5NVVutAtrmmVPKivIDaPa9LOMcN0UN9nEivOSiTJIBtkolZxPqbiqg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[GurbQ8p9e](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Z8vbweSgXXsTSpLrtvMA3fPqE2n0yvlt>



VOTO APROBATORIO

Cuernavaca Morelos a 04 de octubre de 2021

Mtra. Jesica López Bucio Fabian

Directora Interina de la Facultad de Nutrición de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

PRESENTE

Como miembro del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada ““DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE UN ANTÍGENO VACUNAL CONTRA GARRAPATAS PARA REDUCIR EL USO DE PESTICIDAS EN BOVINOS Y CONTRIBUIR AL SOSTENIMIENTO DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA”, del alumno Jesús Alejandro Leyva Pérez, con número de matrícula 20161006200, considero que dicho trabajo reúne los elementos necesarios para que le otorgue mi VOTO APROBATORIO y de esta forma el alumno pueda presentar su examen de grado.

Sin más por lo pronto, quedo a sus finas atenciones.

Atentamente:

M. en I. Homero Hernández Salgado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

HOMERO HERNANDEZ SALGADO | Fecha:2021-10-05 16:43:40 | Firmante

Oduc1pzjDAANi+3JlpKz5+2pplQNh1YJL1ykQAWiTr356V5CPReKxbVvYH11xmHXds/7R12AbGw2Kg14fsM4segwqgKbLgqAvjZ3lDbqG5cw3XWXAvQ3g4PbJr+SE11A74dEoQW25fckBCCi7mwukLUVy3EsbwdHds21zv5EBJ6miEgYCcx8ZMsod8HUB4dc3blagTmCX/OTx0QIqNM1CkEUB8Ylc8kvcgCF0RrA7TiJivHERWHSzmebN/EGpGIIIOOYEOAX12QpvnAWCP+QLOTSoEJJL+nUrbIK9QKBSihgcyGj4R8timPdjMNU4usdY5wt+u9oVC3DHprywZ9eVQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jRs9kNWtq](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fwEbrN2OwF8KgUydTAZSuwjokSurmXZm>

