

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Caracterización proteómica de la proteína
VDAC de *Rhipicephalus microplus* durante la
infección con *Babesia bigemina*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

IVÁN CORONA GUERRERO

DIRECTORA

DRA. MINERVA CAMACHO NUEZ

CODIRECTOR

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, enero de 2021

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Integración del jurado:

Presidente: Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez

Secretario: Dra. Minerva Camacho Nuez

Vocal: Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

Directora de Tesis

Dra. Minerva Camacho Nuez

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesora- Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Profesor- Investigador

Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Autónoma de Querétaro

ASESORES

Dra. Elizabeth Jacqueline Castañeda Ortiz

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesora- Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Quisiera agradecer a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga y a la Dra. Claudia Selene Zarate Guerra por su participación como lectoras de tesis en mi proceso de titulación.

Agradecimiento especial a la Dra. Elizabeth Jacqueline Castañeda Ortiz por su constante, certero y valioso apoyo durante la realización de este proyecto.

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de beca otorgada: 726477.

Este proyecto de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número: 283344. Y que lleva por título: “Caracterización molecular de RmVDAC, una proteína de intestino de *Rhipicephalus microplus* y su papel en la transmisión de la Babesiosis bovina

DEDICATORIA

Este trabajo se realizó en conjunto con muchas personas que, de una manera u otra, ayudaron a la terminación de mi carrera de Maestro en Ciencias Genómicas.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi familia, quienes me brindaron su apoyo incondicional durante todo el desarrollo de este proyecto, especialmente a mis padres **Hermelinda y Juan Martin**.

De igual manera, agradecer a mis amigos entre los que quisiera destacar a: **Victor Manuel Delgado Franyutti**, por estar siempre echándome ÁNIMO desde la preparatoria hasta los momentos más tensos del posgrado.

A mis amigos **Lorena, Luz, Carlos, Roxana, “El” Miguel, Susana, Leonardo “Quetza” y Ángel “Saito”** porque además de sus buenas vibras, me ayudaron mucho para prepararme previamente a mis seminarios, estoy seguro de que no podría haber llegado tan lejos sin su apoyo.

A todas las personas con las que tuve el gusto de trabajar en los laboratorios del Posgrado en Ciencias Genómicas: **Mariana “Manzanita”, Víctor “Fashion”, Mar, Enrique “Quique”, Jose, Blanca, Darío, Ameyatzin, Rogelio “Roger”, Fabricio, Jessi y Sharon**.

Especialmente quisiera agradecer el apoyo técnico para la realización de los experimentos en el laboratorio a la **Dra. Jacqueline Castañeda** y por el valiosísimo apoyo en la colecta de garrapatas a mi colegas y grandes amigos **Cristian Figueroa, Jose Antonio Henández, Mauricio Medina, Rodrigo Morales y Miguel Guzmán**.

El presente trabajo se realizó durante la pandemia del SARS-CoV-2, un suceso histórico que marco tanto la realización del proyecto como la vida de quienes he mencionado previamente y de quienes faltaron por mencionar. A todos les deseo que salgan con salud física y mental de esto y espero pronto nos podamos volver a reunir.

“All the memories we'll share
Greet us everywhere
Along life's twisting road
We'll drink a toast to tomorrow
And one to days long ago.”

Blackmore's Night

Tabla de contenido:

Índice

Lista de abreviaturas	6
Resumen.....	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Garrapatas	12
1.2 Control de garrapatas	22
2 Antecedentes particulares.....	27
2.1 Nuevos candidatos vacunales	27
2.2 Canal de aniones dependiente de voltaje	30
2.3 Isoformas de VDAC	32
2.4 Características de BmVDAC.....	40
3 JUSTIFICACIÓN.....	45
4 HIPÓTESIS.....	45
5 OBJETIVO GENERAL	45
6 OBJETIVOS PARTICULARES	45
7 Estrategia experimental	46
7.1 Objetivo 1: Caracterizar <i>in silico</i> las posibles isoformas de BmVDAC e identificarlas en extractos de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i>	46
7.2 Objetivo 2: Analizar la expresión diferencial de las isoformas de BmVDAC en intestinos de <i>R. microplus</i> infectados con <i>B. bigemina</i> a diferentes tiempos post-repleción.....	47
7.3 Predecir <i>in silico</i> el papel de las MPTs de BmVDAC en la interacción con el plasminógeno bovino.....	47
7.4 Proponer un modelo de la posible función de al menos una de estas MPTs de BmVDAC en interacción con el plasminógeno bovino.....	47
8 Materiales y métodos	48

8.1	Objetivo 1: Caracterizar <i>in silico</i> las posibles isoformas de BmVDAC e identificarlas en extractos de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i>	48
8.1.1	Determinar la presencia de múltiples copias del gen de <i>Bmvdac</i>	48
8.1.2	Predicción de sitios de acetilación y fosforilación en BmVDAC.....	48
8.1.3	Selección de bovinos libres de <i>B. bigemina</i>	49
8.1.4	Colecta y disección de garrapatas.....	50
8.1.5	Extracción de proteínas totales	50
8.1.6	Isoelectroenfoque	51
8.1.7	Western-Blot.....	52
8.1.8	Análisis de imagen de los geles de 2D-PAGE con el programa PDQuest 53	
8.2	Objetivo 3: Predecir <i>in silico</i> el papel de las MPTs de BmVDAC en la interacción con el plasminógeno bovino.....	53
8.2.1	Predicción de estructura terciaria de BmVDAC mediante modelaje por homología.	53
8.2.2	Localización de los RMPC en regiones accesibles de BmVDAC.	54
8.2.3	Predicción de interacción a nivel de secuencia	54
8.2.4	Modificación postraduccional <i>in silico</i>	54
8.2.5	Docking proteína-proteína	54
8.2.6	Análisis de los resultados de docking molecular	55
8.2.7	Análisis de residuos involucrados en la interacción.....	55
8.3	Objetivo 4: Proponer un modelo de la posible función de al menos una de estas MPTs de BmVDAC en interacción con el plasminógeno bovino.	56
8.3.7	Búsqueda bibliográfica	56
8.3.8	Verificación en bases de datos.....	56
9	Resultados	57

9.1	Objetivo 1: Caracterizar <i>in silico</i> las posibles isoformas de BmVDAC e identificarlas en extractos de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i>	57
9.1.1	Determinar la presencia de múltiples copias del gen de <i>Bmvdac</i>	57
9.1.2	Predicción de sitios de acetilación y fosforilación	58
9.1.3	Selección de bovinos libres de <i>B. bigemina</i>	60
9.1.4	Segunda colecta de garrapatas.....	62
9.1.5	Identificación de las posibles isoformas de BmVDAC en extractos de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i>	63
9.1.6	Análisis de imagen de los geles de 2D-PAGE con el programa PDQuest 67	
9.1.7	Comparación con resultados preliminares	68
9.2	Objetivo 3: Predecir <i>in silico</i> la interacción de las MPTs de BmVDAC con el plasminógeno bovino.....	69
9.2.1	Predicción de estructura terciaria de BmVDAC mediante modelaje por homología.	69
9.2.2	Localización de los RMPC en regiones accesibles de BmVDAC.	71
9.2.3	Predicción de las interacciones de BmVDAC con el BtPg.....	72
9.2.4	Modificación postraducciona <i>l in silico</i>	74
9.2.5	Docking proteína-proteína	74
9.2.6	Análisis de los resultados de docking molecular	75
9.3	Objetivo 4: Proponer un modelo de la posible función de al menos una de estas MPTs de BmVDAC en interacción con el plasminógeno bovino.	81
9.3.1	Búsqueda bibliográfica	81
9.3.2	Verificación de componentes del modelo en bases de datos	83
10	Discusión.....	85
11	Conclusiones.....	92
12	Perspectivas.....	93

13	Referencias:	94
14	Material suplementario	109
14.1	Apéndice 1: Tablas suplementarias.....	109
14.2	Preparación de soluciones:.....	121
14.2.1	Buffer de equilibrio 2D.....	121
14.2.2	Buffer de rehidratación.....	121
14.2.3	Buffer de transferencia para Western-Blot	122
14.2.4	Buffer PBS 10X	122
14.2.5	Buffer TNTE	122
14.2.6	Coomassie G250	123
14.2.7	Coomassie R250.....	123
14.2.8	Solución desteñidora.....	123

Lista de abreviaturas

2D-PAGE: Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida

BmVDAC: VDAC de *Rhipicephalus microplus*

BSA: Albúmina de suero bovino

BtPg: Plasminógeno bovino

DTT: Ditioneitol

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G

h: Hora

HK: Hexoquinasa

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IPG: Gradiente de pH inmovilizado

IPP: Inmunoprecipitación

iRNA: RNA de interferencia

kg: Kilogramos

MPT: Modificación postraduccional

mRNA: RNA mensajero

nm: Nanómetro

PI: Punto isoeléctrico

RT-PCR: PCR retrotranscrito

VDAC: Canal de aniones dependiente de voltaje

µg: Microgramos

µl: Microlitros

Índice de figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	15
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Babesia spp</i> (J. Mosqueda et al., 2012).....	18
Figura 3: Situación del control de las garrapatas <i>Rhipicephalus spp.</i> conforme al programa nacional de erradicación.....	21
Figura 4: Características que debe cumplir una proteína para considerarse un candidato vacunal ideal contra garrapatas en bovinos.....	28
Figura 5: Estructura del gen de humano que codifica para <i>vdac1</i>	35
Figura 6: Estructura del gen de humano que codifica para <i>vdac2</i>	37
Figura 7: Cambios en la localización de BmVDAC durante la infección con <i>B bigemina</i>	41
Figura 8: Western-Blot de 2D-PAGE de extractos de proteínas totales de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados con <i>B. bigemina</i> a 72 horas post-repleción.....	43
Figura 9: BLAST local realizado con el programa CLC Genomics Workbench.....	57
Figura 10: Búsqueda realizada con la herramienta BLAST de NCBI.....	58
Figura 11: Búsqueda realizada con la herramienta BLAST de VectorBase.....	58
Figura 12: Predicción de residuos acetilados en BmVDAC.....	59
Figura 13: Predicción de residuos fosforilados en BmVDAC.....	60
Figura 14: Inmunofluorescencias indirectas para detección de <i>B. bigemina</i>	60
Figura 15: Frotis de sangre del bovino infectado a diferentes tiempos post-infección.....	61
Figura 16: Quinetocitos de <i>B. bigemina</i> observados en hemolinfa de <i>R. microplus</i>	62
Figura 17: Determinación de integridad de un extracto total de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i> no infectadas.....	63
Figura 18: 2D-PAGE de extractos de proteínas totales de intestinos de garrapatas no infectadas a 0 horas post-repleción.....	64
Figura 19: Determinación de integridad de un extracto total de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i> infectadas a 0 h post-repleción.....	65
Figura 20: 2D-PAGE y Western-Blot de extractos de proteínas totales de intestinos de garrapatas infectadas a 0 h post-repleción.....	65

Figura 21: Determinación de integridad de un extracto total de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i> no infectadas a 48 h post-repleción.....	66
Figura 22: 2D-PAGE y Western-Blot de extractos de proteínas totales de intestinos de garrapatas no infectadas a 48 h post-repleción.....	67
Figura 23: Imágenes maestras generadas usando el programa PDQuest.....	68
Figura 24: Comparación de spots encontrados en un Western-Blot de garrapatas no infectadas a 72 h post infección con el Western-Blot de los resultados preliminares.....	69
Figura 25: Modelo tridimensional de BmVDAC generado por homología.	71
Figura 26: Representación del pocket de mayor tamaño predicho mediante CASTp.....	72
Figura 27: Puntuación de PSOPIA para las interacciones de BmVDAC con los plasminógenos bovino y humano.	73
Figura 28: Sitios de interacción predichos usando el programa BSpred.	74
Figura 29: Modelo de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino....	77
Figura 30: Modelo de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino....	78
Figura 31: Modelo de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino....	79
Figura 32: Modelo de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino....	80
Figura 33: Modelo hipotético que explica la sobreexpresión y fosforilación de BmVDAC mediadas por un aumento de la concentración de Ca ²⁺ intracelular.	91

Índice de tablas

Tabla 1: Parámetros de Hex seleccionados para la predicción de interacciones mediante docking.....	55
Tabla 2: Seguimiento del estado de salud del bovino infectado <i>B. bigemina</i> durante el periodo de colecta de garrapatas.....	61
Tabla 3: Seguimiento del estado de salud del bovino infectado <i>B. bigemina</i> durante el periodo de la segunda colecta de garrapatas.	62
Tabla 4: Matriz de identidad generada a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de VDAC de <i>R. microplus</i> , ratón y humano calculada usando Clustal omega.	70
Tabla 5: Matriz de identidad generada a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de VDAC de <i>R. microplus</i> , <i>A. variegatum</i> , <i>R. annulatus</i> , <i>A. gambiae</i> y <i>D. melanogaster</i>	70
Tabla 6: Resultados de los dockings realizados con Hex. En la tabla se muestra la ΔG del modelo termodinámicamente más estable en la que las proteínas interactúan con regiones accesibles de BmVDAC.	75
Tabla 7: Resultados de los dockings realizados con PatchDock/FireDock. En la tabla se muestra la ΔG del modelo termodinámicamente más estable en la que las proteínas interactúan con regiones accesibles de BmVDAC.	75
Tabla 8: Comparación de los resultados del ΔG de los complejos generados con HEX y PatchDock/FireDock. Los ligandos resaltados en verde indican que en ambos programas el complejo con BmVDAC_M como receptor es termodinámicamente más estable, los ligandos resaltados en rojo indican que en ambos programas el complejo con BmVDAC_S como receptor es termodinámicamente más estable, los ligandos resaltados en amarillo corresponden a resultados inconsistentes entre ambos programas.....	76
Tabla 9: Resultados de la búsqueda de proteínas homólogas a las descritas en el modelo hipotético de fosforilación de BmVDAC.....	84
Tabla S1:	109

Resumen

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados capaces de causar daños severos a su hospedero y de transmitir múltiples patógenos. En México, *Rhipicephalus microplus* es una de las garrapatas con mayor importancia para la salud animal en el área de la ganadería. *R. microplus* parasita principalmente a bovinos y es el vector de múltiples patógenos como *Babesia bigemina*, un parásito protozoario del phylum Apicomplexa. Esta garrapata y los patógenos que transmite causan pérdidas millonarias a la industria ganadera mexicana. Una estrategia de control integral de garrapatas ha sido implementada en México para disminuir el impacto económico causado por *R. microplus*. El canal de aniones dependiente de voltaje de *R. microplus* (BmVDAC) es una proteína que se encuentra altamente conservada entre múltiples especies y cepas de garrapatas, es inmunogénica en bovinos y disminuye la viabilidad de las garrapatas que se alimentan de bovinos inmunizados. Estas características hacen que BmVDAC sea considerado como un candidato vacunal prometedor. Trabajos anteriores de nuestro grupo de trabajo han demostrado que, durante la infección con *B. bigemina*, BmVDAC se sobreexpresa y se relocaliza en células intestinales de *R. microplus*. Además, se ha demostrado que BmVDAC interactúa con el plasminógeno bovino cuando la proteína es purificada de muestras de intestinos de garrapata infectados con *B. bigemina* a 72 horas post repleción. Por otra parte, en trabajos anteriores se ha observado que un anticuerpo específico anti-BmVDAC reconoce más de un spot con el mismo peso molecular pero diferente punto isoeléctrico a las 72h post-repleción, en garrapatas infectadas con *B. bigemina*, lo que podrían representar diferentes isoformas de la proteína que se expresan diferencialmente como consecuencia de la infección. El objetivo del presente trabajo fue identificar las isoformas de BmVDAC que *R. microplus* expresa durante la infección con *B. bigemina*. Mediante análisis bioinformático se buscó descartar la presencia de múltiples copias del gen que codifica para BmVDAC y predecir las posibles modificaciones postraduccionales de la proteína. Los resultados obtenidos indican que no existen múltiples copias del gen de *Bmvdac* en el genoma de *R. microplus*. Además, doce residuos únicos susceptibles a acetilaciones y fosforilaciones presentes en regiones no transmembranales y pockets moleculares fueron predichos. A nivel experimental se realizaron ensayos de inmunodetección en una membrana de nitrocelulosa de proteínas separadas mediante 2D-PAGE, con el anticuerpo específico anti-BmVDAC, utilizando extractos de intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas a 0, 24 y 48 h postrepleción; los resultados mostraron un solo spot. Para determinar la posible función de las posibles modificaciones postraduccionales de BmVDAC realizamos un docking proteína-proteína entre BmVDAC y el plasminógeno bovino usando dos programas diferentes. Esta interacción ya se había demostrado experimentalmente con anterioridad en nuestro grupo. Las predicciones de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino indicaron que los complejos formados por estas dos proteínas son más estables cuando BmVDAC se encuentra fosforilada. Estos resultados sugieren que la interacción de BmVDAC con el plasminógeno se encuentra regulada por las modificaciones postraduccionales de BmVDAC expresadas durante la infección con *B. bigemina*.

Abstract

Ticks are obligate hematophagous ectoparasites capable of gravely harm its host and transmit several pathogens. In Mexico, *Rhipicephalus microplus* is one of the most relevant ticks in the field of veterinary healthcare and livestock industry. *R. microplus* mainly feeds on cattle and its vector to diverse pathogens such as *B. bigemina*, an apicomplexan protozoa parasite. This tick and its borne pathogens are the reason for millionaire loses to the Mexican livestock industry. An integrated tick control strategy was implemented in Mexico to diminish the economical and health impact caused by *R. microplus* infestations. A promising novel vaccine candidate is the *R. microplus* voltage-dependent anion channel (BmVDAC). This is a highly conserved protein between multiple tick species and strains, its immunogenic in cattle and decreases viability of ticks fed on immunized cattle. Previous projects of our workgroup have demonstrated that, during *B. bigemina* infection, BmVDAC is upregulated and relocalized in *R. microplus* midgut cells. It has been demonstrated that BmVDAC interacts with the bovine plasminogen when it is extracted from *B. bigemina*-infected midgut cells at a 72-hour post-repletion time. Additionally, results of previous projects indicate that an anti-BmVDAC specific antibody recognizes multiple spots with equal molecular weight but different isoelectric point at a 72-hour post-repletion time, in total protein extract of *B. bigemina*-infected midgut cells. These results suggest that multiple BmVDAC isoforms could be expressed because of the infection. This project's objective was to identify the BmVDAC isoforms expressed in *R. microplus* midgut cells during the *B. bigemina* infection. By conducting a series of bioinformatic analyses we sought to rule out the possibility of multiple copies of the *Bmvdac* gene being coded in *R. microplus* genome and to predict the possible post-translational modifications of the protein. Results rule out the existence of multiple copies of the *Bmvdac* in the *R. microplus* genome. Additionally, twelve unique amino acid residues susceptible to phosphorylation and acetylation located at non-transmembrane protein regions and molecular pockets were predicted. At an experimental level, we performed 2D Western-Blot assays with an anti-BmVDAC-specific antibody, using total protein extracts from *B. bigemina*-infected *R. microplus* midgut samples at post-repletion times of 0, 24 and 48 h; results showed one single spot. we performed more in-depth *in silico* analyses to determine the possible role of the predicted residue phosphorylations. For this reason, we performed protein-protein docking predictions between BmVDAC and the bovine plasminogen using two different programs. This interaction was previously experimentally confirmed in a previous project of our workgroup. Docking prediction indicated that the BmVDAC and bovine plasminogen complexes are more stable when BmVDAC is phosphorylated. These results suggest that the interaction between BmVDAC and the bovine plasminogen is regulated by BmVDAC post-translational modifications expressed during *B. bigemina* infections.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Garrapatas

Las garrapatas son artrópodos ectoparásitos obligados de alimentación estrictamente hematófaga. Estos parásitos pertenecen a la clase Arachnida, subclase Acari, orden Parasitiformes y suborden Ixodida (Anderson y Magnarelli, 2008). Particularmente, las garrapatas de la familia Ixodidae (garrapatas duras) poseen un escudo dorsal y un aparato bucal (capítulum) que sobresale en el extremo frontal (Spickler, 2007).

La duración del ciclo de vida de las garrapatas, su longevidad y la eficiencia en la oviposición son influenciados por múltiples factores ambientales. Los fotoperiodos, la temperatura y la humedad relativa son las variables que más influyen en el éxito del desarrollo y reproducción de las poblaciones de garrapatas. Los valores óptimos de estos factores son distintos para cada especie (Troughton y Levin, 2007). Por otra parte la disponibilidad de hospedero es el factor biológico con mayor influencia en el proceso de alimentación, muda de fases de vida y efectividad en la reproducción (Troughton y Levin, 2007). Finalmente, los patrones de comportamiento como búsqueda de hospedero, agrupamiento y reproducción se encuentran fuertemente mediados por feromonas (Parola y Raoult, 2001).

La distribución de estos parásitos se extiende desde las regiones subárticas hasta los trópicos, sin embargo, la mayor diversidad de especies de garrapatas se encuentra en regiones con climas tropicales y subtropicales (Anderson y Magnarelli, 2008). Las garrapatas pueden parasitar una gran cantidad de hospederos vertebrados como mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Cada especie tiene un tropismo hacia un hospedero específico (o un grupo determinado de hospederos) (McCoy et al., 2013).

Para detectar la presencia de sus hospederos, las garrapatas poseen una serie de órganos especializados como el órgano de Haller y los palpos del aparato bucal, los cuales son capaces de detectar cambios de temperatura, corrientes de aire y emisiones de dióxido de carbono (Anderson y Magnarelli, 2008; Parola y Raoult, 2001). Las estrategias que las garrapatas emplean para entrar en contacto con sus hospederos son muy variadas. El comportamiento de las garrapatas en etapas en las que no se encuentran adheridas a su hospedero puede ser no nidícolas (que permanecen al aire libre) o nidícolas (que buscan refugios en lugares cerrados)

(Anderson y Magnarelli, 2008; Dantas-Torres, 2008). Para la búsqueda de hospederos las garrapatas pueden emplear principalmente dos tipos de comportamiento: el primero consiste en esperar en los extremos de superficies como paredes de nidos o en las puntas de la vegetación y adherirse a su hospedero una vez que este entra en contacto con ellas. El otro comportamiento típico consiste en mantenerse ocultas hasta que detectan a un hospedero. Una vez que pasa esto, la garrapata se dirige hacia su hospedero para poder adherirse a este. Distintas cepas de una misma especie pueden adoptar tipos diferentes de comportamiento dependiendo de la región en la que se encuentre y las condiciones ambientales (Anderson y Magnarelli, 2008; Dantas-Torres, 2008).

Las garrapatas se alimentan por periodos prolongados de tiempo. El proceso de alimentación se divide en dos fases de ingesta de sangre: iniciando con una fase lenta de adaptación seguido de uno rápido, en el que las hembras aumentan su tamaño y peso (Binnington, 1978). Para sujetarse de su hospedero y alimentarse, las garrapatas cuentan con un hipostoma, un aparato bucal especializado que lleva a cabo múltiples funciones. En la porción dorsal posee dentículos cuya forma previene que la garrapata sea removida del hospedero, además de poseer un canal de alimentación a través del cual el parásito ingiere la sangre del hospedero, y al mismo tiempo, inyecta la saliva (Anderson y Magnarelli, 2008). La saliva de las garrapatas contiene compuestos anticoagulantes y vasodilatadores, los cuales permiten una irrigación de sangre abundante en el lugar de la picadura, además de ayudar a evadir la respuesta inmune celular mediante enzimas proteolíticas (Estrada-Peña y De La Fuente, 2014). Adicionalmente a los dentículos del hipostoma, las garrapatas poseen una secreción capaz de endurecerse la cual les permite afianzar su adhesión al hospedero (Anderson y Magnarelli, 2008).

Las diferentes garrapatas pertenecientes a la familia Ixodidae tienen ciclos de vida muy similares. La principal diferencia entre el desarrollo entre distintas especies de garrapatas es el número de hospederos que cada una infesta. Los ciclos de vida de estos parásitos pueden ser de uno, dos o tres hospederos. Las garrapatas de un hospedero pasan por todos sus estadios sin desprenderse de su hospedero, las de dos hospederos se desprenden para mudar de ninfa a adulto y las de tres hospederos se desprenden para cada muda de estadio (Spickler, 2007).

El ciclo de vida de las garrapatas inicia con la eclosión de los huevos. Las larvas eclosionadas poseen únicamente seis patas y pueden buscar un hospedero inmediatamente, o bien, entrar en un estado de hibernación conocido como diapausa (Anderson y Magnarelli, 2008). Tras repletarse, las larvas mudan a ninfas, las cuales poseen ya 8 patas, pero son reproductivamente inmaduras y deben alimentarse nuevamente para mudar a adultos (Anderson y Magnarelli, 2008). Los adultos ya son reproductivamente maduros, poseen dimorfismo sexual y, dependiendo de la especie, pueden copular mientras la hembra está adherida al hospedero o en el suelo mientras buscan un nuevo hospedero (Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

México es un país cuyo territorio está constituido en su totalidad por regiones tropicales y subtropicales. Además, los hospederos se encuentran disponibles durante todo el año. Estas características permiten que las garrapatas puedan completar su ciclo de vida varias veces en un año (Rodríguez Vivas et al., 2017). En México se ha reportado la presencia de 100 especies de garrapatas, lo que equivale al 11.3% de la diversidad mundial. De estas especies, 32 pertenecen a la familia Ixodidae (de los géneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* y *Rhipicephalus*). En el ámbito de la salud veterinaria de ganado bovino, la garrapata con mayor importancia en México es *Rhipicephalus microplus* (Pérez et al., 2014).

R. microplus es una garrapata que típicamente parasita bovinos, aunque se han reportado casos menos comunes de infestaciones en equinos y cérvidos (Rodríguez-Vivas et al., 2013; Ueti et al., 2008). Una vez que los huevos de esta garrapata eclosionan, las larvas pueden permanecer en vida libre hasta 4 meses antes de morir por inanición, en caso de no encontrar un hospedero (Spickler, 2007). *R. microplus* tiene un ciclo de vida de un solo hospedero, por lo que puede mudar a todos sus estadios de vida y copular sin desprenderse (Figura 1). Una vez que comienza a alimentarse, la garrapata puede completar su ciclo de vida en un periodo de 3 a 4 semanas (Spickler, 2007). El porcentaje de supervivencia, el número de huevos ovipositados y el tiempo que las poblaciones de garrapatas requieren para completar su ciclo de vida dependen de factores ambientales (temperatura, humedad relativa y exposición a la luz solar directa), factores no ambientales (disponibilidad de hospederos y presencia de depredadores) e incluso factores antropogénicos (Leal et al., 2018).

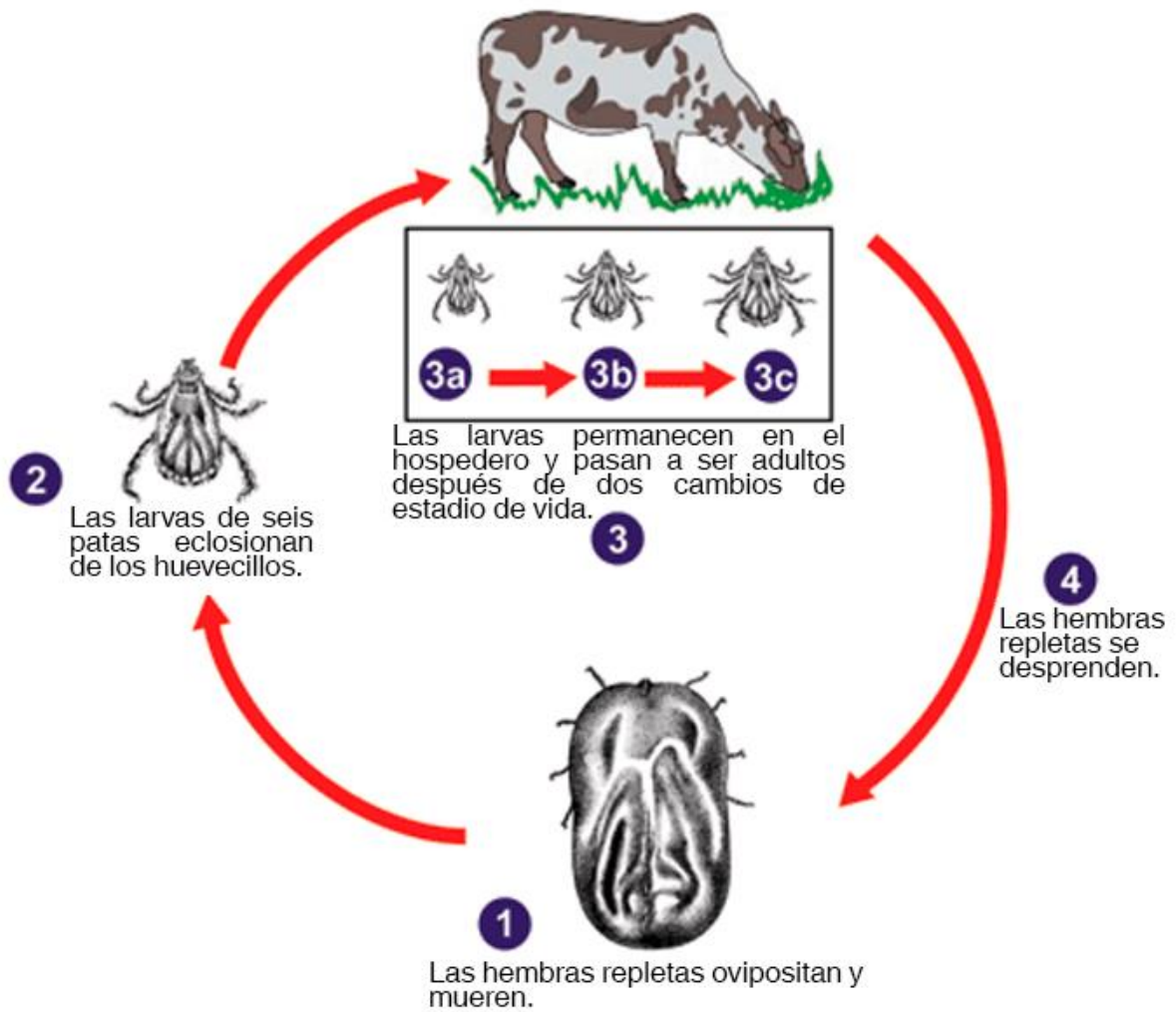


Figura 1: **Ciclo de vida de *R. microplus***. El ciclo de vida comienza cuando una hembra repleta oviposita (1), posteriormente, las larvas eclosionan de los huevecillos (2) y se adhieren a un bovino (3a). *R. microplus* muda a ninfa (3b) y a adulto (3c) sin desprenderse de su hospedero (3). Una vez repletas, las hembras se desprenden del bovino y se preparan para la oviposición (4). Imagen tomada y modificada del CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

El ciclo de vida de las garrapatas, su modo de alimentación, su alta variedad de hospederos y su abundante descendencia han favorecido su selección como vector para una gran variedad de patógenos (Parola y Raoult, 2001). Las garrapatas tienen un importante rol en la transmisión de patógenos protozoarios y bacterianos de interés de salud humana y veterinaria (Parola y Raoult, 2001). Los patógenos transmitidos por garrapatas también están adaptados para mantenerse a través de los estadios de vida de sus vectores y para transmitirse de manera transovárica a las siguientes generaciones (Raoult y Roux, 1997).

La principal enfermedad que *R. microplus* transmite al ganado bovino en México es la babesiosis causada por los parásitos *B. bigemina* y *B. bovis* (Bock et al., 2004). Los parásitos del género *Babesia* pertenecen al phylum Apicomplexa, cuyos miembros se caracterizan por poseer un complejo apical que les permite invadir los eritrocitos de su hospedero (Bock et al., 2004). *Anaplasma marginale* es otro patógeno de alta importancia de salud animal en México. *A. marginale* es una bacteria intraeritrocitaria obligada perteneciente al orden de Rickettsiales. Esta bacteria causa pérdidas económicas debido a la severidad que la enfermedad provoca en bovinos susceptibles y a la dificultad que hay en su control (Aubry y Geale, 2011). El control de la enfermedad se ha dificultado debido a las infecciones persistentes que provoca la bacteria, así como el mecanismo de evasión del sistema inmune que emplea para generar múltiples variantes antigénicas (Aubry y Geale, 2011).

La babesiosis es una enfermedad causada por patógenos del género *Babesia*. Estos parásitos tienen un ciclo de vida complejo que requiere de un vector (principalmente una garrapata *Rhipicephalus spp.*) y un hospedero mamífero (principalmente bovinos) para ser completado. El ciclo de vida inicia cuando una larva infectada se alimenta de un bovino. Durante el proceso de alimentación, los esporozoitos de *Babesia* migran de las glándulas salivales de la garrapata hacia el torrente sanguíneo del bovino. En el torrente sanguíneo, los esporozoitos invaden los eritrocitos y maduran a trofozoítos (Figura 2A, 2B). Los trofozoítos se dividen mediante fisión binaria y dan lugar a dos merozoitos cada uno (Figura 2C, 2D). Los merozoitos pueden liberarse de la célula, causando lisis en el proceso, e invadir un nuevo eritrocito para continuar este ciclo intracelular en el bovino (Figura 2F). Si una garrapata se alimenta del bovino, los merozoitos se convierten en gametocitos extracelulares al liberarse de los eritrocitos infectados, continuando el ciclo de vida en el vector (Figura 2F, 2G). Los gametocitos se reproducen de manera sexual para formar un cigoto (Figura 2H). El cigoto madura a una etapa infectiva e invade las células intestinales (Figura 2I). Los cigotos maduran en quinetocitos, lisan las células intestinales y migran a través de la hemolinfa para realizar una infección transovárica al infectar las células embrionarias de los ovarios de las garrapatas (Figura 2J, 2K, 2L). Las larvas que eclosionan de huevecillos infectados se encuentran infectadas con quinetocitos (Figura 2M). Los quinetocitos migran a las glándulas salivales y forman esporoblastos al detectar estímulos que

ocurren cuando la larva se adhiere a un bovino (Figura 2N). Cada esporoblasto da lugar a miles de esporozoitos, los cuales son depositados en el torrente sanguíneo del bovino durante el proceso de alimentación, completando el ciclo de vida (Figura 2O, 2P). (J. Mosqueda et al., 2012)

Los signos, síntomas y severidad de la babesiosis varían dependiendo de cual especie de *Babesia* se encuentre infectando. Los síntomas comunes de la enfermedad son fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia, anorexia, abortos, pérdida severa de peso y, en casos severos y mal controlados, la muerte del bovino (Bock et al., 2004; Rojas-Martínez et al., 2018).

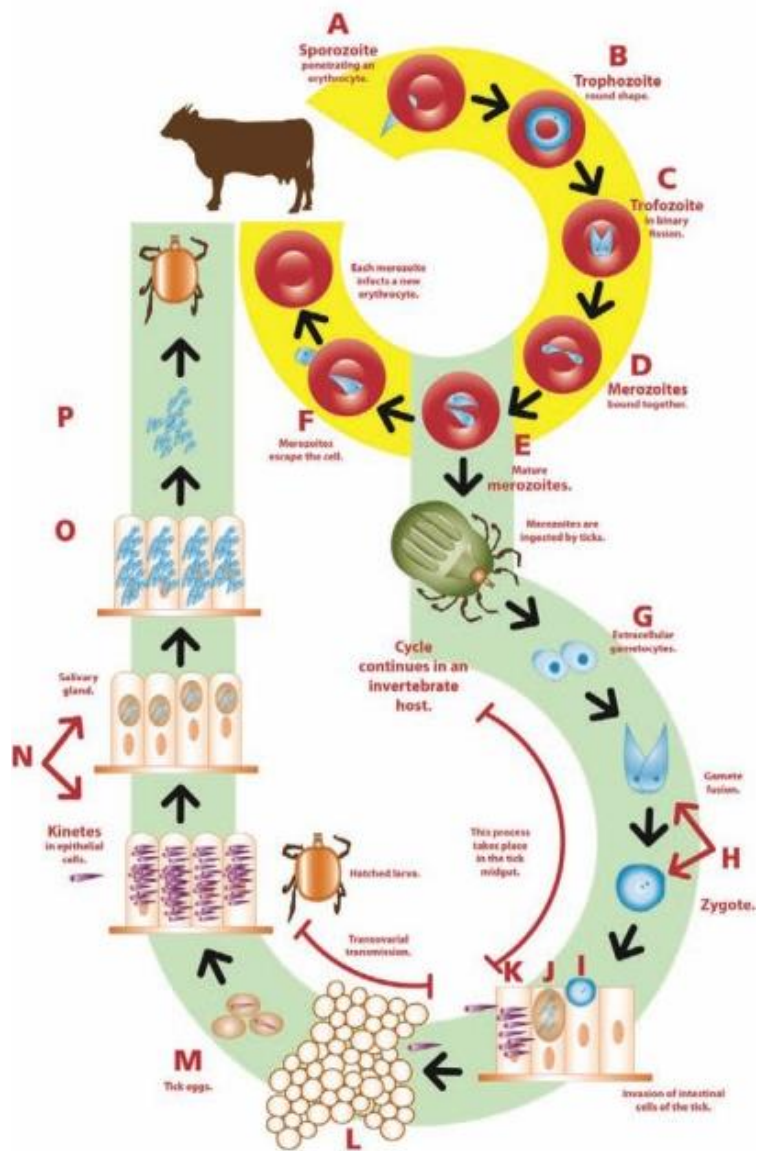


Figura 2: Ciclo de vida de *Babesia* spp (J. Mosqueda et al., 2012). El fragmento marcado en amarillo representa la parte del ciclo de vida que se lleva a cabo en el bovino y el fragmento resaltado en verde se lleva a cabo en la garrapata.

El cuadro clínico característico de *B. bigemina* presenta fiebre moderada y hemoglobinuria como síntomas tempranos. Generalmente, las infecciones de *B. bigemina* no causan síntomas graves, pero, en casos severos los bovinos afectados pueden presentar anemia aguda grave e ictericia. Estos síntomas causan rápidamente hemólisis vascular y pueden dar lugar a la muerte del bovino si la infección no es tratada (Bock et al., 2004). En casos poco severos o tratados a tiempo la recuperación es rápida y completa, aunque los bovinos permanecen seguir contagiando garrapatas hasta por 7 semanas después (Bock et al., 2004).

Las infecciones de *B. bovis* causan un cuadro clínico agudo más severo que *B. bigemina*, caracterizado por fiebre de ~40°C durante 3 a 7 días, falta de apetito, depresión, respiración acelerada, debilidad y dificultad motora. En infecciones prolongadas se puede presentar anemia hemolítica severa, hemoglobinuria, ictericia y problemas circulatorios. La agregación de eritrocitos infectados en capilares de cerebro y pulmones puede causar daños severos en estos órganos y causar la muerte del bovino (Bock et al., 2004). La recuperación de los bovinos infectados por *B. bovis* suele ser más tardada que con *B. bigemina* y suele dejar secuelas menores en los bovinos (Bock et al., 2004; Rojas-Martínez et al., 2018)

Las garrapatas del género *Rhipicephalus* se encuentran distribuidas a lo largo de la mayoría del territorio mexicano. Las principales especies presentes son *R. microplus*, *R. annulatus* y *R. sanguineus*. Los hábitats favorables y la disponibilidad de hospederos dificultan el control de la población de estos hospederos. Debido a esto se implementó la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp.* a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994, la cual tiene como propósito establecer procedimientos para el control de las poblaciones de garrapatas. La implementación de la estrategia ha dado como resultado el establecimiento de zonas libres de garrapatas y zonas en proceso de erradicación (Diario Oficial de la federación, 1995). Las zonas libres de garrapatas son los territorios en los que, tras múltiples aplicaciones de tratamientos garrapaticidas e inspecciones minuciosas (llevadas a cabo en conjunto por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA)), no se detectan garrapatas del género *Rhipicephalus* (Ramón et al., 2012).

La zona libre de garrapata se extiende a lo largo de los estados de Sonora, Chihuahua, Baja California, Baja California Sur, Tlaxcala y Aguascalientes (Figura 3) (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020). Las zonas en las que no se han concluido las aplicaciones de garrapaticidas e inspecciones antes mencionadas se denomina como territorio en proceso de erradicación (Ramón et al., 2012). El territorio en proceso de erradicación incluye partes de los estados de Baja California Sur, Sinaloa y Chihuahua (Figura 3) (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020). De acuerdo con lo establecido en la estrategia nacional, el resto del país se considera como zona de control, debido a que éste es el

hábitat endémico de las garrapatas del género *Rhipicephalus* y se deben llevar a cabo continuamente medidas para el control de la población de estos parásitos. Finalmente, hay territorios de la zona endémica que se encuentran próximas a ser declaradas como libres naturales, los cuales se encuentran en los estados de Durango, Zacatecas, Chihuahua, San Luis Potosí, Hidalgo y Morelos (Figura 3) (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020).

Los hatos de ganado que se intenten exportar a los Estados Unidos deben estar libres de garrapatas debido a las normas establecidas por SAGARPA y USDA. Antes de cruzar la frontera los bovinos deben ser sometidos a tratamientos garrapaticidas y preparados para la inspección por personal del servicio veterinario de USDA. En caso de que se detecten garrapatas en un solo bovino, todo el lote debe ser sometido de nuevo a un baño garrapaticida y aislado por un periodo de 10 a 14 días antes de ser sometidos a una segunda inspección (Ramón et al., 2012). Un hato que falla dos inspecciones es catalogado como no apto para importación por parte de las autoridades estadounidenses, de igual manera, el ganadero que intentó exportar el hato entra en una lista de restricción, la cual implica que se puede impedir que la importación de lotes del ganadero en cuestión en un periodos que pueden ir desde un año hasta ser permanentes (Ramón et al., 2012). Lo anterior ha hecho que tanto a los ganaderos como a las autoridades mexicanas busquen estrategias cada vez más efectivas para el control de las garrapatas.



Figura 3: Situación del control de las garrapatas *Rhipicephalus spp.* conforme al programa nacional de erradicación. La zona libre se encuentra representada en color verde claro, la zona de erradicación en amarillo y la zona de control endémico en verde oscuro y anaranjado (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020).

En México se estima que hay ~24,973,983 bovinos en riesgo (Rodríguez Vivas et al., 2017). En términos monetarios se estima que las infestaciones de garrapatas causan por sí mismas una pérdida de producción en la industria de carne y lácteos equivalente a aproximadamente \$573'608'076 USD al año (Rodríguez Vivas et al., 2017). Además, hay pérdidas económicas en las industrias de la piel y el ganado de producción (Betancur Hurtado y Giraldo-Ríos, 2016). Las técnicas inadecuadas de control de parásitos también causan pérdidas económicas a los trabajadores de la industria pecuaria. El principal problema son los bloqueos comerciales que se imponen a los productos en los que se detecta acumulación de fármacos y al mayor costo que tiene el tratamiento contra parásitos resistentes a los fármacos (Betancur Hurtado y Giraldo-Ríos, 2019).

1.2 Control de garrapatas

Por el impacto económico que las garrapatas causan en la industria ganadera es necesario desarrollar y llevar cabo estrategias para el control de la población de estos parásitos. Múltiples métodos se han desarrollado para poder llevar a cabo un control eficiente, como el uso de fármacos garrapaticidas, vacunas contra garrapatas, métodos de vigilancia y control integral.

Los fármacos garrapaticidas son el método de control de garrapatas más utilizado actualmente en la industria ganadera. En México, las lactonas macrocíclicas son el grupo de fármacos ixodicidas más utilizados (Rodríguez-Vivas et al., 2014), aunque también se usan en menor medida garrapaticidas arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas y piretroides (Manjunathachar et al., 2014). Las lactonas macrocíclicas más usados en la ganadería son la ivermectina y la moxidectina (Nolan, 2012).

Cada grupo de fármacos tiene un mecanismo de acción distinto. Las lactonas macrocíclicas actúan bloqueando los canales de cloro activados por GABA y glutamato en células nerviosas y células musculares (Fox, 2006). Estos fármacos tienen un elevado peso molecular por lo que no pueden atravesar la barrera hematoencefálica, por lo tanto, su uso es seguro en humanos y ganado para tratar infecciones por múltiples nemátodos o infestaciones por ácaros, entre los que se encuentran las garrapatas (Fox, 2006).

Las lactonas macrocíclicas sirven como antagonistas en receptores acoplados a canales iónicos, su función consiste en unirse a los receptores de manera irreversible. Los efectos a nivel celular varían dependiendo del fármaco, por ejemplo, la unión irreversible del dicloro-difenil-tricloroetano (DTT) a los receptores acoplados a canales de sodio impide que tras un estímulo la membrana pueda regresar a un potencial de reposo (Coats, 1990).

La ivermectina es otro fármaco introducido en el mercado como un antiparasitario de amplio espectro en 1981. Este fármaco tuvo un remarcable éxito comercial debido a su bajo costo y a su alta efectividad en el control de diversos helmintos intestinales y ectoparásitos (Fox, 2006; Rodríguez-Vivas et al., 2014). Adicionalmente, la viabilidad

de la ivermectina se mantiene durante periodos de 56 días en los que se logra registrar una eficacia mayor al 95% (Rodríguez-Vivas et al., 2014).

Otra ventaja del uso de fármacos es la diversidad de métodos mediante los cuales pueden ser aplicados al ganado, los que se usan más comúnmente son los baños por inmersión, baños por aspersion y aplicaciones inyectables (Aguilar-Tipacamu y Rodríguez-Vivas, 2003; Diario Oficial de la federación, 1995; Días Carrasco et al., 2000).

La inespecificidad de fármacos como la ivermectina y otras lactonas macrocíclicas permite controlar múltiples parásitos, sin embargo, también pueden afectar a especies benéficas, como insectos polinizadores (Días Carrasco et al., 2000). La ivermectina además de ser estable en el hospedero, también puede permanecer en el ambiente. Estos fármacos pueden mantener su efectividad en heces de ganado tratado (Días Carrasco et al., 2000; Fox, 2006) y en el suelo de terrenos en los que se han llevado a cabo baños garrapaticidas (Aubry y Geale, 2011; Colovic et al., 2013). El uso contante y la prolongada viabilidad han llevado a una acumulación de una amplia gama de fármacos garrapaticidas en el suelo y en los productos de origen bovino, lo cual representa potenciales problemas de salud para la flora y fauna silvestre y para los consumidores de los productos antes mencionados (Betancur Hurtado y Giraldo-Ríos, 2019; Chicoine et al., 2007).

El uso desmedido de fármacos garrapaticidas y su acumulación en el ambiente han dado lugar a la aparición de cepas de garrapatas resistentes a los fármacos. Las malas prácticas en el uso de estos productos como: baños frecuentes, el uso de un solo fármaco por periodos prolongados y el almacenamiento de los químicos, aceleran el ritmo en el que las cepas resistentes aparecen y se seleccionan por encima de las susceptibles (Dantas-Torres, 2008; George, 2000). En México en los 1980s las garrapatas resistentes a los acaricidas organofosforados fueron las primeras en ser descritas. La existencia de estas cepas resistentes llevó a la introducción de uso generalizado de fármacos piretroides (Amitraz fue el más popular), hasta el periodo entre 1993 y 2001 donde se reportaron casos de garrapatas resistentes a este tipo de fármacos (Rodríguez-Vivas et al., 2014). En 2017, las cepas resistentes a múltiples drogas tuvieron un marcado aumento de prevalencia en México y en zonas de

cuarentena y erradicación de la frontera de Texas, EUA., afectando tanto al ganado como a fauna silvestre (Thomas et al., 2020). La prevalencia de cepas multirresistentes han aumentado en muestras recolectadas de un 5% hasta un 50% en el periodo de 2008 a 2017 (Thomas et al., 2020).

Las estrategias de control de garrapatas en las que se utilizan solo fármacos comenzaron a perder efectividad con la aparición de cepas resistentes a los garrapaticidas. Las vacunas fueron vistas como una alternativa viable como método de control efectivo de garrapatas en el ganado bovino. El primer antecedente de una inmunización exitosa fue el del uso de un macerado de *R. microplus* para inmunizar bovinos libres de garrapatas, en los que se observó una disminución en el peso de las garrapatas alimentadas de bovinos inmunizados en comparación con las que se alimentaron de un bovino no inmunizado (Willadsen et al., 1995). La vacuna de macerado tenía la desventaja de no poseer un antígeno específico que brindara resultados consistentes, razón por la cual comenzaron a buscarse proteínas específicas que sirvieran como antígenos vacunales (Willadsen et al., 1995). La proteína Bm86 fue aislada de una fracción de células intestinales de *R. microplus*, el gen fue secuenciado y su estructura fue descrita entre 1989 y 1992. Bm86 fue expresada de manera recombinante y usada exitosamente como antígeno de vacunas contra garrapatas por grupos de investigación en Australia y Cuba a principios de los años 90s (Canales et al., 1997; Willadsen et al., 1995). La vacuna desarrollada por el grupo cubano se comercializó con el nombre de GAVAC® y fue probada con éxito en múltiples países de Latinoamérica (Canales et al., 1997).

Los animales inmunizados con vacunas contra garrapatas desarrollan una protección contra estos ectoparásitos, lo que conlleva a la reducción de las infestaciones (Manjunathachar et al., 2014). Esta reducción de la infestación ocurre cuando los anticuerpos que se encuentran en la sangre ingerida bloquean proteínas del epitelio intestinal, impidiendo el funcionamiento correcto de las células y causando daños tisulares en el intestino de la garrapata (Bastos et al., 2010; Willadsen et al., 1995). Las garrapatas alimentadas con sangre de animales inmunizados se ven afectadas de múltiples maneras como en la disminución de peso y viabilidad tras terminar su alimentación (Bastos et al., 2010), en la disminución de la viabilidad y el peso de la

masa de huevecillos (Olds et al., 2012) y en el impedimento para la muda de ninfas a adultos (Bastos et al., 2010).

Las vacunas son un método de control de garrapatas que ofrece una alta efectividad con costos relativamente bajos (Manjunathachar et al., 2014). La aplicación de vacunas reduce la necesidad del uso de fármacos en baños garrapaticidas constantes, lo cual reduce el costo del control de estos parásitos. La aplicación de inmunizaciones ha logrado disminuir la frecuencia entre tratamientos químicos de entre 7 a 21 días a intervalos de entre 120 a 1095 días (Suárez Pedroso et al., 2007). Otra ventaja del uso de vacunas es que no hay generación de cepas resistentes, como ocurre con las cepas resistentes a fármacos tras usos repetidos del mismo tratamiento químico (De La Fuente y Kocan, 2006). Las vacunas basadas en antígenos que no se encuentren naturalmente expuestas al sistema inmune del hospedero (por ejemplo, proteínas de células intestinales, como Bm86), son las que menos probabilidades tienen de generar resistencia ya que es menos probable que las garrapatas desarrollen mecanismos de evasión de la respuesta inmune como lo harían con antígenos constantemente expuestos (como proteínas de glándulas salivales) (Manjunathachar et al., 2014). Otra de las ventajas de las vacunas es que evitan la acumulación de productos químicos en el suelo o en la carne y leche, lo cual disminuye los riesgos para la salud de los consumidores y de los animales tratados (Rosario Cruz y Dominguez García, 2009).

La principal desventaja del uso de vacunas contra garrapatas es la necesidad de inmunizaciones constantes para mantener títulos de anticuerpos suficientes para conferir protección contra los ectoparásitos. Por ejemplo, para tener la mayor efectividad posible con la vacuna TickGARD™ se requieren 4 inmunizaciones consecutivas para un periodo de 12 semanas (Olds et al., 2012). Otra desventaja de las vacunas comercialmente disponibles es que se basan en antígenos poco conservados entre múltiples cepas de garrapatas. El uso de antígenos poco conservados impide el uso de la vacuna en regiones en donde son prevalentes las cepas que expresen variantes de la proteína diferentes a las de la vacuna, o donde habitan múltiples cepas que expresen diferentes antígenos (Manjunathachar et al., 2014).

TickGARD™ y GAVAC™ son las primeras vacunas comerciales, basadas en Bm86, que han sido aplicadas con éxito como parte de programas de control integral en Australia y algunas regiones de Latinoamérica (Ueti et al., 2008; Willadsen et al., 1995). Sin embargo, la alta variabilidad de BM86 ha hecho necesario desarrollar nuevas vacunas comerciales basadas en la variante de BM86 expresadas por las cepas prevalentes en regiones en las que no pueda aplicarse TickGARD™ o GAVAC™. La vacuna Bovimune Ixovac™ (Lapisa, México) es utilizada actualmente en México con resultados favorables para el control inmunológico de *R. microplus*.

El concepto de “Una Salud” consiste en abordar la salud humana, veterinaria y el cuidado del medio ambiente de manera integrada bajo la perspectiva del cuidado de la salud del ecosistema (Gyles, 2016). Para integrar este concepto al control integral de las garrapatas es necesario conocer factores del ecosistema que afecten la eficacia con la cual las garrapatas pueden encontrar hospederos y completar su ciclo de vida. En el ámbito doméstico y de pequeños productores ganaderos, los métodos de vigilancia de los vectores han sido utilizados para determinar cuáles son estos factores y como tomar ventaja de ellos para disminuir la severidad de las infestaciones y aplicar más eficazmente métodos de control químico. Estos métodos consisten en esfuerzos comunitarios para evitar el establecimiento de garrapatas en hogares y potreros (Álvarez-Hernández et al., 2017). Las bióticos y abióticos presentes en las unidades de producción influyen en la carga parasitaria que presentan los bovinos. Por ejemplo, factores como temperaturas altas, humedad relativa elevada, baja radiación solar y forraje de monocultivo tienen alta correlación con altas cargas parasitarias (Salazar B. et al., 2016). La carga parasitaria en los hospederos depende también de que la raza de bovinos presentes en el potrero sea susceptible a las especies de garrapatas presentes (Ramón et al., 2012; Salazar B. et al., 2016).

Un método control integral de garrapatas basado en la aplicación de la vacuna Gavac™ se implementó de manera exitosa en Cuba a mediados de los 90s. Este programa consiste en la inmunización de los bovinos, y en la reducción del uso de baños garrapaticidas. Como se menciona previamente, la inmunización disminuye gradualmente la población de garrapatas y se reduce la aparición de cepas resistentes con los baños aplicados con menos frecuencia y se reducen los costos destinados al control de las garrapatas. Adicionalmente, al conocer las características de los

potreros, los bovinos y los vectores, los ganaderos de Latinoamérica han aplicado métodos de control integral básicos como el movimiento controlado de bovinos a zonas con menor presencia de garrapatas en distintas épocas del año (Drexler et al., 2014) o la crianza de cruza de mayor producción de carne y lácteos que presenten también una alta resistencia natural a las garrapatas (Shyma et al., 2013).

El programa de control integral tuvo éxito en Cuba, Venezuela, Brasil y Colombia (Suárez Pedroso et al., 2007). Sin embargo, en México no tuvo éxito debido a la alta variabilidad que hay entre la proteína Bm86 recombinante de Gavac™ y la expresada por las cepas mexicanas de *R. microplus*. Esta limitante fue superada con el desarrollo de vacunas formuladas a partir de Bm86 recombinante altamente conservada en comparación con la proteína de las cepas presentes en México (Ixovac) (Lapisa, 2016). Las vacunas basadas en Bm86 aún tienen la desventaja intrínseca de estar basadas en una proteína poco conservada entre múltiples cepas de garrapatas, lo cual impide su uso y distribución a gran escala, sin mencionar que su efectividad en otras especies de garrapatas es muy limitada (Olds et al., 2012). Las limitaciones de las vacunas basadas en Bm86 han hecho necesario buscar nuevos candidatos vacunales.

2 Antecedentes particulares

2.1 Nuevos candidatos vacunales

Los nuevos candidatos vacunales deben cumplir una serie de características para poder ser usados de manera eficiente en el control integral de garrapatas y las enfermedades que éstas transmiten. De acuerdo al concepto de “vaccinómica”, es necesario entender las interacciones moleculares de las tres partes que participan en las infestaciones de garrapatas: los hospederos, los vectores y los patógenos (De la Fuente y Merino, 2013). La primera característica importante es que el antígeno usado como nuevo candidato vacunal debe tener proteínas homólogas en las especies de garrapatas de interés en salud animal y ser altamente conservado en estas especies. Otra característica importante es la inmunogenicidad del candidato vacunal, ya que, si los hospederos generan anticuerpos específicos, se puede conferir protección contra todas las especies que expresen homólogos conservados del antígeno usado en la vacuna. Las últimas dos características que deben cumplir tienen que ver con el efecto que los anticuerpos causan en las garrapatas y los patógenos. En el vector, el bloqueo

del antígeno con los anticuerpos debe interferir con funciones vitales de la garrapata (como absorción de nutrientes y/o reproducción), a la vez que debe interferir con la interacción vector-patógeno, impidiendo que los microorganismos transmitidos por el vector completen su ciclo de vida (De la Fuente y Merino, 2013) (Figura 4).

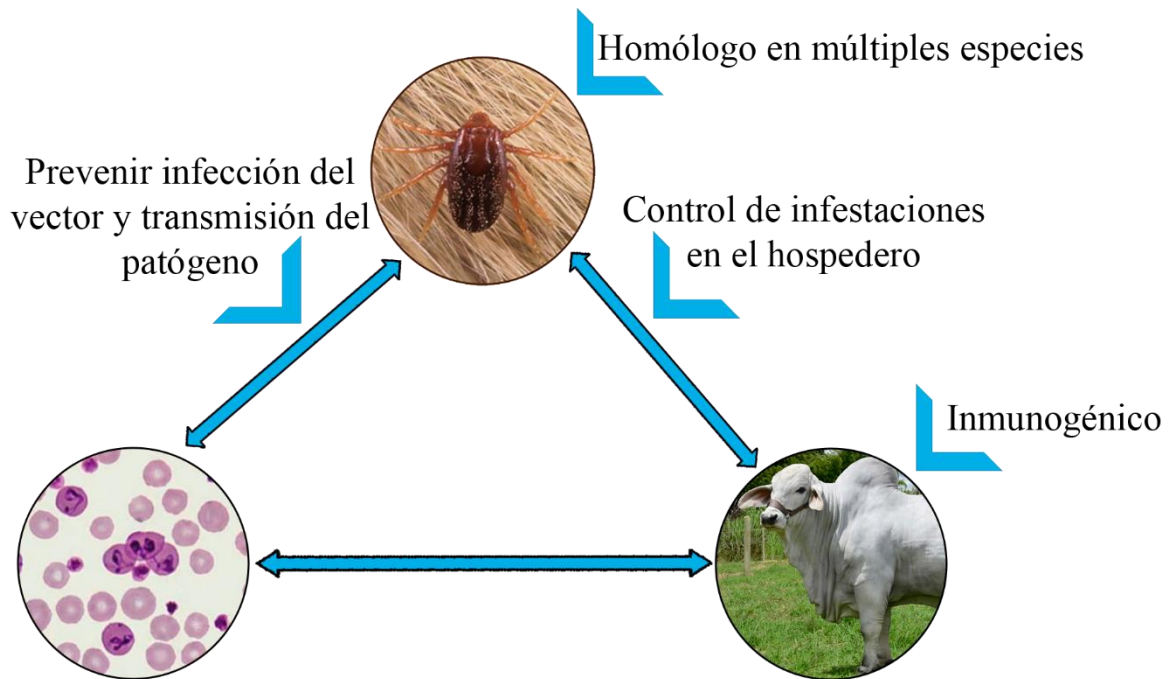


Figura 4: Características que debe cumplir una proteína para considerarse un candidato vacunal ideal contra garrapatas en bovinos. 1) Ser inmunogénico en bovinos. 2) Múltiples especies de garrapatas deben expresar proteínas homólogas altamente conservadas. 3) Los anticuerpos generados contra este antígeno deben controlar las infestaciones en la población de bovinos. 4) Se debe prevenir la infección de patógenos en el vector que los transmite.

Las aproximaciones proteómicas son ampliamente usadas en la búsqueda de posibles candidatos vacunales. Generalmente, las búsquedas se enfocan en proteínas sobreexpresadas en las primeras 24 horas post-infestación o post-repleción (Rego et al., 2019). Otra opción es la identificación de proteínas de las garrapatas que se encuentren interactuando con proteínas del patógeno mediante metodologías como ensayos de doble híbrido, cross-linking, overlay, etc. (Artigas-Jerónimo et al., 2018; Hernández Aparicio, 2020; Rego et al., 2019; Rodríguez-Hernández et al., 2012). Las proteínas identificadas en estos ensayos deben ser caracterizadas para poder comparar las secuencias con homólogos de otras especies y determinar si se

encuentran altamente conservados. Las proteínas altamente conservadas son expresadas de manera recombinante y usadas para ensayos de inmunización. En los ensayos de inmunización se busca replicar la resistencia natural a las garrapatas que algunos bovinos desarrollan después de ser infestados (Rego et al., 2019).

Los resultados positivos obtenidos de la aplicación de las vacunas basadas en la proteína Bm86 de *R. microplus* fueron los antecedentes en la búsqueda de vacunas basadas en proteínas homólogas de otras especies. Sin embargo, estas vacunas basadas en homólogos de Bm86 no han tenido éxito al no poder generar una respuesta inmune capaz de disminuir la viabilidad de las garrapatas alimentadas de sangre de animales inmunizados. Un ejemplo fue el uso de los homólogos recombinantes de Bm86 de *Ixodes ricinus*: Ir86-1 e Ir86-2. El uso de estas proteínas como antígenos tuvo poco éxito a causa de las diferencias entre los ciclos de vida de *I. ricinus* y *R. microplus*, específicamente a la menor duración del ciclo de vida de *I. ricinus* (Rego et al., 2019).

TROPSA es una proteína altamente conservada expresada en la membrana de células del intestino de múltiples especies de garrapatas (Artigas-Jerónimo et al., 2018). TROPSA participa en la interacción con proteínas de varios patógenos y les permite internalizarse en las células intestinales (Rego et al., 2019). La proteína de superficie exterior A (OspA) de *Borrelia burgdorferi* es un ejemplo de proteína usada por un patógeno para interactuar con TROPSA (Artigas-Jerónimo et al., 2018). El silenciamiento de TROPSA con iRNA disminuyó la interacción de *B. bigemina* con células intestinales (Rego et al., 2019). A pesar de su alto grado de conservación y su papel en la interacción con patógenos, el uso de TROPSA como antígeno recombinante se descartó como consecuencia de un 0% de efectividad global (disminución de peso y viabilidad de garrapatas alimentadas o de los huevecillos ovipositados y disminución de la infección en el vector) (Merino et al., 2013).

Una aproximación diferente fue el uso de proteínas involucradas en la adhesión de la garrapata al hospedero. SILK es una proteína flageliforme homóloga a las proteínas que las arañas de la familia Araneidae expresan en sus glándulas ampollaceas, mientras que *R. microplus* produce SILK en las glándulas salivales. La expresión de SILK en *R. microplus* aumenta cuando la garrapata se alimenta de sangre infectada con *A. marginale*, pero disminuye cuando se alimenta de sangre infectada con *B.*

bigemina o coinfectada con ambos patógenos (Merino et al., 2013). SILK ha sido probada como antígeno vacunal mostrando resultados de efectividad global del 62%.

Otro candidato vacunal que ha sido evaluado con éxito es subolesina, un factor de transcripción expresado en garrapatas homólogo a la akirina expresada en insectos (Contreras y de la Fuente, 2016). Subolesina y akirina son factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune y la remodelación de cromatina (Artigas-Jerónimo et al., 2018). A diferencia de SILK, la expresión de subolesina aumenta cuando hay infección tanto de *A. marginale* como de *B. bigemina*, además, se ha observado un porcentaje de efectividad global de 70% en garrapatas alimentadas de sangre de bovinos inmunizados con subolesina recombinante (Merino et al., 2013).

Las vacunas quiméricas son una opción que también ha sido abordada en ensayos de vacunación. Q38 es una de las vacunas quiméricas probadas con mayor éxito para el control de múltiples vectores. Q38 está compuesta de múltiples epítopos B conservados de subolesina y akirina (Contreras y de la Fuente, 2016). La inmunización con Q38 ha tenido efectos variados dependiendo de la especie de garrapata estudiada. El porcentaje de efectividad global es de 99% en *I. ricinus*, 75% en *R. microplus* y 46% en *I. ricinus* (Contreras y de la Fuente, 2016).

La efectividad dispar contra múltiples especies de garrapatas que mostró la inmunización con Q38 ha hecho necesario la búsqueda de otro candidato vacunal que tenga un alto porcentaje de efectividad similar entre múltiples especies de garrapatas. El canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) es una proteína con gran potencial de uso como antígeno vacunal. VDAC cumple con las características necesarias para ser considerado como candidato vacunal (Shoshan-Barmatz et al., 2010; Shoshan-Barmatz, De, et al., 2017): tiene funciones importantes para la supervivencia de la garrapata, un alto grado de conservación entre especies de garrapatas y con participar en la interacción vector-patógeno (Rodríguez-Hernández et al., 2012, 2015).

2.2 Canal de aniones dependiente de voltaje

En mamíferos, VDAC se localiza principalmente en la membrana externa mitocondrial, sin embargo, es posible que se relocalice hacia otros organelos. VDAC tiene la capacidad de modular su conductancia, selectividad y permeabilidad con base en el potencial de membrana, modificaciones postraduccionales (MPTs) e interacción con

otras proteínas (Bouyer et al., 2011), lo cual le permite llevar a cabo una gran variedad de funciones. La principal función de este canal es el transporte de iones, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- y OH^- . Este canal también transporta moléculas pequeñas involucradas en el metabolismo energético, como ATP, ADP, piruvato, succinato, y citocromo C (Shoshan-Barmatz et al., 2010; Shoshan-Barmatz, De, et al., 2017). VDAC también participa en la regulación de la apoptosis mediante la liberación de citocromo C de la matriz mitocondrial hacia el citoplasma. Dependiendo de las proteínas con las que interaccione, VDAC puede tener un papel pro-apoptótico (Bax y Bak) o anti-apoptótico (Bcl-2, Bcl-xL y hexoquinasa) (Shoshan-Barmatz, De, et al., 2017). Además, otras proteínas como la hexoquinasa o la tubulina usan a VDAC como un punto de anclaje a la mitocondria (Shoshan-Barmatz et al., 2010; Shoshan-Barmatz, De, et al., 2017).

VDAC es usada por múltiples patógenos como un punto de interacción con las células de su hospedero. Parásitos como *Mycobacterium avium* y *Encephalitozoon hellem* expresan en la superficie de sus vacuolas las proteínas MmpL4 y Ehssp1, respectivamente. La unión de mmpL4 a VDAC promueve la oligomerización del canal, lo que permite a *M. avium* exportar toxinas y lípidos micobacterianos. Este proceso está asociado a la patogenicidad y la supervivencia de la bacteria al permitir evadir los mecanismos de endocitosis y al sistema inmune (Danelishvili et al., 2017). Por otra parte, la proteína Ehssp1 de *E. hellem* le permite a este patógeno intracelular anclarse a VDAC cuando se encuentra localizado en la membrana para poder llevar a cabo el proceso de invasión celular y, una vez que el esporoplasma se encuentra en el citoplasma, Ehssp1 se ancla a VDAC localizado en la membrana externa mitocondrial para permitir a *E. hellem* aprovechar el metabolismo energético de su célula hospedera (Han et al., 2019).

Algunos patógenos son capaces también de relocalizar y modular la expresión de VDAC. El virus dengue (DENV) expresa la proteína estructural DENV E, la cual es capaz de unirse a la proteína chaperona GRP78. Durante la infección de DENV, se observa una sobreexpresión de GRP 78 y una relocalización de VDAC a los sitios de replicación viral (sin cambiar los niveles de expresión de VDAC). VDAC es indispensable para la replicación de DENV, ya que si su expresión es silenciada con

siRNA la expresión de proteínas virales disminuye significativamente (Jitobaom et al., 2016).

Plasmodium falciparum, que es un parásito apicomplejo que comparte características con *Babesia spp*, al infectar eritrocitos requiere de canales iónicos de amplio espectro para el transporte de nutrientes y desechos con el medio extracelular. El complejo periférico receptor de benzodiazepina (PBR, por sus siglas en inglés) consta de las proteínas VDAC, TSPO y ANT, las cuales poseen las características necesarias para transportar una amplia gama de metabolitos. En este complejo VDAC juega un papel importante debido a su multifuncionalidad. Los eritrocitos infectados con *P. falciparum* sobreexpresan el complejo PBR y relocalizan las proteínas que lo conforman a la membrana celular (Bouyer et al., 2011).

2.3 Isoformas de VDAC

Las isoformas son variantes alternativas de una misma proteína, pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas o con un alto porcentaje de identidad. Cada isoforma de una proteína puede tener algunas funciones y mecanismos de regulación únicos, así como otros compartidos entre varias isoformas y se expresan en diferentes proporciones (Perrin y Ervasti, 2010; Stastna y Van Eyk, 2012). Las isoformas de proteínas pueden generarse por cuatro mecanismos: expresión de diferentes copias de un gen, splicing alternativo, MPTs e isoformas de mRNA (Nelson et al., 2017; Stastna y Van Eyk, 2012).

Las isoformas de múltiples copias de genes son variantes de una misma proteína expresadas en genes diferentes. Cada isoforma tiene pequeñas variantes en su secuencia de aminoácidos (pueden tener un porcentaje de identidad mayor al 93%) (Perrin y Ervasti, 2010). Las isoformas de diferentes copias de genes pueden dar lugar a subisoformas mediante splicing alternativo o por MPTs (Shoshan-Barmatz et al., 2010).

En eucariontes, un mismo transcrito puede editarse durante el proceso de maduración dando lugar a distintos mRNA maduros que pueden incluir u omitir diferentes exones y sitios de poliadenilación. Los mRNA maduros editados se traducen en polipéptidos diferentes (Nelson et al., 2017). El splicing alternativo permite que los genomas eucariontes y virales expresen una diversidad de genes mayor a la que tendrían en

caso de codificar para una única proteína por cada gen. Las células pueden favorecer el procesamiento del mRNA durante la edición por splicing alternativo para dar lugar a una isoforma específica en respuesta a estímulos ambientales (Nelson et al., 2017).

Las MPTs son procesamientos enzimáticos que sufren las cadenas polipeptídicas después de ser traducidas de mRNA. La mayoría de proteínas que son susceptibles a modificarse típicamente contienen un péptido señal que les permite, inmediatamente después de ser traducidas, transportarse al retículo endoplásmico, en donde son modificadas (Nelson et al., 2017). Otras proteínas pueden ser modificadas en el citoplasma o en sitio celular en el que desempeñan su función (Lee et al., 2003). Dos de las principales MPTs capaces de modular la actividad y la interacción de las proteínas son las fosforilaciones y las acetilaciones. Las acetilaciones y fosforilaciones desempeñan un papel importante en la regulación de las vías de señalización en mamíferos. En humanos, el 30% de las proteínas fosforilarse y el 80% puede acetilarse (Ardito et al., 2017; Drazic et al., 2016)

La fosforilación es una modificación reversible en la que un grupo fosfato es añadido a una proteína en un residuo de serina, treonina o tirosina. Estas modificaciones son llevadas a cabo por enzimas cinasas y revertidas por fosfatasas. Las fosforilaciones tienen un papel que podría ser descrito como de “interruptores moleculares” que permiten activar o inhibir la actividad de algunas enzimas (Hernández et al., 2010). De igual manera, la fosforilación puede permitir la interacción de una proteína con otras moléculas (incluyendo otras proteínas), o bien, inhibir la interacción mediante impedimento estérico (Nelson et al., 2017).

Las acetilaciones son MPTs reversibles que consisten en la adición de un grupo acetilo proveniente de una molécula de acetil-CoA a un residuo de lisina (Ali et al., 2018). Si el residuo de lisina se encuentra en el extremo N-terminal del polipéptido, la modificación es irreversible. Las enzimas lisina acetiltransferasas (KAT) son las responsables de transferir los grupos acetilo a las proteínas, mientras que las enzimas lisina deacetilasas (KDAC) tienen la función de removerlos. La principal utilidad de la acetilación de proteínas es la generación de nuevos sitios de interacción con moléculas que reconocen específicamente sitios acetilados y neutralizando la carga de sitios con cargas parcialmente negativas (Ali et al., 2018).

Las isoformas de mRNA son ediciones alternativas en la longitud de la cola de poly(A) en el extremo 3' que el mRNA sufre durante el proceso de maduración. La variación en la longitud de la cola de poly(A) permite que un mensajero aumente su estabilidad si su afinidad es mayor a proteínas de unión al RNA (RBP) como HuR que disminuye la actividad de exonucleasas 3' o disminuya su estabilidad si es afín a la tristetraprolina, una RBP que recluta efectores con actividad degradativa del mRNA (Mayya y Duchaine, 2019).

Las isoformas de mRNA tienen también un papel en la determinación del sitio de expresión de la proteína alternativo a la expresión de un péptido señal. Este mecanismo consiste en ensamble del mRNA en una ribonucleoproteína (mRNP) formada por el mRNA y RBPs afines a una isoforma específica del mensajero. Estas mRNPs son transportadas por proteínas motoras a través del citoesqueleto hacia un sitio celular en el que son ancladas. Las mRNPs ancladas son disociadas mediante mecanismos como interacción del mRNA con otras proteínas o MPTs de las proteínas que conforman el complejo. Posteriormente, el mRNA es liberado y traducido en el sitio de anclaje (Mayya y Duchaine, 2019).

En modelos mamíferos como humano y ratón se han descrito 3 isoformas de VDAC por copias múltiples del gen. Estos genes se encuentran codificados en tres diferentes loci de distintos cromosomas (Shoshan-Barmatz et al., 2010). Otros organismos solo codifican una sola copia de VDAC y las isoformas son generadas únicamente mediante splicing alternativo o MPTs (Stastna y Van Eyk, 2012). Los genes que codifican para estas isoformas poseen múltiples intrones, lo que permite la expresión de sub isoformas mediante splicing alternativo (Shoshan-Barmatz et al., 2010). Las 3 isoformas de VDAC comparten características estructurales, funcionales y tienen ~70% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Shoshan-Barmatz, N. Maldonado, et al., 2017). La expresión diferencial de cada isoforma depende de la línea celular, los estímulos extracelulares y condiciones intracelulares (como concentración de Ca^{2+} o estrés oxidativo) (Messina et al., 2012; Reina et al., 2016).

El gen que codifica para *vdac1* en humano se encuentra en el cromosoma 5, contiene 9 exones y tiene una longitud de 30 kb. Esta isoforma tiene 3 exones que contienen regiones 5'-UTR alternas (exones 0, I y Ibis) y la secuencia codificante se encuentra

en los exones II al IX (Figura 5A). A diferencia de las otras dos copias, *vdac1* tiene un primer intrón extenso de 14.4 kb (Shoshan-Barmatz et al., 2010). Las isoformas generadas por splicing alternativo a partir de este gen solo varían en la región 5'-UTR del mRNA (Figura 5B, 5C y 5D). La región codificante del mRNA y la proteína traducida de las 3 subisoformas no tienen diferencia en su longitud (Shoshan-Barmatz et al., 2010; Shoshan-Barmatz, N. Maldonado, et al., 2017).

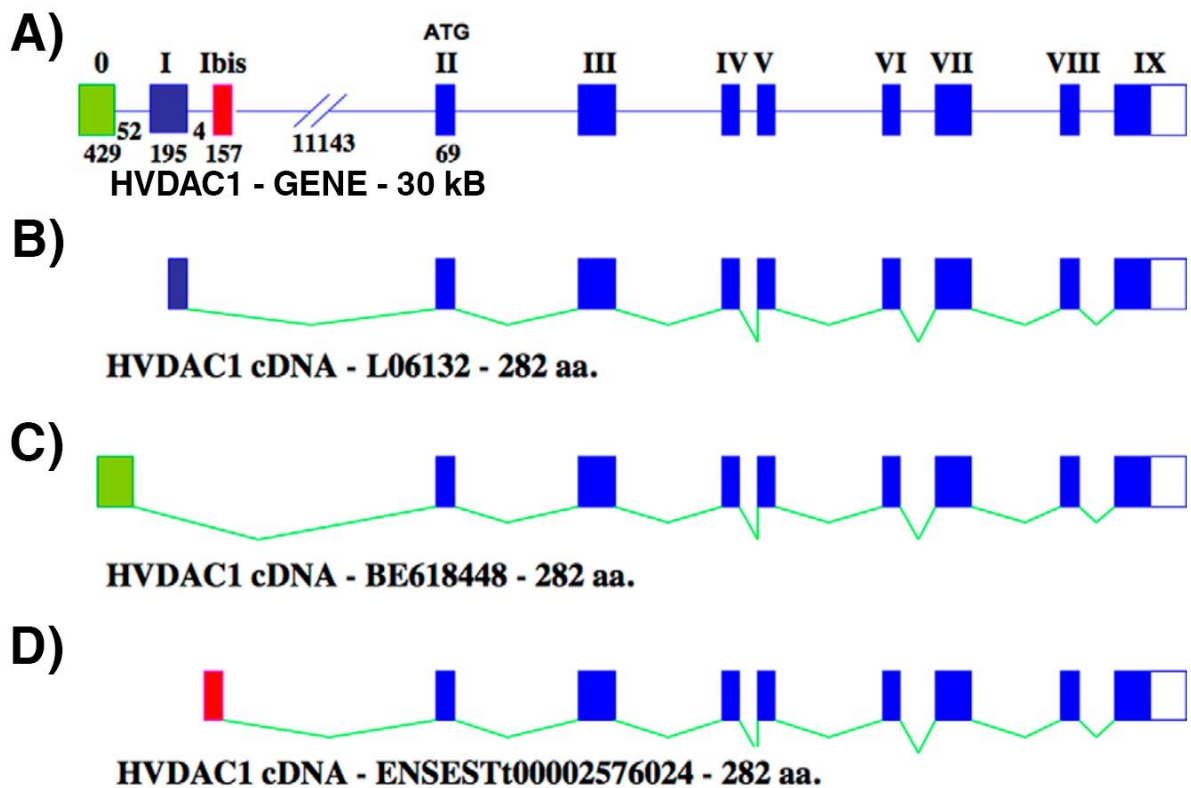


Figura 5: Estructura del gen de humano que codifica para *vdac1*. La estructura general del gen que codifica para *vdac1* incluye tres posibles sitios de inicio de la transcripción (A). Las subisoformas de *vdac1* generadas mediante splicing alternativo pueden incluir los exones 5' UTR I (B), 0 (B) o Ibis (C) (Imagen tomada y modificada de Shoshan-Barmatz et al., 2010).

VDAC1 es la isoforma más abundante en las células y es la que tiene mayor similitud en secuencia, estructura y funciones con otros organismos (Messina et al., 2012). Una de las funciones de VDAC1 es la modulación del tráfico de metabolitos entre el citoplasma y la mitocondria. La interacción de otras proteínas con VDAC1 influye en el papel que cumplirá. La misma isoforma de la proteína puede cumplir con roles

opuestos, por ejemplo, al interactuar con Bax, VDAC1 puede oligomerizarse y permitir la salida del factor de inducción de apoptosis (AIF) y citocromo-C (cit-C) al citoplasma, lo cual inicia la apoptosis mediante la vía de las caspasas. Por otro lado, la interacción con proteínas como las hexocinasas o Bcl-xL, VDAC1 se vuelve impermeable al paso de cit-C o AIF. (Shoshan-Barmatz, N. Maldonado, et al., 2017).

El efecto Warburg es un proceso en el que células cancerígenas usan como principal fuente de energía la glicólisis, mientras que el metabolismo mitocondrial disminuye o se apaga completamente (Maldonado, 2017). Durante este proceso, la interacción de la $\alpha\beta$ -tubulina con VDAC1 impide la entrada de sustratos de las reacciones de respiración celular (como el piruvato, por ejemplo). Al mismo tiempo, el cierre de VDAC por la interacción con $\alpha\beta$ -tubulina impide la salida de metabolitos inductores de apoptosis (Maldonado, 2017; Shoshan-Barmatz, N. Maldonado, et al., 2017). Estas funciones hacen que VDAC1 tenga un papel prominente en el metabolismo de células cancerígenas, especialmente en microambientes con menos concentraciones de oxígeno.

El gen que codifica para *vdac2* en humano se encuentra en el cromosoma 10, contiene 10 exones y tiene una longitud de 16.4 kb (Figura 6A). El gen *vdac2* puede generar 3 subisoformas mediante splicing alternativo. El gen codifica para 3 regiones N-terminal diferentes, el extremo N-terminal de la primer isoforma se encuentra codificado en los exones II y III (Figura 6B), el de la segunda se encuentra codificado en el exón IIbis (Figura 6C), la tercera isoforma es una variante corta codificada en los mismos exones que la segunda, pero se pierde un fragmento del exón IIbis (Figura 6D) (Shoshan-Barmatz et al., 2010).

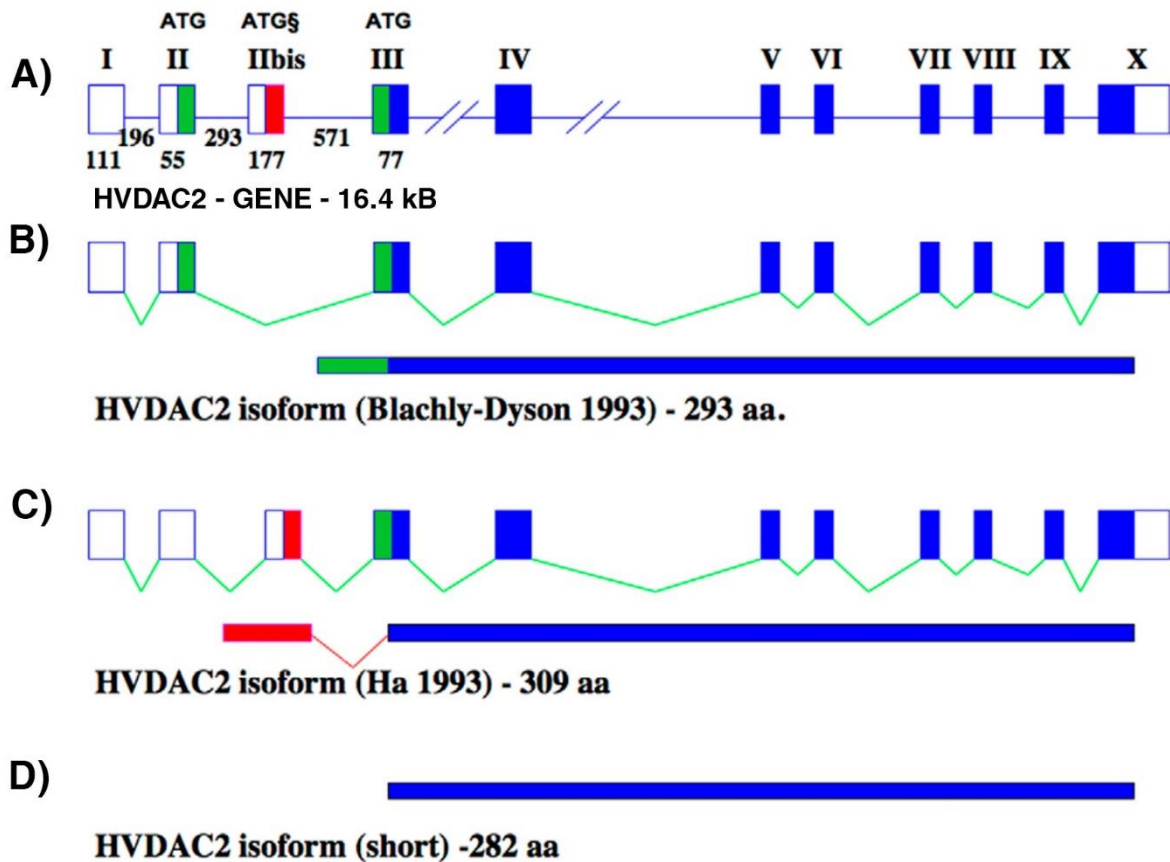


Figura 6: Estructura del gen de humano que codifica para *vdac2*. La estructura general del gen que codifica para *vdac2* incluye dos posibles sitios de inicio de la transcripción (A). Las subisoformas de *vdac2* generadas mediante splicing alternativo pueden incluir la región 5' UTR y el sitio de inicio de la transcripción en los exones II y III (B) o en los exones IIBis y III (esta subisoforma puede dar lugar a una variante larga de VDAC2 (C) o una variante corta (D) (Imagen tomada y modificada de Shoshan-Barmatz et al., 2010).

VDAC2 es la segunda isoforma más abundante en las células y es expresada mayormente en células de fases tempranas de la espermatogénesis (Messina et al., 2012). VDAC2 comparte muchas funciones realizadas por VDAC1 como su papel en el transporte molecular y en el metabolismo tipo Warburg en células cancerígenas. Sin embargo, VDAC2 tiene mayor afinidad por proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL. VDAC2 tiene un papel anti-apoptótico lo suficientemente importante como para imposibilitar la generación de ratones transgénicos deficientes para el gen de *vdac2*, mientras que sí ha sido posible generar ratones viables deficientes para los genes de *vdac1* y *vdac3* (Raghavana et al., 2015; Shoshan-Barmatz et al., 2010). De las 3 isoformas, VDAC2 es la que tiene un mayor contenido de cisteínas, esto le permite ser

oxidada por ROS con mayor facilidad. La oxidación de VDAC2 previene que las ROS causen daño en el núcleo y que se inicie de esta manera un proceso apoptótico mediante la vía intrínseca (Messina et al., 2012).

El gen que codifica para *vdac3* en humano se encuentra en el cromosoma 8, contiene 9 exones y tiene una longitud de 16.4 kb (Shoshan-Barmatz et al., 2010). VDAC3 no posee subisoformas generadas mediante splicing alternativo (Reina et al., 2016; Shoshan-Barmatz et al., 2010). La inserción de VDAC3 en membranas artificiales es menos eficiente en comparación con las otras 2 isoformas. De igual manera, VDAC3 no cambia su conformación a un estado cerrado al aplicar altos voltajes en pruebas electrofisiológicas, contrario a lo que sucede con VDAC1 y 2 (Reina et al., 2016).

Al igual que VDAC2, VDAC3 comparte la mayoría de sus funciones con VDAC1. La expresión de VDAC3 es más abundante en tejido testicular y desempeña un rol importante en el desarrollo de las gónadas, ya que se ha observado que los ratones machos transgénicos sin el gen de *vdac3* son infértiles (Reina et al., 2016; Shoshan-Barmatz et al., 2010).

VDAC3 posee 6 residuos de cisteína que pueden estar en un estado basal reducido u oxidarse a múltiples niveles (+1, +3, +5). El estado de oxidación de VDAC3 es un marcador de daño mitocondrial por ROS, dependiendo del número de residuos de cisteína oxidados y por el grado de oxidación de estos residuos, la maquinaria celular puede usar múltiples mecanismos para degradar las proteínas dañadas. El mecanismo que corresponde a un menor daño es la ubiquitinación de VDAC y su transporte al proteasoma, en caso de un daño "intermedio" se realiza un proceso de transporte vesicular de las proteínas dañadas al lisosoma y el mecanismo para daño más severo (un alto número de oxidaciones irreversibles) es un proceso de mitofagia (Reina et al., 2016).

VDAC3 tiene un papel importante en el metabolismo de células cancerígenas que presentan un fenotipo Warburg. VDAC3 tiene una menor afinidad por medicamentos anticancerígenos como la erastina, una droga que induce la apoptosis mediante la vía intrínseca funcionando de manera análoga a una proteína proapoptótica que favorece la liberación de cit-C. Una alta expresión de VDAC3 está asociada a fenotipos de resistencia de resistencia al cáncer (Reina et al., 2016).

Las tres isoformas de VDAC han sido identificadas y diferenciadas en extractos totales y mitocondriales de proteínas de varios tejidos de ratón. Al separar los extractos mediante SDS-PAGE: VDAC1 mostró una migración menor a la esperada, VDAC2 mostró una migración igual a la de VDAC1 a pesar de su mayor peso molecular y VDAC3 tuvo una migración mayor a la de las 2 anteriores (Shoshan-Barmatz et al., 2010). Al separar estos extractos mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE) se han observado múltiples variantes de cada isoforma con peso molecular igual, pero distinto punto isoeléctrico (Liberatori et al., 2004; Menzel et al., 2009).

Los patrones de migración y las variantes observadas en 2D-PAGE pueden ser explicadas por la presencia de isoformas de MPTs. VDAC puede ser modificado principalmente fosforilaciones o acetilaciones. Estas MPTs no alteran significativamente el peso molecular, pero si pueden alterar el punto isoeléctrico (PI) (Nelson et al., 2017). Cada isoforma es susceptible a diferentes modificaciones postraduccionales, algunas son compartidas entre varias isoformas, como las acetilaciones reversibles de los residuos de lisina 20, 28 y 61 que pueden ocurrir tanto en VDAC1 y VDAC3 (Shoshan-Barmatz et al., 2010).

Las MPTs desempeñan un papel regulatorio en las funciones que VDAC desempeña. Por ejemplo, la interacción de VDAC1 con $\alpha\beta$ -tubulina solo ocurre cuando VDAC se encuentra fosforilado. En el modelo propuesto por Sheldon et al., 2011, VDAC es fosforilado en el lado del canal con mayor contenido de secuencias consenso blanco para serina y treonina-cinasas, lado que además se encuentra expuesto al citoplasma cuando VDAC se inserta en la membrana externa mitocondrial, permitiendo las cinasas citoplásmicas. La interacción entre VDAC y la $\alpha\beta$ -tubulina se lleva a cabo en dos pasos, en el primer paso la tubulina interactúa con los residuos fosforilados en regiones no transmembranales del canal, para que posteriormente el extremo c-terminal de la tubulina (cargado negativamente) interactúe con la región del poro (cargada positivamente).

Una vía de señalización pro-apoptótica en la que participan AKT y GS3K- β como mediadores de la unión entre VDAC y la hexoquinasa 2 (HK2). La unión de VDAC y HK2 ocurre cuando VDAC es fosforilado por GS3K- β , esta unión tiene un efecto antiapoptótico al impedir la salida de cit-C al citoplasma. Sin embargo, AKT es capaz

de inactivar a GS3K- β al fosforilarlo, permitiendo que la mitocondria pueda liberar cit-C e iniciar así un proceso de apoptosis mediante la vía intrínseca (Raghavana et al., 2015). Los homólogos de VDAC en mamíferos cumplen funciones muy variadas sin tener múltiples sitios catalíticos de manera similar a las proteínas moonlighting (Rojas-Martínez et al., 2018).

2.4 Características de BmVDAC

Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de proteínas del intestino de *R. microplus*, que es la primera barrera que deben traspasar los parásitos para infectar a las garrapatas. En trabajos previos por ensayos proteómicos de overlay y espectrometría de masas, se identificó una de las proteínas de las células intestinales que interactúan con fases sexuales de *B. bigemina* inducidas *in vitro*. Esta proteína es el canal de aniones dependiente de voltaje de *R. microplus* (BmVDAC, por sus siglas en inglés) (Rodríguez-Hernández et al., 2012). Posteriormente, pruebas de RT-PCR y Western-Blot permitieron determinar que BmVDAC se sobreexpresa a partir de las 24 h post-infección, tanto a nivel de mRNA como de proteína, además se determinó que a partir de las 24 h post-repleción en garrapatas infectadas con *B. bigemina* ocurre una relocalización de BmVDAC (Figura 7) (Rodríguez-Hernández et al., 2015) de manera similar a lo que se observa durante la infección de *P. falciparum*. Este comportamiento de este canal iónico en respuesta a la infección de *B. bigemina* sugirió fuertemente que BmVDAC debía estar jugando una función durante el proceso de invasión del parásito al intestino de la garrapata.

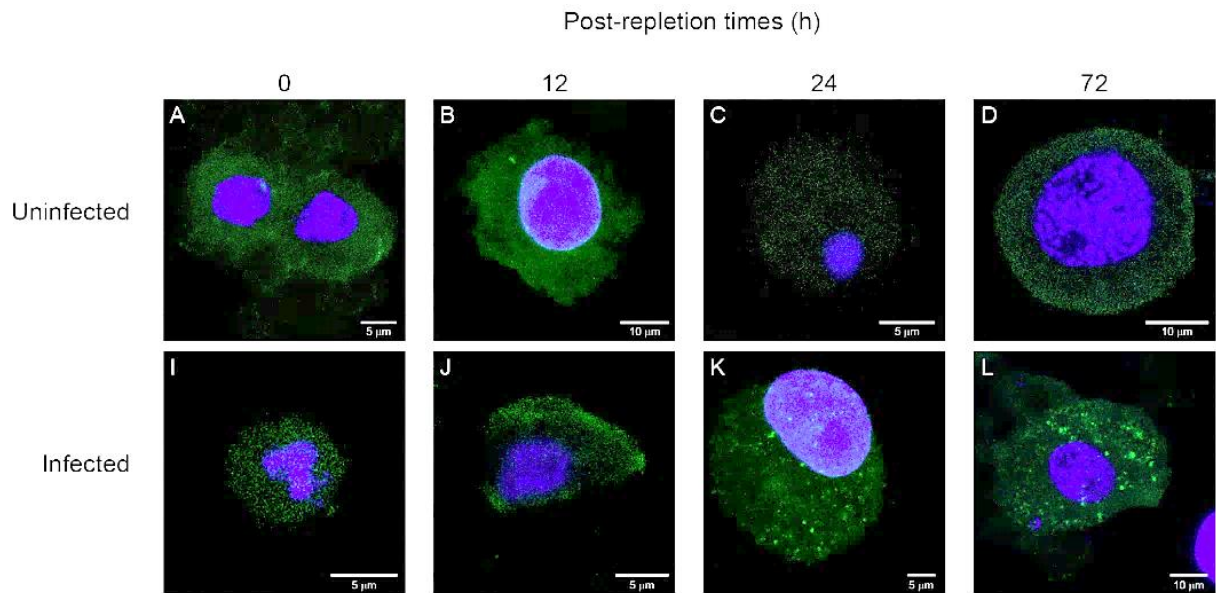


Figura 7: Cambios en la localización de BmVDAC durante la infección con *B. bigemina*. Las células de garrapatas infectadas y no infectadas fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos anti-BmVDAC de conejo. Posteriormente, las células fueron incubadas con anticuerpos anti-conejo conjugados con FITC. BmVDAC se muestra de color verde (FITC) y el núcleo de color azul (DAPI).

Con base en la premisa de que BmVDAC cumple con todas las características de un candidato vacunal, una prueba de inmunización con una vacuna basada en BmVDAC fue necesaria para determinar si BmVDAC podría conferir protección inmunológica contra las garrapatas. Esta prueba se llevó a cabo en tres grupos de bovinos: un grupo control de bovinos infectados inoculados con adyuvante sin antígeno, uno de bovinos infectados con *B. bigemina* e inmunizados con BmVDAC recombinante (rBmVDAC) (grupo 1) y uno de bovinos no infectados con *B. bigemina* e inmunizados con rBmVDAC (grupo 2) (Ortega-Sánchez et al., 2019). En ambos grupos inmunizados hubo una elevada respuesta de anticuerpos en comparación con el grupo control, con una respuesta humoral específica hacia los epítopos B de regiones de BmVDAC no conservadas en comparación con VDAC de *Bos taurus*, a pesar de que esta proteína tienen un ~59% de identidad con BmVDAC, esto indica que esta vacuna confiere protección específica contra la proteína de la garrapata (Ortega-Sánchez et al., 2019).

La vacuna disminuyó el número de garrapatas repletas colectadas de bovinos inmunizados. Además, las garrapatas repletas alimentadas de los bovinos y sus huevecillos tuvieron un peso disminuido en comparación del grupo control (Ortega-Sánchez et al., 2019).

Por otro lado, el número de garrapatas repletas, así como su peso y el peso de los huevecillos ovipositados fue mayor en el grupo 1 a comparación del grupo control, caso contrario al grupo 2, en el que disminuyó el número de garrapatas colectadas, su peso y el peso de los huevecillos. En general, la vacuna tuvo una efectividad global del 82%. Este resultado sugiere que los anticuerpos bloquean la proteína con la que interactúa *B. bigemina*, el patógeno no puede infectar las células intestinales y, por lo tanto, la garrapata se ve menos afectada por la infección (Ortega-Sánchez et al., 2019).

Los puntos tratados previamente aunados a los resultados de la prueba de vacunación indican que BmVDAC es un candidato vacunal ideal para disminuir la población de garrapatas y de enfermedades que éstas transmiten en poblaciones de bovinos inmunizados. Sin embargo, es necesario estudiar a mayor profundidad la función que BmVDAC desempeña durante la infección de *B. bigemina* en el intestino de la garrapata para entender por qué hay un comportamiento diferente de la vacuna dependiendo de si el bovino del que se alimentan las garrapatas se encuentra infectado o no con *B. bigemina*.

Con el objetivo de profundizar en la posible función de la proteína BmVDAC en nuestro grupo de trabajo se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IPP) usando un anticuerpo específico contra la proteína BmVDAC recombinante y extractos de intestinos de garrapatas infectadas con *B. bigemina* y no infectadas a diferentes tiempos post-repleción. A las 72 h postrepleción se obtuvo un complejo diferencial que, al analizarse por espectrometría de masas, reveló que BmVDAC se une al plasminógeno bovino (BtPg), lo que fue verificado posteriormente en ensayos de binding blot (Hernández Aparicio, 2020), sin embargo, no se observaron complejos cuando se realizaron ensayos de Pull Down usando BmVDAC recombinante con extractos de intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas a los mismos tiempos de repleción que en la IPP. Estos resultados nos permitieron hipotetizar que probablemente la proteína recombinante expresada en *Escherichia coli* carecía de modificaciones postraduccionales requeridas para su interacción con otras proteínas.

Por otra parte, en resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo, 3 spots fueron identificados en un Western-Blot de 2D-PAGE de extracto total de proteínas de

intestinos de garrapatas infectadas con *B. bigemina* a 72 h post-repleción usando anticuerpos anti-rBmVDAC (Figura 8).

Los spots observados tienen un peso molecular de ~30 kDa y el spot A tiene un punto isoeléctrico esperado para BmVDAC (punto isoeléctrico de 8.35). El menor punto isoeléctrico de los spots B y C sin un cambio en el peso molecular puede indicar la expresión de isoformas por modificaciones postraduccionales. La expresión de isoformas de BmVDAC a las 72 h post-repleción podría sugerir que la interacción con el Pg solo se haya observado en extractos de proteínas totales a las 72 h post-repleción debido a MPTs de BmVDAC, de manera análoga al mecanismo de interacción de VDAC con $\alpha\beta$ -tubulina o HK2 en mamíferos (Maldonado, 2017; Raghavana et al., 2015).

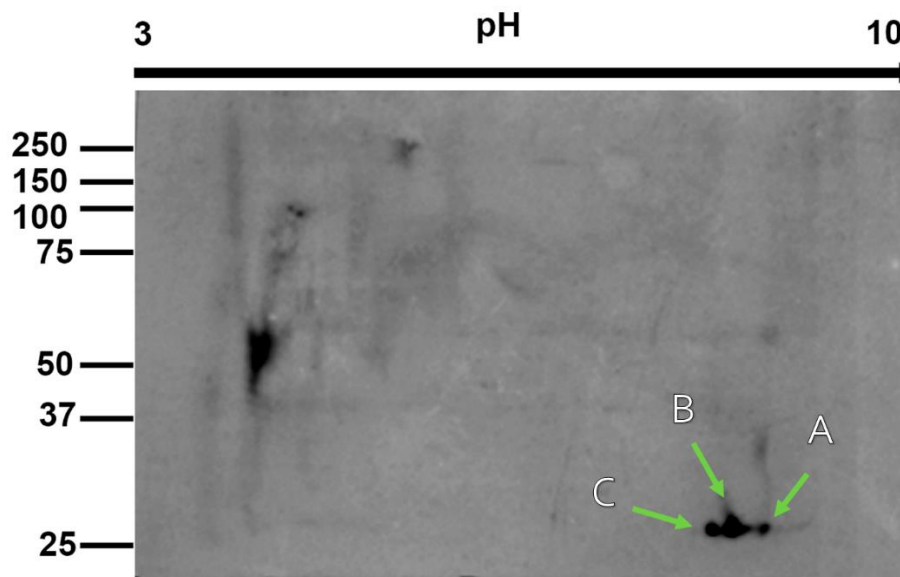


Figura 8: Western-Blot de 2D-PAGE de extractos de proteínas totales de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* a 72 horas post-repleción. 3 spots con peso molecular de ~30 kDa y diferentes puntos isoeléctricos (pH: A = 8.35, B = 7.86, C = 7.4) fueron identificados usando anticuerpos anti-rBmVDAC como anticuerpo primario.

La alta conservación de BmVDAC entre múltiples cepas y especies de garrapatas, así como su relevancia para el metabolismo de la garrapata y la viabilidad de su progenie, han hecho que BmVDAC se posicione como un importante candidato vacunal con resultados satisfactorios para el control de las garrapatas (Ortega-Sánchez et al., 2019).

La aplicación de una vacuna que use a BmVDAC como antígeno puede también integrar el control de *B. bigemina*, sin embargo, para que esto sea posible es necesario conocer la función que BmVDAC tiene en el proceso de invasión de *B. bigemina* a las células intestinales de la garrapata. La identificación y caracterización de las posibles isoformas de BmVDAC expresadas durante la infección con *B. bigemina* será un gran paso para integrar la información que ha sido obtenida en distintos proyectos de nuestro grupo de trabajo (Hernández Aparicio, 2020; Rodríguez-Hernández et al., 2012, 2015).

3 JUSTIFICACIÓN

Las infestaciones de *R. microplus* y los patógenos que esta garrapata transmite son de gran importancia en los campos de la salud animal y la industria ganadera. Debido al fallo en las estrategias de control integral en México, la búsqueda de métodos para lograr un control eficiente de estos ectoparásitos se ha vuelto una prioridad.

BmVDAC es un importante candidato vacunal por su relevancia para el metabolismo de la garrapata y para la interacción vector-patógeno con *B. bigemina*. La caracterización de las isoformas de BmVDAC permitirá entender mejor las posibles funciones de esta proteína en la interacción entre la garrapata y el patógeno e hipotetizar si en *R. microplus* BmVDAC podría ser una proteína con múltiples funciones, producto de la expresión de múltiples isoformas. Por todas las razones anteriores el presente trabajo se enfocará en la caracterización de posibles isoformas de la proteína BmVDAC que se expresen durante el proceso de infección de *R. microplus* con *B. bigemina*.

4 HIPÓTESIS

R. microplus expresa diferencialmente isoformas de BmVDAC en células intestinales durante la infección con *B. bigemina*.

5 OBJETIVO GENERAL

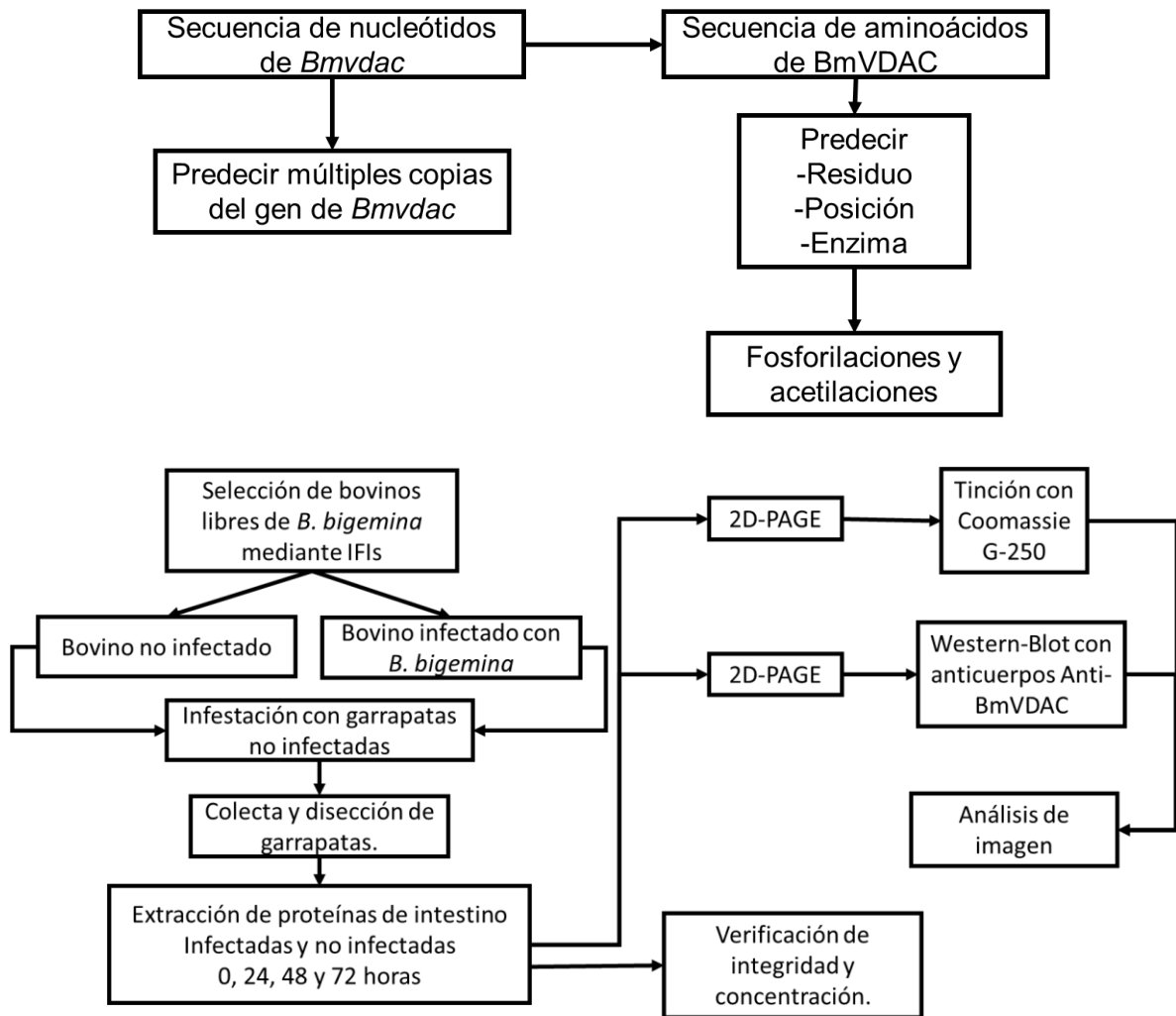
Identificar y caracterizar las isoformas de la proteína BmVDAC de *R. microplus* durante la infección con *B. bigemina*.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

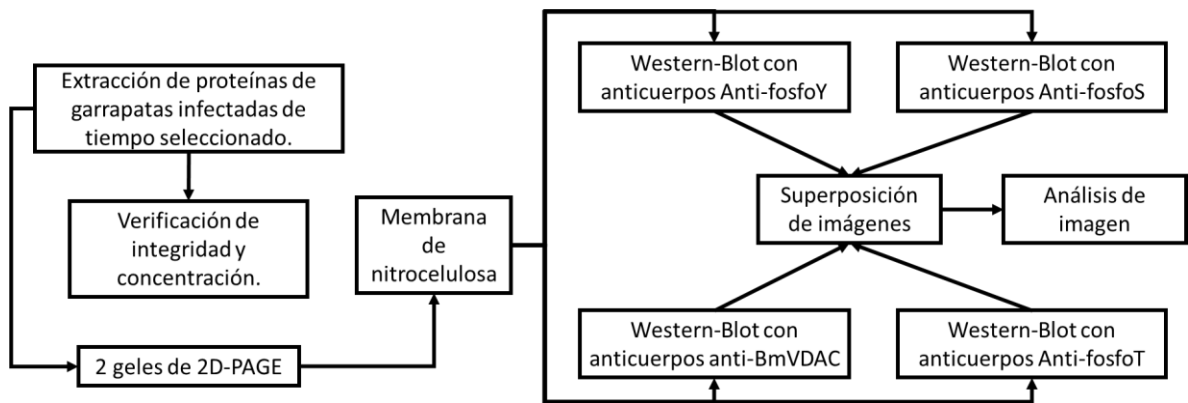
- 1.- Caracterizar *in silico* las posibles isoformas de BmVDAC e identificarlas en extractos de proteínas de intestinos de *R. microplus*.
- 2.- Analizar la expresión diferencial de las isoformas de BmVDAC en intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* a diferentes tiempos post-repleción.
- 3.- Predecir *in silico* el papel de las MPTs de BmVDAC en la interacción con el plasminógeno bovino.
- 4.- Proponer un modelo de la posible función de al menos una de estas MPTs de BmVDAC en interacción con el plasminógeno bovino.

7 Estrategia experimental

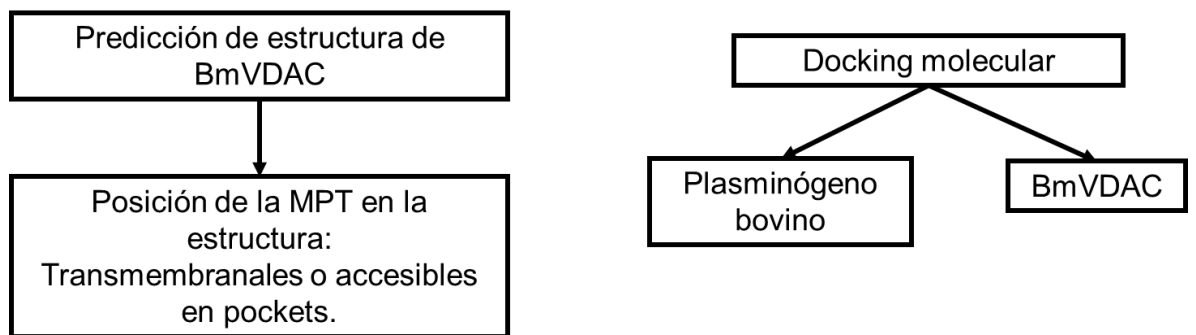
7.1 Objetivo 1: Caracterizar *in silico* las posibles isoformas de BmVDAC e identificarlas en extractos de proteínas de intestinos de *R. microplus*.



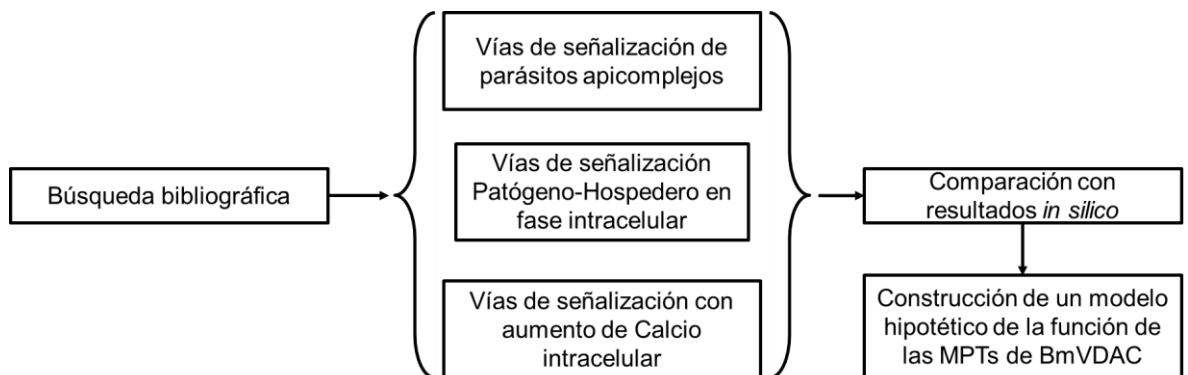
7.2 Objetivo 2: Analizar la expresión diferencial de las isoformas de BmVDAC en intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* a diferentes tiempos post-repleción.



7.3 Predecir *in silico* el papel de las MPTs de BmVDAC en la interacción con el plasminógeno bovino.



7.4 Proponer un modelo de la posible función de al menos una de estas MPTs de BmVDAC en interacción con el plasminógeno bovino.



8 Materiales y métodos

8.1 Objetivo 1: Caracterizar *in silico* las posibles isoformas de BmVDAC e identificarlas en extractos de proteínas de intestinos de *R. microplus*.

8.1.1 Determinar la presencia de múltiples copias del gen de *Bmvdac*

Una base de datos local consta de entradas almacenadas en la misma computadora en la que se realizan los análisis, sin necesidad de acceder a un servidor. Una base de datos local de búsqueda del genoma de *R. microplus* fue generada usando los contigs del genoma no ensamblado con el programa CLC Genomics Workbench (Qiagen Bioinformatics). La secuencia de nucleótidos de *Bmvdac* se usó como secuencia de búsqueda para determinar la presencia de múltiples copias de *Bmvdac*. Al realizar la búsqueda de BLAST en una base de datos de contigs, se espera no observar múltiples coincidencias de la base de datos con la misma región de la secuencia.

Posteriormente, esta búsqueda se repitió contra el genoma ensamblado de *R. microplus* (Jia et al., 2020) usando el servidor web NCBI BLAST, usando *Bmvdac* como secuencia de búsqueda y restringiendo la búsqueda indicando el genoma de *R. microplus* como base de datos de búsqueda (número de acceso de GenBank: GCA_013339725.1).

Una búsqueda similar se realizó con el fin de tener un punto de comparación con otra especie de garrapata con genoma secuenciado. Esta consulta se realizó usando *Bmvdac* como secuencia de búsqueda en la herramienta BLAST de la base de datos VectorBase, restringiendo la consulta al genoma de la garrapata *I. scapularis* (número de acceso de GenBank: GCA_000208615.1).

8.1.2 Predicción de sitios de acetilación y fosforilación en BmVDAC

La predicción de sitios fosforilados fue realizada usando los programas GPS 5.0 (Xue et al., 2011) y NetPhos 3.0 (Blom et al., 1999). Los programas usados para realizar la predicción residuos fosforilados fueron GPS-PAIL (Deng et al., 2016) y ASEB (Likun Wang et al., 2012). Los parámetros usados fueron distintos dependiendo del programa de predicción utilizado. Los resultados de ASEB fueron filtrados tomando en cuenta la predicción con el p-value más bajo para los resultados de cada KAT disponible en el programa. Los resultados de GPS-PAIL fueron filtrados usando el umbral medio de

calificación incluido en las opciones del programa. En GPS se usó la opción de umbral de calificación alto. Con NetPhos se utilizó la opción de umbral medio del programa.

Los residuos predichos por ambos programas para su respectiva MPT fueron referidos como residuos modificados predichos consenso (RMPC). Únicamente los RMPCs fueron incluidos en los análisis subsecuentes. Los RMPC que los programas indicaron que son modificados por enzimas que no tienen homólogos en garrapatas fueron descartados.

8.1.3 Selección de bovinos libres de *B. bigemina*

Seis becerros de raza Holstein con peso menor a 250 kg fueron seleccionados para realizar pruebas de inmunofluorescencias indirectas (IFIs) para determinar que estuvieran libres de *B. bigemina*. Las inmunofluorescencias se realizaron por duplicado sobre laminillas de frotis sanguíneos de bovinos infectados con *B. bigemina* con parasitemia del 21%. Los frotis se fijaron con solución fijadora (etanol al 95%, ácido acético glacial 5%) durante 5 minutos a -20°C. Las laminillas fijadas se lavaron con PBS y se incubaron con solución de permeabilización (tritón 0.1%, PBS 1X). Después de permeabilizar, las laminillas se lavaron con PBS y se incubaron con los sueros de los bovinos candidato y los controles (anticuerpo primario) en concentración 1:80. Como control negativo se usó suero de bovino no infectado y como control positivo se usó suero de bovino infectado con *B. bigemina*. Las laminillas con anticuerpos se incubaron a 37°C durante 1 hora en agitación ligera protegidas de la luz. Posteriormente, las laminillas fueron lavadas 3 veces con PBS y 2 veces con agua desionizada. Después del lavado, las laminillas se incubaron con anticuerpos anti-bovino marcados con Alexa Fluor 488® (Jackson ImmunoResearch, EUA) en dilución 1:200 en ausencia de luz a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, se repitió el paso de lavado anterior. La visualización de las muestras se llevó a cabo con un microscopio de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 490 nanómetros y un filtro de 525 nm. Seis campos de cada frotis se observaron con un objetivo 100X, el bovino se consideró como negativo al no lograrse observar eritrocitos con merozoitos en ninguno de los campos visualizados.

8.1.4 Colecta y disección de garrapatas.

Dos bovinos libres de *B. bigemina* fueron infestados con 1 g de larvas de *R. microplus* cepa Media Joya. Uno de los bovinos fue esplenectomizado a los 16 días post-infestación. El bovino esplenectomizado fue infectado con un vial de sangre con 1×10^8 eritrocitos infectados 7 días después de la esplenectomía. A partir de que el bovino infectado mostró fiebre, se colectaron las garrapatas repletas y se monitoreó la parasitemia, temperatura y hematocrito del bovino. Una vez que se presentó un hematocrito menor al 20%, se administró Imidocarb para tratar la infección (3 mg/kg).

Las garrapatas recolectadas de los bovinos infectado y no infectado fueron divididas en cuatro grupos de tiempo post-repleción: 0 h, 24 h, 48 h y 72 h. Las garrapatas de los grupos de 24, 48 y 72 h fueron almacenadas en una incubadora a 28°C con humedad relativa al 70% hasta alcanzar el tiempo post-repleción indicado (las garrapatas del grupo de 0 h se disectaron el mismo día de la colecta).

Las garrapatas fueron disectadas para extraer los intestinos. Los intestinos extraídos se lavaron con buffer PBS pH 7.2 con inhibidor de proteasas cOplete® (Roche, Alemania). Posteriormente, los intestinos lavados se almacenaron en viales de PBS pH 7.2 con inhibidor de proteasas cOplete® con cinco intestinos cada uno. Los viales se mantuvieron en congelación a -70°C.

La prueba de quinetos se realizó para corroborar que las garrapatas colectadas del bovino infectado si estuvieran infectadas con *B. bigemina*. Esta prueba se llevó a cabo extendiendo un frotis de hemolinfa de una garrapata infectada a 8 días post-repleción. El frotis se fijó con metanol y se tiñó con colorante Giemsa. La observación de quinetocitos en el microscopio confirma la infección de las garrapatas con *B. bigemina*.

8.1.5 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas se llevó a cabo mediante el método de lisis con buffer TNTE, usando 15 intestinos para cada experimento. Los intestinos se lavaron con buffer PBS pH 7.4 hasta que éste se observara completamente traslucido sin rastros perceptibles de hemoglobina. Los intestinos limpios se centrifugaron brevemente y se descartó por completo el sobrenadante. A cada muestra se le agregaron 150 µl de buffer TNTE e inhibidor de proteasas cOplete® en una concentración final 1x, se agitó por vórtex brevemente y se dejó incubando en hielo por 15 minutos. Las muestras se sonicaron

durante tres minutos cada una (80% de amplitud, 30 segundos de pulso, 30 segundos de pausa). Los tubos con las muestras sonicadas se centrifugaron a 220000 x g por 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril.

Las proteínas del extracto total fueron cuantificadas y se verificó su integridad para verificar que la muestra pudiera ser usada para el isoelectroenfoque. La integridad de las proteínas se verificó realizando una electroforesis de gel de poliacrilamida al 10%. Se mezclaron 5 µl de la muestra con 5 µl de buffer de corrida 2X. La muestra se corrió a 100V hasta que el frente llegara al final del gel. El gel se tiñó con colorante de Coomassie R-250 y se destiñó con solución desteñidora (16.5% de metanol, 5% de ácido acético glacial).

La cuantificación se realizó con el método de Bradford. Como estándar se usaron diluciones seriales de albumina de suero bovino (BSA) con concentraciones de 80, 40, 20, 10 y 5 µg como estándares. Diluciones 1:50 y 1:100 de las muestras fueron preparadas. En una placa de 96 pozos los estándares y las muestras problemas se prepararon por triplicado. En cada pozo se mezclaron 10 µl de muestra y 200 µl de reactivo de Bradford en dilución 1:4 (previamente filtrado). La placa se agitó suavemente y se dejó incubando durante 5 minutos en ausencia de luz y se midió la absorbancia de los pozos usando un lector de placas con filtro de 595 nm. Usando la absorbancia de los estándares se creó una curva estándar ($R^2 > 0.99$) con la que se comparó la absorbancia de las muestras para calcular la concentración de las muestras.

8.1.6 Isoelectroenfoque

Con el fin de eliminar sales, lípidos y otros contaminantes iónicos que puedan interferir con el isoelectroenfoque, los extractos totales de proteínas íntegras y con concentración suficiente fueron divididos en 3 viales de 50 µg y se procesaron con un kit de clean up (ReadyPrep 2-D Clean-up (BioRad, EUA)) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. En el paso final de elusión, los 3 pellets del extracto proteico limpio se eluyeron en un solo tubo de 1.5 ml con 90 µl de buffer de rehidratación (8M de urea, 2% de CHAPS, 50 mM de DTT). La integridad de las proteínas del extracto y la cuantificación se volvieron a llevar a cabo con el mismo procedimiento.

Para cada experimento, se hidrataron 2 tiras IPG con un gradiente de pH de 7 a 10 con 240 µg de proteínas, 0.2% anfolinas para pH 7-10, 0.002% de azul de bromofenol (ajustados a un volumen final de 120 µl). Las tiras se mantuvieron en hidratación pasiva durante 16 horas, cubiertas con aceite mineral y protegidas de la luz. Las tiras se retiraron de la bandeja al terminar el tiempo de hidratación, se removió el exceso de aceite mineral y se colocaron en una bandeja para isoelectroenfoque con aceite mineral fresco. El isoelectroenfoque se corrió con un programa con un primer paso de 250 V con gradiente de amperaje lineal durante 40 minutos, un segundo de 4000 V con gradiente de amperaje lineal durante 3 horas y un tercer paso de 4000 V con gradiente de amperaje rápido hasta que la tira alcance 16000 volts/hora. Una vez terminado el isoelectroenfoque, las tiras IPG se retiraron de la bandeja y se incubaron en buffer de equilibrio con 97.4 mM de DTT durante 15 minutos y en buffer de equilibrio con 20.27 mM de yodoacetamida por otros 15 minutos. Las tiras equilibradas se montaron cada una en un gel de poliacrilamida de 1 mm al 12% junto con una tira de papel filtro impregnada con 4 µl de marcador de peso molecular. La tira IPG y el papel con marcador de peso molecular se cubrieron con agarosa al 0.8% y se corrieron mediante electroforesis a 100V hasta que el frente de corrida llegó al fondo del gel. Uno de los geles se tiñó con Coomassie G-250 o nitrato de plata (en caso de requerir mayor sensibilidad).

8.1.7 Western-Blot

El Western-Blot se estandarizó usando los extractos totales de proteínas de intestinos de *R. microplus*. Las proteínas extraídas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia en húmedo. La transferencia se realizó a 100V por una hora (manteniendo la cámara en hielo y usando un agitador magnético). La membrana fue teñida con colorante rojo de Ponceau para corroborar que la transferencia se realizó correctamente. Tras observar spots bien definidos, la membrana se lavó con TBS-tween hasta retirar todo el colorante. Posteriormente, la membrana se bloqueó incubándose toda la noche (12 a 16 h) en una solución de TBS-tween con leche en polvo al 5% en agitación a 4°C. Al terminar el bloqueo, la membrana se lavó con TBS-Tween y se incubó en solución de anticuerpo bovino anti-BmVDAC recombinante (bovino 7316) (Dilución 1:1000 de suero bovino en

TBS-Tween con leche en polvo al 1%) en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, se lavó nuevamente la membrana y se incubó a temperatura ambiente durante una hora y media en una solución de leche en polvo al 1% con anticuerpos anti-bovino unidos a peroxidasa de rábano en dilución 1:1000. Al finalizar la incubación, la membrana se lavó y se reveló añadiendo el substrato para la peroxidasa de rábano (ECL substrate kit, Promega, EUA) a la membrana. Las imágenes del Western-Blot se obtuvieron sobreponiendo una imagen de bioluminiscencia (para visualizar los spots detectados con los anticuerpos) y una imagen colorimétrica (para visualizar los marcadores de peso molecular) usando un equipo ChemiDoc y el programa Image Lab (BioRad, EUA).

8.1.8 Análisis de imagen de los geles de 2D-PAGE con el programa PDQuest

Para corroborar que los spots de los geles teñidos correspondieran con los spots identificados con anticuerpos anti-BmVDAC en los Western-Blot se usó el programa PDQuest (BioRad, EUA). Mediante este software se corroboró la coincidencia entre los spots de los geles teñidos y los Western-Blot. El peso molecular se calculó de manera automática por el programa tomando como referencia los marcadores de peso molecular y el punto isoeléctrico se calculó usando una tabla de distancia/pH provista por BioRad. La coincidencia de los spots se realizó de manera automática.

8.2 Objetivo 3: Predecir *in silico* el papel de las MPTs de BmVDAC en la interacción con el plasminógeno bovino.

8.2.1 Predicción de estructura terciaria de BmVDAC mediante modelaje por homología.

Al momento de realizar este escrito no existe una estructura cristalográfica publicada de BmVDAC, por esta razón fue necesario generar un modelo tridimensional de BmVDAC mediante homología. Una búsqueda en BLAST fue realizada para determinar cuáles son las proteínas con una estructura cristalizada publicada con mayor porcentaje de identidad. Un alineamiento múltiple se realizó usando los tres resultados con mayor identidad y porcentaje de cobertura. El alineamiento múltiple se usó como base para generar un modelo tridimensional por homología usando el programa Easymodeller (Kuntal et al., 2010).

8.2.2 Localización de los RMPC en regiones accesibles de BmVDAC.

La localización de los RMPC fue determinada para excluir de las predicciones de docking molecular a los residuos de BmVDAC que no puedan ser accesibles para interactuar con otras proteínas. La determinación de las regiones no transmembranales se realizó comparando las regiones no transmembranales descritas para VDAC1 de humano en SWISS-MODEL (número de acceso P21796). La predicción de pockets moleculares se realizó en el servidor web CASTp (Tian et al., 2018) usando el archivo .pdb del modelo de BmVDAC generado por homología.

8.2.3 Predicción de interacción a nivel de secuencia

La predicción de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno a nivel de secuencia se realizó usando el servidor web PSOPIA (Murakami y Mizuguchi, 2014). Posteriormente, la predicción de los posibles sitios de interacción proteína-proteína de BmVDAC se realizó con la herramienta BSpred (Mukherjee y Zhang, 2011).

8.2.4 Modificación postraduccional *in silico*

Para poder comparar la interacción de BmVDAC antes y después de ser modificado en las predicciones de docking molecular se realizó una modificación *in silico* de la estructura de la proteína usando el servidor web Vienna-PTM (Margreitter et al., 2013). En esta herramienta se cambiaron los RMPCs por residuos fosforilados o acetilados, según sea el caso. La estructura de BmVDAC sin MPTs se nombró como BmVDAC_S y la estructura modificada *in silico* como BmVDAC_M.

8.2.5 Docking proteína-proteína

La predicción de interacción entre BmVDAC y el BtPg a nivel de estructura terciaria se realizó mediante el uso de dos protocolos diferentes de docking proteína-proteína. En ambos protocolos BmVDAC_S y BmVDAC_M se usaron como receptores y como ligando se usaron el BtPg completo, así como sus dominios Pan y Kringle 1, 2, 3, 4 y 5.

El primer protocolo se realizó con el programa Hex (Y. K. Liang y Bian, 2016; D. Ritchie y Orpailleur, 2013), usando los parámetros descritos en la tabla 1. El segundo protocolo se realizó en dos pasos, el primero utilizando la herramienta PatchDock. En el segundo paso se tomaron los 10 mejores resultados de PatchDock para ser procesados por FireDock (Duhovny et al., 2002).

Tabla 1: Parámetros de Hex seleccionados para la predicción de interacciones mediante docking.

Parámetro	Valor
Tipo de correlación	SHAPE+ELECTRO+DARS
Método de búsqueda	Rango angular
Post procesamiento	Minimización mediante OPLS

8.2.6 Análisis de los resultados de docking molecular

En el protocolo de Hex se obtuvieron 100 modelos de cada interacción. De estos modelos se excluyeron aquellos en los que el ligando interactuara con regiones transmembranales de BmVDAC que se encontraran fuera del pocket. En la primera parte del protocolo de PatchDock/FireDock, de los 100 resultados obtenidos, los 10 mejores puntuados fueron procesados posteriormente por FireDock. De estos resultados, los complejos en los que el ligando interactuara con regiones transmembranales de BmVDAC que se encontraran fuera del pocket fueron omitidos de análisis subsecuentes. La ΔG de los complejos no excluidos fue calculada por los mismos programas que realizaron el docking de manera automática.

8.2.7 Análisis de residuos involucrados en la interacción

Usando el modelo con el menor ΔG de cada combinación de receptor-ligando, se determinaron los residuos que participan en la interacción entre ambas proteínas usando el programa Molegro Molecular Viewer (Molexus). Este programa permitió visualizar cuáles residuos de cada proteína participan en la interacción y determinar qué tipo de interacción llevan a cabo (puente de hidrógeno, electrostática o estérica).

La posición de los residuos que participan en cada interacción se comparó con la de los RMPCs para determinar si existen RMPCS que participen de manera constante en la interacción con el BtPg y sus diferentes dominios. La ΔG de los complejos con un mismo ligando se comparó para determinar si, de manera general, los complejos que tienen como receptor a BmVDAC_M son más estables que los que tienen a BmVDAC_S.

8.3 Objetivo 4: Proponer un modelo de la posible función de al menos una de estas MPTs de BmVDAC en interacción con el plasminógeno bovino.

8.3.7 Búsqueda bibliográfica

Una búsqueda bibliográfica se realizó para generar una vía de señalización hipotética que explique la unión de BmVDAC con el BtPg. El primer paso consistió en partir desde la información que se conoce respecto a la expresión de posibles isoformas de BmVDAC, es decir, la fase intracelular de *B. bigemina* y otros parásitos apicomplejos. Con base en esta premisa, la búsqueda se enfocó en los cambios de procesos celulares que pueden causar *B. bigemina* y otros protozoarios apicomplejos en la célula durante su fase intracelular, que sean capaces de inducir la sobreexpresión de BmVDAC y de cinasas. Con base en la información recabada, se generó un modelo hipotético que explique la sobreexpresión de BmVDAC, la fosforilación y la relocalización a membrana celular.

8.3.8 Verificación en bases de datos.

Una búsqueda de genes y proteínas homólogas en las bases de datos GenBank y UniProt se realizó para verificar que el modelo teórico fuera plausible. Cada proteína incluida en el modelo debe tener un homólogo en *R. microplus*, *B. bigemina* o en un organismo filogenéticamente cercano.

9 Resultados

9.1 Objetivo 1: Caracterizar *in silico* las posibles isoformas de BmVDAC e identificarlas en extractos de proteínas de intestinos de *R. microplus*.

9.1.1 Determinar la presencia de múltiples copias del gen de *Bmvdac*

Para descartar la posibilidad de que *R. microplus* codifique más de una copia del gen de *Bmvdac*, una base de datos local se creó usando los contigs del genoma de BmVDAC. La secuencia de nucleótidos del gen de *Bmvdac* se usó como secuencia de búsqueda para un BLAST local. La búsqueda con el BLAST local dio como resultados coincidencias con múltiples contigs, sin embargo, la secuencias de los contigs correspondían a diferentes sitios de la secuencia del gen que codifica para BmVDAC (Figura 9).

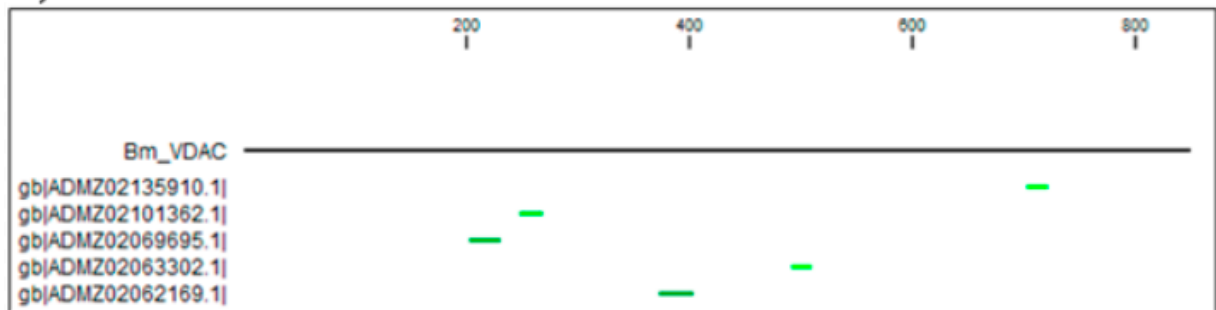


Figura 9: BLAST local realizado con el programa CLC Genomics Workbench. Una base de datos local se generó usando contigs no ensamblados. Las coincidencias encontradas no muestran múltiples contigs que tengan coincidencia con la misma región de *Bmvdac*.

Para tener mayor certeza, se realizó una búsqueda con la herramienta BLAST de NCBI usando la secuencia de *Bmvdac* como entrada de consulta y restringiendo la búsqueda al genoma de *R. microplus* recientemente publicado (Jia et al., 2020). Esta búsqueda tuvo como resultado dos coincidencias con una cobertura del 100% y un 99.18% de identidad con la secuencia de *Bmvdac* usada para la búsqueda (Figura 10). Los dos resultados corresponden al mismo genoma de *R. microplus* disponible en distintas bases de datos con diferentes números de acceso.

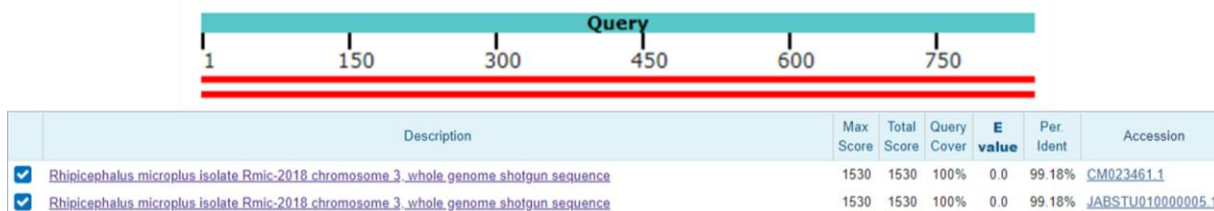


Figura 10: Búsqueda realizada con la herramienta BLAST de NCBI. La búsqueda se llevó a cabo usando la secuencia de nucleótidos de *Bmvdac* como secuencia de entrada y restringiendo la búsqueda al genoma ensamblado de *R. microplus*.

Adicionalmente, se realizó una búsqueda similar usando un genoma ensamblado y anotado. Al no contar con un genoma de *R. microplus* con estas características, la búsqueda se realizó usando el genoma de *I. scapularis* (cepa Wikel) como base de datos con la herramienta BLAST de VectorBase. Esta búsqueda dio como resultado una coincidencia con una cobertura del 100% y un 82.7% de identidad. Además, múltiples coincidencias parciales fueron reportadas, pero no hubo ninguna que coincidiera con otra en un fragmento de la secuencia de *Bmvdac* y la dirección en la que se habían secuenciado (Figura 11).

Organism	Database	HSPs					
Ixodes scapularis	(Contigs) Wikel strain genomic contig sequences, IscaW1 assembly	10					
Hit	Query	Aln Length	E-value	Score	Identity	Query Hit	DB Sequence Hit
<input type="checkbox"/> ABJB010965009.1	BmVDAC_complete_cds	849	0.0	962	82.7%		
<input type="checkbox"/> ABJB010394005.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		
<input type="checkbox"/> ABJB010562518.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		
<input type="checkbox"/> ABJB010111800.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		
<input type="checkbox"/> ABJB010775367.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		
<input type="checkbox"/> ABJB010852753.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		
<input type="checkbox"/> ABJB010279139.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		
<input type="checkbox"/> ABJB010594135.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		
<input type="checkbox"/> ABJB010655296.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		
<input type="checkbox"/> ABJB010225689.1	BmVDAC_complete_cds	44	0.52	44	81.8%		

Figura 11: Búsqueda realizada con la herramienta BLAST de VectorBase. La búsqueda se realizó usando la secuencia de nucleótidos de *Bmvdac* como secuencia de entrada y el genoma anotado de *I. scapularis* como base de datos.

9.1.2 Predicción de sitios de acetilación y fosforilación

En la predicción de sitios acetilados con GPS-PAIL se encontraron 4 residuos únicos acetilados: K11, K109, K114 y K273 (Figura 12A), mientras que la predicción con ASEB dio como resultado 4 residuos únicos acetilados: K108, K109, K114 y K175

(Figura 12B). Dos RMPC de acetilación se obtuvieron con base en los resultados de ambos programas: K109 y K114 (Figura 12C).

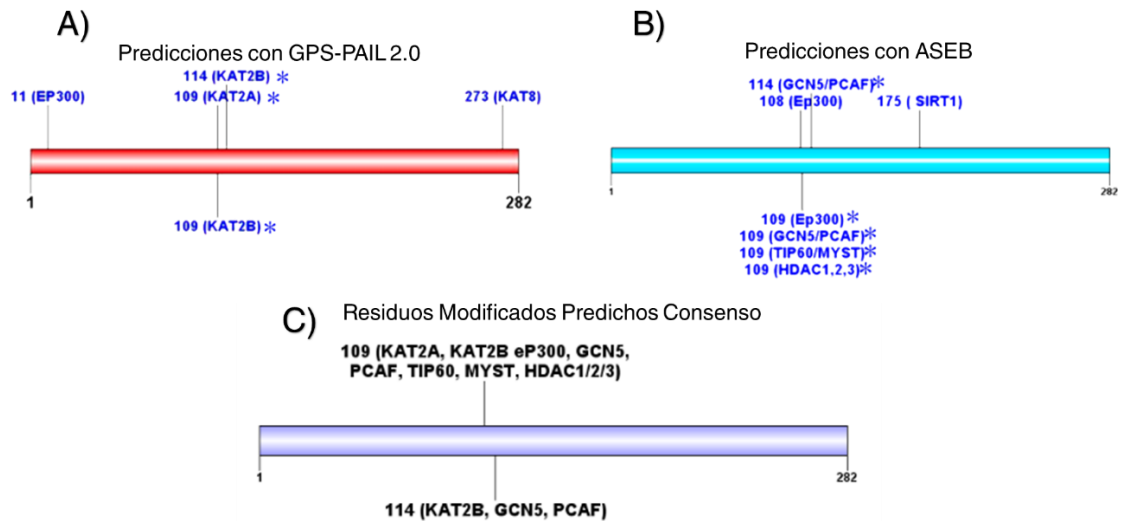


Figura 12: Predicción de residuos acetilados en BmVDAC. La predicción se realizó usando los programas GPS-PAIL 2.0 (A) y ASEB (B). Los sitios únicos predichos en ambos programas se consideran RMPCs (C).

NetPhos predijo 13 residuos fosforilados únicos, de los cuales 2 son residuos de tirosina, 6 residuos de treonina y 5 residuos de serina (Figura 13A). GPS predijo 38 residuos fosforilados únicos, de los cuales 18 son residuos de treonina, 14 residuos de serina y 5 residuos de tirosina (Figura 13B). Al comparar los resultados anteriores, el resultado 13 RMPC de fosforilación: 2 residuos de tirosina (Y6 y Y61), 5 de serina (S46, S56, S164, S231 y S255) y 6 de treonina (T36, T59, T69, T106, T158, T247) (Figura 13C).

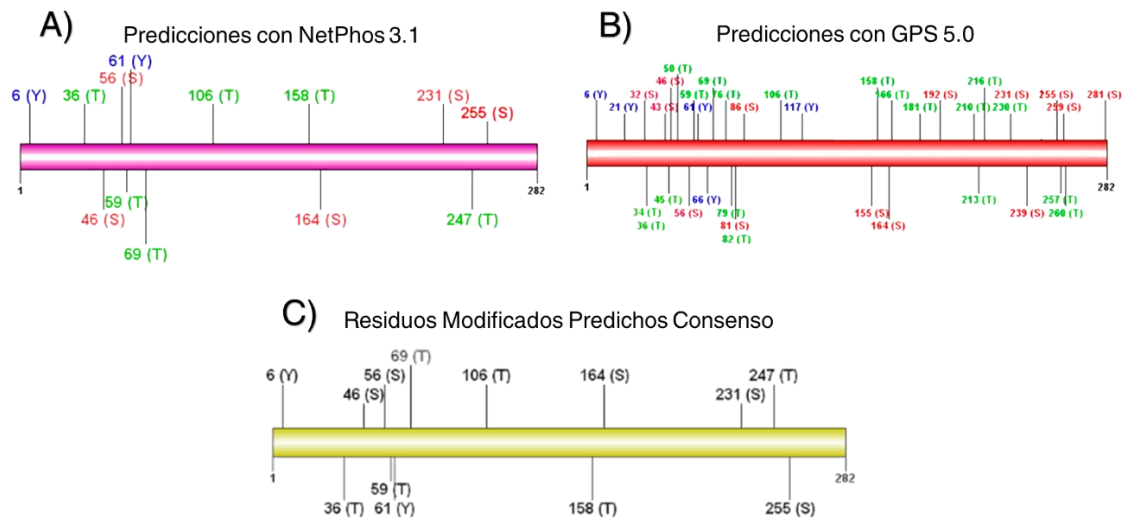


Figura 13: Predicción de residuos fosforilados en BmVDAC. La predicción se realizó usando los programas NetPhos 3.1 (A) y GPS 5.0 (B). Los sitios únicos predichos en ambos programas se consideran RMPs (C).

9.1.3 Selección de bovinos libres de *B. bigemina*

Los frotis de todos los bovinos candidatos dieron resultado negativo a *B. bigemina* en las inmunofluorescencias indirectas (Figura 14). Dos bovinos del grupo se trasladaron a la Nave de Infectómica Animal (NINFA) de la Universidad Autónoma de Querétaro para llevar a cabo los procesos de infestación, esplenectomía e infección con *B. bigemina*.

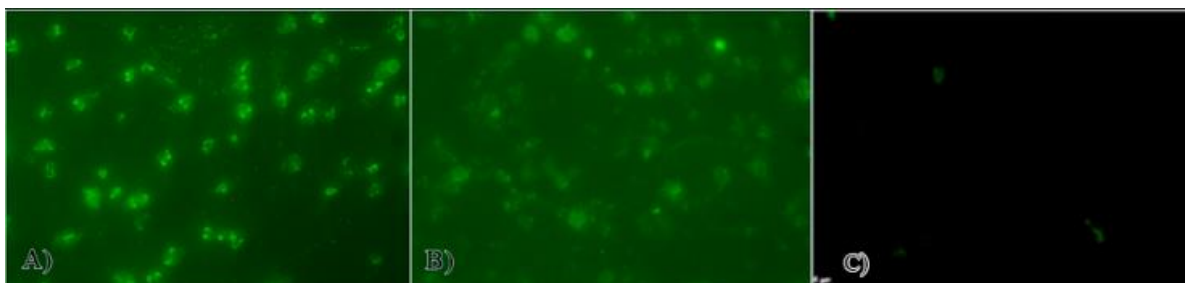


Figura 14: Inmunofluorescencias indirectas para detección de *B. bigemina*. IFI de una muestra infectada usada como control positivo (A), la de un bovino negativo a *B. bigemina* (B) y un control negativo (C).

En el día 5 post infección se corroboró la infección del bovino al observar esporozoítos en un frotis sanguíneo (Figura 15A). A partir de este día se colectaron las garrapatas repletas. Durante la colecta, el estado de salud fue monitoreado diariamente (Tabla 2).

El experimento se detuvo en el día 8 post-infección debido a la alta parasitemia y bajo hematocrito del bovino (Figura 15B) y el bovino fue tratado con Imidocarb.

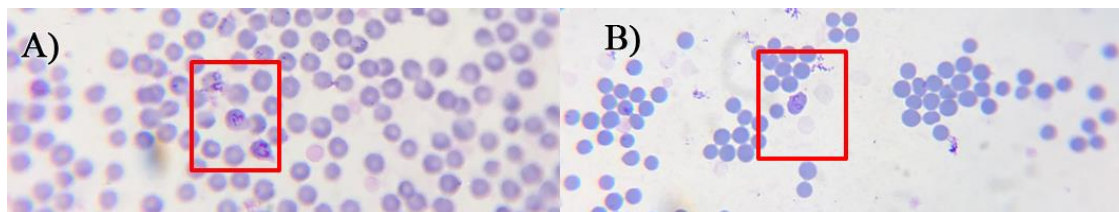


Figura 15: Frotis de sangre del bovino infectado a diferentes tiempos post-infección. Frotis sanguíneos del bovino infectado a 5 días post-infección con un hematocrito del 34.5% y 0.4% de parasitemia (A) y a 8 días post-infección con hematocrito 16.5% y una parasitemia del 0.95% (B).

Tabla 2: Seguimiento del estado de salud del bovino infectado *B. bigemina* durante el periodo de colecta de garrapatas.

Días post infección	Hematocrito	Temperatura	Parasitemia
5	34.5%	38.7 °C	0.4 %
6	31.5%	38.9 °C	0.61 %
7	23 %	39.3 °C	1.05 %
8	16.5%	37.5 °C	0.95 %

Las garrapatas colectadas fueron divididas en 4 grupos de distintos tiempos post-repleción: 0, 24, 48 y 72 horas. Las garrapatas de los grupos de 24, 48 y 72 horas se mantuvieron en una incubadora hasta alcanzar su tiempo post-repleción indicado. Las garrapatas fueron disectadas para extraer los intestinos al transcurrir su tiempo post-repleción indicado (las del grupo de 0 horas se disectaron el día de la colecta). Los intestinos extraídos de las disecciones se almacenaron en viales de cinco intestinos cada uno a -70°C. La infección de las garrapatas se confirmó al poder observar quinetocitos en el frotis de hemolinfa (Figura 16).

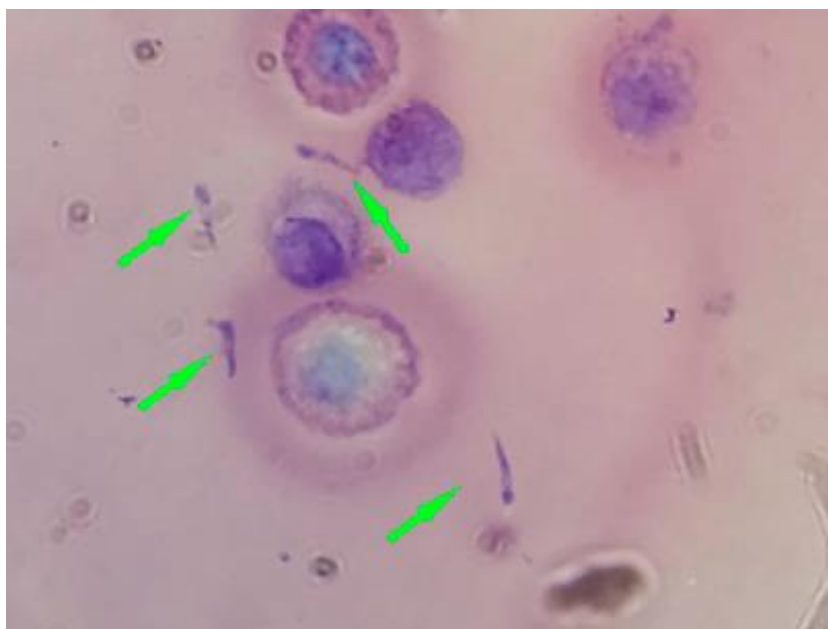


Figura 16: Quinetocitos de *B. bigemina* observados en hemolinfa de *R. microplus*. El frotis de hemolinfa a 8 días post repleción fue teñido con Giemsa.

9.1.4 Segunda colecta de garrapatas

Debido a que se agotaron las muestras, fue necesario repetir el experimento de la infestación controlada de bovinos. En esta ocasión se usaron dos becerros libres de *B. bigemina*, uno de raza Angus y uno de raza Charoláis. Ambos bovinos fueron infestados de la misma manera que en el experimento anterior. El bovino infectado fue esplenectomizado e infectado como se especifica previamente. La colecta de garrapatas inició a los 4 días post infección, una vez que se observaron esporozoítos en un frotis sanguíneo y se monitorearon los signos clínicos a lo largo del experimento (Tabla 3). En total, se colectaron 234 garrapatas de los bovinos infectados y 432 de los bovinos no infectados.

Tabla 3: Seguimiento del estado de salud del bovino infectado *B. bigemina* durante el periodo de la segunda colecta de garrapatas.

Días post infección	Hematocrito	Temperatura	Parasitemia
4	36.5%	38 °C	<0.01%
5	34%	38 °C	0.01%
6	29%	38.8 °C	3%
7	28%	38.5 °C	72%

9.1.5 Identificación de las posibles isoformas de BmVDAC en extractos de proteínas de intestinos de *R. microplus*.

9.1.5.1 Muestras de intestinos de garrapatas a 0 horas post-repleción.

Las muestras de intestinos no infectados a 0 horas post-repleción se usaron para establecer las condiciones estándar de la técnica de electroforesis bidimensional. En la extracción de proteínas totales y tratamiento por cleanup se logran ver proteínas íntegras con bandas (Figura 17). El clean-up del extracto de proteínas se usó para realizar 2 geles de 2D-PAGE, los geles se tiñeron con nitrato de plata y se observó un patrón de spots definido (Figura 18).

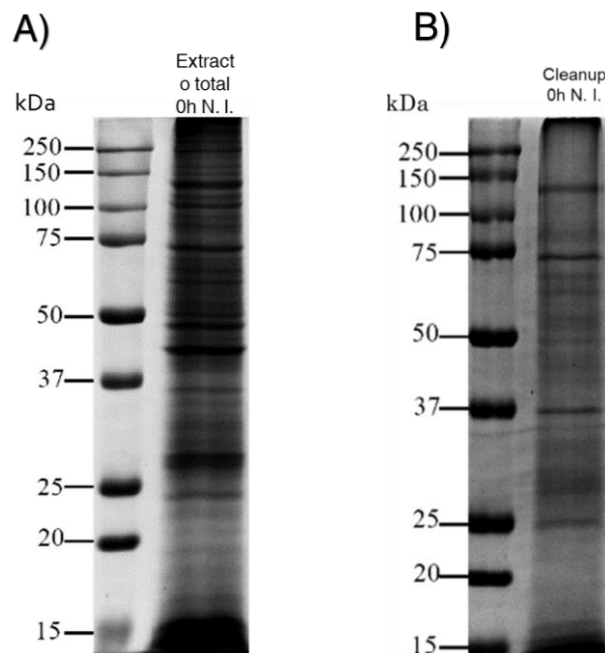


Figura 17: Determinación de integridad de un extracto total de proteínas de intestinos de *R. microplus* no infectadas. Extracto de proteínas totales (A) y muestra con tratamiento de clean up (B) de intestinos de garrapatas no infectadas a 0 horas post-repleción mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

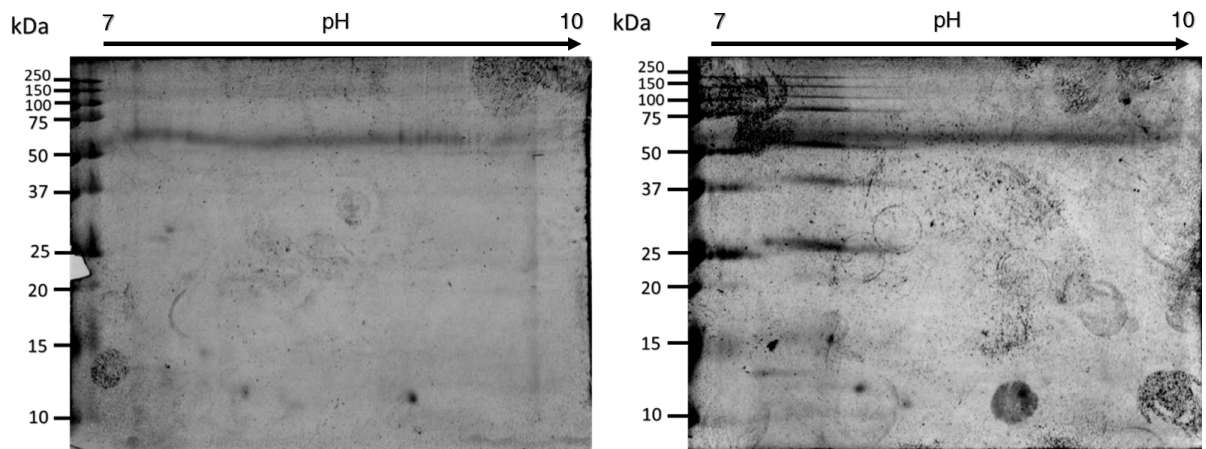


Figura 18: 2D-PAGE de extractos de proteínas totales de intestinos de garrapatas no infectadas a 0 horas post-repleción. Ambos geles fueron teñidos con nitrato de plata.

En la extracción de proteínas totales y cleanup se logran ver proteínas íntegras con bandas en todos los pesos moleculares (Figura 19). El isoelectroenfoque se corrió en dos tiras IPG con pH 7-10 hidratadas con 240 µg de proteínas cada una. Uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie G-250 (Figura 20X) y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para llevar a cabo un Western-Blot (Figura 20Y). Tanto en el gel teñido como en el Western-Blot se observan spots que corresponden en peso molecular y punto isoeléctrico.

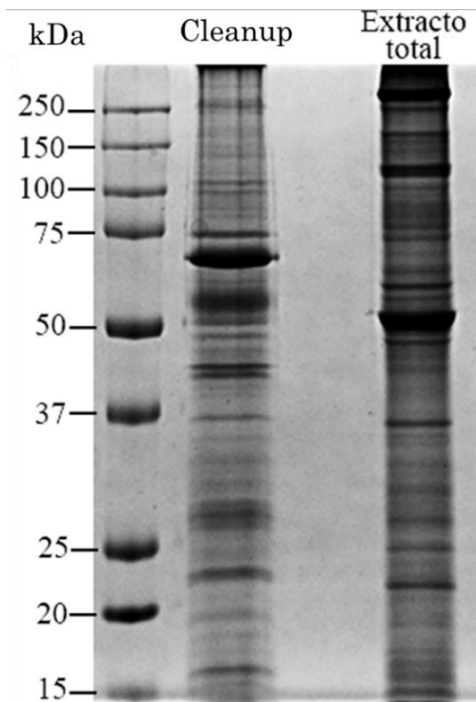


Figura 19: Determinación de integridad de un extracto total de proteínas de intestinos de *R. microplus* infectadas a 0 h post-repleción. Se observa la integridad de las proteínas de un extracto total y de la muestra con tratamiento de clean up. En el gel se cargaron 20 μ g y 35 μ g de proteínas en los carriles del extracto con tratamiento de clean up y extracto total, respectivamente.

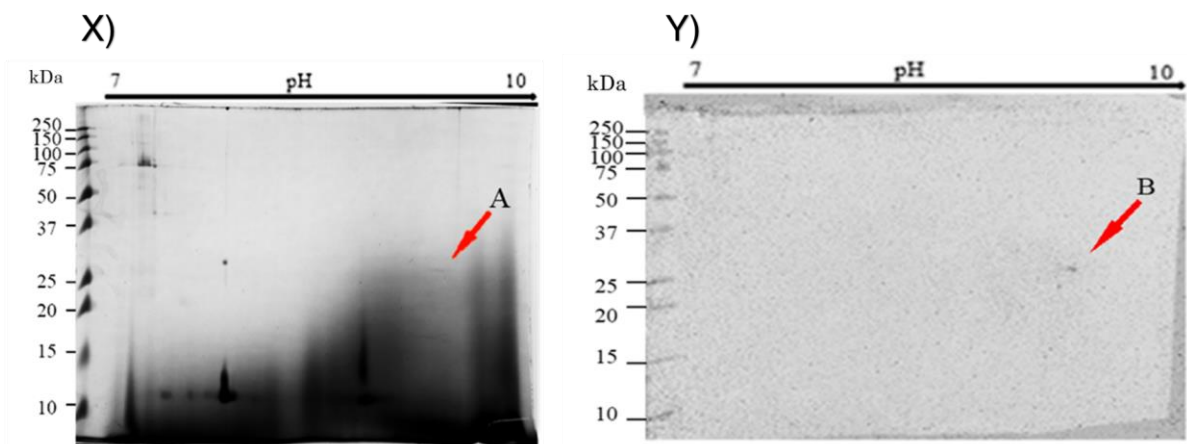


Figura 20: 2D-PAGE y Western-Blot de extractos de proteínas totales de intestinos de garrapatas infectadas a 0 h post-repleción. El gel de 2D-PAGE fue teñido con azul de Coomassie G-250 (X) y para el Western-Blot se usó un anticuerpo primario anti-BmVDAC y anticuerpo secundario anti-bovino (Y). El spot A del gel teñido con Coomassie corresponde en peso molecular y punto isoeléctrico con el spot B del Western-Blot.

9.1.5.2 Muestras de intestinos de garrapatas a 48 horas post-repleción.

Para la extracción de proteínas totales y el clean up de muestras de intestinos de garrapatas no infectadas a 48 horas post-infección se usaron 3 viales con 5 intestinos. La integridad de las proteínas fue verificada después de la extracción total y del clean up (Figura 21). Dos tiras IPG con pH de 7 a 10 se hidrataron con 240 μg de proteínas (100 μl del clean up) para correr el isoelectroenfoque y la segunda dimensión. Uno de los geles fue teñido nitrato de plata y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se realizó un Western-Blot como se describió previamente. Tanto en el gel teñido con plata (Figura 22X) como en el Western-Blot (Figura 22Y) se observaron spots con el peso molecular y punto isoeléctrico esperados de BmVDAC.

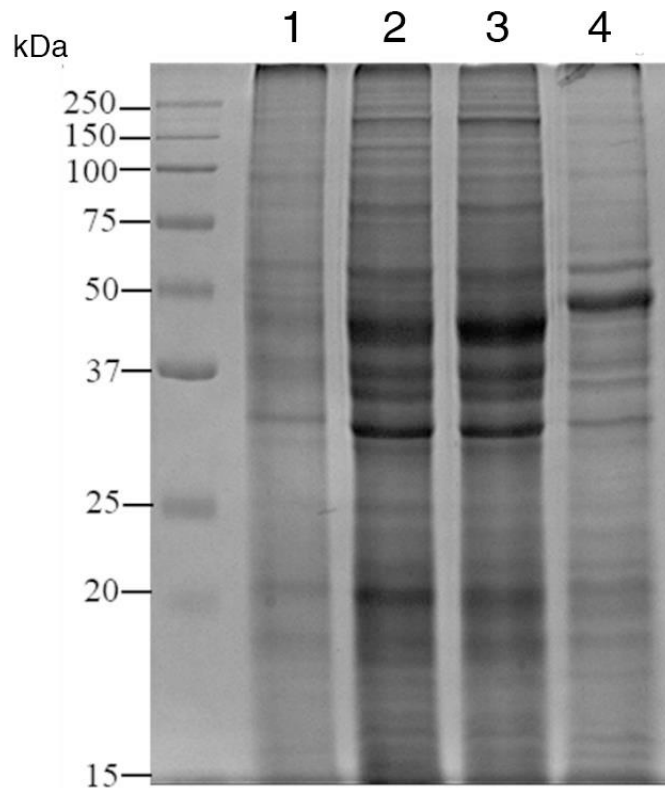


Figura 21: Determinación de integridad de un extracto total de proteínas de intestinos de *R. microplus* no infectadas a 48 h post-repleción. En los carriles del extracto total de proteínas (1, 2 y 3) y muestras con tratamiento de clean up (4) se observan bandas íntegras en todos los pesos moleculares. En el gel se cargaron 18 μg , 35 μg , 35 μg y 20 μg de proteína en los carriles 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

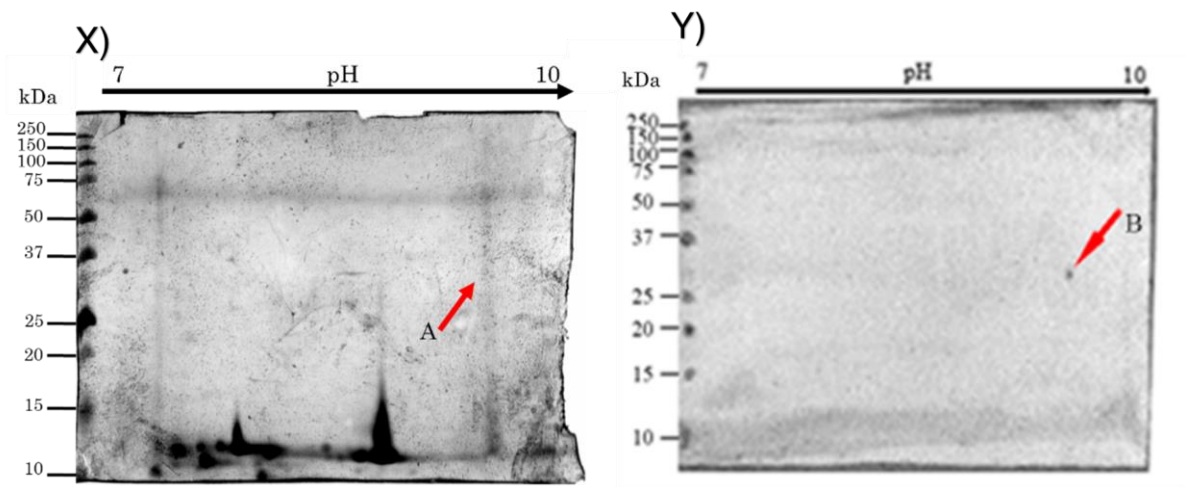


Figura 22: 2D-PAGE y Western-Blot de extractos de proteínas totales de intestinos de garrapatas no infectadas a 48 h post-repleción. El gel de 2D-PAGE fue teñido con nitrato de plata (X) y para el Western-Blot se usó un anticuerpo primario anti-BmVDAC y anticuerpo secundario anti-bovino (Y). El spot A del gel teñido con Coomassie corresponde en peso molecular y punto isoeléctrico con el spot B del Western-Blot.

9.1.6 Análisis de imagen de los geles de 2D-PAGE con el programa PDQuest

Para corroborar que los spots de los geles teñidos correspondieran con los de los Western-Blot se usó el programa PDQuest (BioRad, EUA). Mediante este software se corroboró la coincidencia entre los spots de los geles teñidos y los Western-Blot y se calculó el peso molecular y punto isoeléctrico de los spots correspondientes a BmVDAC. En ambos casos, BmVDAC se observó con un peso molecular de ~30 kDa y un punto isoeléctrico de ~9.3 (Figura 23).

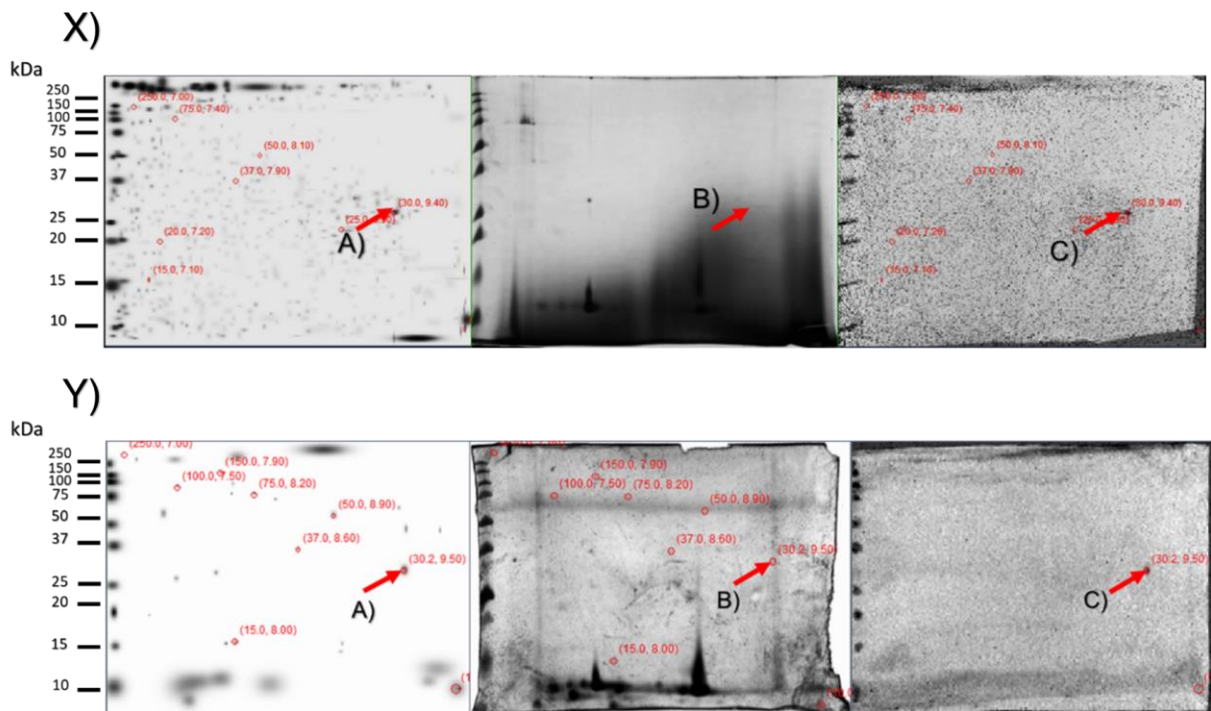


Figura 23: Imágenes maestras generadas usando el programa PDQuest. X) Imágenes de intestinos infectados a 0h post-replicación. Y) Imágenes de intestinos no infectados a 48h post-replicación. La coincidencia de los spots se realizó de manera automática. (A) se obtuvo a partir de un spot detectado automáticamente en el gel teñido con Coomassie o nitrato de plata (B), y este corresponde con el spot de BmVDAC del Western-Blot (C).

9.1.7 Comparación con resultados preliminares

Usando los resultados de Western-Blot obtenidos en este trabajo, se realizó una comparación entre los spots observados en el Western-Blot de 2D-PAGE de extractos de proteínas totales de intestinos de *R. microplus* a 0 horas post-replicación no infectadas (Figura 24A) y los spots obtenidos en resultados preliminares con extractos de proteínas totales de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* a 72 h post replicación (Figura 24B), en la que se observa que el spot correspondiente a BmVDAC con mayor PI de la muestra de intestinos infectados tiene un PI igual al único spot de esta misma proteína observado en la muestra no infectada. Esta comparación nos indicó que las posibles isoformas encontradas en los resultados preliminares tienen un menor punto isoeléctrico que los spots descritos en muestras no infectadas o de tiempos anteriores a las 72 horas post-replicación.

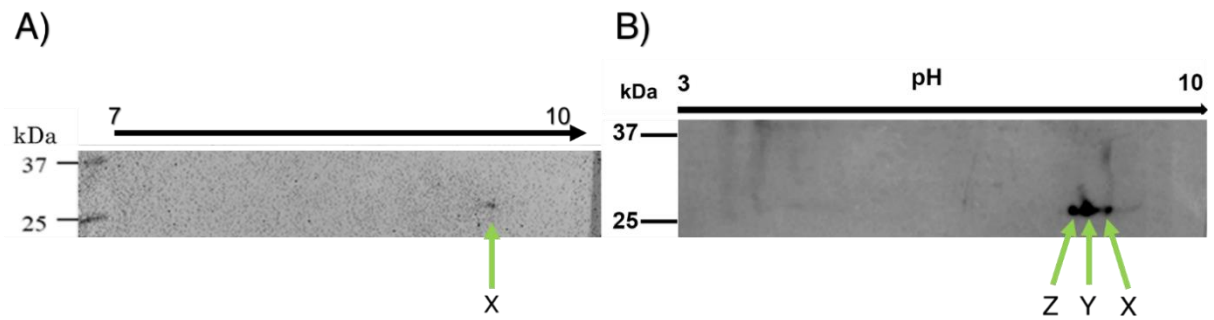


Figura 24: Comparación de spots encontrados en un Western-Blot de garrapatas no infectadas a 72 h post infección con el Western-Blot de los resultados preliminares. Se compararon los spots observados en el Western-Blot del 2D-PAGE detectados con un anticuerpo primario anti-BmVDAC de extractos de proteínas totales de intestinos de *R. microplus* no infectados a 0 horas post-repleción (A) con el de extractos garrapatas infectadas con *B. bigemina* a 72 horas post-repleción (B). Entre ambos Western-Blot múltiples spots con peso molecular de ~30 kDa y diferentes puntos isoeléctricos (pH: X = 8.35, Y = 7.86, Z = 7.4) fueron identificados.

9.2 Objetivo 3: Predecir *in silico* la interacción de las MPTs de BmVDAC con el plasminógeno bovino.

9.2.1 Predicción de estructura terciaria de BmVDAC mediante modelaje por homología.

Una búsqueda con BLAST se realizó para determinar cuáles son las proteínas con mayor porcentaje de identidad que tuvieran una estructura cristalizada publicada para generar el modelo por homología. Las proteínas que se eligieron fueron VDAC1 y VDAC2 de humano y VDAC2 de ratón (número de accesos de UniProt P21796, P45880 y Q60930, respectivamente). Un alineamiento múltiple se realizó con las secuencias de aminoácidos de BmVDAC y las de VDAC de mamíferos antes mencionadas. Con base en este alineamiento se obtuvo una matriz de identidad (Tabla 4).

Tabla 4: Matriz de identidad generada a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de VDAC de *R. microplus*, ratón y humano calculada usando Clustal omega.

Proteínas de mamífero				
	<i>R. microplus</i>	<i>M. musculus</i> (VDAC 2)	<i>H. sapiens</i> (VDAC 1)	<i>H. sapiens</i> (VDAC 2)
<i>R. microplus</i>	100%	58.51%	58.16%	58.16%
<i>M. musculus</i> (VDAC2)	58.51%	100%	94.22%	97.17%
<i>H. sapiens</i> (VDAC1)	58.16%	94.22%	100%	99.65%
<i>H. sapiens</i> (VDAC2)	58.16%	97.17%	99.65%	100%

Un segundo alineamiento múltiple se realizó para comparar el porcentaje que tiene BmVDAC con las proteínas VDAC de mamíferos es similar al que hay entre BmVDAC y proteínas VDAC de artrópodos. Para este alineamiento se usaron las secuencias de aminoácidos de BmVDAC, y las de VDAC de *Amblyomma variegatum*, *R. annulatus*, *Anopheles gambiae* y *Drosophila melanogaster*. Con los resultados del segundo alineamiento se generó una segunda matriz de identidad (Tabla 5).

Tabla 5: Matriz de identidad generada a partir del alineamiento múltiple de las secuencias de VDAC de *R. microplus*, *A. variegatum*, *R. annulatus*, *A. gambiae* y *D. melanogaster*.

Proteínas de artrópodos					
	<i>R. microplus</i>	<i>A. variegatum</i>	<i>R. annulatus</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>R. microplus</i>	100%	93.16%	97.36%	60.28%	58.16%
<i>A. variegatum</i>	93.16%	100%	91.63%	56.41%	54.70%
<i>R. annulatus</i>	97.36%	91.63%	100%	56.83%	54.63%
<i>A. gambiae</i>	60.28%	56.41%	56.83%	100%	73.05%
<i>D. melanogaster</i>	58.16%	54.70%	54.63%	73.05%	100%

El porcentaje de similitud de BmVDAC con las VDAC de otras garrapatas fue el mayor de todos (93.16% a 97.36%). Las proteínas de mamíferos tuvieron porcentajes de identidad con BmVDAC (58.16% - 58.51%) similares a las de *A. gambiae* y *D. melanogaster* la misma proteína de *R. microplus* (58.16% - 60.28%). Las estructuras de las proteínas de mamífero fueron usadas para la generación de un modelo tridimensional por homología usando el programa EasyModeller (Kuntal et al., 2010), ya que cuentan con un porcentaje de identidad suficiente (Xiang, 2006).

9.2.2 Localización de los RMPC en regiones accesibles de BmVDAC.

Usando como base el modelo tridimensional generado, los RMPC presentes en regiones no transmembranales se determinaron comparando la estructura generada por homología con la estructura de VDAC1 de humano disponible en SWISS-MODEL (número de acceso P21796). los residuos que se encuentran expuestos son tirosina 6 y 61, treonina 36, 106 y 158, serina 164 y lisina 109 (Figura 25).

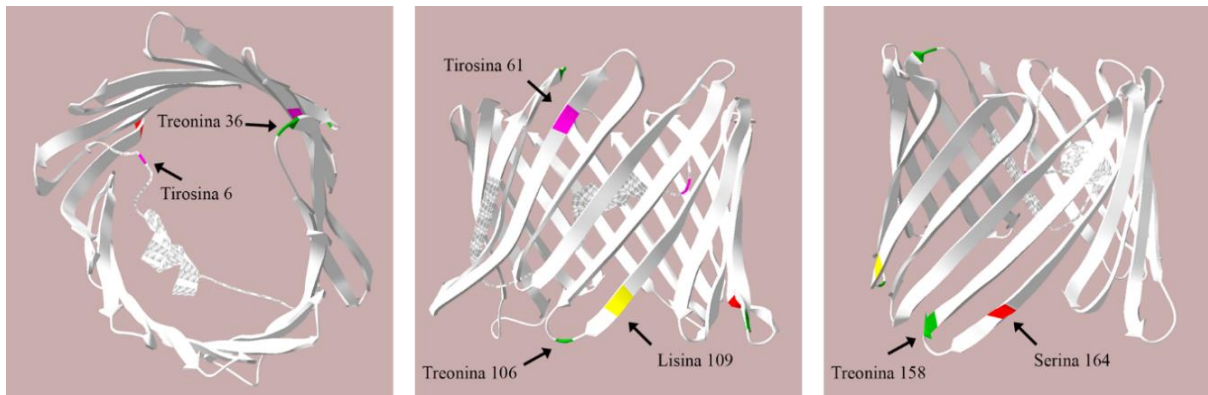


Figura 25: Modelo tridimensional de BmVDAC generado por homología. En el modelo se indican los RMPC que se encuentran en regiones no transmembranales.

Adicionalmente, se realizó una predicción de “pockets” usando CASTp (Tian et al., 2018) para determinar los RMPC presentes en concavidades en la superficie de BmVDAC accesibles a través de la apertura del canal. El pocket principal predicho cuenta con 3 aperturas, un área de superficie de 3873 \AA^2 (Figura 26A). En la superficie accesible del pocket, los RMPC fueron señalados. En total, 9 RMPC pertenecientes al pocket fueron encontrados, estos residuos son lisina 109 y 114, serina 56, 46, 231 y 164, treonina 69 y 106 y tirosina 6 (Figura 26B).

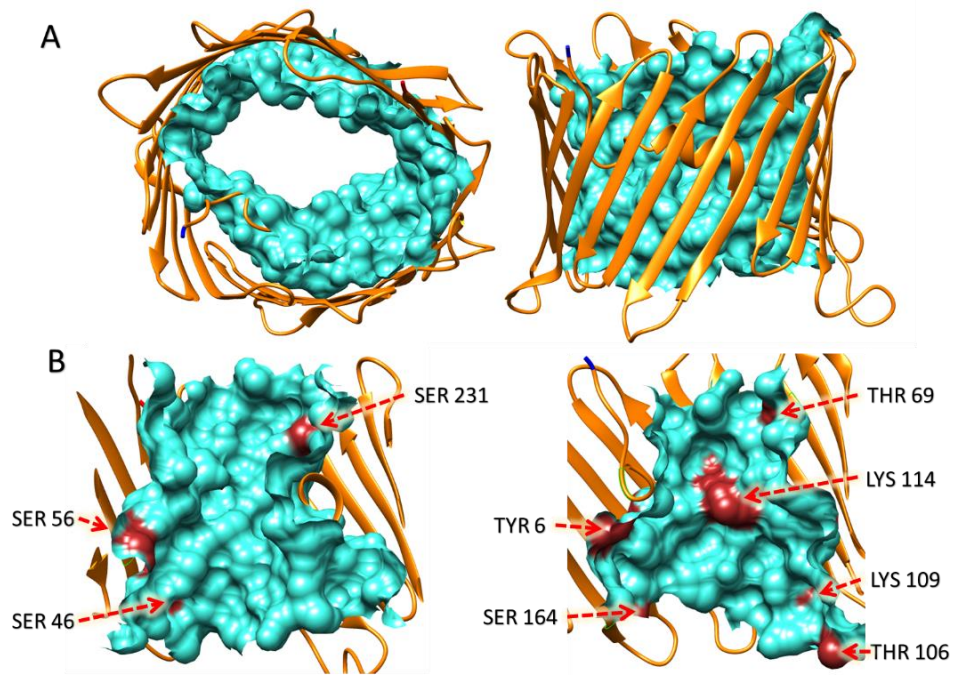


Figura 26: Representación del pocket de mayor tamaño predicho mediante CASTp. (A) Representación del pocket de mayor tamaño de BmVDAC generado con CASTp (azul) y su ubicación con respecto a la estructura terciaria (naranja). (B) Posición de los residuos modificados predichos sobre la superficie del pocket.

9.2.3 Predicción de las interacciones de BmVDAC con el BtPg

Para determinar si BmVDAC y BtPg se realizaron predicciones *in silico*. La primera predicción se realizó con la herramienta PSOPIA, la cual predice la probabilidad de que dos proteínas interactúen con base en su secuencia de aminoácidos, dominios predichos y en cálculos basados en redes neurales (Murakami y Mizuguchi, 2014). Las puntuaciones idénticas de la predicción a nivel de secuencia de interacción de BmVDAC con BtPg (Figura 27A) con los homólogos humanos de VDAC y el plasminógeno (Figura 27B) sugieren que hay una afinidad similar entre las proteínas del bovino y de la garrapata.

A

SEQUENCE1: BmVDAC-PLASMINOGEN Pfam
 SEQUENCE2: BmVDAC-PLASMINOGEN Pfam

Sseq	Sdom	Snet	Sall
0.3537	0.0000	0.0000	0.3537

B

SEQUENCE1: VDAC-PLASMINOGENO_Humano Pfam
 SEQUENCE2: VDAC-PLASMINOGENO_Humano Pfam

Sseq	Sdom	Snet	Sall
0.3537	0.0000	0.0000	0.3537

Figura 27: Puntuación de PSOPIA para las interacciones de BmVDAC con los plasminógenos bovino y humano. Puntuación para (A) la interacción de BmVDAC y BtPg y (B) VDAC y plasminonógeno humano (“SEQUENCE1” y “SEQUENCE2” nombran el archivo FASTA del cual se obtuvieron las secuencias para la predicción). Las puntuaciones corresponden a comparación de secuencias (Sseq), probabilidad de interacción de los dominios individuales (Sdom) y camino mas corto entre proteínas homólogas en una red de interacción (Snet) y puntuación total (Sall).

La determinación de los residuos que fungen como sitios de interacción fue realizada con el programa BSpred (Mukherjee y Zhang, 2011). El algoritmo de BSpred predijo 29 posibles residuos de aminoácidos pertenecientes a sitios predichos para interacción (Figura 28A), de los cuales uno es un sitio modificado predicho y dos se encuentran adyacentes a sitios modificados predichos (Figura 28B).

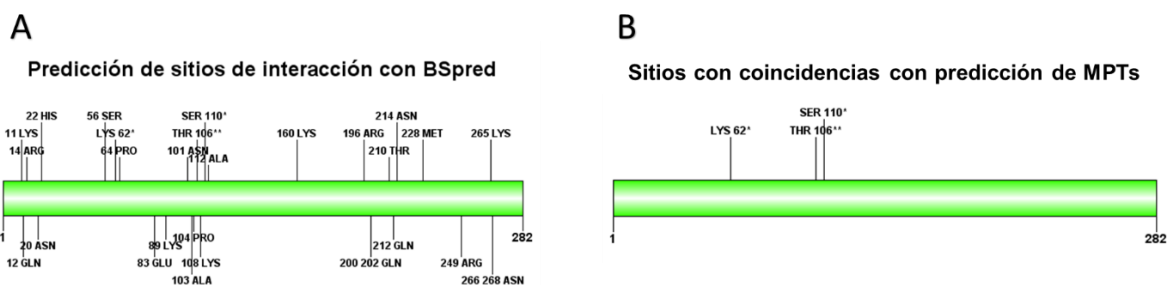


Figura 28: Sitios de interacción predichos usando el programa BSpred. (A) Sitios de interacción predichos, se obtuvieron 29 posibles residuos que participan en la interacción, (B) de los cuales, se indica cual corresponde a un RMPC (***) o adyacentes a RMPC (*).

9.2.4 Modificación postraduccional *in silico*

El modelo de BmVDAC fue modificado *in silico* usando la herramienta Vienna-PTM, para incluir los RMPC en la estructura de la proteína. Tanto el modelo de BmVDAC no modificado (BmVDAC_S) como el modelo modificado (BmVDAC_M) se usaron para realizar las predicciones de docking molecular.

9.2.5 Docking proteína-proteína

Las predicciones de docking proteína-proteína realizadas con dos protocolos: Hex y PatchDock/FireDock. Usando Hex se obtuvieron los 100 resultados con menor ΔG para cada combinación de receptor/ligando. En el segundo protocolo, se obtuvieron 100 resultados con el programa PatchDock. De estos resultados, los 10 con menor ΔG fueron procesados con el programa FireDock. Los modelos obtenidos con ambos protocolos fueron analizados y se excluyeron los modelos en los que el ligando interactuara con regiones transmembranales del receptor.

Los residuos de cada proteína que participaban en interacciones y el tipo de interacciones se determinaron usando Molegro Molecular Viewer (Molexus) (Tabla S1). Se comparó el ΔG entre los complejos con receptor BmVDAC_M contra los que tienen BmVDAC_S y el mismo ligando. La comparación se hizo usando los complejos con menor ΔG de cada combinación de receptor ligando. La tabla 6 muestra la comparación de los resultados obtenidos con Hex y la tabla 7 los resultados obtenidos con PatchDock/FireDock.

Tabla 6: Resultados de los dockings realizados con Hex. En la tabla se muestra la ΔG del modelo termodinámicamente más estable en la que las proteínas interactúan con regiones accesibles de BmVDAC.

Resultados de energía libre (J/mol) de los dockings obtenidos con Hex		
	Receptor	
Ligando	BmVDAC_S	BmVDAC_M
P. completa	-403.6	-681.8733
Kringle 1	-637.1	-13261.27
Kringle 2	-424	2424.371
Kringle 3	-423	-1341.443
Kringle 4	-344.8	5415.238
Kringle 5	-667.1	-19020.51
Pan	-477.1	-4112.561

Tabla 7: Resultados de los dockings realizados con PatchDock/FireDock. En la tabla se muestra la ΔG del modelo termodinámicamente más estable en la que las proteínas interactúan con regiones accesibles de BmVDAC.

Resultados de energía libre (kcal/mol) de los dockings obtenidos con PatchDock/FireDock		
	Receptor	
Ligando	BmVDAC_S	BmVDAC_M
P. completa	-6.22	-25.31
Kringle 1	5.03	-19.54
Kringle 2	0.24	4.64
Kringle 3	0.43	1.92
Kringle 4	8.73	3.63
Kringle 5	-0.36	-1.61
Pan	-18.68	-1.88

9.2.6 Análisis de los resultados de docking molecular

En la mayoría de los complejos obtenidos tanto en Hex como en PatchDock la energía libre de los complejos que tienen BmVDAC_M como receptor es menor en comparación de las que tienen a BmVDAC_S. Las únicas predicciones que tuvieron resultados consistentes con ambos programas al comparar el ΔG con el receptor modificado y no modificado fueron los que tuvieron como ligando al BtPg y los dominios Kringle 1, 2 y 5 (Tabla 8).

Tabla 8: Comparación de los resultados del ΔG de los complejos generados con HEX y PatchDock/FireDock. Los ligandos resaltados en verde indican que en ambos programas el complejo con BmVDAC_M como receptor es termodinámicamente más estable, los ligandos resaltados en rojo indican que en ambos programas el complejo con BmVDAC_S como receptor es termodinámicamente más estable, los ligandos resaltados en amarillo corresponden a resultados inconsistentes entre ambos programas.

Receptor del complejo con el ΔG termodinámicamente más estable.		
Ligando del complejo	Programa utilizado	
	Hex	PatchDock/FireDock
P. completa	BmVDAC_M	BmVDAC_M
Kringle 1	BmVDAC_M	BmVDAC_M
Kringle 2	BmVDAC_S	BmVDAC_S
Kringle 3	BmVDAC_M	BmVDAC_S
Kringle 4	BmVDAC_S	BmVDAC_M
Kringle 5	BmVDAC_M	BmVDAC_M
Pan	BmVDAC_M	BmVDAC_S

Los complejos en los que se usaron como ligando los dominios kringle 5 (Figura 29), kringle 1 (Figura 30) y el BtPg (Figura 31) completo tuvieron una ΔG menor al tener a BmVDAC_M como receptor usando ambos protocolos. Por otro lado, los únicos complejos predichos con ambos protocolos que tuvieron una ΔG mayor al interactuar con BmVDAC_M fueron los que tenían a kringle 2 como ligando (Figura 32).

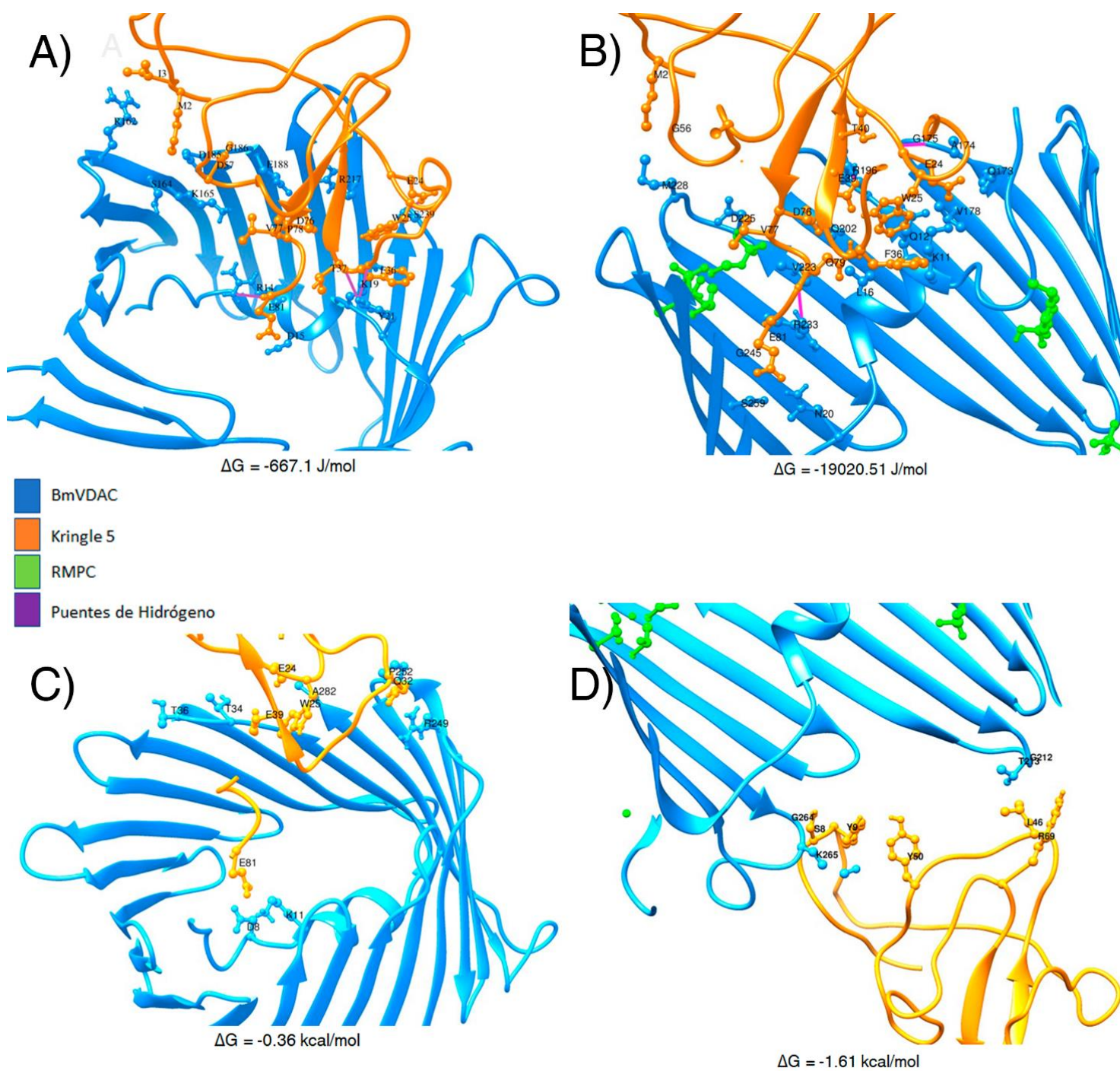


Figura 29: Modelo de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino. Los complejos predichos con los programas Hex (A y B) y PatchDock/FireDock (C y D) fueron comparados. El dominio kringle 5 del BtPg se usó como ligando y BmVDAC_S (A y C) o BmVDAC_M (B y D) como receptor. El complejo con el receptor modificado tuvo la ΔG termodinámicamente más favorable en ambos casos.

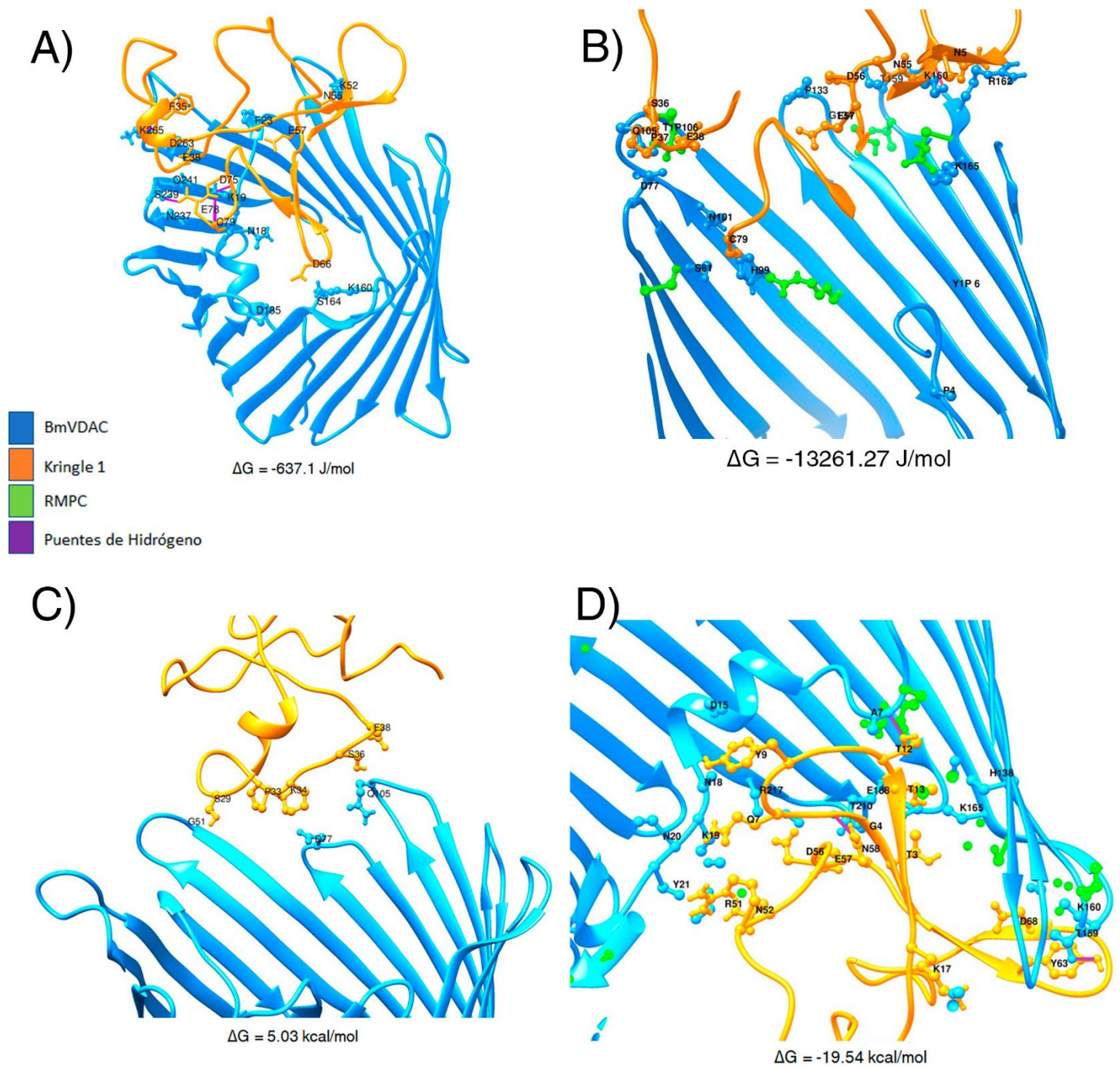


Figura 30: Modelo de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino. Los complejos predichos con los programas Hex (A y B) y PatchDock/FireDock (C y D) fueron comparados. El dominio kringle 1 del BtPg se usó como ligando y BmVDAC_S (A y C) o BmVDAC_M (B y D) como receptor. El complejo con el receptor modificado tuvo la ΔG termodinámicamente más favorable en ambos casos.

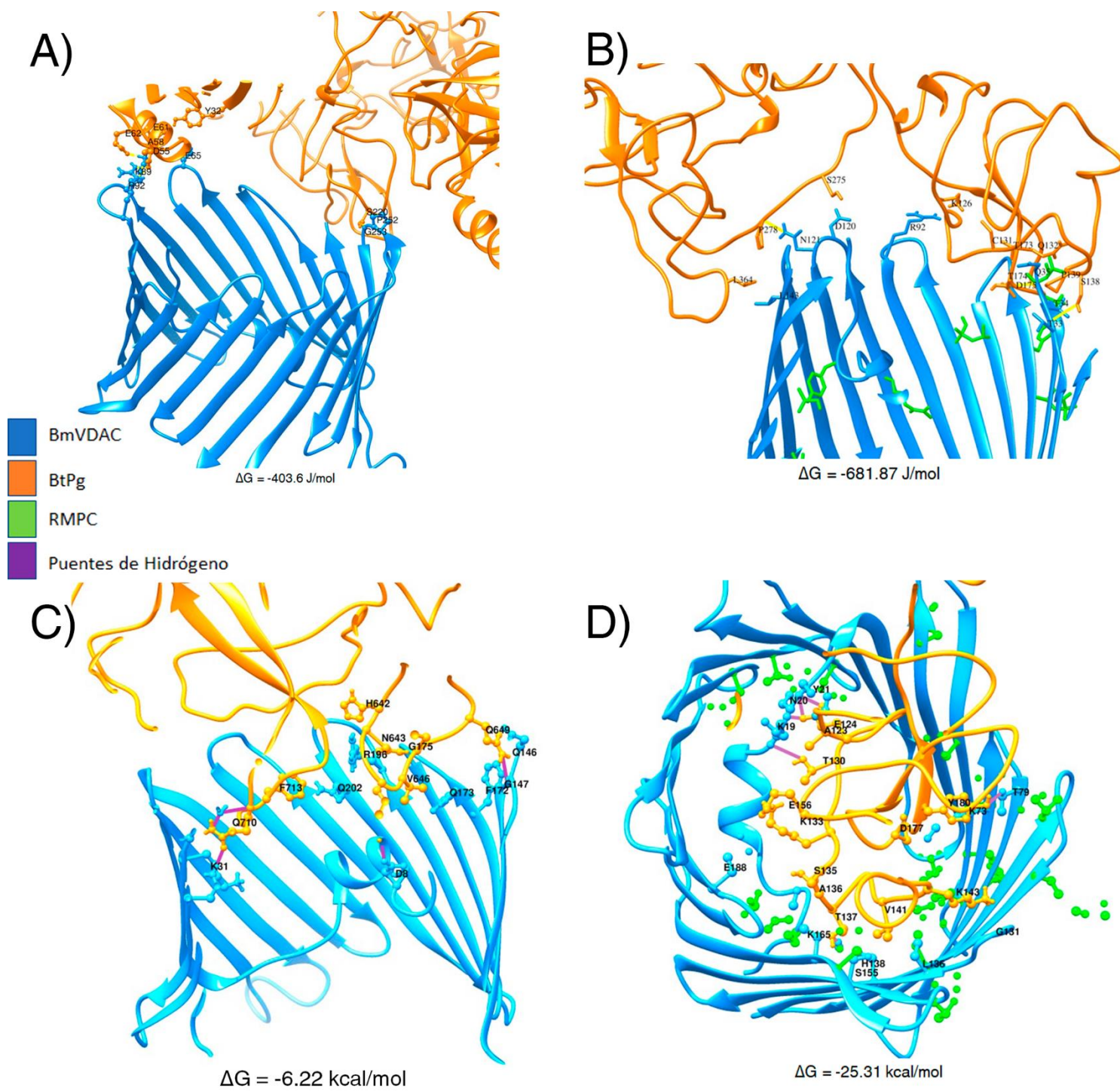


Figura 31: Modelo de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino. Los complejos predichos con los programas Hex (A y B) y PatchDock/FireDock (C y D) fueron comparados. El BtPg completo se usó como ligando y BmVDAC_S (A y C) o BmVDAC_M (B y D) como receptor. El complejo con el receptor modificado tuvo la ΔG termodinámicamente más favorable en ambos casos.

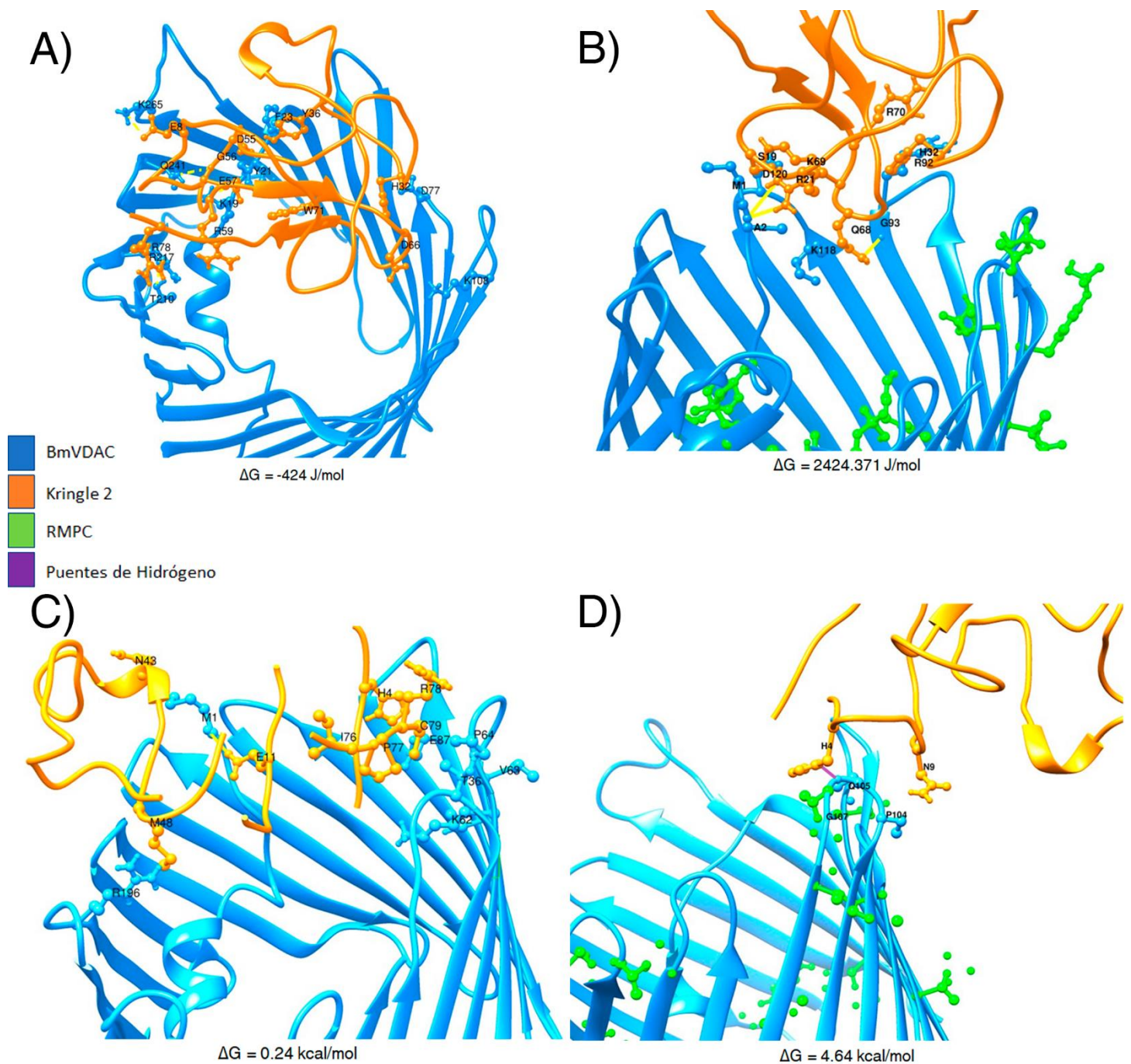


Figura 32: Modelo de interacción entre BmVDAC y el plasminógeno bovino. Los complejos predichos con los programas Hex (A y B) y PatchDock/FireDock (C y D) fueron comparados. El dominio kringle 1 del BtPg se usó como ligando y BmVDAC_S (A y C) o BmVDAC_M (B y D) como receptor. El complejo con el receptor modificado tuvo la ΔG termodinámicamente más favorable en ambos casos.

9.3 Objetivo 4: Proponer un modelo de la posible función de al menos una de estas MPTs de BmVDAC en interacción con el plasminógeno bovino.

9.3.1 Búsqueda bibliográfica

La búsqueda bibliográfica de procesos celulares se enfocó en artículos de investigación y revisiones de evasión de respuesta inmune en invertebrados y cambios en la concentración de metabolitos. En la búsqueda de artículos en los que estuviera involucrado *Babesia spp.* y la evasión de la respuesta inmune en garrapatas, una revisión que menciona los métodos de respuesta inmune en garrapatas ante la infección con *Babesia microti*. Los métodos mencionados en la revisión fueron: expresión de péptidos antimicrobianos y la generación de especies reactivas de oxígeno (Sonenshine y Macaluso, 2017).

Los péptidos antimicrobianos mencionados en el artículo de revisión son defensinas, lisozimas y microplusinas. Una búsqueda bibliográfica posterior indicó que no hay artículos que indiquen una correlación entre el aumento en la expresión de ninguno de estos péptidos antimicrobianos y VDAC en artrópodos. Múltiples artículos de investigación indican una relación entre la respuesta inmune iniciada mediante receptores tipo NOD (NLRs) y la producción de especies reactivas de oxígeno (Saleh, 2011; Shao et al., 2015; Shaw et al., 2016). Tanto vertebrados como invertebrados poseen vías de señalización capaces de inducir la producción de ROS a partir de la activación de NLRs (Shao et al., 2015), sin embargo, en invertebrados no existen reportes que indiquen que VDAC esté involucrado en esta respuesta.

En artículos revisados respecto a la respuesta inmune contra parásitos intracelulares, el aumento en la concentración de calcio fue un tema recurrente respecto a respuestas celulares mediadas por VDAC, incluyendo la sobreexpresión de VDAC como parte del poro de transición de permeabilidad (PTP) mitocondrial (Gincel et al., 2001; Lele Wang et al., 2015). Con base en esto, la búsqueda bibliográfica se enfocó en el papel del calcio en la invasión de *B. bigemina* en las células del intestino de *R. microplus* y en la expresión de BmVDAC.

Los parásitos del género *Babesia* necesitan altas concentraciones de calcio extracelular y las cinasas dependientes de calcio (CaMKs) de su hospedero para poder llevar a cabo el proceso de invasión (Bork et al., 2006). Actualmente, la información

sobre los mecanismos moleculares que *B. bigemina* lleva a cabo dentro de las células de su hospedero es escasa, sin embargo, usando la información disponible de otros parásitos apicomplejos como *Plasmodium spp.* fue posible generar un modelo hipotético.

Parásitos apicomplejos como *P. falciparum* y *T. gondii* poseen vías de señalización en las que los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) activan las PKCs del parásito o el hospedero (Chakraborty et al., 2017; Millholland et al., 2014). *T. gondii* y *P. falciparum* son capaces de translocar los GPCRs de su hospedero hacia su vacuola parasitófora (Millholland et al., 2014). Al igual que *T. gondii* y *P. falciparum*, *B. bigemina* forma una vacuola parasitófora al invadir las células de su hospedero, sin embargo, la vacuola de *Babesia* se pierde tras un periodo corto (Chakraborty et al., 2017; Gohil et al., 2010). En la vía hipotética propuesta pueden ocurrir dos posibles mecanismos: las GPCRs pueden ser transferidas a la vacuola parasitófora durante el periodo corto de tiempo en el que se encuentra presente, o bien, las GPCRs pueden ser transferidas directamente a la membrana celular de *B. bigemina*.

Los GPCRs secuestradas permiten activar la fosfolipasa C (PLC). La PLC es exportada al citoplasma del hospedero, donde activa las PKCs (Bork et al., 2006; Millholland et al., 2014). Posteriormente, las PKCs del hospedero pueden fosforilar la aducina (Millholland et al., 2014). La aducina es una proteína de unión a componentes del citoesqueleto como la actina. La interacción de la aducina con actina permite estabilizar la unión de la calmodulina con canales iónicos permeables a Ca^{2+} , como TRPC6 (Ayllón et al., 2013; Chakraborty et al., 2017; Matsuoka et al., 2000). La fosforilación de la aducina mediante PKCs disocia la unión de esta proteína con componentes del citoesqueleto. Esta separación permite liberar los canales de Ca^{2+} de la calmodulina e iniciar una internalización de este ion, aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular (Heussler y Stanway, 2008).

El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular es un estímulo que da lugar a la sobreexpresión y oligomerización de VDAC (Jitobaom et al., 2016; Keinan et al., 2013). Adicionalmente, este aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular promueve la activación de CaMKs (Bork et al., 2006; Chakraborty et al., 2017). Las CaMKs son capaces de fosforilar BmVDAC y dar lugar a los fenotipos observados en resultados

previos observados en nuestro equipo de trabajo: la expresión de isoformas fosforiladas y la unión de BmVDAC con el BtPg.

9.3.2 Verificación de componentes del modelo en bases de datos

El modelo hipotético de fosforilación de BmVDAC propuesto en el presente escrito se desarrolló tomando como base 14 artículos científicos publicados en revistas indexadas (9 revisiones y 5 artículos de investigación), los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo y los resultados de las predicciones *in silico* obtenidos para la realización de este escrito. La plausibilidad del modelo depende de que las proteínas que participan en la vía de señalización propuesta tengan homólogos en *Babesia spp.* y garrapatas capaces de servir como vector de estos patógenos. Una búsqueda en la base de datos UniProt permitió verificar que tanto *B. bigemina* como *R. microplus* expresan todas las proteínas necesarias para llevar a cabo la vía de señalización hipotética propuesta (Tabla 9). A la fecha de la escritura de este trabajo, solo se han publicado homólogos putativos de PKC y aducina en *R. microplus*, sin embargo, los homólogos de estas proteínas ya han sido caracterizados en otras garrapatas de la familia Ixodidae como la PKC de *R. appendiculatus* y la aducina de *I. scapularis*. La única proteína sin un homólogo en garrapatas de la familia Ixodidae es TRPC6, sin embargo, cualquier canal catiónico mediado por calmodulina o proteínas del citoesqueleto podría cumplir con la función de TRPC6 (Chakraborty et al., 2017).

Tabla 9: Resultados de la búsqueda de proteínas homólogas a las descritas en el modelo hipotético de fosforilación de BmVDAC.

Proteína de la vía de señalización	Organismo	Número de acceso de UniProt
PLC	<i>B. bigemina</i>	A0A061D1Q8
	<i>B. bovis</i>	A7ASE0
	<i>B. microti</i>	A0A0K3AS94
PKC	<i>R. microplus</i>	A0A6G5A8F4 (proteína putativa)
	<i>R. appendiculatus</i>	A0A131YU47
Aducina	<i>R. microplus</i>	A0A6M2CNF2 (proteína putativa)
	<i>I. scapularis</i>	A0A4D5RS68
Calmodulina	<i>R. microplus</i>	A0A6G5AAT3
		A0A6G4ZUS3
	<i>R. appendiculatus</i>	A0A131YI22
CaMK	<i>R. microplus</i>	A0A6G5A9I8

El modelo hipotético propuesto depende también de que BmVDAC pueda ser fosforilado mediante CaMKs para poder ser plausible. De los 10 RMPC susceptibles a fosforilaciones, los siguientes 8 forman parte de secuencias consenso reconocidas por CaMKs: T36, S46, S56, T69, T106, T158, S164 y S231.

10 Discusión

VDAC es una proteína que puede desempeñar múltiples funciones. En mamíferos la variedad de funciones se debe a la expresión de múltiples isoformas codificadas en múltiples copias del gen, generadas mediante splicing alternativo o generadas mediante modificaciones postraduccionales (Shoshan-Barmatz et al., 2010). *R. microplus* posee un gen homólogo al de *vdac* de mamíferos: *Bmvdac*.

Durante la infección de *B. bigemina*, BmVDAC se sobreexpresa en intestinos de garrapatas, se relocaliza hacia la membrana celular e interactúa con BtPg (Hernández Aparicio, 2020; Rodríguez-Hernández et al., 2015). Este cambio en la función de BmVDAC podría deberse a la expresión de isoformas, lo que se ha descrito en modelos mamíferos (Messina et al., 2012). Debido a que el gen codificado en *R. microplus* no contiene intrones (Rodríguez-Hernández et al., 2012), las isoformas expresadas en las células intestinales de la garrapata podrían ser generadas por múltiples copias del gen o mediante MPTs.

Las isoformas generadas por MPTs en mamíferos permiten regular la interacción de VDAC con otras proteínas. Por ejemplo, la interacción de VDAC con $\alpha\beta$ -tubulina únicamente sucede cuando VDAC ha sido fosforilado. Esta interacción permite regular el metabolismo celular impidiendo la entrada de sustratos de reacciones necesarias para la respiración celular (Maldonado, 2017; Shoshan-Barmatz, N. Maldonado, et al., 2017).

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas es posible determinar si el genoma de una garrapata codifica para múltiples copias de un gen. Una serie de búsquedas mediante BLAST en múltiples bases de datos permitió determinar que solo existe una copia del gen de *Bmvdac* en el genoma de *R. microplus*. Este resultado indica que no es posible que *R. microplus* pueda expresar isoformas de múltiples copias del gen y, por lo tanto, es lógico pensar que las posibles isoformas que se describen en resultados anteriores de nuestro equipo de trabajo son generadas mediante modificaciones postraduccionales.

Las fosforilaciones y acetilaciones son dos MPTs reversibles que han sido descritas en isoformas de VDAC de mamíferos (Sheldon et al., 2011). Estas PTMs disminuyen el PI sin alterar el peso molecular de las proteínas modificadas (Zhu et al., 2005). La

disminución del PI sin cambio en el peso molecular nos lleva a pensar que los spots diferenciales que hemos visto en resultados preliminares son isoformas fosforiladas.

Mediante el uso de 4 programas de predicción de fosforilaciones y acetilaciones, se predijo un total de 15 RMPC en BmVDAC. Para que los RMPC puedan interactuar con otras proteínas, como las enzimas que llevan a cabo la modificación o el BtPg, estas deben estar regiones accesibles de la estructura de BmVDAC. Los canales iónicos que forman un barril- β como BmVDAC tienen dos tipos de regiones accesibles: los residuos no transmembranales y los residuos presentes en pockets moleculares (J. Liang et al., 1998).

Para determinar cuáles residuos se encuentran en regiones accesibles, primero fue necesario generar un modelo tridimensional de BmVDAC mediante homología. El modelo generado por homología se generó usando como molde tres proteínas VDAC de mamífero con un porcentaje de identidad mayor al 50% (lo suficiente para generar un modelo correcto (Stokes-Rees y Sliz, 2010; Xiang, 2006)). Con el modelo tridimensional generado por homología fue posible determinar que siete RMPC se encuentran regiones no transmembranales y nueve en el pocket formado por la concavidad de canal (cuatro de estos residuos se repiten en ambos grupos, es decir, se encuentran en la parte no transmembranal del pocket).

En nuestro grupo de trabajo, el BtPg es uno de los blancos de interacción de mayor interés para nuestro grupo de trabajo. El plasminógeno es un zimógeno precursor a la plasmina, una serina-proteasa involucrada en el proceso de fibrinólisis. A estructura del plasminógeno consta de 5 dominios kringle, un dominio PAN y el dominio proteasa. El dominio PAN mantiene una conformación cerrada de los dominios kringle. Los dominios kringle adoptan una conformación abierta cuando interactúan con moléculas proteínas asociadas al proceso de fibrinólisis como la fibrina o las proteínas de activación del plasminógeno tipo tisular y tipo uroquinasa (tPa y uPa, respectivamente) (Novokhatny, 2008). Una vez que la región entre los dominios kringle 5 y proteasa es accesible a proteasas del organismo como tPa o uPa, o proteasas bacterianas como estreptoquinasas o staphiloquinasas, se realiza un corte proteolítico que libera el dominio proteasa, dando lugar a la plasmina (Pm) (Castellino y Ploplis, 2005; Novokhatny, 2008).

La unión de VDAC con plasminógeno ha sido previamente observada en modelos mamíferos. Particularmente, el dominio kringle 5 del plasminógeno es un ligando de VDAC1 y la unión de estas dos proteínas permite regular múltiples funciones celulares (Li et al., 2014; Y. K. Liang y Bian, 2016). La apoptosis mediante vía intrínseca puede ser iniciada mediante la interacción de VDAC1 en la membrana celular con el dominio kringle 5 del plasminógeno, inhibiendo a AKT. La inhibición de AKT favorece la actividad de GSK3 β y, por consecuencia, la fosforilación de VDAC1. VDAC1 fosforilado es resistente a degradación mediada por ubiquitina y puede acumularse en la membrana externa mitocondrial, permitiendo la salida de citocromo-C al citoplasma (Li et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se demostró que BmVDAC interactúa con el plasminógeno bovino en el intestino de las garrapatas repletas. Las puntuaciones idénticas de la predicción a nivel de secuencia de interacción de BmVDAC con el BtPg sugieren que hay una afinidad similar entre las proteínas del bovino y de la garrapata. La determinación de los residuos que funcionan como sitios de interacción predijo 29 posibles aminoácidos pertenecientes a sitios predichos para interacción, de los cuales uno es un RMPC y dos se encuentran adyacentes a sitios modificados predichos, es decir, forman parte de las secuencias consenso reconocidos por las cinasas.

El análisis anterior no toma en cuenta la conformación tridimensional de BmVDAC ni las regiones del plasminógeno bovino que interactúan con este canal iónico. Para tener un acercamiento más preciso a lo que ocurre en una interacción real se realizó una predicción de docking proteína-proteína mediante dos protocolos. Los dominios del BtPg se incluyeron de manera independiente como ligandos en las predicciones por docking porque se sabe que pueden plegarse e interactuar con otras proteínas de forma independiente (Castellino y Ploplis, 2005; Y. K. Liang y Bian, 2016).

El primer protocolo se realizó con el programa Hex, un programa que previamente ha sido usado para realizar dockings de interacción proteína-proteína (Y. K. Liang y Bian, 2016). Hex realiza la búsqueda de posiciones de interacción mediante un protocolo de rango angular, en el que el ligando rota libremente alrededor del receptor. El programa toma en cuenta 3 factores para generar los modelos de interacción: correlación

estérica (complementariedad de la forma de la superficie), correlación electrostática y el uso de un señuelo como punto de referencia (DARS, por sus siglas en inglés) (D. W. Ritchie et al., 2008). En cada modelo generado, se llevó a cabo un paso adicional de minimización de energía con las condiciones del campo de fuerza OPLS.

Las predicciones de PatchDock están basadas exclusivamente la complementariedad de la superficie de ambas proteínas, asumiendo (Duhovny et al., 2002). Para tener una aproximación más completa, los 10 resultados con mejor puntuación de PatchDock fueron refinados con FireDock. FireDock parte de los resultados de PatchDock y los refina llevando a cabo una serie de cálculos adicionales. En cada modelo, se permite que los residuos que no participan en la interacción roten libremente, dando flexibilidad a la molécula. Posteriormente, se realiza una minimización de energía mediante un modelo de funciones de Monte Carlo y finalmente se calcula la energía libre tomando en cuenta las fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y la fuerza de contacto atómico (ACE, por sus siglas en inglés) (Andrusier et al., 2007).

El modelo de BmVDAC fue modificado *in silico* usando el programa Vienna-PTM, el cual permite añadir modificaciones postraduccionales *in silico* y realizar una simulación corta de dinámica molecular basada en GROMACS (Margreitter et al., 2013).

Al comparar los resultados obtenidos con ambos programas podemos darnos cuenta de que no hay una coincidencia en los residuos que participan en las interacciones de complejos con el mismo receptor y ligando, esto se debe a que los programas usados en ambos protocolos funcionan con algoritmos muy diferentes para la búsqueda de sitios de interacción entre proteínas. Sin embargo, la comparación del cambio en la energía libre de los complejos formados permite realizar comparaciones que expliquen a nivel teórico la manera en la que BmVDAC, presuntamente fosforilado durante la infección con *B. bigemina*, puede interactuar con proteínas como BtPg.

En los resultados de ambos protocolos, los complejos que tenían el plasminógeno completo y los dominios kringle 1 y 5 como ligandos tuvieron una ΔG menor al interactuar con BmVDAC_M en comparación con BmVDAC_S. La fosforilación de VDAC en otros modelos es un mecanismo regulatorio necesario para la interacción con otras proteínas como tubulina o Bak (Li et al., 2014; Sheldon et al., 2011). Kringle 5 es el dominio del plasminógeno mejor caracterizado como ligando de VDAC en

mamíferos. Los resultados del presente trabajo indican que el kringle 5 del BtPg interactúa de manera más eficiente con BmVDAC_M como receptor. El kringle 1 tuvo resultados similares a los de kringle 5, lo que indica que este dominio puede ser un ligando con funciones en nuestro modelo. Los modelos que incluyeron al dominio kringle 2 como ligando tuvieron un comportamiento opuesto, es decir, la interacción es menos eficiente cuando el receptor fue BmVDAC_M.

En algunos dockings donde se usó BmVDAC_S como receptor se predijo que algunos RMPC participan directamente en interacciones (kringle 1, 4, 5 usando Hex y kringle 2, 3, 4, 5 y Pan usando PatchDock/FireDock). Sin embargo, en los dockings que se usa a BmVDAC_M como receptor no se predice que ningún RMPC interactúe directamente con los ligandos. De acuerdo a la literatura, esto puede deberse a la ausencia de dominios de interacción con residuos fosforilados (como los dominios SH2 o PTB) en el plasminógeno (Nishi et al., 2011). El no interactuar directamente, los residuos fosforilados de BmVDAC_M podrían cumplir una función de estabilización de las interacciones estéricas entre ambas proteínas, cumpliendo una función de “hot-spots para interacciones proteína-proteína” (Nishi et al., 2011). Las fosforilaciones de proteínas también pueden cumplir un papel de inhibición de interacción mediante impedimento estérico o de repulsión electrostática por la carga negativa del grupo fosfato (Aguirre et al., 2002), este tipo de regulación negativa podría explicar lo observado en los complejos de kringle 2.

El Ca^{2+} es un ion que puede servir como un cofactor en interacciones proteína-proteína, sin embargo, no se encontraron casos en la literatura de proteínas homólogas a BmVDAC o BtPg que requieran de altas concentraciones de calcio para interactuar. Otro papel importante del Ca^{2+} es el que desempeña durante la fase de invasión intracelular de parásitos del phylum Apicomplexa, como *P. falciparum*. En estos procesos, los parásitos pueden aumentar la concentración de Ca^{2+} de la célula hospedera para alterar el metabolismo de ésta y poder generar un ambiente intracelular y extracelular más favorable para su proliferación (Chakraborty et al., 2017). Con base en lo que se conoce del proceso de invasión de otros parásitos apicomplejos, fue posible generar un modelo hipotético que explique como la invasión de *B. bigemina* puede provocar la sobreexpresión de BmVDAC y su fosforilación mediante el aumento de la concentración de Ca^{2+} de la célula hospedera (Figura 33).

En esta vía hipotética participan proteínas que tienen homólogos tanto en *Babesia spp* como en *R. microplus*. De los 10 residuos fosforilados que se encuentran accesibles a la interacción con otras proteínas, 8 se encuentran en secuencias consenso reconocidas por CaMKs, además, se han descrito homólogos de estas cinasas en *R. microplus* y otras garrapatas evolutivamente relacionadas como *Ixodes scapularis*, por lo que es posible que la fosforilación de BmVDAC se encuentre mediada por estas cinasas durante la infección con *B. bigemina*.

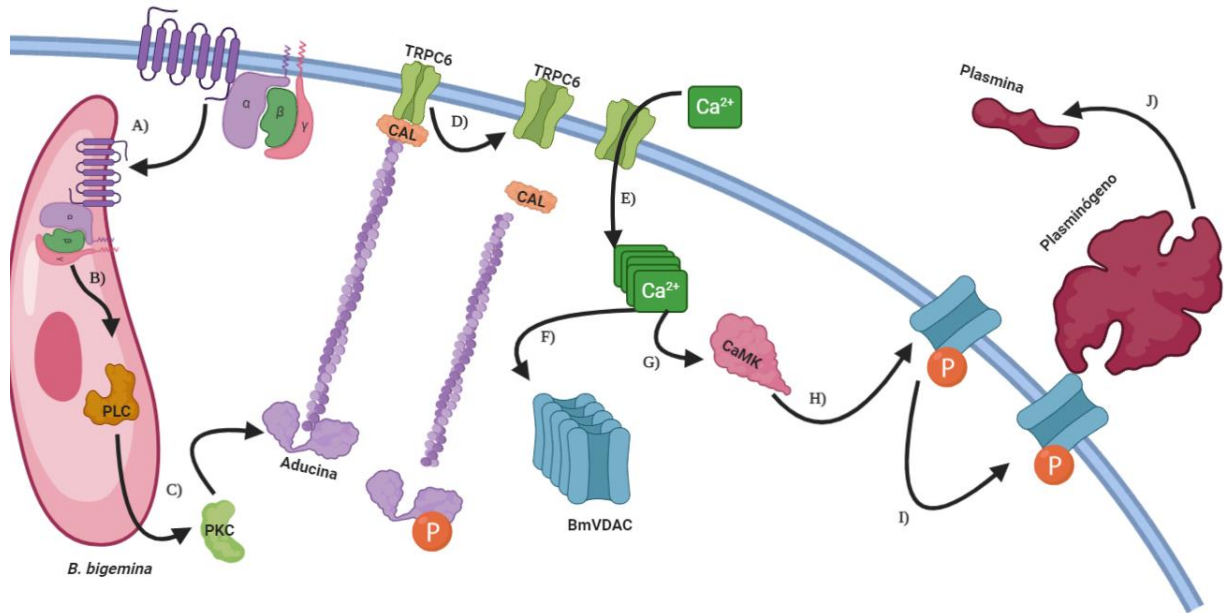


Figura 33: Modelo hipotético que explica la sobreexpresión y fosforilación de BmVDAC mediadas por un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular. En su fase intracelular, *B. bigemina* puede secuestrar GPCRs e integrarlos a su membrana celular (A). La unión del ligando al GPCR secuestrado permitiría que se active la fosfolipasa C de *B. bigemina* (B), la cual a su vez puede ser transportada al citoplasma del hospedador y fosforilar la PKC del hospedador, esta cinasa a su vez fosforila a la aducina unida a proteínas del citoesqueleto (como $\alpha\beta$ -tubulina) (C). La fosforilación de la aducina causa cambios estructurales en las proteínas del citoesqueleto, lo que libera la calmodulina de canales de Ca^{2+} , permitiendo la apertura de canales iónicos permeables a Ca^{2+} , como TRPC6 o un homólogo (D). La apertura de canales de Ca^{2+} causa un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (E), este aumento en la concentración del ion es una señal que induce la sobreexpresión y relocalización de BmVDAC (Shoshan-Barmatz et al., 2010) (F) y activa las CaMKs (G). Las CaMKs pueden fosforilar múltiples proteínas del hospedador (Chakraborty et al., 2017), entre las que se encuentra BmVDAC (H). La fosforilación de BmVDAC permite su interacción con BtPg (I) y esta interacción permite la maduración del BtPg a plasmina (J).

Con nuestros resultados podríamos hipotetizar que la unión de BmVDAC fosforilada al plasminógeno, activa este a plasmina que conduce a la fibrinólisis ayudando a que los cigotos de *B. bigemina* invadan las células epiteliales del intestino de *R. microplus*. El modelo propuesto requiere que *B. bigemina* se encuentre en la fase intracelular de la invasión en las células intestinales de *R. microplus*, es decir, la misma fase en la que se han observado la expresión de posibles isoformas en resultados preliminares y que,

además, se observó la interacción del BtPg-BmVDAC en ensayos de inmunoprecipitación (Hernández Aparicio, 2020).

11 Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que solo existe una copia del gen de *Bmvdac* en el genoma de *R. microplus*. Con base en esta información se puede concluir que las posibles isoformas observadas en resultados preliminares de nuestro equipo de trabajo son generadas mediante modificaciones postraduccionales.

El uso de herramientas bioinformáticas permitió generar un modelo tridimensional de BmVDAC mediante homología en el que se identificaron 12 RMPC únicos, ubicados en regiones no transmembranales y en pockets moleculares.

Las predicciones de docking molecular permitieron ver la manera en la que BmVDAC puede formar complejos con BtPg mediante interacción proteína-proteína. Al comparar la ΔG de los complejos formados, se observó que, al estar fosforilado, BmVDAC puede formar complejos más estables con el plasminógeno en las predicciones realizadas con ambos protocolos de docking (tomando como ligando de BmVDAC al plasminógeno completo). Este comportamiento se observó también al usar los dominios kringle 1 y kringle 5 como ligando. Sin embargo, la ΔG de los complejos en los que el dominio kringle 2 es menos favorable cuando BmVDAC se encuentra fosforilado.

En algunos de los complejos con el receptor no fosforilado, los RMPC interactuaban directamente con RMPC, sin embargo, estos residuos no participan en interacciones en un modelo de receptor fosforilado. Esto es un indicador de que, en este modelo, los residuos modificados tienen la función de favorecer la compatibilidad estérica entre el ligando y el receptor para formar complejos más estables, en lugar de participar en la interacción directamente.

12 Perspectivas

La información generada por los análisis bioinformáticos puede ser confirmada mediante pruebas *in vitro* en el laboratorio. Una posible aproximación para esto podría ser la expresión de una proteína quimérica formada por los péptidos de BmVDAC en los que se encuentran los RMPC que estén presentes en la mayoría de las interacciones predichas (como serina 164 y treonina 36, que siempre se encuentran cercanos a sitios de interacción en los modelos con BmVDAC_M, con la excepción del modelo que tiene como ligando a kringle 5, predicho con PatchDock/FireDock). Si esta proteína quimérica se llegara a usar como antígeno y resultara ser inmunogénico en bovinos, disminuir la viabilidad de las garrapatas que se alimenten del bovino y previene la infección transovárica de *B. bigemina*, podría ser usada como vacuna recombinante en nuevas estrategias de control integral de la garrapata.

13 Referencias:

- Aguilar-Tipacamú, G., & Rodríguez-Vivas, R. I. (2003). Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 111(2–3), 211–216. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00355-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00355-2)
- Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., & White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1531–1537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101521200>
- Ali, I., Conrad, R. J., Verdin, E., & Ott, M. (2018). Lysine Acetylation Goes Global: From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics Graphical Abstract HHS Public Access. *Chem Rev*, 118(3), 1216–1252. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00181>.Lysine
- Álvarez-Hernández, G., Roldán, J. F. G., Milan, N. S. H., Lash, R. R., Behravesh, C. B., & Paddock, C. D. (2017). Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(6), e189–e196. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 195–215. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>
- Andrusier, N., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2007). FireDock: Fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins*, 69(June 2007), 139–159. <https://doi.org/10.1002/prot.21495>
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Muzio, L. Lo. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 271–280. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>
- Artigas-Jerónimo, S., De La Fuente, J., & Villar, M. (2018). Interactomics and tick vaccine development: new directions for the control of tick-borne diseases. *Expert Review of Proteomics*, 15(8), 627–635. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1506701>

- Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). *A Review of Bovine Anaplasmosis*. 58, 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Ayllón, N., Villar, M., Busby, A. T., Kocan, K. M., Blouin, E. F., Bonzón-Kulichenko, E., Galindo, R. C., Mangold, A. J., Alberdi, P., De la Lastra, J. M. P., Vázquez, J., & De la Fuentea, J. (2013). Anaplasma phagocytophilum Inhibits Apoptosis and Promotes Cytoskeleton Rearrangement for Infection of Tick Cells. *Infection and Immunity*, 81(7), 2415–2425. <https://doi.org/10.1128/IAI.00194-13>
- Bastos, R. G., Ueti, M. W., Knowles, D. P., & Scoles, G. A. (2010). The Rhipicephalus (Boophilus) microplus Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute Babesia bovis infection. *Parasites and Vectors*, 3(1), 111. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-111>
- Betancur Hurtado, O. J., & Giraldo-Ríos, C. (2016). Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. In *Ticks and Tick-Borne Pathogens: Vol. i* (Issue tourism, p. 13). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Betancur Hurtado, O. J., & Giraldo-Ríos, C. (2019). Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81167>
- Binnington, K. C. (1978). Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, Boophilus microplus. *International Journal for Parasitology*, 8(2), 97–115. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(78\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(78)90004-8)
- Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*, 294(5), 1351–1362. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3310>
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensem, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(7), S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Bork, S., Das, S., Okubo, K., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2006). Effects of protein kinase inhibitors on the in vitro growth of Babesia bovis. *Parasitology*, 132(6), 775–779. <https://doi.org/10.1017/S0031182006009917>

- Bouyer, G., Cueff, A., Egée, S., Kmiecik, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., Gallagher, P. G., & Thomas, S. L. Y. (2011). Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood*, *118*(8), 2305–2312. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329300>
- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M., & de la Fuente, J. (1997). Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. *Vaccine*, *15*(4), 414–422. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00192-2)
- Castellino, F. J., & Ploplis, V. A. (2005). Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thrombosis and Haemostasis*, *93*(4), 647–654. <https://doi.org/10.1160/TH04-12-0842>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Ticks*. <https://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Life cycle of Hard Ticks that Spread Disease*. https://www.cdc.gov/ticks/life_cycle_and_hosts.html
- Chakraborty, S., Roy, S., Mistry, H. U., Murthy, S., George, N., Bhandari, V., & Sharma, P. (2017). Potential sabotage of host cell physiology by apicomplexan parasites for their survival benefits. *Frontiers in Immunology*, *8*(OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01261>
- Chicoine, A. L., Durden, D. A., Macnaughton, G., & Dowling, P. M. (2007). Ivermectin use and resulting milk residues on 4 Canadian dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, *48*(November 2004).
- Coats, J. R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, *87*, 255–262. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087255>
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, *11*(3), 315–335.

<https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>

- Contreras, M., & de la Fuente, J. (2016). Control of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* tick infestations in rabbits vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. *Vaccine*, *34*(27), 3010–3013. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.092>
- Danelishvili, L., Chinison, J. J. J., Pham, T., Gupta, R., & Bermudez, L. E. (2017). The Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) of *Mycobacterium avium* phagosome are associated with bacterial survival and lipid export in macrophages. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06700-3>
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, *152*(3–4), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>
- De La Fuente, J., & Kocan, K. M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*, *28*(7), 275–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x>
- De la Fuente, J., & Merino, O. (2013). Vaccinomics , the new road to tick vaccines. *Vaccine*, *31*(50), 5923–5929.
- Deng, W., Wang, C., Zhang, Y., Xu, Y., Zhang, S., Liu, Z., & Xue, Y. (2016). GPS-PAIL: Prediction of lysine acetyltransferase-specific modification sites from protein sequences. *Scientific Reports*, *6*(December), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep39787>
- Diario Oficial de la federación. (1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994, Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp.**
- Días Carrasco, M. S., Espuny, A., Escudero, E., & Cárceles, C. M. (2000). *FARMACOLOGÍA DE LOS ENDECTOCIDAS: APLICACIONES TERAPÉUTICAS (II)*. *40*, 15–39.
- Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., & Arnesen, T. (2016). The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1864*(10), 1372–1401. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.007>

- Drexler, N., Miller, M., Gerding, J., Todd, S., Adams, L., Dahlgren, F. S., Bryant, N., Weis, E., Herrick, K., Francies, J., Komatsu, K., Piontkowski, S., Velascosoltero, J., Shelhamer, T., Hamilton, B., Eribes, C., Brock, A., Sneezy, P., Goseyun, C., ... McQuiston, J. H. (2014). Community-based control of the brown dog tick in a region with high rates of rocky mountain spotted fever, 2012-2013. *PLoS ONE*, *9*(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112368>
- Duhovny, D., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2002). Efficient unbound docking of rigid molecules. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, *2452*, 185–200. https://doi.org/10.1007/3-540-45784-4_14
- Estrada-Peña, A., & De La Fuente, J. (2014). The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research*, *108*(1), 104–128. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.016>
- Fox, L. M. (2006). Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *19*, 588–593. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328010774c>
- George, J. E. (2000). Present and Future Technologies for Tick Control. *TROPICAL VETERINARY DISEASES*, *916*, 583–588.
- Gincel, D., Zaid, H., & Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochemical Journal*, *358*(1), 147–155. <https://doi.org/10.1042/bj3580147>
- Gohil, S., Kats, L. M., Sturm, A., & Cooke, B. M. (2010). Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: Moovin' forward. *Trends in Parasitology*, *26*(12), 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.012>
- Gyles, C. (2016). One Medicine, One Health, One World. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, *57*(4), 345–346. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27041751%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4790223>

- Han, B., Ma, Y., Tu, V., Tomita, T., Mayoral, J., Williams, T., Horta, A., Huang, H., & Weiss, L. M. (2019). *Microsporidia Interact with Host Cell Mitochondria via Voltage-Dependent Anion Channels Using Sporoplasm Surface Protein 1*. *10(4)*, 1–24.
- Hernández Aparicio, J. A. (2020). *Identificación de las proteínas que interaccionan con la proteína BmVDAC durante la infección de Rhipicephalus microplus con Babesia bigemina*. Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
- Hernández, F., Langa, E., Cuadros, R., Avila, J., & Villanueva, N. (2010). Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *344(1–2)*, 211–215. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0544-0>
- Heussler, V., & Stanway, R. R. (2008). Cellular and molecular interactions between the Apicomplexan parasites Plasmodium and Theileria and their host cells. *Parasite*, *15(3)*, 211–218. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153211>
- J. Mosqueda, A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamu, & G. J. Canto. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, *19(10)*, 1504–1518. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>
- Jia, N., Wang, J., Shi, W., Du, L., Sun, Y., Zhan, W., Jiang, J. F., Wang, Q., Zhang, B., Ji, P., Bell-Sakyi, L., Cui, X. M., Yuan, T. T., Jiang, B. G., Yang, W. F., Lam, T. T. Y., Chang, Q. C., Ding, S. J., Wang, X. J., ... Cao, W. C. (2020). Large-Scale Comparative Analyses of Tick Genomes Elucidate Their Genetic Diversity and Vector Capacities. *Cell*, *182(5)*, 1328-1340.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.023>
- Jitobaom, K., Tongluan, N., & Smith, D. R. (2016). Involvement of voltage-dependent anion channel (VDAC) in dengue infection. *Scientific Reports*, *6*(September), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35753>
- Keinan, N., Pahima, H., Ben-Hail, D., & Shoshan-Barmatz, V. (2013). The role of calcium in VDAC1 oligomerization and mitochondria-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1833(7)*, 1745–1754. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.017>
- Kuntal, B. K., Aparoy, P., & Reddanna, P. (2010). EasyModeller: A graphical interface

to MODELLER. *BMC Research Notes*, 3, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-226>

- Lapisa. (2016). *Vacuna recombinante coadyuvante para el control de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) spp.* CONTENIDO. http://www.ixovac.com/wp-content/uploads/2017/08/Manual_Ixovac.pdf
- Leal, B., Thomas, D. B., & Dearth, R. K. (2018). Population dynamics of Off-Host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Larvae in response to habitat and seasonality in South Texas. *Veterinary Sciences*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/vetsci5020033>
- Lee, M. S., Kao, S. C., Lemere, C. A., Xia, W., Tseng, H. C., Zhou, Y., Neve, R., Ahlijanian, M. K., & Tsai, L. H. (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *Journal of Cell Biology*, 163(1), 83–95. <https://doi.org/10.1083/jcb.200301115>
- Li, L., Yao, Y. C., Gu, X. Q., Che, D., Ma, C. Q., Dai, Z. Y., Li, C., Zhou, T., Cai, W. Bin, Yang, Z. H., Yang, X., & Gao, G. Q. (2014). Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32628–32638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567792>
- Liang, J., Edelsbrunner, H., & Woodward, C. (1998). Anatomy of protein pockets and cavities: Measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Science*, 7(9), 1884–1897. <https://doi.org/10.1002/pro.5560070905>
- Liang, Y. K., & Bian, L. J. (2016). Voltage-dependent anion channel-1, a possible ligand of plasminogen kringle 5. *PLoS ONE*, 11(10), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164834>
- Liberatori, S., Canas, B., Tani, C., Bini, L., Buonocore, G., Godovac-Zimmermann, J., Mishra, O. P., Delivoria-Papadopoulos, M., Bracci, R., & Pallini, V. (2004). Proteomic approach to the identification of voltage-dependent anion channel protein isoforms in guinea pig brain synaptosomes. *Proteomics*, 4(5), 1335–1340. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300734>

- Maldonado, E. N. (2017). VDAC-tubulin, an anti-Warburg pro-oxidant switch. *Frontiers in Oncology*, 7(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00004>
- Manjunathachar, H. V., Saravanan, B. C., Kesavan, M., Karthik, K., Rathod, P., Gopi, M., Tamilmahan, P., & Balaraju, B. L. (2014). Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(S2), S770–S779. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60725-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60725-8)
- Margreitter, C., Petrov, D., & Zagrovic, B. (2013). Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), 422–426. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt416>
- Matsuoka, Y., Li, X., & Bennett, V. (2000). Adducin: Structure, function and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(6), 884–895. <https://doi.org/10.1007/PL00000731>
- Mayya, V. K., & Duchaine, T. F. (2019). Ciphers and executioners: How 3'-untranslated regions determine the fate of messenger RNAs. *Frontiers in Genetics*, 10(January), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00006>
- McCoy, K. D., Léger, E., & Dietrich, M. (2013). Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(October), 57. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00057>
- Menzel, V. A., Cassará, M. C., Benz, R., De Pinto, V., Messina, A., Cunsolo, V., Saletti, R., Hinsch, K. D., & Hinsch, E. (2009). Molecular and functional characterization of VDAC2 purified from mammal spermatozoa. *Bioscience Reports*, 29(6), 351–362. <https://doi.org/10.1042/BSR20080123>
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., & Moreno-cid, J. A. (2013). Vaccination with proteins involved in tick – pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*, 31(49), 5889–5896.
- Messina, A., Reina, S., Guarino, F., & De Pinto, V. (2012). VDAC isoforms in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(6), 1466–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.005>
- Millholland, M. G., Mishra, S., Dupont, C. D., Love, M. S., Shilling, D., Kazanietz, M.

- G., Foskett, J. K., Hunter, C. A., Sinnis, P., & Greenbaum, D. C. (2014). A Host GPCR Signaling Network Required for the Cytolysis of Infected Cells Facilitates Release of Apicomplexan Parasites. *Cell Host Microbe.*, 13(1), 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.001.A>
- Mukherjee, S., & Zhang, Y. (2011). Protein-protein complex structure predictions by multimeric threading and template recombination. *Structure*, 19(7), 955–966. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.04.006>
- Murakami, Y., & Mizuguchi, K. (2014). Homology-based prediction of interactions between proteins using Averaged One-Dependence Estimators. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-213>
- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). Worth Publishers.
- Nishi, H., Hashimoto, K., & Panchenko, A. R. (2011). Phosphorylation in protein-protein binding: Effect on stability and function. *Structure*, 19(12), 1807–1815. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.021>
- Nolan, T. (2012). Macrocyclic Lactones in the Treatment and Control of Parasitism in Small Companion Animals. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, 1078–1094. <https://doi.org/10.2174/138920112800399167>
- Novokhatny, V. (2008). Structure and activity of plasmin and other direct thrombolytic agents. *Thrombosis Research*, 122(SUPPL. 3), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.06.018>
- Olds, C., Mwaura, S., Crowder, D., Odongo, D., Van Oers, M., Owen, J., Bishop, R., & Daubenberger, C. (2012). Immunization of cattle with Ra86 impedes *Rhipicephalus appendiculatus* nymphal-to-adult molting. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3(3), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.03.003>
- Ortega-Sánchez, R., Camacho-Nuez, M., Castañeda-Ortiz, J. E., Martínez-Benítez, M. B., Hernández-Silva, D. J., Aguilar-Tipacamú, G., & Mosqueda, J. (2019). Effect of immunization of cattle with recombinant BmVDAC on the infection process of *Babesia bigemina* in response to *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine*.

- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(6), 897–928. <https://doi.org/10.1086/319347>
- Pérez, T. M., Guzmán-Cornejo, C., Montiel-Parra, G., Paredes-León, R., & Rivas, G. (2014). Biodiversidad de ácaros en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 399–407. <https://doi.org/10.7550/rmb.36160>
- Perrin, B. J., & Ervasti, J. M. (2010). The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton*, 67(10), 630–634. <https://doi.org/10.1002/cm.20475>
- Raghavana, A., Sheiko, T., Gragam, B. H., & Craigen, W. J. (2015). Voltage-dependant anion channels: Novel insights into isoform function through genetic models. *Biochim Biophys Acta.*, 1818(5), 213–223. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-673-3>
- Ramón, J., Sáenz, G., & Hernández, R. (2012). *Boophilus microplus : estado actual de la resistencia a los acaricidas en la frontera México Estados Unidos y su impacto en la relación comercial Boophilus microplus : current status of acaricide resistance on the Mexican American border and its impact on.* 3(370), 1–8.
- Raoult, D., & Roux, V. (1997). Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 694–719. <http://cmr.asm.org/content/10/4/694.abstract>
- Rego, R. O. M., Trentelman, J. J. A., Anguita, J., Nijhof, A. M., Sprong, H., Klempa, B., Hajdusek, O., Tomás-Cortázar, J., Azagi, T., Strnad, M., Knorr, S., Sima, R., Jalovecka, M., Fumačová Havlíková, S., Ličková, M., Sláviková, M., Kopacek, P., Grubhoffer, L., & Hovius, J. W. (2019). Counterattacking the tick bite: Towards a rational design of anti-tick vaccines targeting pathogen transmission. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3468-x>
- Reina, S., Guarino, F., Magri, A., & De Pinto, V. (2016). VDAC3 as a potential marker of mitochondrial status is involved in cancer and pathology. *Frontiers in Oncology*, 6(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00264>

- Ritchie, D., & Orpailleur, T. (2013). Hex 8.0.0 User Manual. *Protein Docking Using Spherical Polar Fourier Correlations*.
- Ritchie, D. W., Kozakov, D., & Vajda, S. (2008). Accelerating and focusing protein-protein docking correlations using multi-dimensional rotational FFT generating functions. *Bioinformatics*, 24(17), 1865–1873. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn334>
- Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., Alvarez-Sánchez, M. E., Neri, A. F., Mendoza-Hernández, G., & Camacho-Nuez, M. (2012). The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of Babesia bigemina sexual stages with Rhipicephalus microplus midgut cells. *Veterinary Parasitology*, 187(3–4), 538–541. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.028>
- Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., León-Ávila, G., Castañeda-Ortiz, E. J., Álvarez-Sánchez, M. E., Camacho, A. D., Ramos, A., & Camacho-Nuez, M. (2015). BmVDAC upregulation in the midgut of Rhipicephalus microplus, during infection with Babesia bigemina. *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 368–374. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.016>
- Rodriguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M. M., Rosado-Aguilar, J. A., Trinidad-Martinez, I., Torres-Acosta, J. Felipe de J., Ticante-Perez, V., Castro-Marín, J. m., Tapia-Moo, C. A., & Vázquez-Gómez, G. (2013). Red deer (*Cervus elaphus*) as a host for the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. 1937, 543–552. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9672-z>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Pérez-Cogollo, L. C., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Trinidad-Martinez, I., Miller, R. J., Li, A. Y., Pérez de León, A., Guerrero, F., & Klafke, G. (2014). Rhipicephalus (Boophilus) microplus resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 23(2), 113–122. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014044>
- Rodríguez Vivas, R. I., Grisi, L., De León, A. A. P., Villela, H. S., De Jesús Torres-Acostaa, J. F., Sánchez, H. F., Salas, D. R., Cruz, R. R., Saldierna, F., & Carrasco,

- D. G. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61–74. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>
- Rojas-Martínez, C., Rodríguez-Vivas, R. I., Millán, J. V. F., Bautista-Garfias, C. R., Castañeda-Arriola, R. O., Lira-Amaya, J. J., Urióstegui, P. V., Carrasco, J. J. O., & Martínez, J. A. Á. (2018). Bovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured in vitro with a serum-free medium. *Parasitology International*, 67(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.11.004>
- Rosario Cruz, R., & Dominguez García, D. I. (2009). *Estrategias para el control de la garrapata Boophilus microplus y la mitigación de la resistencia a los pesticidas*. 6, 22.
- Salazar B., R., Barahona-Rosales, R., & Sánchez, M.-S. (2016). Tick loads in *Bos taurus* cattle grazing in two contrasting production systems. *Revista MVZ Cordoba*, 21(2), 5404–5415. <https://doi.org/10.21897/rmvz.606>
- Saleh, M. (2011). The machinery of Nod-like receptors: Refining the paths to immunity and cell death. *Immunological Reviews*, 243(1), 235–246. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01045.x>
- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). *Reconocimientos internacionales en garrapata Boophilus spp*. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/garrapata-boophilus-spp>
- Shao, B. Z., Xu, Z. Q., Han, B. Z., Su, D. F., & Liu, C. (2015). NLRP3 inflammasome and its inhibitors: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 6(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00262>
- Shaw, D. K., McClure, E. E., Wang, X., & Pedra, J. H. F. (2016). Deviant behavior: Tick-borne pathogens and inflammasome signaling. *Veterinary Sciences*, 3(4), 1–26. <https://doi.org/10.3390/vetsci3040027>
- Sheldon, K. L., Maldonado, E. N., Lemasters, J. J., Rostovtseva, T. K., & Bezrukov, S. M. (2011). Phosphorylation of voltage-dependent anion channel by

serine/threonine kinases governs its interaction with tubulin. *PLoS ONE*, 6(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025539>

Shoshan-Barmatz, V., De Pinto, V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N., & Arbel, N. (2010). VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(3), 227–285. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.03.002>

Shoshan-Barmatz, V., De, S., & Meir, A. (2017). The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1, Ca²⁺ Transport, Apoptosis, and Their Regulation. *Frontiers in Oncology*, 7(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00060>

Shoshan-Barmatz, V., N. Maldonado, E., & Krelin, Y. (2017). VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell Stress*, 1(1), 11–36. <https://doi.org/10.15698/cst2017.10.104>

Shyma, K. P., Gupta, J. P., & Singh, V. (2013). Breeding strategies for tick resistance in tropical cattle: a sustainable approach for tick control. *Journal of Parasitic Diseases*, 39(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s12639-013-0294-5>

Sonenshine, D. E., & Macaluso, K. R. (2017). Microbial invasion vs. tick immune regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00390>

Spickler, A. R. (2007). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus factsheet*. 1–3. <https://entomologytoday.org/tag/rhipicephalus-microplus/>

Stastna, M., & Van Eyk, J. E. (2012). *Analysis of protein isoforms: can we do it better?* 100(2), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations

Stokes-Rees, I., & Sliz, P. (2010). Protein structure determination by exhaustive search of protein data bank derived databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21476–21481. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012095107>

Suárez Pedroso, M., Méndez Mellor, L., Valdez, M., de Moura Souza, R., dos Reis Camargo, A. J., Constanza Vargas, N., & Ascanio Evanoff, E. (2007). Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería Cubana y

en regiones de latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac □ dentro de un programa de lucha integral. *Documento Sexta Conferencia Electrónica Redectopar*, 17.

- Thomas, D. B., Klafke, G., Busch, J. D., Olafson, P. U., Miller, R. A., Mosqueda, J., Stone, N. E., Scoles, G., Wagner, D. M., & Perez-De-Leon, A. (2020). Tracking the Increase of Acaricide Resistance in an Invasive Population of Cattle Fever Ticks (Acari: Ixodidae) and Implementation of Real-Time PCR Assays to Rapidly Genotype Resistance Mutations. *Annals of the Entomological Society of America*, *X*, 1–12. <https://doi.org/10.1093/aesa/saz053>
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., & Liang, J. (2018). CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W363–W367. <https://doi.org/10.1093/nar/gky473>
- Troughton, D. R., & Levin, M. L. (2007). Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, *44*(5), 732–740. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.5.732>
- Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., Kappmeyer, L. S., & Knowles, D. P. (2008). *Persistently Infected Horses Are Reservoirs for Intrastadial Tick-Borne Transmission of the Apicomplexan Parasite Babesia equi* □. *76*(8), 3525–3529. <https://doi.org/10.1128/IAI.00251-08>
- Wang, Lele, Yang, X., & Shen, Y. (2015). Molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(8), 1489–1498. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1810-1>
- Wang, Likun, Du, Y., Lu, M., & Li, T. (2012). ASEB: A web server for KAT-specific acetylation site prediction. *Nucleic Acids Research*, *40*(W1), 376–379. <https://doi.org/10.1093/nar/gks437>
- Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G. S., & Hungerford, J. (1995). Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, *110*(S1), S43. <https://doi.org/10.1017/S0031182000001487>
- Xiang, Z. (2006). Advances in Homology Protein Structure Modeling. *Current Protein*

& *Peptide Science*, 7(3), 217–227. <https://doi.org/10.2174/138920306777452312>

Xue, Y., Liu, Z., Cao, J., Ma, Q., Gao, X., Wang, Q., Jin, C., Zhou, Y., Wen, L., & Ren, J. (2011). GPS 2.1: Enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(3), 255–260. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq094>

Zhu, K., Zhao, J., Lubman, D. M., Miller, F. R., & Barder, T. J. (2005). Protein pI shifts due to posttranslational modifications in the separation and characterization of proteins. *Analytical Chemistry*, 77(9), 2745–2755. <https://doi.org/10.1021/ac048494w>

14 Material suplementario

14.1 Apéndice 1: Tablas suplementarias

Tabla S1: Tabla de interacciones descritas para cada complejo generado por ambos protocolos. Cada tabla indica los residuos que participan en cada tipo de interacción.

*: Un residuo modificado predicho se encuentra cercano a uno solo de los residuos que se encuentran interactuando. **: Un residuo modificado predicho se encuentra cercano a ambos residuos que se encuentran interactuando. ***: El residuo del receptor es un RMPC.

Interacciones predichas usando el programa Hex:

Ligando: Kringle 1		Receptor: BmVDAC_S		$\Delta G: -637.1 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
239	78	263	38	164***	66
19	75	160*	66	241	38
	78	19	78		79
	79	185	66		237
265	35			52*	55
				18	79
				23	57
Ligando: Kringle 2		Receptor: BmVDAC_S		$\Delta G: -424 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
256	8	217	59	21	71
210	78	265	8		55
241	56	77	32	23	36
19	57	108**	66		
		19	57		

Ligando: Kringle 3		Receptor: BmVDAC_S		ΔG: -423 J/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
33*	48			33	47
31	48			50	
281	48			38	9
36	51			34	51
	16			35	45
	17		46		
282	49			64*	17
Ligando: Kringle 4		Receptor: BmVDAC_S		ΔG: -344.8 J/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
202	77	196	77	252	45
249	72	225	76	282	47
	72	227*	76	226	76
231***	78			249	75
225	76			228*	75
227	76				76
Ligando: Kringle 5		Receptor: BmVDAC_S		ΔG: -667.1 J/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
239	24	188	76	186	57
14	81	217	76	162*	3
21	37	185	57	164***	2
	36	15	81	19	36
					25
				188	78
				165**	77

Ligando: PAN		Receptor: BmVDAC_S		$\Delta G: -477.1 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
92	23	92	23	1	62
15	73	15	73	118*	66
60	71	118*	66		67
	74	39*	72	4*	66
		62	71	3*	66
		60	71		
Ligando: Proteína completa		Receptor: BmVDAC_S		$\Delta G: -403.6 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
89	62	89	62	89	58
92	55	92	55	65*	32
253	220	65*	61		61
				253	220
				252	220

Ligando: Kringle 1		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: -13261.27 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
217	63	165**	5	186	15
19	64	188	5	134*	56
160*	5				57
				131	57
				133	56
				159*	56
				160	55
					18
				14*	66
					67
				206	67
				77	37
				105**	36
					38
				162*	5
				237	65
				18	66
				17	66
				101*	79
				81	79
				99**	79
				186	15
Ligando: Kringle 2		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: 2424.371 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
92	32	92	70	120	69
2	21			1	19
93	68			118	68

Ligando: Kringle 3		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: -1341.443 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
188	70	*138	69	19	75
	74			217	78
				237	78
Ligando: Kringle 4		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: 5415.238 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
90	74			94	98
91	74			117	75
				146	30
Ligando: Kringle 5		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: -19020.51 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
233*	79	87	31	11	36
196	39	233	81	178	24
	40	196	39	174	24
175	29			228	56
					2
				259	81
				20	
				225**	77
				202	39
					76
				245	81
				33*	62
				16	79
				12	79
					25
				223	81
				173	24

Ligando: PAN		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: -4112.561 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
		118	54	2	54
		62**	31	1	46
			30	95	53
		39*	31	120	47
				39	31
				35**	31
				34*	31
				64**	30
				87	29
Ligando: Proteína completa		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: -681.8733 \text{ J/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
33	138	92	126	35**	131
35**	175				132
121	278				139
					174
					173
				143	364
				120	275
				34*	174
					139

Interacciones predichas usando los programas PatchDock/FireDock:

Ligando: Kringle 1		Receptor: BmVDAC_S		ΔG : 5.03 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
				105*	38
					36
				51	33
					29
				77	34
Ligando: Kringle 2		Receptor: BmVDAC_S		ΔG : 0.24 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
1*	11	63	78	1*	43
					11
				63	79
				64*	79
				62	79
				87	4
					79
				61	78
					79
				36***	76
					77
				196	48

Ligando: Kringle 3		Receptor: BmVDAC_S		ΔG : 0.43 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
227*	35	225	35	39	25
255	31	196	24	35**	20
31*	28		38	30	30
279	29	249	32	282	46
247	35			223	28
228*	35			229*	35
				231***	35
				230**	36
Ligando: Kringle 4		Receptor: BmVDAC_S		ΔG : 8.73 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
155*	10	165**	56	136	10
164***	8		57	21	25
77	46	52	31	108*	62
76	46	179	20	105**	45
106***	67		25	51	30
					31
				72*	48
				101*	49
				99	49
				112	49
				185	5
				165**	5
				186	5

Ligando: Kringle 5		Receptor: BmVDAC_S		ΔG : -0.36 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
252	32	8*	81	36***	39
		11*	81	34*	25
				249	32
				282	24
Ligando: PAN		Receptor: BmVDAC_S		ΔG : -18.68 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
118*	54	118*	54	175	35
89	20	89	20	174	35
196	4			37**	15
95	53				16
				92	23
					57
				63	17
					18
				36***	14
					16
				199	4
					5
				58*	30
				120	46
					47
				118*	54

Ligando: Proteína completa		Receptor: BmVDAC_S		$\Delta G: -6.22 \text{ kcal / mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
8*	645	8*	645	173	646
33*	710	120	653	32*	710
41*	710	87	606	31	710
146	649	196	642	35**	708
				1*	647
				175	643
				202	713
				147	649
				172	649
				92	604
					634
Ligando: Kringle 1		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: -19.54 \text{ kcal/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
7**	12	160	68	217	56
159	63	188	56	138	13
188	58	108*	17	210	57
				165**	3
					4
				19	7
				20	7
				21	51
					52
				15	9
				18	9
Ligando: Kringle 2		Receptor: BmVDAC_M		$\Delta G: 4.64 \text{ kcal/mol}$	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
105*	4			104	9
				107*	4

Ligando: Kringle 3		Receptor: BmVDAC_M		ΔG: 1.92 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
45*	38	188	47	23	62
167*	46			21	40
165*	46				62
184	48			217	49
15	35			210	49
73**	24			44	38
				45	38
				153**	46
				187	48
				189	48
Ligando: Kringle 4		Receptor: BmVDAC_M		ΔG: 3.63 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
132	12			133	12
	14			134	12
				159*	10
				160*	9
					10
				161	10
Ligando: Kringle 5		Receptor: BmVDAC_M		ΔG: -1.61 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
				264	8
				265	9
					50
				213	46
				212	69
				264	8

Ligando: PAN		Receptor: BmVDAC_M		ΔG: -1.88 kcal/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
				200	46
				198	46
Ligando: Proteína completa		Receptor: BmVDAC_M		ΔG: -681.8733 J/mol	
Puentes de Hidrógeno		Interacción electrostática		Interacción estérica	
Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno	Residuo de aminoácido de BmVDAC	Residuo de aminoácido del Plasminógeno
21	124	73	177	136	141
20	124	188	133	21	123
19	130				
79*	180			165*	135
138	137				136
					137
				131	143
				155**	137
					141

14.2 Preparación de soluciones:

14.2.1 Buffer de equilibrio 2D

Reactivo	Cantidad
UREA	6 M
Glicerol	30%
Tris (pH 8.8)	50 mM
SDS	2%
Azul de bromofenol	0.002%

El buffer de equilibrio 2D debe prepararse usando agua desionizada y esterilizada por filtración. Una vez que todos los reactivos se disolvieron, el buffer debe esterilizarse en autoclave. El buffer estéril se debe proteger de la luz y almacenarse a 4°C.

14.2.2 Buffer de rehidratación

Reactivo	Cantidad
CHAPS	65 mM
Urea	6.99 M
DTT	200 mM
Agua desionizada estéril	c. b. p. 500 l

El buffer de rehidratación debe prepararse fresco cada vez que se vaya a realizar una reacción de cleanup. Para preparar el buffer se deben resuspender 0.02 g de CHAPS en 200 µl de agua desionizada estéril. Posteriormente, 0.21 g de urea deben diluirse en la solución de CHAPS. En un tubo separado, 0.0154 g de DTT se deben diluir en 100 µl de agua desionizada estéril. Finalmente, se deben tomar 35 µl de la solución de DTT y agregarlos a la solución de CHAPS-urea. La solución se afora a 500 µl usando las marcas de un tubo de 1.5 ml usando agua desionizada estéril. El buffer debe ser almacenado en hielo o a 4°C hasta el momento de su uso.

14.2.3 Buffer de transferencia para Western-Blot

Reactivo	Cantidad
Glicina	144 g
Trizma base	30 g
Agua desionizada	c. b. p. 1 l

14.2.4 Buffer PBS 10X

Reactivo	Cantidad
NaCl	1.37 M
KCl	0.270 M
Fosfato de Sodio dibásico	0.1 M
Fosfato de Potasio monobásico	20 mM
Agua desionizada	c. b. p. 1 l

Antes de aforar, el pH del buffer debe ajustarse al valor necesario para el experimento que se esté realizando. El buffer debe esterilizarse mediante autoclave y almacenarse a 4°C.

14.2.5 Buffer TNTE

Reactivo	Cantidad
Tris HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X100	0.4%
Agua desionizada estéril	c. b. p. 25 ml

El buffer TNTE debe prepararse con agua desionizada estéril y esterilizarse mediante filtración. El buffer debe almacenarse a 4°C y puede usarse hasta 3 semanas después de su preparación.

14.2.6 Coomassie G250

Reactivo	Cantidad
Azul de Coomassie G250	80 g
Ácido clorhídrico	35 mM
Agua desionizada estéril	c. b. p. 1 l

El azul de Coomassie debe disolverse durante 1 h con agua desionizada estéril. Después de transcurrido el tiempo, el ácido clorhídrico se agrega a la solución y se afora con agua desionizada estéril a 1 l. La solución de Coomassie debe protegerse de la luz y puede almacenarse a temperatura ambiente.

14.2.7 Coomassie R250

Reactivo	Cantidad
Metanol	50%
Azul de Coomassie R250	0.05 %
Ácido acético	10 %
Agua desionizada estéril	c. b. p. 400 ml

14.2.8 Solución desteñidora

Reactivo	Cantidad
Ácido acético	5 %
Metanol	16.5 %
Agua desionizada estéril	c. b. p. 1 l