



COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA VDAC DEL INTESTINO
DE LA GARRAPATA *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* Y SU
FUNCIÓN EN LA INTERACCIÓN CON *BABESIA BIGEMINA***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS GENOMICAS

P R E S E N T A :

MC. ELBA RODRIGUEZ HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MINERVA CAMACHO NUEZ

Mexico, D.F. noviembre de 2015

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.

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y el laboratorio de inmunología en la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Para realizar este trabajo se contó con el apoyo económico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM-7D83023005) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Proyecto No. 78921). Además de una la beca del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF/179/2011). Un agradecimiento especial para estas instituciones.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesora investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM

CO-DIRECTOR

Dr. Juan J. Mosqueda Gualito

Profesor investigador
Facultad de Ciencias Naturales, UAQ

ASESORES

Dra. Elizbeth Álvarez Sánchez

Profesora investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM

Dra. Raquel Cossio-Bayúgar

Investigadora titular
CENID-PAVET, INIFAP

Dra. Mavil López Casamichana

Profesora investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM

Dra. Gloria León Ávila

Profesora investigadora
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México que me brindó la oportunidad a través del Posgrado en Ciencias Genómicas de realizar mis estudios de doctorado y por el apoyo para la impresión de esta tesis (convenio No. UACM-CSE-ITR/155/2015).

A los profesores del Posgrado en Ciencia Genómicas que son parte esencial de este logro, gracias por sus enseñanzas.

A la Dra. Minerva Camacho Nuez por creer en mí e invitarme a trabajar en su proyecto de investigación, por el tiempo, el apoyo incondicional que me brindó, por la orientación y la experiencia que compartió conmigo; le agradezco sinceramente su valiosa enseñanza que fue parte fundamental para concluir esta etapa en mi vida.

A mi mentor y amigo el Dr. Juan Mosqueda Gualito le dedico un agradecimiento especial, ya que el creyó en mi desde el inicio de mi vida profesional y es parte esencial de este logro.

A mis asesoras, la Dra. Gloria León Ávila, la Dra. Elizbeth Álvarez Sánchez, la Dra. Mavil López Casamichana la y la Dra. Raquel Cossio-Bayúgar, por su apoyo y valiosa colaboración para la realización de este proyecto.

A mi familia, amigos y compañeros, quienes siempre estuvieron dispuestos a aconsejarme, colaborar y orientarme en todo lo necesario para lograr este trabajo.

Dedicatoria

**A mi familia que me alimenta de amor y
cariño, a quienes siempre viviré agradecida por
darme el mejor ejemplo de trabajo y
superación.**

**A Cristhian, por su amor y apoyo en esta etapa
de mi vida.**

Índice general

Abreviaturas	I
Índice de figuras	II
Índice de tablas	IV
Resumen	V
1. Introducción	1
1.1. Características generales de la babesiosis bovina	3
1.2. Características generales del vector <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
1.3. Ciclo biológico de la garrapata <i>R. microplus</i>	5
1.4. Métodos de control y mecanismo de resistencia de las garrapatas	6
1.5. Control inmunológico de garrapatas: vacunas	8
1.6. Situación actual de la campaña de erradicación del vector <i>R. microplus</i> en México	11
1.7. Agente etiológico de la babesiosis y su clasificación taxonómica	13
1.8. Características genómicas de <i>Babesia</i> sp.	15
1.9. Ciclo biológico de <i>Babesia</i> sp. dentro de la garrapata	17
2. Antecedentes directos	21
2.1. Características generales del Canal de Aniones Dependiente de Voltaje (VDAC)	24
2.2. Estructura genómica y expresión de VDAC	27
2.3. Importancia de VDAC en la permeabilidad de la membrana mitocondrial	29
2.4. Regulación del canal VDAC por proteínas de la familia Bcl-2	30
2.5. Liberación del citocromo c inducido por Bax/Bak a través de VDAC	32
2.6. Localización de la proteína VDAC en la célula	33

2.7. Posible función de VDAC en localizaciones extramitocondriales	35
3. Antecedentes particulares del tema	37
3.1. La porina VDAC en la infección con virus, bacterias y protozoarios	37
4. Estado del arte	43
4.1. Investigación genómica y proteómica en la interacción garrapata-parásito	43
4.2. Importancia de continuar el estudio del tema	46
5. Hipótesis	48
6. Objetivo General	48
7. Objetivos específicos	48
8. Esquemas de la Estrategia experimental	49
9. Metodología	52
9.1. Obtención de intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas con <i>B. bigemina</i>	52
9.2. Prueba de hemolinfa en garrapatas <i>R. microplus</i> infectadas y no infectadas con <i>B. bigemina</i>	53
9.3. Clonación del gen que codifica para la proteína BmVDAC en el vector TOPO TA	54
9.4. Análisis del nivel de expresión del gen <i>Bmvdac</i> en intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas	56
9.5. Clonación de una secuencia parcial del gen <i>Bmvdac</i> en el vector de expresión pCold I	58
9.6. Expresión y purificación de la proteína recombinante BmVDAC	60

9.7. Inmunodetección de la proteína BmVDAC en células de intestino de garrapatas infectadas y no infectadas con <i>B. bigemina</i>	61
A) Análisis de Western blot	61
B) Análisis de inmunofluorescencia	63
9.8. Evaluación de la participación de la proteína BmVDAC durante el proceso de infección de <i>B. bigemina</i> a <i>R. microplus</i>	64
9.9. Alimentación artificial de garrapatas	64
9.10. Análisis de los parámetros biológicos y transmisión de <i>B. bigemina</i>	65
A) Peso y ovoposición de las garrapatas	65
B) Cuantificación de quinetos en la hemolinfa de garrapatas por microscopía óptica	66
9.11. Análisis estadístico	66
10. Resultados	67
10.1. Obtención de intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas con <i>B. bigemina</i>	67
10.2. Clonación del gen que codifica para la proteína BmVDAC en el vector TOPO TA	69
10.3. Análisis del nivel de expresión del gen <i>Bmvdac</i> en intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas	77
10.4. Clonación de una secuencia parcial del gen <i>Bmvdac</i> en el vector de expresión pCold I	80
10.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante BmVDAC	83

10.6. Obtención de anticuerpos policlonales contra BmVDAC	84
10.7. Inmunodetección de la proteína BmVDAC en tejido intestinal de garrapata	88
A) Ensayo de Western blot	88
B) Ensayo de inmunofluorescencia	90
10.8. Evaluación de la participación de la proteína BmVDAC durante el proceso de infección de <i>B. bigemina</i> a <i>R. microplus</i>	92
10.9. Alimentación artificial de garrapatas	92
10.10. Efecto de los anticuerpos contra la proteína BmVDAC en el peso y ovoposición de las garrapatas	93
10.11. Cuantificación de quinetos en la hemolinfa de garrapatas por microscopia óptica	96
11. Discusión de los resultados	98
12. Conclusiones	105
13. Perspectivas	106
14. Bibliografía	107
15. Anexo (publicaciones)	

Abreviaturas

VDAC	Canal de Aniones Dependiente de Voltaje
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hank's
PBS	Amortiguador de fosfato salino
MEM	Medio Minimo Escencial
V	Volts
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS
TBS-T	Amortiguador Tris-NaCl-Tween
PSA	Persulfato de amonio
kDa	kilodalton
g	Constante gravitatoria 9.8 m/s
PM	Peso molecular
TNTE	Solución Tris-NaCl-Triton-EDTA
pb	pares de bases
µg	Microgramo
µl	Microlitros
SFB	Suero fetal bovino
TBE	Amortiguador de Tris, Borato y EDTA
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Representación esquemática del ciclo biológico de la garrapata <i>R. microplus</i> .	6
Figura 2. Mapa de la situación zoonosanitaria de la campaña contra la garrapata del género <i>Rhipicephalus</i> referida a las fases del programa.	13
Figura 3. Frotis sanguíneo de bovino infectado con <i>B. bigemina</i> .	14
Figura 4. Representación esquemática del ciclo biológico de <i>B. bigemina</i> dentro del hospedero vertebrado (bovino) y hospedero invertebrado (garrapata).	19
Figura 5. Ensayos de overlay de proteínas de garrapatas con fases sexuales de <i>B. bigemina</i> .	23
Figura 6. Modelo topológico en segunda dimensión de la estructura secundaria de VDAC de humano.	25
Figura 7. Modelo representativo de la formación del dímero de VDAC1 en humano.	26
Figura 8. Análisis de la infección con <i>B. bigemina</i> en sangre del bovino.	68
Figura 9. Análisis de la infección con <i>B. bigemina</i> en garrapatas, mediante la prueba de hemolinfa.	68
Figura 10. Análisis de las clonas para determinar la presencia del inserto por diferencias en el tamaño del ADN plasmídico.	70
Figura 11. Digestión enzimática de plásmidos para determinar la presencia del inserto.	70
Figura 12. Secuencia parcial obtenida del gen <i>Bmvdac</i> .	72
Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína VDAC de diferentes especies.	73
Figura 14. Predicción de la estructura terciaria de la proteína BmVDAC.	74

Figura 15.	Alineamiento entre las secuencias <i>Bmvdac</i> y TC19533.	76
Figura 16.	Análisis del nivel de expresión transcrpcional del gen <i>Bmvdac</i> en células intestinales de garrapata.	78
Figura 17.	Análisis de especificidad de oligonucleótidos para la amplificación del gen <i>Bmvdac</i> .	80
Figura 18.	Clonación del fragmento del gen <i>Bmvdac</i> y análisis de las colonias por PCR de colonia	82
Figura 19.	SDS-PAGE de extractos de <i>E. coli</i> de cultivo en los que se indujo la expresión de la proteína recombinante BmVDAC.	83
Figura 20.	Western blot del extracto de proteínas usando anticuerpos anti-tag de histidinas.	85
Figura 21.	Prueba de solubilidad de la proteína recombinante BmVDAC.	86
Figura 22.	Cromatograma de la purificación de la proteína BmVDACr mediante una columna de níquel.	86
Figura 23.	Purificación de la proteína BmVDACr mediante cromatografía de afinidad.	87
Figura 24.	Western blot de las fracciones obtenidas en la purificación de la proteína BmVDACr.	87
Figura 25.	Western blot de extractos totales de células de intestino de la garrapata <i>R. microplus</i> .	89
Figura 26.	Análisis de inmunofluorescencia de células de intestino de garrapatas infectadas y no infectadas con <i>B. bigemina</i> .	91
Figura 27.	Alimentación artificial de garrapatas.	92
Figura 28.	Efecto del anticuerpo en el peso de las garrapatas <i>R. microplus</i> .	94
Figura 29.	Garrapatas repletas en proceso de ovoposición.	95
Figura 30	Efecto del anticuerpo en la ovoposición de las garrapatas.	95

Figura 31	Prueba de hemolinfa para la detección de quinetos de <i>B. bigemina</i> .	97
-----------	---	----

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Estrategias de control integrado aplicado en México y Estados Unidos para el control de las garrapatas en la ganadería bovina.	11
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>B. bigemina</i> .	15
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación del gen <i>Bmvdac</i> .	70
Tabla 4. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes <i>Bmvdac</i> y <i>esterasa</i> por RT-PCR punto final	77
Tabla 5. Oligonucleótidos con sitios de restricción para la amplificación del gen que codifica para el péptido BmVDAC de 24.7 kDa.	81

Resumen

Rhipicephalus microplus es el vector más estudiado en la investigación veterinaria, debido a que transmite diferentes patógenos al ganado, como es el caso de los parásitos del género *Babesia*, causantes de la babesiosis bovina. El estudio de los mecanismos moleculares en la interacción *Rhipicephalus-Babesia*, es crucial para implementar estrategias que ayuden a controlar la enfermedad. Actualmente, los avances en la investigación sobre esta interacción han permitido proponer diversos candidatos a vacunas bloqueadoras de la transmisión del patógeno y/o de control del vector. En este escenario, identificamos previamente a la porina mitocondrial VDAC en las células intestinales de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BmVDAC) que interacciona con las fases sexuales de *Babesia*, esta proteína al parecer tiene una participación relevante al momento de la infección de la garrapata vector con el parásito.

En el presente trabajo se caracterizó a la proteína BmVDAC en respuesta a la infección con *Babesia bigemina*, para lo cual fue analizado el nivel de expresión del transcrito *Bmvdac* en respuesta a la infección con *Babesia* mediante ensayos de RT-PCR, los resultados demuestran que el gen *Bmvdac* aumenta significativamente ($p < 0.0001$) su nivel de expresión en garrapatas infectadas con respecto a las no infectadas, sustancialmente a las 24 horas post-repleción. Adicionalmente, una secuencia parcial de la proteína BmVDAC fue clonada y expresada, para producir anticuerpos anti-BmVDAC, los cuales se utilizaron para inmunolocalizar y determinar el nivel de expresión de la proteína en tejido intestinal de la garrapata mediante ensayos de Western Blot e

inmunofluorescencia. Los resultados mostraron una expresión diferencial significativa y redistribución de la proteína BmVDAC entre células infectadas y no infectadas especialmente a las 24 hrs post-repleción. Estos resultados en conjunto corroboran lo observado en el análisis por RT-PCR, sugiriendo que esta modificación está dada como una reacción de las células intestinales del vector frente a la infección inicial con *Babesia*, como se ha reportado en otros organismos. Conjuntamente, la participación de la proteína BmVDAC en el proceso de infección fue evaluada mediante un ensayo de bloqueo con anticuerpos, mediante la alimentación artificial de garrapatas. Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que la proteína BmVDAC es importante en el proceso de infección de *Babesia bigemina* al intestino de su vector; sin embargo, es necesario determinar con ensayos funcionales si esta proteína podría ser un candidato vacunal en el bloqueo de la transmisión de *Babesia* y control del vector.

1. Introducción

Las garrapatas son parásitos hematófagos que afectan a sus hospederos directamente (especialmente en grandes infestaciones), al alimentarse de su sangre y perforar sus pieles; e indirectamente como vectores de patógenos que causan enfermedades infecciosas (Riek., 1964). Estos artrópodos se consideran uno de los transmisores de microorganismos más importantes y sólo son superados por los insectos que son vectores de patógenos en humanos, como es el caso de los mosquitos (Parola y Raoult., 2001). *Rhipicephalus microplus* es el ectoparásito de más amplia distribución a nivel mundial, causando grandes pérdidas económicas en la industria ganadera, debido a que transmiten agentes infecciosos como *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, los cuales son protozoarios intraeritrocíticos del filo *Apicomplexa*, causantes de la babesiosis (Bock y cols., 2004., Peter y cols., 2005., Guerrero y cols., 2005); esta infección afecta a animales domésticos, silvestres y humanos. Los signos y síntomas que ocasiona incluyen: fiebre, hemoglobinuria, hemoglobinemia, anemia hemolítica, anorexia, a menudo culminando en muerte, lo que resulta en una alta morbilidad y mortalidad principalmente en animales adultos (McCosker., 1981., Wright., 1973).

Los parásitos del género *Babesia* son ingeridos por las garrapatas causando infección en los órganos; el intestino es la primera barrera que debe atravesar *Babesia* para poder desarrollarse y completar su ciclo de vida; por lo que el proceso de invasión de las fases sexuales de *Babesia* al epitelio intestinal de las garrapatas es un paso crítico para el establecimiento del parásito. Sin embargo;

existen muy pocos reportes acerca de las moléculas y la función que éstas tienen durante la invasión de los parásitos al intestino del vector. Recientemente nuestro grupo identificó mediante ensayos de overlay y espectrometría de masas en tándem, una proteína del intestino de *R. microplus* que interacciona con fases sexuales de *B. bigemina* (Rodríguez-Hernández y cols., 2012). Los péptidos obtenidos mostraron una cobertura de identidad del 33% con la secuencia de la proteína denominada Canal Selectivo de Aniones Dependiente de Voltaje (VDAC, por sus siglas en inglés) del genoma de la garrapata *Ixodes scapularis*. La secuencia del gen no pudo ser localizado en el genoma de la garrapata *R. microplus*, ya que aún no se ha secuenciado el genoma completo (hasta el momento de este estudio), solo se han reportado alrededor de 150 secuencias codificantes y un índice de genes denominado BmiGI de 20, 417 ESTs (Expressed Sequence Tags, por sus siglas en inglés) (Guerrero y cols., 2005; Ullmann y cols., 2005), lo cual resultó una limitante para la identificación.

VDAC es una proteína que se encuentra en la membrana externa mitocondrial y permite el paso de moléculas pequeñas al espacio intermembranal de la mitocondria, además, participa en interacciones complejas regulando el metabolismo y la apoptosis de las células (Young y cols., 2007; Roman y cols., 2006). Algunos patógenos intracelulares pueden activar o inhibir la apoptosis de las células hospedadoras a nivel mitocondrial, a través de la interacción de alguna de sus proteínas con proteínas de la membrana externa mitocondrial entre las que se encuentra VDAC, que regulan la permeabilidad de ésta (Boya y cols., 2001). Este trabajo se enfocó a determinar la expresión y localización de la proteína BmVDAC

en el intestino de la garrapata *R. microplus* y su posible función dentro del proceso de invasión de *B. bigemina*.

1.1. Características generales de la babesiosis bovina

La babesiosis es un problema grave en salud animal, principalmente en países tropicales y subtropicales (McCosker PJ; 1981). En el territorio mexicano del total de cabezas de ganado que existen, un poco menos de 22 millones (Centro de Estadística Agropecuaria., 2002) se encuentran en regiones donde el protozoario y su vector son endémicos; y la babesiosis tiene una tasa de prevalencia de entre el 4-6% (Mosqueda y cols., 2004). Los animales que han sufrido una infección con *Babesia* sp. permanecen infectados crónicamente después del tratamiento y actúan como reservorios para que las garrapatas se infecten cuando se alimentan de su sangre, evento que asegura la permanencia del parásito en el medio ambiente (Riek., 1964; Mahoney y cols., 1973). La importancia de la enfermedad se debe a las consecuencias que origina; como las pérdidas económicas en producción de leche, carne, mortalidad, abortos y gastos generados por tratamientos para el control del vector, particularmente la utilización de acaricidas y vacunas (Bock y cols., 2004). Las pérdidas económicas estimadas en México por daños causados por las garrapatas y las enfermedades causadas por los patógenos que éstas transmiten, como es el caso de la babesiosis bovina fue de 286 millones de dólares en 1975 (Beltran., 1975)

1.2. Características generales del vector *Rhipicephalus microplus*

Dentro de la industria veterinaria, las garrapatas son uno de los vectores más importantes en cuanto a transmisión de enfermedades se refiere, estos ectoparásitos pertenecen al filo Artrópoda, dentro del orden Acarina y se clasifican en Argasidae e Ixodidae (Klompen y cols., 1996). Estos vectores se alimentan de la sangre del hospedero bovino ingiriendo grandes cantidades de ella, así que el área de su cutícula aumenta para contenerla, pudiendo aumentar hasta en 200 veces su peso (Sonenshine., 1991). Algunos géneros de garrapatas Ixodides como *Hyalomma* y *Rhipicephalus* son de mayor importancia económica en las zonas tropicales, ya que son endémicas de esas regiones.

Los problemas que causan estos vectores en la ganadería están basados principalmente en sus efectos directos en caso de las grandes infestaciones; como la reducción en el peso del bovino, anemia y pérdidas en la producción de leche y carne (L'Hostis y Seegers., 2002; Peter y cols., 2005). Los efectos indirectos, los cuales quizá sean los más importantes ya que comprometen la vida del hospedero en un corto plazo, debido a que estas pueden producir toxinas y transmitir patógenos a sus hospederos bovinos, culminando estos algunas veces en enfermedades letales (Peter y cols., 2005).

En México las garrapatas tienen una amplia distribución, debido a que el país cuenta con grandes extensiones de territorio con climas tropicales y

subtropicales; se sabe que *Rhipicephalus spp* se distribuye en el 51.5% del país (Mosqueda y cols., 2007) y se ha estimado que el 75% (31, 247, 734 cabezas de ganado) de la población total del ganado que existe, está distribuido en áreas infestadas de garrapatas (SIAP., 2000) y por lo tanto esos animales están en riesgo de ser infectados. Sin embargo, actualmente no se tienen cifras sobre los costos provocados por estos vectores, aunque se considera que el costo del control de las garrapatas en México es alto como en otros países. En el mercado mundial los costos sobre el control de garrapatas se estiman de 70 millones de dólares (Rotwell., 2003). La investigación actual para el control de estos y otros vectores es por ahora el camino más fértil en el que se aplica la ciencia en el ámbito de la industria ganadera; no sólo como una manera de buscar mejoras en la productividad, sino para mejorar la calidad de vida del ganado en el mundo.

1.3. Ciclo biológico de la garrapata *R. microplus*

La primera fase de desarrollo de las garrapatas se lleva a cabo en la tierra o hierba y ya que son ectoparásitos hematófagos es necesario que suban a un hospedero. Las garrapatas *R. microplus* son de un solo hospedero y su ciclo biológico se divide en dos fases: la fase de vida libre, donde la hembra que se encuentra infestando un bovino es fecundada y se repleta de sangre (Sonenshine., 1991). Posteriormente, esta hembra se desprende del hospedero para ovopositar en el suelo (ovopositan entre 2000 y 5000 huevos), los huevos se incuban y aproximadamente de 7 a 21 días después nacen las larvas; estas se mantienen en el pasto hasta que un bovino llega e inmediatamente las larvas

infestan al bovino y comienzan a alimentarse de su sangre (Figura 1). En la siguiente fase parasitaria; la garrapata se desarrolla a ninfa y después se diferencian a macho o hembra, tras la fase de copulación y una vez que las hembras se fecundan se alimentan hasta repletarse. Las hembras repletas caen del bovino y comienza nuevamente el ciclo. La duración del ciclo biológico de las garrapatas oscila de entre 20 a 41 días dependiendo de la temperatura y humedad principalmente (Garris., 1991)

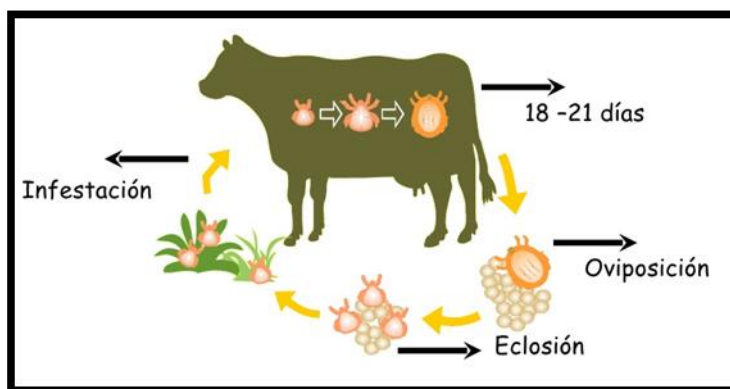


Figura 1. Representación esquemática del ciclo biológico de la garrapata *R. microplus* (<http://es.slideshare.net/iggm/garrapatas>).

1.4. Métodos de control y mecanismo de resistencia de las garrapatas

El control actual de las garrapatas se basa en el uso de productos químicos como los acaricidas (organofosforados, piretroides, amidinas y endectocidas). Sin embargo, debido al uso indiscriminado de estos productos las garrapatas han desarrollado mecanismos de resistencia a prácticamente todos los existentes en el mercado; incluidos la mezcla entre ellos (Rodríguez-Vivas y cols.,

2006). En México se documentó por primera vez la resistencia de ciertas poblaciones de garrapatas a los productos químicos a partir de fallas en la campaña de control en Tuxpan Veracruz (Aguirre y cols., 1986); posteriormente, se reportaron otros casos de resistencia específica hacia piretroides, amitraz, amidinas y la multirresistencia (Aguirre y cols., 1986; Ortiz y cols., 1995; Rosario-Cruz y cols., 2009). El mecanismo de resistencia a los garrapaticidas es una condición genética que le permite a las garrapatas adaptarse a ambientes tóxicos a diferencia de las poblaciones de garrapatas susceptibles (Rosario-Cruz y cols., 2009).

En términos claros; el uso de los productos químicos para controlar poblaciones de garrapata, por sí mismos no originan la resistencia; el evento se desarrolla mediante mutaciones genéticas que les confieren la resistencia y por lo tanto la capacidad de sobrevivir a esos productos tóxicos (Roush., 1993; Salomon., 1983). En una población de garrapatas que no ha sido expuesta a garrapaticidas pocos individuos de esa población tienen alelos de resistencia, y en consecuencia son en su mayoría susceptibles. Cuando esa población se somete a un garrapaticida los individuos con alelos resistentes tienen ventaja selectiva y sobreviven al químico, se reproducen y esa generación de garrapatas también es resistente a ese producto. Este es un fenómeno de selección de individuos resistentes, si esta ventaja se mantiene aún con la exposición continua del químico, se conforman poblaciones de garrapatas resistentes (Roush., 1993).

Actualmente, se tienen descritos dos mecanismos de defensa que han desarrollado las garrapatas para contrarrestar el efecto tóxico de los productos

químicos (Baffi y cols., 2008): La detoxificación metabólica; es consecuencia de la acción de enzimas como el citocromo P450, las glutatión S transferasas y carboxilesterasas, que degradan y/o sequestran las moléculas tóxicas. La resistencia mediada por esterasas es uno de los principales mecanismos de detoxificación de piretroides y organofosforados en insectos y garrapatas incluyendo *R. microplus* (Miller y cols., 2008). La modificación del sitio blanco; la cual es causada por una mutación en el sitio de acción del producto químico. Mediante este mecanismo las garrapatas evaden el efecto tóxico del ingrediente activo del garrapaticida (Baffi y cols., 2008; Rosario-Cruz y cols., 2008). A este respecto, se ha reportado que la substitución de una fenilalanina por una isoleucina en la proteína del canal de sodio, confiere a las garrapatas resistencia a piretroides sintéticos; o la sustitución de glutamina por arginina en la acetilcolinesterasa III, la cual podría asociarse con resistencia a organofosforados (He y cols., 1999; Temeyer y cols., 2007).

1.5. Control inmunológico de garrapatas: vacunas

Las vacunas contra la garrapata son una alternativa para su control en ganado bovino, sin embargo, una gran desventaja de estas es que no matan inmediatamente al vector. Esta estrategia de control ha recibido particular atención en la actualidad debido a las ventajas que ofrece. Cuando la garrapata se alimenta de la sangre de un bovino se da una estrecha relación donde la larva se fija con su aparato bucal, inmediatamente después las glándulas salivales de la garrapata secretan sustancias digestivas e inhibidores de la coagulación que permiten que el

ectoparásito se desarrolle, además de sustancias como inactivadores del sistema del complemento, inhibidores de la agregación de neutrófilos, bradiquinina, anafilotoxinas, histamina y agentes antiinflamatorios. En la saliva de la garrapata se encuentran antígenos que son ampliamente estudiados como blancos de vacunas contra garrapata (Wikel y cols., 1992).

Actualmente, existen dos vacunas comerciales contra la garrapata (*R. microplus*); la denominada TickGARD PLUS-_R y la GavacTM disponibles en Australia y América Latina respectivamente. Estas vacunas se basan en la glicoproteína que fue aislada del intestino de *R. microplus* (antígeno Bm86), el gen Bm86 se expresa en huevos, larvas, ninfas, machos y hembras adultas (Nijhof y cols., 2009); estudios de silenciamiento mediante RNA de interferencia revelan que este antígeno tiene una participación importante en la alimentación y digestión de la sangre en garrapatas alimentadas de bovinos infectados con *Babesia bovis* (Bastos y cols., 2010). Estudios usando anticuerpos anti-Bm86 revelaron que éstos reconocen moléculas en la superficie de las células epiteliales del intestino de la garrapata lo que interfiere con el proceso de endocitosis provocando la lisis celular y disminuyendo la capacidad reproductiva (Willadsen., 1997). La vacuna Bm86 también afecta la capacidad reproductiva de las garrapatas en un 50 a un 90% y disminuye su peso en un 30%, pero no produce mortalidad (Jonsson y cols., 2000; De la Fuente y cols., 2007). Una nueva estrategia para obtener un control integrado de garrapata es la utilización vacunas diseñadas con varios antígenos y el uso de adyuvantes; recientemente se probó el antígeno recombinante Bm86-CG contra infestaciones por garrapata y mostró una eficacia

del 31%, con lo que se sugiere que podría ser utilizado como una vacuna polivalente para el control de *R. microplus* (Cunha y cols., 2012). En un estudio donde se analizó el genoma de *R. microplus* se identificaron dos nuevos antígenos que al ser probados en bovinos (bajo condiciones controladas) se observó más del 70% de mortalidad en garrapatas *R. microplus*, sin embargo, los autores sugieren que la prueba debe hacerse en campo para determinar los verdaderos efectos y comprobar si esta vacuna puede ser más eficiente que las que se encuentran disponibles en el mercado (Guerrero y cols., 2011).

En muchos países se han realizado estudios sobre el control integrado de garrapatas, utilizando vacunas comerciales y/o diferentes productos químicos en conjunto; en México se han utilizado los organofosforados por muchos años, a pesar de los problemas de resistencia (Rodríguez-Vivas y cols., 2006). Sin embargo, el aumento de cepas resistentes a diferentes ixodícidas crea la necesidad de desarrollar estrategias nuevas de control basadas en el control integrado. El control integrado de garrapatas consiste en la asociación del medio ambiente y la dinámica de población de especies de plagas, combinando técnicas y métodos sustentables (Rodríguez-Vivas y cols., 2011). En la tabla 1 se señalan algunas estrategias de control integrado aplicado en México y Estados Unidos.

Tabla 1. Estrategias de control integrado aplicado en México y Estados Unidos para el control de las garrapatas en la ganadería bovina.

Herramientas de control integrado	Resultados (país)	Autor
Vacuna GavacTM + Amitraz	Estudio in vivo: 100 % de mortalidad en garrapatas resistentes a PS. (México).	Redondo y cols. (2004)
Vacuna GavacTM + diferentes ixodicidas	Estudio in vivo: Se usó durante 10 años: Se redujo los tratamientos ixodicidas de 24 a 7- 8 por año y se redujo el número de garrapatas adultas promedio de 100 a 20 por animal. (México).	De la Fuente y cols. (2007)
PBO + permetrina	Aumentó el índice de sinergismos de 2.1 a 3.6.	Li y cols. (2010)
PBO + coumafos	Aumentó el índice de sinergismos de 0.9 a 1.6.	
PBO + amitraz	Aumentó el índice de sinergismos de 0.9 a 2.5. (Estados Unidos)	
Verbutina + permetrina	Aumentó el índice de sinergismos de 2.4 a 4.4.	Li y cols. (2010)
Verbutina + coumafos	Aumentó el índice de sinergismos de 1.5 a 6.0.	
Verbutina + amitraz	Aumentó el índice de sinergismos de 1.8 a 15.(Estados Unidos).	

PS: Piretroides sintéticos

PBO: Butóxido de piperonilo

1.6. Situación actual de la campaña de erradicación del vector *R. microplus* en México

La garrapata *R. microplus* se considera el más importante vector que afecta al ganado bovino en México y el mundo (Klompen y cols., 1996). Esta garrapata pertenece a la familia Ixodidae, grupo que incluye a garrapatas con escudos rígidos que se extienden en toda la superficie dorsal en los machos y solo una porción pequeña detrás del aparato chupador en hembras (Nuñez y cols., 1987; Horak y cols., 2002). Entre sus huéspedes además del ganado bovino, podemos mencionar búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres (Klompen y cols., 1996). Las infestaciones

por un gran número de garrapatas pueden disminuir la producción y dañar las pieles; además de transmitir enfermedades como babesiosis y anaplasmosis (Rajput y cols., 2006).

La babesiosis fue erradicada de los Estados Unidos en 1943 mediante la eliminación del vector. Sin embargo, en México aún no se ha erradicado y se mantiene una zona permanente de cuarentena a lo largo de la frontera norte mexicana para evitar su reintroducción a los Estados Unidos. Debido a su importancia económica y sanitaria, la garrapata *R. microplus* es la principal especie bajo control en las campañas que se realizan en nuestro país. Actualmente la situación zoonosanitaria de la campaña contra la garrapata del género *Rhipicephalus* se encuentra en diferentes fases dentro de la república mexicana; una gran parte del norte del país y aéreas del centro corresponden a zonas libres, lo que comprende a 94.4 millones de hectáreas que equivalen al 47.88% del territorio (Figura 2). Sólo el 0.57% corresponden a zonas en fase de erradicación (1.1 millones de hectáreas) que se localizan en áreas donde el parásito ha sido eliminado por efecto de la campaña. La fase de control se lleva a cabo en 101.6 millones de hectáreas lo que representa una superficie del 51.5% del territorio nacional (SENASICA, 2015).



Figura 2. Mapa de la situación zoonosanitaria de la campaña contra la garrapata del género *Rhipicephalus* referida a las fases del programa (<http://www.senasica.gob.mx/?id=4393>).

1.7. Agente etiológico de la babesiosis y su clasificación taxonómica

El agente causal de la babesiosis bovina son los parásitos protozoarios del género *Babesia*, orden Piroplasmida y filo Apicomplexa. Existen dos especies que afectan al ganado bovino, *B. bovis* y *B. bigemina*; estas se encuentran ampliamente distribuidas en África, Asia, Australia, Centroamérica y Sudamérica. Dentro del hospedero vertebrado *B. bigemina* se presenta en el interior del eritrocito en forma de merozoítos (Figura 3), ocupando un espacio entre el centro y el margen, este se encuentra en forma redondeada, ovalada o irregular. La forma ovalada, mide de 3 a 4 micras de largo por 0.8 a 1.2 micras de ancho (Mahoney y

cols., 1973). Un bovino infectado con *B. bigemina*, puede alcanzar una parasitemia que supera el 10% y puede llegar hasta un 30%; los signos más importantes consisten en fiebre, hemoglobinuria y anemia (Bock y cols., 2004).

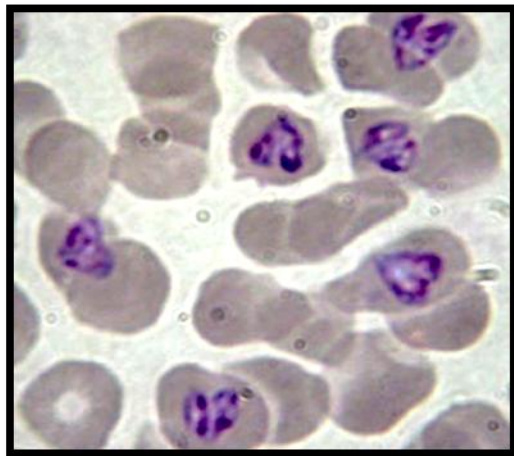


Figura 3. Frotis sanguíneo de bovino infectado con *B. bigemina*. En la imagen se pueden observar eritrocitos infectados con merozoítos de *Babesia* (violeta). Frotis teñido con colorante Giemsa, observado en el objetivo de inmersión. Fotografía tomada por J. Mosqueda.

El ciclo de *B. bigemina* dentro de su vector *Rhipicephalus* fue estudiado por Riek en 1968; las observaciones que surgieron de ese trabajo contribuyeron a la clasificación de *Babesia* y a determinar la cercanía de esta con coccidias y *Plasmodium* (Riek., 1968). Adicionalmente, se revelaron detalles del ciclo biológico del parásito dentro de su vector; como el desarrollo de fases asexuales a fases sexuales; esta observación reveló sin lugar a dudas que *Babesia* no pertenecía a

la familia de las amibas como se creía. Levine planteó cambios en la clasificación de los *Esporozoas* y se originó la sub rama *Apicomplexa*, actualmente reclasificada a filo (Levine., 1971; Levine y cols., 1980; Levine., 1988) (tabla 2); el cambio se debio a que este parásito presenta un órgano complejo en el extremo anterior denominado complejo apical, el cual se puede observar en el microscopio electrónico. Estas observaciones permitieron determinar el parentesco de *Babesia* con miembros del filo Apicomplexa.

Sistema de clasificación propuesto por Levine (1988):

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *B. bigemina*

Reino: protista	Orden: Piroplasmida
Sub reino: Protozoo	Super familia: Babesioidea
Filo: Apicomplexa	Familia: Babesiidae
Clase: Sporozoea	Género: <i>Babesia</i>
Sub clase: Anaplasmea	Especie: <i>Babesia bigemina</i>

1.8. Características genómicas de *Babesia* sp.

B. bigemina y *B. bovis* son protozoarios intracelulares causantes de la babesiosis bovina, y tienen gran impacto económico en la industria ganadera, ya que causan pérdidas económicas debido a los efectos de la enfermedad en los animales. Por esta razón es importante estudiar todos los aspectos de su mecanismo de infección tanto en el hospedero invertebrado como vertebrado; con

la publicación del genoma completo de *B. bovis* y el genoma parcial de *B. bigemina* es posible el estudio a detalle de genes involucrados en la patogenia de este parásito hacia sus células blanco (Brayton y cols., 2007; <http://www.sanger.ac.uk/>). El estudio a nivel genómico permite realizar comparaciones sobre las características compartidas con otros protozoarios patógenos e identificar genes, homólogos a los ya identificados con potencial diagnóstico, vacunal y terapéutico. Las etiquetas de secuencias expresadas (EST) que se tienen de *B. bigemina* también permiten analizar genes diferencialmente expresados en las fases del parásito de interés en la investigación de estrategias novedosas de control de la enfermedad (de Vries y cols., 2006).

El genoma de *B. bovis* fue secuenciado a partir del aislado T2Bo de Texas; su genoma nuclear está integrado por cuatro cromosomas con diferentes tamaños (2.62, 2.59, 1.73 y 1.25 Mpb) con un total de 8.2 Mpb, estos cromosomas tienen regiones ricas en adeninas y timinas que corresponden al 58.2% de la secuencia, con una longitud aproximada de 3,000 pb. En su estructura cuenta con tres operones de rARN, 44 genes ARN que codifican para ARNt y 3,671 genes que codifican proteínas nucleares. Adicionalmente, contiene dos genomas extras: un apicoplasto circular de 33,000 pb y el mitocondrial de 6,000 pb (Brayton y cols., 2007). El tamaño reducido del genoma de *B. bovis* en relación con otros genomas de organismos pertenecientes al mismo grupo correlaciona con su reducida capacidad metabólica. Dentro de los cuatro cromosomas de *B. bovis* se encuentran distribuidos genes que codifican al antígeno variante de la superficie

del eritrocito o VESA (por sus siglas en inglés variant erythrocyte surface antigen); estos genes participan en diferentes mecanismos como la citoadherencia y variabilidad antigénica (Allred., 2003). Además existen genes que codifican a proteínas de cuerpos esféricos (SBP2), los cuales forman parte de los organelos apicales del protozoario, y que son liberados dentro de los eritrocitos del bovino durante la invasión (Dowling y cols., 1996), y genes que codifican al antígeno variable de superficie del merozoíto VMSA que son blanco de anticuerpos bloqueadores de la invasión (Hines y cols., 1992). El genoma del aislado T2Bo contiene cinco genes *vmsa* incluyendo *msa1* y cuatro copias de *msa2* (Brayton y cols., 2007). Para desarrollar nuevas estrategias de control de la enfermedad como vacunas a base de múltiples antígenos recombinantes o vacunas de parásitos que estimulen el sistema inmune, o moléculas que permitan desarrollar métodos de diagnóstico sensibles y económicos, es necesario estudiar los genes que codifican antígenos de superficie tanto en *B. bovis* como en *B. bigemina*. La secuenciación próxima del genoma completo de *B. bigemina* permitirá realizar estudios comparativos e integrales de antígenos homólogos.

1.9. Ciclo biológico de *Babesia* sp. dentro de la garrapata

Los parásitos del género *Babesia* cumplen su ciclo de vida dentro de la garrapata para poder transmitirse, hay una relación compleja entre el parásito, su vector y el hospedero vertebrado, en esta relación debe existir un equilibrio que

depende de que tan competente es la garrapata para establecer una respuesta de defensa contra la infección por *Babesia*, y la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmune del hospedero (Tsuji y cols., 2007).

Las garrapatas desarrollan una respuesta inmune rápida en una infección con parásitos, esta respuesta esta mediada por la expresión de proteínas con propiedades antimicrobianas que ayudan a eliminar a los parásitos, asegurando la sobrevivencia del vector ya que, de no ser así, la multiplicación de los patógenos dentro del epitelio intestinal del vector le provocarían la muerte por la inevitable destrucción del tejido. Los hemocitos son células fagocíticas que se encuentran en la hemolinfa de los artrópodos y forman parte de la respuesta inmune expresando péptidos antimicrobianos ricos en cisteína, estos hemocitos además pueden aclarar la infección mediante la formación de nódulos, encapsulación, producción de especies reactivas de oxígeno, además de los péptidos antimicrobianos que ayudan al vector a defenderse de la infección (Fogaca y cols., 2004). Una proteína que se ha descrito con propiedades parasitocidas es la longicina, que al expresarse permite la reducción del número de parásitos dentro de la garrapata (Tsuji y cols., 2007).

En el ciclo biológico de *Babesia* sp. se observan dos fases críticas de desarrollo, una fase sexual que se lleva a cabo dentro del vector invertebrado (garrapata) y una fase asexual dentro del hospedero vertebrado (bovino); este ciclo biológico resulta complejo ya que el parásito debe adaptarse al medio ambiente de cada hospedero. Las fases sexuales o gametocitos (strahlenkörper) dentro de la garrapata se inducen a través de distintos cambios fisiológicos que

incluyen; variaciones de temperatura, pH, tensión de oxígeno y la concentración de bióxido de carbono y glucosa, proceso que se desarrolla durante las primeras 24 horas posterior a la repleción de la garrapata (Gough y cols., 1998; Bock y cols., 2004); estas fases forman agregados celulares multinucleados que se aparean y fusionan para formar a los cigotos a las 48 horas post-repleción, los cuales eventualmente atraviesan el epitelio intestinal e infectan a células basófilas del intestino medio donde se multiplican por fisión binaria dando lugar a los quinetos que son liberados a la hemolinfa a las 72 horas postrepleción (Figura 4).

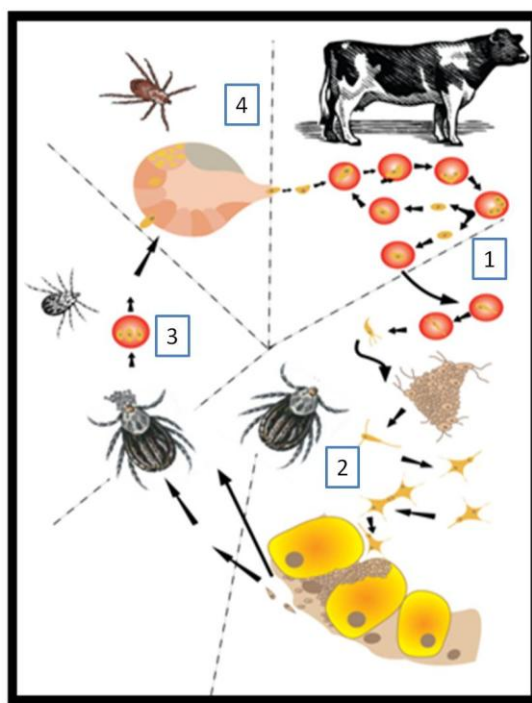


Figura 4. Representación esquemática del ciclo biológico de *B. bigemina* dentro del hospedero vertebrado (bovino) y hospedero invertebrado (garrapata). 1) multiplicación de trofozoítos y merozoítos de *B. bigemina* dentro de los eritrocitos de bovino. 2) Infección de células intestinales por fases sexuales de *B. bigemina* y multiplicación de los quinetos en el intestino. 3) Invasión de órganos

internos de la garrapata por parte de los quinetos, donde infectan los óvulos fecundados (transmisión transovárica). 4) Infección de glándulas salivales por los quinetos y transmisión de esporozoítos a su hospedero vertebrado a través de la alimentación de la garrapata (adaptado de Bock y cols., 2004).

Los quinetos se trasladan a otros órganos de la garrapata como los ovarios y glándulas salivales, los infectan e invariablemente son capaces de penetrar los embriones para ser transmitidos transováricamente (Riek., 1964; Bock y cols., 2004). Cuando las larvas de garrapata eclosionan, los quinetos transmitidos viajan a las glándulas salivales donde se transforman en estadios multinucleados que se fragmentan para formar esporozoítos (merozoítos pequeños haploides). En general los esporozoítos se desarrollan cuando la garrapata infectada se adhiere al huésped vertebrado, sin embargo, en *B. bigemina* los esporozoítos se desarrollan hasta que la larva empieza a alimentarse, y deberán pasar 9 días para que sean infectivos; considerando esta singularidad, *Babesia* sp. se transmite solo cuando la garrapata está en fase de ninfa y adulto (Callow y Hoyte., 1961; Riek., 1964; Dalgliesh y cols., 1978). En infecciones causadas por *B. bovis* los esporozoítos infectivos se forman usualmente de 2 a 3 días después que las larvas del vector se adhieren al bovino (Bock y cols., 2004).

2. Antecedentes directos

La invasión de *Babesia* sp. a órganos de su vector es crucial para el establecimiento del parásito en la garrapata y por lo tanto, representa un campo de investigación fértil muy importante. Rudzinska y colaboradores demostraron que *B. microti* invade las células del intestino de *Ixodes dammini* mediante un mecanismo combinado de penetración activa e invaginación (Rudzinska y cols., 1983). Las proteínas en los órganos del vector que participan en el reconocimiento de moléculas del parásito aún no han sido descritas; aunque sí se conocen algunas en otros patógenos, como es el caso de la garrapata *Ixodes scapularis*, donde se identificó una proteína del intestino que es importante en la invasión con *B. burdorferi*, ésta es una glicoproteína de bajo peso molecular (55 kDa) llamada TROSPA (por sus siglas en inglés Tick Receptor Osp A Protein) y es un receptor específico que se encuentra en el intestino de la garrapata y participa en el proceso de invasión de la bacteria a ese órgano (Pal y cols., 2004).

Quizá el principal modelo de estudio de la relación vector-patógeno lo observamos en los parásitos del género *Plasmodium* sp, que son transmitidos por los mosquitos al humano. Este protozooario al igual que *Babesia* sp. pertenece al filo Apicomplexa, por lo que comparten características muy similares en varios aspectos; como morfología, tropismo celular y patogénesis (Schetters y Eling., 1999; Fasila y cols., 2004; Mosqueda y cols., 2004; Lobo., 2005). Uno de los reportes enfocados a investigar las moléculas que participan o son modificadas en el mecanismo de invasión de *Plasmodium* sp. al intestino del mosquito, es el modelo de la teoría de la bomba de tiempo, en el que se muestra que existen

cambios de morfología, cambios en la organización del citoesqueleto y aumento en la concentración de marcadores de muerte celular como el óxido nítrico en el intestino de *Anopheles stephensi*, cuando está infectado con oquinetos de *P. berghei*. Los oquinetos entran directamente a las células a través de la membrana plasmática apical lateral causando efectos irreversibles y muerte celular (Zieler y Dvorak., 2000).

De manera particular, en la asociación *Babesia* sp-garrapata también se tienen antecedentes de estudios que abarcan la infección *in vitro*. Mediante el cultivo primario de células de intestino, glándulas salivales y ovarios de *R. microplus* se analizó la invasión de *B. bigemina* hacia esas células y a través de la microscopía de fluorescencia se observó que sólo las células de intestino son infectadas por las fases sexuales, mientras que las células de ovarios y glándulas salivales son infectadas por quinetos de *B. bigemina*. Este hallazgo planteó un escenario donde debían existir moléculas que estuvieran mediando la interacción entre las fases sexuales y esas células (Rodríguez., 2007). Eventualmente, mediante ensayos de overlay 2D y espectrometría de masas en tándem acoplado a cromatografía líquida, se identificó una porina del intestino de *R. microplus* que interacciona con fases sexuales de *B. bigemina* (Figura 5); ésta porina mitocondrial llamada Canal de Aniones Dependiente de Voltaje ó BmVDAC (Rodríguez-Hernández y cols., 2012) tiene una participación interesante en los procesos de infección de diversos patógenos.

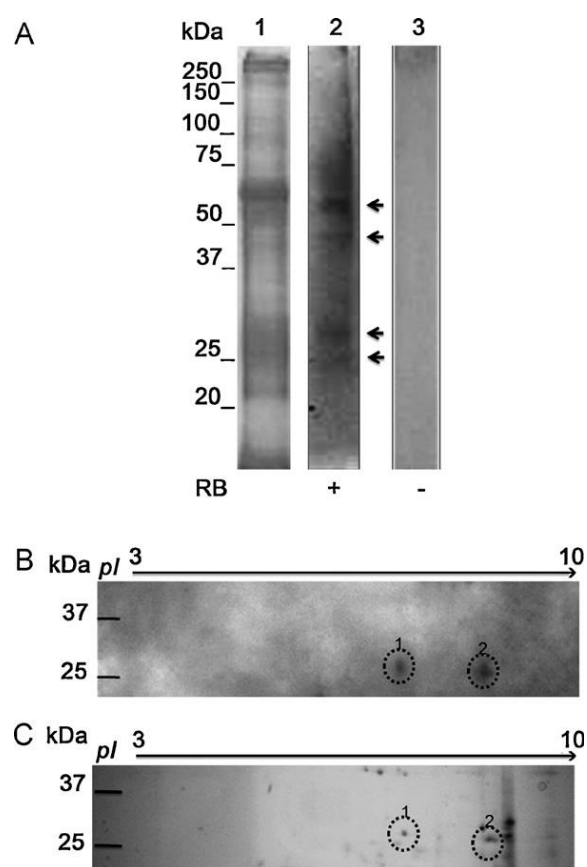


Figura 5. Ensayos de overlay de proteínas de garrapatas con fases sexuales de *Babesia*. Panel A: Línea 1, proteínas de intestino de garrapata. Línea 2, overlay de proteínas intestinales incubadas con fases sexuales de *Babesia* y línea 3 proteínas de intestino sin fases sexuales de *Babesia*. El peso molecular está indicado en kDa. Panel B: overlay en dos dimensiones demostrando la interacción entre proteínas del intestino y fases sexuales biotiniladas de *Babesia* sp. Panel C: SDS-PAGE 2D de extractos de intestino de garrapatas *R. microplus*, la cual corresponde a una réplica del gel del panel B. Los spots 1 y 2 fueron cortados e identificados por LC MS/MS (Rodríguez-Hernández y cols., 2012).

Interesantemente la expresión de la proteína VDAC ha sido investigada en células infectadas con otros parásitos Apicomplexa, como es el caso de *Toxoplasma gondii*. Este protozoo infecta la célula hospedera formando una vacuola parasitófora desde donde secreta la proteína ROP 2, la cual interacciona con proteínas en la membrana externa mitocondrial entre las que se encuentra la proteína VDAC (Nelson y cols., 2008). También se ha observado que en fibroblastos infectados con este parásito, tanto la proteína VDAC como otras proteínas se sobreexpresan en respuesta a la infección (Boya y cols., 2001; Nelson y cols., 2008). Sin duda, la proteína VDAC juega un papel importante en procesos celulares claves y debido a que su expresión se modifica ante infecciones causadas por parásitos intracelulares esta proteína es un blanco potencial para el diseño de estrategias de control de las enfermedades.

2.1. Características generales del Canal de Aniones Dependiente de Voltaje (VDAC)

Las porinas VDAC fueron identificadas inicialmente en la membrana externa de las mitocondrias; son canales que tienen un peso molecular de entre 30 a 35 kDa (Sorgato y Morgan., 1993) y son la principal ruta del flujo de metabolitos entre el citoplasma y la mitocondria a través de la membrana, se han encontrado en plantas, hongos y humanos, donde están implicados en procesos apoptóticos. El canal VDAC es una proteína integral de membrana, y a través de modelaje computarizado de la secuencia primaria de aminoácidos se ha propuesto la posible organización transmembranal del VDAC (Figura 6), que consiste de un

polipéptido que tiene un desplegado de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos alternados, que forman de 13 a 19 cadenas β transmembranales compuestas de una α hélice sencilla en el extremo amino terminal; esta conformación permite separar un medio ambiente apolar de uno polar, construyendo un barril que se inserta en la membrana formando el poro (Bayrhuber y cols., 2008).

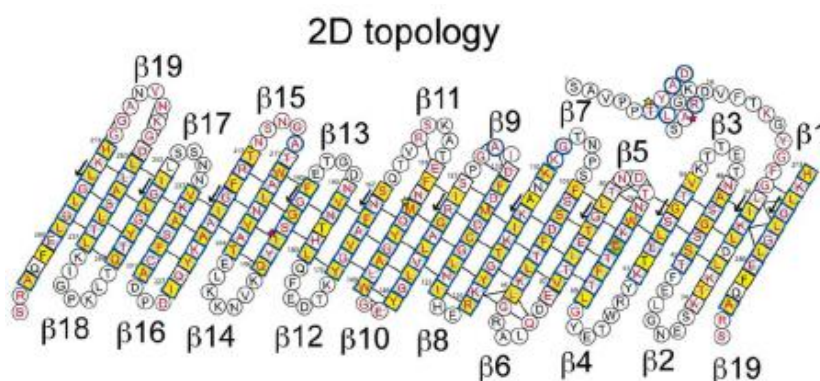


Figura 6. Modelo topológico en segunda dimensión de la estructura secundaria de VDAC de humano. Se muestran las 19 cadenas β dos veces para indicar que el barril es cerrado (Bayrhuber y cols., 2008).

Las cadenas β están conectadas en ambos lados de la membrana por una serie de asas de péptidos de diferentes tamaños, que sirven como sitios potenciales de interacción con otras proteínas. La proteína VDAC tiene diferentes estados de oligomerización reportados en varias especies, que van de monómeros, dímeros, trímeros, tetrameros hexámeros y grandes oligómeros (Malia y cols., 2007); los dímeros pueden formarse a través de una pequeña interface hidrofóbica formada por cuatro cadenas β [β 1, β 2, β 18, β 19] (Figura 7). La isoforma de VDAC 1 humano (hVDAC1) adopta una arquitectura de beta

barril, compuesta de 19 cadenas β con un α hélice localizada horizontalmente a la mitad del poro. La arquitectura de este canal es común a todas las proteínas VDAC y es adoptada por el poro de importe general TOM40 de mamíferos, el cual está localizado en la membrana externa mitocondrial (Colombini y cols., 1992; Bayrhuber y cols., 2008).

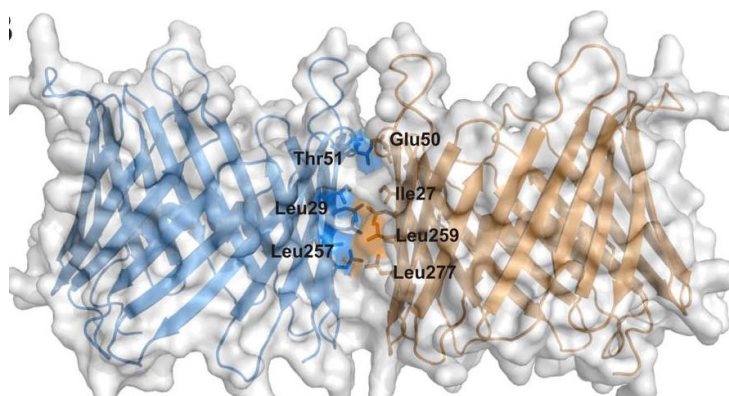


Figura 7. Modelo representativo de la formación del dímero de VDAC1 en humano. Superficie con residuos en la cadena β señalados en la interface del dímero (Bayrhuber y cols., 2008).

En un estudio donde se reconstituyó a la proteína VDAC 1 de humano en la bicapa lipídica celular, se redujo la conductancia de la membrana cuando las células se trataron con el polifenol curcumina (colorante natural procedente de la cúrcuma). La curcumina interaccionó con residuos de la alfa hélice N- terminal del canal VDAC y con la pared de este; como se reveló por modelado molecular, seguido por análisis mutacional. El péptido N- terminal modelado demostró

cambios conformacionales en dicroísmo circular, después del tratamiento con curcumina. De acuerdo a estos resultados se sugirió que la interacción de la curcumina con aminoácidos en el extremo N-terminal y en la pared del canal dirigía a la alfa hélice a una conformación cerrada. Esto restringía el movimiento, el cual es requerido para la apertura del canal (Tewari y cols., 2015; Reuter y cols., 2011).

2.2. Estructura genómica y expresión de VDAC

Los genes que codifican para las proteínas VDAC se han secuenciado en diversos organismos eucariontes. En algunos mamíferos se han identificado genes que codifican para tres isoformas de la proteína VDAC (Rahmani y cols., 1998; Blanchly–Dyson y cols., 1997). Los tres genes conservan una organización de las secuencias muy similar; los empalmes exón/intron son conservados; las diferencias que se observan se encuentran en las regiones no traducidas 5' y 3' del RNAm, la región del promotor es rica en G+C y no contiene el elemento denominado caja TATA, éstas dos últimas características son propias de los genes housekeeping, lo que sugiere que estos genes pueden tener una amplia expresión y distribución en diferentes tejidos celulares (Sampson y cols., 1997).

En todas las especies de mamíferos, las isoformas VDAC1 y VDAC2 están distribuidas en varios tejidos, sin embargo, en el ratón VDAC2 se expresa más en testículo, mientras que VDAC1 no se expresa en este tejido en

condiciones normales (Sampson y cols; 1996). La isoforma VDAC3 de humano y rata tiene una amplia distribución en diferentes tejidos, con una alta expresión especialmente en los testículos (Rahmani y cols., 1998). Las proteínas VDAC de diferentes especies están poco conservadas en cuanto a secuencia de aminoácidos, sin embargo, se conservan los dominios estructurales por lo que se mantienen las propiedades selectivas de salida y entrada del canal. La comparación de las estructuras de los genes VDAC revela que el marco de lectura abierto de esta porina tiene algunas diferencias en cuanto al contenido de intrones y exones en los organismos. En los vertebrados como los humanos y ratón está compuesto de 8 exones y 7 intrones, por otro lado, el gen de VDAC de *C. elegans* cuenta con 4 intrones y 5 exones; el VDAC de los parálogos de *Drosophila melanogaster* tiene 2 intrones y 3 exones, y los parálogos de VDAC en plantas tienen de 4 a 5 intrones (Young y cols., 2007).

La localización subcelular de VDAC le permite interaccionar con muchas moléculas, todas esas interacciones pueden influenciar en la determinación del destino celular de VDAC. Los estudios iniciales de esta proteína se enfocaban en determinar la función del canal VDAC 1 y su regulación por calcio y especies reactivas de oxígeno. Actualmente, se ha investigado la participación de las porinas 2 y 3 en eventos fisiopatológicos. Esto podría tener importantes aplicaciones en el entendimiento de los mecanismos básicos en la detección mitocondrial de lípidos y podría contribuir a definir un nuevo blanco terapéutico para investigaciones futuras (Martel y cols., 2014).

2.3. Importancia de VDAC en la permeabilidad de la membrana mitocondrial

La permeabilidad de las membranas mitocondriales está regulada principalmente por la formación de un complejo multiproteico, conocido como poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PTPm); éste se ubica en los sitios de unión entre las membranas interna y externa mitocondrial. El complejo es capaz de formar poros no selectivos en la membrana y está formado por elementos de membrana como el VDAC que se localiza en la membrana externa mitocondrial (MEM), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) en la membrana interna mitocondrial (MIM), y ciclofilina D (ciclo D) en la matriz mitocondrial (Tsujiimoto y Shimizu., 2007; Kroemer y cols., 2007); existen otras proteínas que también se asocian con el PTPm como el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR), la hexoquinasa ligada a VDAC (HK), y la creatinina kinasa (CK), aunque aún no se sabe si ésta juega un papel importante en la fisiología mitocondrial. Sin embargo, bajo condiciones fisiopatológicas variadas, como el aumento en la concentración de calcio, el incremento del estrés oxidativo, la baja concentración de ATP y la despolarización mitocondrial, el complejo forma un poro entre las membranas internas y externa, permitiendo la abertura del PTPm y por lo tanto, la libre difusión de solutos a través de las membranas (Kroemer y cols., 2007).

La permeabilidad transitoria del poro es un blanco importante para la familia de proteínas Bcl-2, ya que Bcl-2/Bcl-x y Bax-Bak interacciona con VDAC y

ANT (Tsujimoto y Shimizu., 2007). La porina VDAC es permeable a solutos de 1.5 kDa, lo que permite el intercambio de NADH/FADH (poder reductor) y el ATP/ADP entre el espacio intermembranal y el citosol que, como sabemos, son fundamentales para la cadena respiratoria (Mitchell y Moyle., 1965); la permeabilidad de la MEM y la MIM puede ser interrumpida de tal forma que, al abrirse el canal en la membrana interna se gasta el gradiente de protones (H^+) a través de la membrana, lo que resulta en el desacoplamiento de la cadena respiratoria, y la expansión de la matriz, provocando la ruptura de la membrana externa permitiendo la salida de las moléculas pro-apoptóticas y por lo tanto la muerte celular (Douce y Neuburger., 1999).

2.4. Regulación del canal VDAC por proteínas de la familia Bcl-2

Las sustancias y sustratos que utiliza la mitocondria o salen de ella deben cruzar la membrana externa mitocondrial. La principal característica de la membrana es su alta permeabilidad la cual se debe principalmente a la presencia de los canales VDAC formados por porinas (Shimizu y cols., 1998). Estos canales VDAC son dependientes de voltaje y selectivos para aniones y debido a su importante función, debe ser regulado de una forma específica dependiendo de las necesidades celulares. Entre las moléculas que tienen una función reguladora sobre VDAC se encuentran las proteínas de la familia Bcl-2.

Las proteínas de la familia Bcl-2 son moléculas determinantes en el control de la vida y la muerte de la célula (Shimizu y cols., 1999), es decir, pro-apoptóticas

o anti-apoptóticas. Estas proteínas se sintetizan en la membrana de la mitocondria y pueden aumentar su permeabilidad o disminuirla hasta bloquear el escape de citocromo c. Eventualmente el citocromo c liberado, activa a proteasas de muerte llamadas caspasas. Dentro de la familia Bcl-2 las proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl W y BRAG son proteínas que inhiben la apoptosis; mientras que, dentro de las proteínas pro-apoptóticas están Bax, Bak, Bad, y Bcl x que se activan por fosforilación. Estas producen una caída del potencial transmembranal con el consecuente aumento en la permeabilidad de la membrana (Shimizu y cols., 1998).

Un segundo mecanismo a través del cual el citocromo c puede ser liberado al citosol es a través de un canal que se forma en la membrana externa mitocondrial, cuando proteínas de la familia de Bcl-2 como Bax y Bak, que se encuentran normalmente en el citosol, se translocan a la mitocondria y se oligomerizan para formar una estructura de poro durante la apoptosis. Estas proteínas forman un canal por donde se escapan las moléculas de citocromo c el cual activa la cascada de proteasas (Zha y cols., 1996). Además del efecto directo que se cree tienen las proteínas de la familia Bcl-2 sobre la permeabilidad mitocondrial, también se ha reportado que Bax podría tener una función independiente estimulando la salida de calcio del retículo endoplásmico dirigiéndolo hacia la mitocondria. El mecanismo que favorece este movimiento no se ha determinado, pero se ha sugerido que podría involucrar los sitios de contacto entre estos dos organelos (Luo X y cols., 1998).

2.5. Liberación del citocromo c inducido por Bax/Bak a través de VDAC

La actividad de la porina VDAC en la membrana mitocondrial está directamente modulada por proteínas de la familia Bcl-2 (Shimizu y cols., 1999; Priault y cols., 1999). La proteína Bcl-x cierra el canal VDAC en liposomas, mientras que Bax/Bak abren el canal suficiente tiempo para que el citocromo c se libere al citoplasma, sugiriendo que VDAC tiene un papel esencial en la liberación del citocromo c mediado por la asociación de Bax/Bak (Shimizu y cols., 1999). En un estudio se demostró que las proteínas Bax/Bak inducen la liberación del citocromo c de la mitocondria de células de levadura nativa, pero no de la mitocondria de células de levadura carentes de VDAC-1, esto se realizó usando aislados mitocondriales y células (Priault y cols., 1999, Shimizu y cols., 1999; Shimizu y cols., 2000); por lo que se propone el modelo donde se involucra a VDAC con la liberación de citocromo c, además se ha visto que la micro-inyección de anticuerpos anti-VDAC en estas células impide la liberación del citocromo c inducido por Bax y la muerte celular, por lo que se refuerza el modelo (Shimizu y cols., 1999).

En estudios electrofisiológicos del canal VDAC-Bax se observó que éste continuamente permanece en estado abierto, difiriendo al mecanismo rápido de cierre-apertura observado del VDAC, y que este poro es cuatro veces más grande que el canal formado por el VDAC solo (Shimizu y cols., 2000). En un contexto fisiológico los canales VDAC-Bax formados en la membrana mitocondrial, podrían

ser permeables para una gran cantidad de moléculas conocidas que son liberadas de la mitocondria durante la apoptosis (Roucou y cols., 2000). Bax/Bak podría inducir cambios conformacionales de la proteína VDAC para formar poros grandes o podría estar involucrada en la producción de un poro grande junto con VDAC (Shimizu y cols., 1999; Shimizu y cols., 2000).

2.6. Localización de la proteína VDAC en la célula

La presencia de las porinas en localizaciones extramitocondriales fue reportada inicialmente por Thinnes y colaboradores (Thinnes y cols., 1989), y desde entonces se impulsó la investigación y estudio de la posible existencia de porinas en dominios, organelos y membranas de diferentes tipos celulares, además de tratar de explicar la función que éstas pueden tener en esos compartimentos. Como se menciona antes, en humanos, rata y ratón existen tres diferentes genes VDAC que codifican distintas isoformas (Sampson y cols., 1997). En análisis transcripcionales las isoformas de VDAC de mamífero fueron encontradas expresadas en una variedad de tejido. El papel de la isoforma VDAC 1 ha sido investigado y se postuló su participación en la permeabilidad del poro de transición (PTP) (Shimizu y cols., 1999; Bernardi y cols., 2001).

La posibilidad de que VDAC pudiera interaccionar con otras proteínas celulares, entre las que se encuentran proteínas del citoesqueleto fue investigada a detalle desde 1989. Thinnes y colaboradores fueron los primeros en reportar la existencia de la porina VDAC (31 HL) en el plasmalema de linfocitos humanos

(Thinnes y cols., 1989; Tsujimoto y cols., 2002), y posteriormente fue identificada en la membrana plasmática de las células endoteliales, por lo que los investigadores sugieren que VDAC es el receptor para plasminógeno 5 en esas células (González-Gronow y cols., 2003). Otro reporte de la localización de la proteína VDAC en otros compartimentos, es un trabajo donde se localizaron las isoformas 1 y 2 de VDAC en fibras densas externas (OFD) del flagelo de espermatozoides, encontrándose grandes cantidades de proteína de las dos isoformas en las OFD (las OFD son componentes subcelulares específicos del flagelo del espermatozoide) de espermatozoide de bovino (Hinsch y cols., 2004).

La localización de la porina VDAC en la membrana externa mitocondrial además permite la interacción con proteínas que median y regulan la integración de funciones mitocondriales con actividades celulares. Como un transportador de metabolitos, VDAC 1 contribuye al fenotipo metabólico de las células cancerígenas, debido a que esta proteína se sobre-expresa en muchos tipos de cáncer y en ensayos de silenciamiento de la expresión de la proteína VDAC 1 induce la inhibición del desarrollo del tumor (Gottlieb y cols., 2005; Hanahan y cols., 2011). VDAC 1, regula la liberación de proteínas apoptóticas, sirviendo como un punto de anclaje para las proteínas que interaccionan con la mitocondria, como la hexoquinasa, Bcl2 y Bcl-xL, algunos de los cuales están también altamente expresados en muchos cánceres. De manera particular, cuando la hexoquinasa se une a VDAC 1 se suprime la apoptosis; lo que ofrece a la célula una ventaja proliferativa e incrementa la resistencia a quimioterapia. En resumen, estas funciones específicas apuntan a que VDAC 1 podría ser un blanco para

afectar el metabolismo re-programado de las células cancerígenas y su habilidad para evadir la apoptosis (Pastorino y cols., 2005; Shoshan-Barmatz y cols., 2014).

2.7. Posible función de VDAC en localizaciones extramitocondriales

La función de la proteína VDAC en la membrana mitocondrial ya ha sido estudiada a profundidad, sin embargo, aún no se conoce bien su función en organelos no mitocondriales, por lo que en los últimos años se ha investigado a este respecto con la finalidad de explicar en qué procesos está implicada según su localización. Un reporte sugiere que concentraciones fisiológicas de NADH afectan la permeabilidad, indicando un posible mecanismo donde la glucólisis tiene la habilidad para suprimir la fosforilación oxidativa. La proteína VDAC ha sido identificada como un componente del complejo receptor de Benzodiazepinas, el cual está ligado a la biosíntesis de esteroides y también ha sido co-purificada junto con el complejo receptor de ácido γ -aminobutírico subunidad A (McEnery., 1992; Bureau y cols., 1992).

Una función conocida de la proteína VDAC es la difusión de ATP a través de la membrana plasmática (Shoshan-Barmatz y cols., 1996). La porina VDAC puede funcionar como un canal de liberación de cloro, asociado a la regulación de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), como un componente del canal modificado inducido por despolarización del complejo, que se encuentra desregulado en la fibrosis quística (Thinnes y Reymann., 1997). Esto está

fundamentado en datos que indican una co-localización de la proteína VDAC y CFTR (Puchelle y cols., 1993) y en la habilidad de VDAC para unir ATP (Thinnes y cols., 1994; Thinnes., 2014). La localización caveolar de VDAC corresponde a una función importante de captación de solutos a través de pinocitosis (Lisanti y cols., 1994). En este proceso el material para ser internalizado primero se encierra en vesículas derivadas de caveolas (las caveolas son microdominios de la membrana plasmática y están envueltas en varios procesos entre los cuales está la endocitosis), las cuales se mantienen cerradas hasta el plasmalema, y su contenido es liberado en el citoplasma a través de una ruta no conocida; presumiblemente un canal regulado (Anderson y cols., 1992).

La proteína VDAC también ha sido localizada abundantemente en balsas lipídicas neuronales. En esos microdominios, el canal VDAC está asociado con un complejo de proteínas de señalización que detonan respuestas neuro-protectoras. La pérdida de la integridad de las balsas lipídicas puede resultar en la alteración de asociaciones de multi-complejos y alteración de las respuestas de señalización que pueden promover la activación de VDAC. Algunos reportes indican que VDAC puede estar envuelta en los mecanismos de neurotoxicidad beta amiloide inducida por el péptido A β , a través de un mecanismo aún desconocido (Carlson y cols., 2013; Fernandez-Echevarria y cols., 2014). El péptido A β (glicoproteína transmembranal) se genera a partir de la proteína precursora amiloide (APP), y es liberada al espacio extracelular donde puede formar agregados, los cuales precipitan en forma de placas seniles (depósitos que se encuentran en el cerebro de pacientes con Alzheimer's) que pueden conducir a enfermedades

neuropatológicas como Alzheimer's. Recientemente se demostró que la proteína VDAC1 se asocia con la proteína APP y el péptido A β en balsas lipídicas de las neuronas. Esta interacción se observó en la corteza frontal de cerebros humanos afectados por la enfermedad en fases tempranas y también se demostró que el péptido A β expuesto en la membrana incrementa la desfosforilación de VDAC 1, lo que correlaciona con la muerte celular. La desfosforilación de VDAC 1 fue corroborada en balsas lipídicas de cerebro de pacientes con Alzheimer's; esto sugiere que el péptido A β está envuelto en el estado de fosforilación de VDAC en balsas lipídicas neuronales. Las modificaciones post-traduccionales de este canal pueden contribuir al desarrollo y progresión de la patología de la enfermedad (Pastorino y cols., 2005; Fernandez-Echevarria y cols., 2014).

3. Antecedentes particulares del tema

3.1. La porina VDAC en la infección con virus, bacterias y protozoarios

La célula cuenta con un mecanismo de muerte (apoptosis) que limita la propagación de algunos virus y bacterias intracelulares. Sin embargo, también los patógenos han diseñado estrategias de evasión de la respuesta inmune del hospedero y han desarrollado mecanismos propios que le confieren la capacidad para regular la apoptosis y prevalecer. Algunos virus por ejemplo, dentro de la célula hospedera sintetizan proteínas que bloquean la apoptosis (en la fase temprana cuando se está replicando), como parte de un mecanismo para su

proliferación y como parte de una estrategia para minimizar la respuesta inmune (Restifo., 2000). La apoptosis también puede promover la diseminación viral, a través de cuerpos apoptóticos; así que los virus además emplean mecanismos para inducir apoptosis, lo que representa una estrategia regulada de los patógenos intracelulares para poder invadir, proliferar y eventualmente salir a infectar otras células específicas. Los virus modulan la apoptosis empleando varias proteínas que intervienen en rutas de transducción de señales pro-apoptóticas (Tschopp y cols., 1998; Gao y Kwaik., 2000).

La mitocondria juega un papel importante en el control de la apoptosis, mediante la liberación de moléculas activadoras de apoptosis como el citocromo c. Los patógenos pueden inducir o inhibir la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que se traduce en un potencial regulatorio de la apoptosis (Kroemer., 2000). Los virus contienen genes que codifican para proteínas parecidas a las proteínas de la familia Bcl2, que son inhibidores de apoptosis e interaccionan con VDAC; el virus de la fiebre de cerdo africano produce la proteína 5-HL/A179L, el Herpes virus la proteína HVS-Bcl-2 y el virus del herpes 8 asociado a Sarcoma de Kaposi la proteína KSBcl-2 (Kroemer., 1997). La proteína X del virus de la hepatitis B (HBV-X) interacciona particularmente con la isoforma tres de VDAC (Rahmani y cols., 2000). La proteína HBV-X es un potente inductor de apoptosis cuyos efectos son neutralizados por Bcl-2 (Schuster y cols., 2000).

En el caso de las bacterias, las Gram negativas contienen porinas en su membrana externa, a través de las cuales se difunden las moléculas hidrofílicas (con pesos moleculares de >600Da) en el espacio periplásmico. Las porinas B de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* se translocan de la membrana externa bacteriana a la membrana celular del hospedero y finalmente se localizan intracelularmente en el compartimento mitocondrial. La principal diferencia estructural entre las porinas de diferentes especies de *Neisseria* sp. reside en los bucles que están separando las cadenas β plegadas, en particular el L3 y L5 (Massari y cols., 2000; Cowan y cols., 1992). Las porinas bacterianas (homólogos de VDAC mitocondrial) pueden servir como receptores para la unión de fagos y bacteriosinas (Kroemer., 1997). Las interacciones PorB/VDAC, HBV-X/VDAC sugieren la posibilidad de que se pueda afectar la permeabilidad de la membrana mitocondrial en la célula hospedera; puesto que tanto la PorB y HBV-X interaccionan directamente con VDAC en la mitocondria (Massari y cols., 2000).

Recientemente, se demostró que en realidad la porina PorB expresada en *N. gonorrhoeae* juega múltiples papeles durante la infección. Mediante un panel de mutantes de la cepa FA1090 que expresa una variedad de genes mutantes *porB*, se identificaron múltiples regiones de la porina que están envueltas en la unión a factores reguladores del complemento (C4b, H) y confirmaron que PorB requiere de la unión de por lo menos un factor para sobrevivir a los efectos bactericidas del suero humano. Además, se investigó la habilidad de esas mutantes para inhibir la apoptosis y el estallido oxidativo en leucocitos, sin embargo; no se lograron identificar los dominios de la porina requeridos para ambas funciones, pero

identificaron dominios de porina no esenciales y algunas porciones potencialmente esenciales, lo que contribuye al entendimiento de la importancia de los dominios de la proteína VDAC requeridos para la regulación complementaria (Chen y cols., 2013).

La gran cantidad de porinas que se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas son esenciales para nutrirse de los metabolitos del medio. La porina PorB de *N. gonorrhoeae* serotipo A ha sido descrita como una molécula dependiente de fosfato que ayuda a la diseminación de la enfermedad y a la invasión de la célula hospedera. En un reporte realizado recientemente, se analizó esta porina por cristalografía de rayos X en presencia de fosfato y ATP, para determinar la importancia de la relación estructura-función. La estructura de esta porina a una resolución de 3.3 amstrongs expone un excedente de carga positiva en el canal. Dentro del canal, la unión del ATP es regulada por residuos de carga positiva, los cuales ligan el azúcar y el fosfato del ligando. En la estructura resuelta se observaron dos iones fosfato, uno de ellos se encontraba sujetado por dos residuos de arginina (Arg92 y Arg124). La importancia del residuo Arg92 en la invasión bacteriana hacia la célula huésped fue demostrada mediante ensayos de mutación. Interesantemente, también se determinó que esta Arg92 es el único residuo involucrado en la diseminación de la bacteria, por lo que se sugiere a esta como una proteína distintiva entre porinas neiseriales (Zeth y cols., 2013).

Un caso interesante sobre la participación de la proteína VDAC en la infección con protozoarios lo observamos con *Toxoplasma gondii*. Este es un parásito intracelular que como *Babesia* sp, es parte del filo Apicomplexa. En la célula hospedera *T. gondii* forma una vacuola parasitófora, durante este proceso el complejo apical del parásito juega un papel muy importante, debido a que tiene una mezcla de proteínas especializadas incluyendo las que son liberadas por las roptrias, que interaccionan con proteínas del hospedero. ROP 2 es una de estas proteínas secretada a la membrana parasitófora vacuolar modificada por el parásito e interacciona con la mitocondria del hospedero (Nelson y cols., 2008). En estudios realizados con protozoarios del género *Toxoplasma*, se ha observado que el perfil de expresión proteica de células infectadas con *T. gondii* se modifica comparado con el perfil de células no infectadas, son principalmente proteínas que participan en rutas metabólicas y sobreexpresión de proteínas que participan en la apoptosis, como las proteínas VDAC (Boya y cols., 2001, Nelson y cols., 2008). Adicionalmente, también se ha investigado la expresión de VDAC en infecciones con protozoarios del filo Microsporidia, los cuales son muy parecidos a los parásitos del género *Toxoplasma*, por lo menos a nivel morfológico y tropismo celular. Los Microsporidios son parásitos intracelulares obligados, con genoma extremadamente reducido y dependen del ATP que obtienen del hospedero para sobrevivir (Urch y cols., 2009). El microsporidio *Encephalitozoon cuniculi* prolifera dentro de una vacuola membranosa, por lo que se investigó cómo el ATP suministrado del medio es captado durante la interface hospedero-vacuola; usando microscopia electrónica espacial encontraron una capa sencilla de revestimiento mitocondrial en la vacuola parasitófora. La unión mitocondrial ocurre

durante la fase vegetativa del parásito, en la cual se expone en el citoplasma, de esta manera incrementa la superficie de la membrana disponible para interacción mitocondrial. Encontraron también que la porina mitocondrial distribuye el ATP y que VDAC se encuentra en altas concentraciones en los sitios de interacción vacuola-mitocondria. Al parecer *E. cuniculi* maximiza el suministro de ATP por medio de la unión directa de la mitocondria a la vacuola parasitófora aproximando este organelo a 0.020 micrones de las formas de crecimiento vegetativo del parásito. La entrada de ATP es incrementada por grupos de porinas transportadoras de ATP localizadas en esas regiones de la membrana externa mitocondrial muy próximas al parásito (Hacker y cols., 2014).

Inicialmente se reportó la localización de las proteínas VDAC en membranas mitocondriales y se descartaba su presencia en extracto no mitocondrial (en cerebro de murino); Sin embargo, actualmente se sabe que también se encuentran de manera extramitocondrial en diferentes tipos celulares y microdominios. Las caveolas son microdominios especializados que se encuentran en determinadas regiones de la membrana plasmática, son ricos en esfingolípidos y colesterol y participan en transducción de señales y tráfico de colesterol. Sin embargo, la función de la porina VDAC en estos microdominios aún no se sabe. La interacción vector-patógeno es un punto crítico en el desarrollo del parásito y en la transmisión de la enfermedad hacia su hospedero definitivo; por lo que hasta el momento ésta interacción representa el mejor modelo de investigación para desarrollar estrategias efectivas de control de la enfermedad.

En este trabajo fue de nuestro interés investigar la interacción a nivel molecular que existe entre *R. microplus* y *B. bigemina* y resolver la incógnita sobre el modelo de invasión de *Babesia* sp, precisamente como se ha evidenciado en otros patógenos.

4. Estado del arte

4.1. Investigación genómica y proteómica en la interacción garrapata-parásito

Los protozoarios del género *Babesia* se desarrollan en la garrapata, a través de la cual son transmitidos al hospedero bovino donde cumplen su ciclo de vida que a menudo causa la muerte del hospedero. En esta relación existe una interacción compleja que favorece la sobrevivencia del parásito; y ha sido estudiada a nivel molecular para conocer la relación bovino-*Babesia* sp, los resultados de estas investigaciones han permitido el desarrollado de métodos diversos de control del parásito, sin embargo, hasta la fecha no se ha podido avanzar mucho para evitar las infecciones por babesiosis. Los reportes dirigidos al estudio de la interacción entre la garrapata vector y los parásitos que estas transmiten son pocos, sin embargo, actualmente se ha incrementado el interés en este campo.

Con ayuda de la información genómica y proteómica se ha podido avanzar en el desarrollo de estrategias mejoradas de control de enfermedades transmitidas por garrapatas. Uno de los primeros estudios realizados en este aspecto, fue con *Borrelia burgdorferi* (agente causal de la enfermedad de Lyme), la cual es una bacteria transmitida por garrapatas a los humanos, mejor conocida como borreliosis; mediante un análisis de la expresión de varios genes en respuesta a la infección con este patógeno, se encontró uno que codifica para defensinas, importantes moléculas de la respuesta inmune que ayudan a resolver la infección dentro de la garrapata (Rudenko., 2005). Por otra parte, se ha analizado la expresión diferencial de genes en glándulas salivales de garrapatas *R. appendiculatus* infectadas y no infectadas con *Theileria parva* y se observó que solo algunos genes son expresados diferencialmente en respuesta a la infección. Algunos de estos genes codifican para proteínas de garrapata que ayudan a evadir la respuesta inmune (respuesta inflamatoria) del bovino cuando esta se alimenta; (Nene y cols., 2004).

Rachinsky y colaboradores analizaron la expresión diferencial de las proteínas de ovarios e intestinos de *R. microplus* infectados y no infectados con *Babesia bovis* (Rachinsky y cols., 2007). La expresión diferencial de proteínas fue evidenciada mediante electroforesis en gel en dos dimensiones y las proteínas fueron identificadas a través de espectrometría de masas; con la finalidad de determinar las diferencias en la expresión de proteínas de membrana para encontrar moléculas blanco que permitan desarrollar estrategias nuevas de control del vector. La proteína calreticulina se encontró sobreexpresada en ovarios

infectados, ésta regula los niveles de calcio intracelular y se ha encontrado en la saliva de las garrapatas, no obstante, es una proteína altamente conservada en vertebrados, lo que impide que sea candidato vacunal contra garrapatas. Otras proteínas que se sobreexpresan en respuesta a la infección con *Babesia* sp. son las asociadas a la membrana y otras de bajo peso molecular como la lisozima (6-36 kDa). Los autores sugieren que son péptidos de defensa del vector en respuesta a la infección como se ha reportado en otros microorganismos (Papagianni., 2003). Recientemente Heekin y colaboradores estudiaron el transcriptoma del ovario de la garrapata *R. microplus* en respuesta a la infección con *B. bovis*, obtuvieron una librería de ADNc de ovarios de garrapatas infectadas; secuenciaron 400 EST y los reportaron a la base de datos BmGI. A partir de estas secuencias realizaron un análisis seriado de la expresión de genes a través de microarreglos diseñados para detectar cambios en la expresión de genes que fueron inducidos por *B. bovis*, los resultados demostraron que al menos 41 transcritos se sobreexpresaron en ovarios de garrapatas infectadas con respecto a las no infectadas. Este estudio permitió conocer el perfil del transcriptoma de ovario de *R. microplus* modulado por la infección con *B. bovis*; los autores sugieren que estos datos pueden ser útiles para el estudio molecular de la interacción *R. microplus-Babesia* sp (Heekin y cols., 2013)

Una aportación reciente a los esfuerzos por determinar las proteínas importantes en el proceso de invasión de *Babesia* sp. a células de la garrapata, es el trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, donde se analizó la interacción de fases sexuales con proteínas de intestinos de garrapatas *R.*

microplus. Los resultados demostraron que algunas proteínas entre las que se encuentra la proteína BmVDAC interaccionan de manera específica con las fases sexuales biotiniladas de *Babesia* sp. Lo que sugiere que esta proteína podría tener un papel importante en el mecanismo de infección con el parásito (Rodriguez-Hernández y cols., 2012). La limitada información sobre los mecanismos moleculares e identidad de las proteínas que participan en la infección de *Babesia* sp. hacia órganos de la garrapata, hasta ahora era un obstáculo para entender la interface *Babesia* sp-garrapata. Los avances en el estudio de las moléculas importantes durante la invasión como BmVDAC abren una vía para explicar mecanismos fundamentales en esta compleja asociación.

4.2. Importancia de continuar el estudio del tema

Las garrapatas son importantes vectores de enfermedades que afectan la salud y el bienestar de los animales, debido a que son hospederos de diferentes microorganismos patógenos que transmiten de manera eficiente a sus hospederos bovinos. La babesiosis bovina es una de las enfermedades que es transmitida por las garrapatas al ganado bovino; esta enfermedad provoca severas pérdidas económicas en la ganadería en las regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo (McCosker., 1981). En México, el 70% de las cabezas de bovinos que existen se encuentran en zonas endémicas para el vector y el parásito. La prevalencia de la babesiosis varía entre 4 a 96% (Mosqueda y cols., 2004) y las

tasas más altas de transmisión duran de 6 a 9 meses, generalmente de primavera a otoño, disminuyendo en los meses de invierno (Bock. y cols., 2004).

Las cuantiosas pérdidas económicas causadas por la babesiosis se deben no solo a la mortalidad, sino también a las pérdidas en la producción de leche, carne, a abortos en las vacas preñadas y a los gastos en las medidas de control como son: el uso de acaricidas, vacunas y tratamientos terapéuticos (Bock y cols., 2004). En México se ha estimado que las pérdidas económicas ocasionadas por las garrapatas del ganado y las enfermedades que transmiten incluyendo la babesiosis bovina, fue de 286 millones de dólares en 1975 (Beltran., 1975).

El estudio y caracterización de la interacción a nivel molecular entre *B. bigemina* y la garrapata *R. microplus*, contribuirán al conocimiento de la función de las proteínas que están involucradas en el proceso de invasión de *Babesia* a células de la garrapata. Lo cual permitiría a futuro proponer moléculas como candidatas para desarrollar vacunas bloqueadoras de la transmisión de *Babesia* sp. Esto implicaría aportar conocimiento sobre el ciclo biológico y nuevas alternativas de control de la enfermedad.

5. Hipótesis

La invasión de las células intestinales de la garrapata *R. microplus* por *B. bigemina* es mediada por la porina BmVDAC.

6. Objetivo General

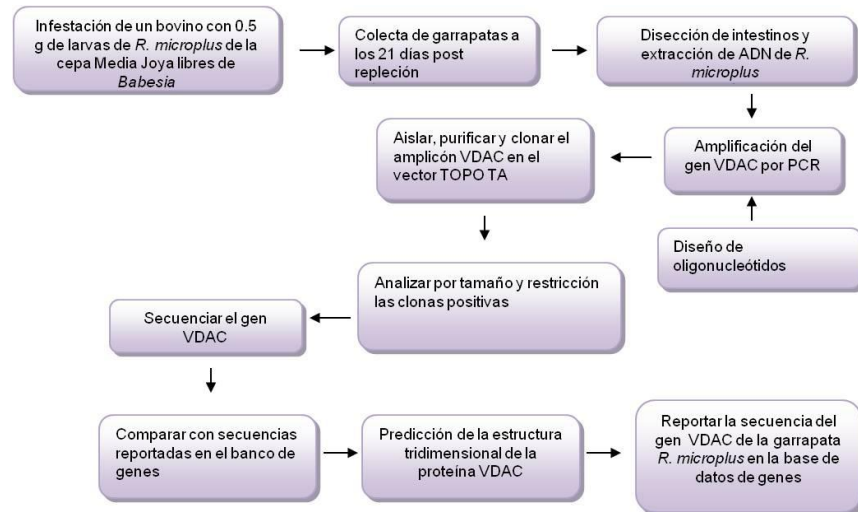
Caracterizar a la proteína BmVDAC en el proceso de invasión de *Babesia bigemina* a las células intestinales de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

7. Objetivos específicos

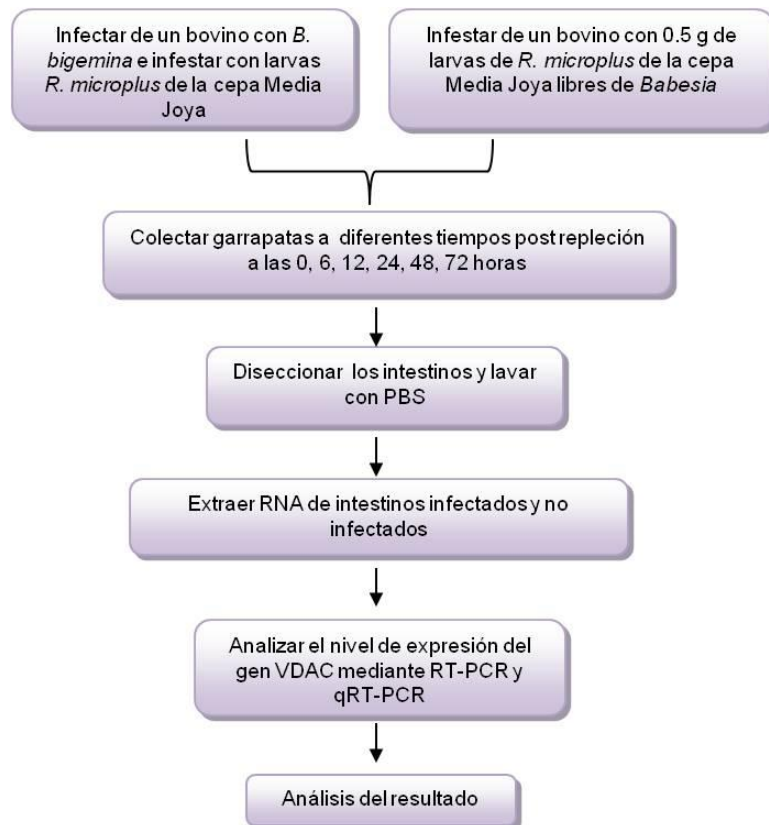
1. Obtener la secuencia del gen que codifica para la proteína BmVDAC de *Rhipicephalus microplus*.
2. Determinar el nivel de expresión del gen *Bmvdac* en intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas.
3. Localizar a la proteína BmVDAC en células del intestino de *Rhipicephalus microplus* infectadas y no infectadas.
4. Evaluar la participación de la proteína BmVDAC durante el proceso de invasión de *Babesia bigemina* a *Rhipicephalus microplus*.

8. Esquemas de la Estrategia experimental

1. Obtener el gen que codifica para la proteína BmVDAC

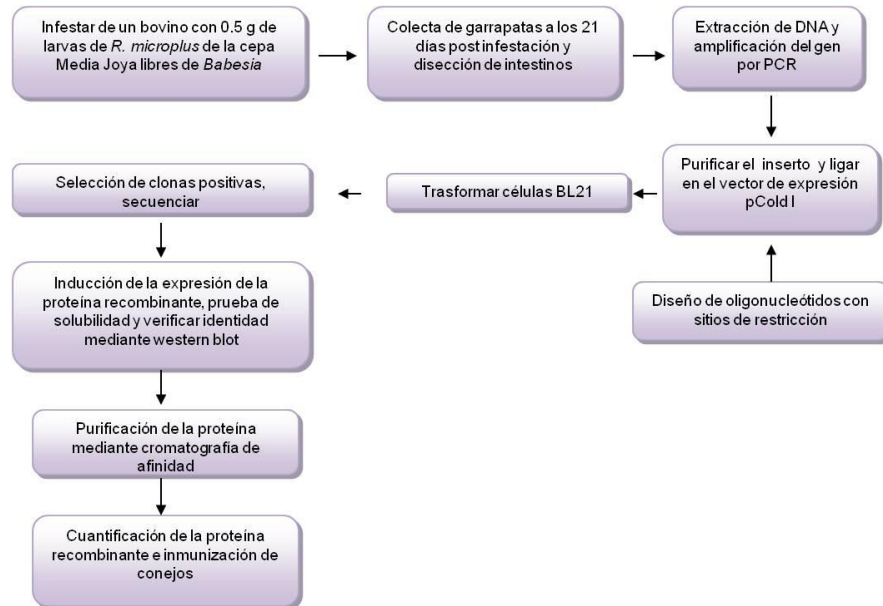


2. Determinar el nivel de expresión del gen que codifica para la proteína BmVDAC en intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas

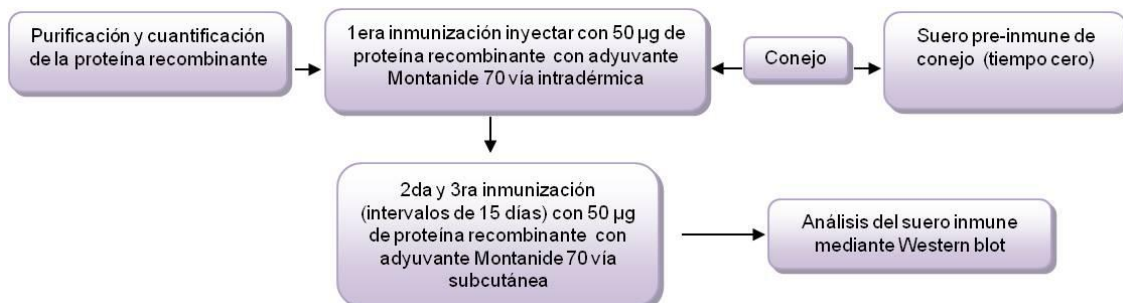


3. Localizar la proteína BmVDAC en células del intestino de *Rhipicephalus microplus* infectadas y no infectadas

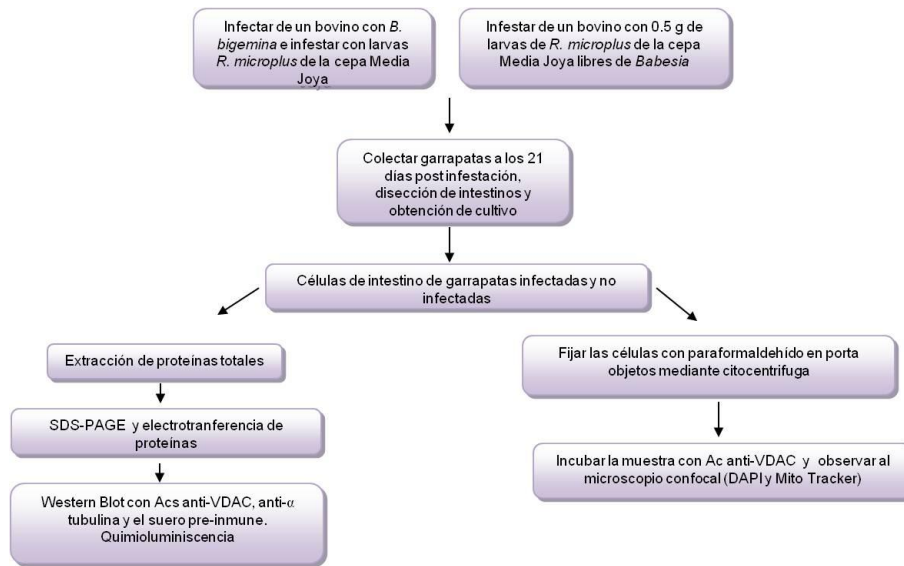
a) Obtención de la proteína recombinante



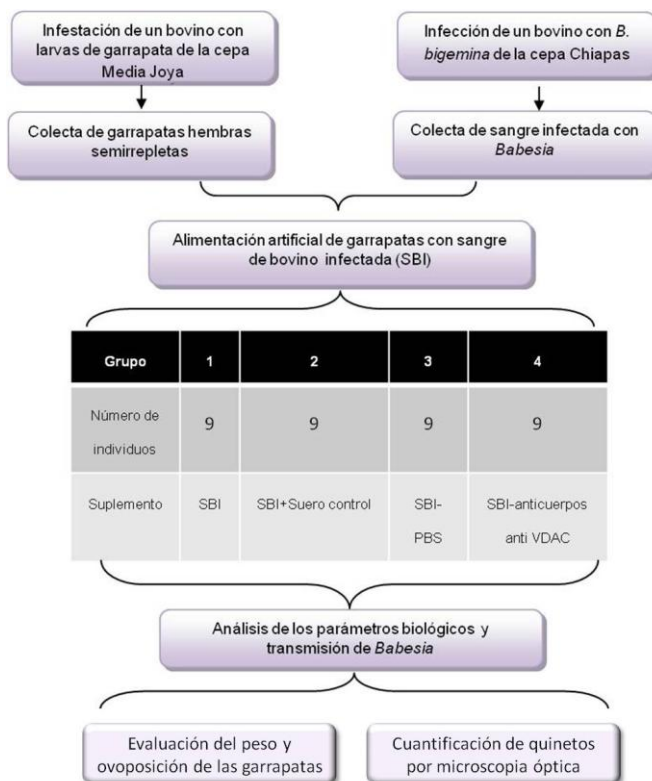
b) Producción de anticuerpos policlonales



a) Inmunodetección de la proteína BmVDAC



4. Evaluar la participación de la proteína BmVDAC durante el proceso de infección de *Babesia bigemina* a *Rhipicephalus microplus*



9. Metodología

9.1. Obtención de intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas con *B. bigemina*

Las muestras biológicas fueron obtenidas a partir de la infestación de un bovino con 0.5 g de larvas de garrapata de la cepa media Joya (larvas obtenidas del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria [CENID PAVET], Jiutepec, Morelos) esta cepa de garrapatas es libre de *Babesia* spp. y ha sido mantenida en el laboratorio bajo condiciones controladas. Posteriormente, se colectaron las garrapatas a los 21 días post-infestación, que correspondieron a garrapatas semi-repletas. Por otro lado, para obtener garrapatas infectadas con *B. bigemina* se infestó otro bovino con larvas de garrapata de la misma cepa y después éste fue infectado con *B. bigemina* de la cepa Chiapas (cepa obtenida del CENID PAVET) (se analizaron las garrapatas a las 72 horas postrepleción para verificar la infección). Los intestinos de las garrapatas colectadas fueron disectados y se obtuvieron las células con las cuales se estableció un cultivo primario. Las células fueron contadas en un hematocitómetro y se cultivaron en placas de 24 pozos (1×10^4 cel/pozo) en medio de cultivo para garrapata que consta de Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Leibovitz's 15 (L-15), caldo triptosa fosfato, suero fetal bovino con antibiótico y antimicótico.

El cultivo se mantuvo en incubación y a las 24 horas las células fueron almacenadas en alícuotas de 1×10^6 células/ml a -70°C , bajo varias condiciones, necesarias para los diferentes ensayos: fueron almacenadas en Trizol para extracción de ADN y ARN, otras fueron almacenadas en solución de sales balanceadas de Hank's (Invitrogen, EUA) para la extracción de proteínas (para los ensayos de Western blot) y otras fueron fijadas para los ensayos de inmunofluorescencia. Estas muestras se usaron para extraer las proteínas totales, proteínas de membrana y proteínas solubles con el kit Ready Prep, Protein Extraction Kit membrane (Bio-Rad, EUA).

9.2. Prueba de hemolinfa en garrapatas *R. microplus* infectadas y no infectadas con *B. bigemina*

La infección de las garrapatas con *B. bigemina* fue determinada mediante una prueba de hemolinfa (Burgdorfer., 1970). Simultáneamente se realizó una prueba para determinar la presencia de quinetos de *B. bigemina* en la hemolinfa de las garrapatas utilizadas para este estudio, para verificar la infección y/o descartarla. 10 garrapatas de cada grupo Fueron seleccionadas y a las 72 horas post-repleción se les cortó una coxa de la pata. La hemolinfa se colectó en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente las muestras fueron fijadas con metanol al 70%, y después estos fueron teñidos con el colorante Giemsa durante 7 minutos; las muestras se observaron en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100 X) y fueron fotodocumentadas.

9.3. Clonación del gen que codifica para la proteína BmVDAC en el vector TOPO TA

La secuencia del gen *Bmvdac* se desconocía hasta el momento de este estudio y para obtenerla a partir del genoma de *R. microplus*, se aisló ADN de garrapata *R. microplus* de la cepa Media Joya que fue extraído mediante un kit comercial (Gentra systems, EUA). Usando este ADN como templado se amplificó el gen por PCR. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia nucleotídica (*Bmvdacf* 5'-ATGGCTCCTCCGTGCTACGC-3' y *Bmvdacr* 5'-CTTGTGTCCTCCCTGGTTGAA-3') obtenida de la traducción reversa de los péptidos identificados por espectrometría de masas (Rodríguez-Hernández y cols., 2012). Sin embargo, una parte de la secuencia de unos 27 nucleótidos no fue incluida debido a que ese fragmento no fue identificado por LC MS/MS. Por lo tanto, con estos oligonucleótidos se amplificó una secuencia parcial del gen. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95 °C por dos minutos, 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 45 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 7 minutos. El ADN amplificado se purificó a partir del gel de agarosa con un kit comercial (Quiagen, DE) y con el producto purificado se realizó una reacción de ligación con 1 µl del vector TOPO TA (Invitrogen, EUA) y se transformaron células competentes *E. coli* TOP10.

Las células (100-150 µl) fueron plaqueadas en medio sólido LB/ampicilina (100 µg/ml), y se incubaron a 37 °C toda la noche. Las colonias que crecieron se seleccionaron para su análisis y fueron cultivadas en 3 ml de medio líquido

LB/ampicilina. El ADN plasmídico de las clonas fue purificado con un kit comercial (Roche, CHE) y digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. El plásmido que liberó el inserto fue utilizado para preparar una reacción de PCR para secuenciación usando los oligonucleótidos M13. El producto fue purificado con un kit comercial (Qiagen, ARM), fue liofilizado durante 30 minutos a temperatura ambiente y secuenciado en un analizador genético 3130 (Applied Biosystems, EUA). La secuencia obtenida se comparó con las secuencias reportadas en la base de datos de genes del NCBI (Mediante un BLAST de nucleótidos). Posteriormente la secuencia de nucleótidos se tradujo a secuencia de aminoácidos mediante una herramienta de traducción de libre acceso (<http://web.expasy.org/translate/>). La predicción de la estructura terciaria de la secuencia fue realizada mediante el modelado por homología con el programa SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) y el modelo se visualizó con el programa PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

Una vez obtenida la secuencia parcial del gen *Bmvdac*, se realizó una RT-PCR con oligo dT, para completar la secuencia del extremo 3' del gen. El RNA fue extraído de garrapatas *R. microplus*, se sometió a tratamiento con 1µl de DNAsa para 1 µg de RNA (1u/µl) (Promega Biotech, EUA), se preparo la reacción y se realizó una electroforesis del producto amplificado en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente, el amplicón se escindió del gel y fue purificado mediante un kit comercial (Qiagen, ARM). La ligación se realizó con 30 ng del amplicón y 10 ng del vector TOPO TA, con esta construcción se transformaron células competentes

E. coli DH5 α TOP10. El ADN plasmídico de las clonas fue purificado y secuenciado.

9.4. Análisis del nivel de expresión del gen *Bmvdac* en intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas

La expresión del gen *Bmvdac* se determinó mediante la técnica de RT-PCR punto final, para lo cual, se infestaron dos bovinos con larvas de garrapatas de la cepa Media Joya, uno de los bovinos fue infectado con *B. bigemina* de la cepa Chiapas. A los 21 días post-infestación se colectaron las garrapatas; fueron desinfectadas y se seleccionaron seis grupos de 60 garrapatas infectadas y no infectadas. Posteriormente, se disectaron los intestinos a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-repleción, éstos fueron lavados con PBS frío y se trataron con tripsina al 0.25% para la disociación del tejido. Las células se incubaron en medio de cultivo para garrapata por 24 hrs, posteriormente fueron almacenadas en Trizol (Invitrogen, EUA). El RNA extraído se usó para los ensayos de RT-PCR bajo las siguientes condiciones de amplificación: 55 °C por 30 min, 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg y una extensión final de 72 °C por 7 minutos, usando el kit: SuperScript One-Step RT-PCR con *Taq* Platinum (Invitrogen, EUA) de cada condición a cada uno de los tiempos antes mencionados, las secuencias de los oligonucleótidos fueron: para el gen *Bmvdacf* sentido 5'-CGC GGA TCC CCG TGC TAC GCA GAC TTG-3' y el anti-sentido *Bmvdacr* 5'-CCC CCA AGC TTG CTA CGC AAC CCA GGC CGA ATC-3' y para la amplificación de la esterasa usada como control, fueron el sentido Estf

5'-CCA TCT ACC ACGACG CAT TC- 3' y el anti-sentido Estr 5'- GGG CAG GAG ATC TGG CTT C- 3' . El producto amplificado fue resuelto en un gel de agarosa al 1% y utilizando como control endógeno el gen de esterasa (Este gen no varia bajo las condiciones probadas) (Cossío-Bayúgar y cols., 2009), el ADN fue visualizado por su tinción con GelRed (Biotium, EUA).

La extracción del ARN se realizó como se describe a continuación: Las muestras de intestino fueron descongeladas en hielo durante 15 minutos, posteriormente se mezcló en el vortex hasta que se obtuvo una mezcla homogénea, se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezcló en el vortex por 15 segundos y se centrifugó por 15 minutos a 12,000 x g a 2 °C. El sobrenadante fue recuperado y colocado en otro tubo al cual se le adicionaron 500 µl de isopropanol, se mezcló y fue centrifugado a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C. Después se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en hielo, se lavó con etanol al 75% en agua DEPC, después fue centrifugado por 5 minutos a 7,500 x g a 4 °C, se decantó el etanol y se secó la pastilla por 5 minutos en hielo. Al final la pastilla se resuspendió con 50 µl agua de ampolleta, se cuantificó el ARN y fue resuelto en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con buffer TBE por 15 min a 100 Volts. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNAsa libre de RNAsa (RQ1 DNAsa) (Promega Biotech, EUA) siguiendo las especificaciones del proveedor y se realizó una reacción de RT-PCR en un solo paso con un kit comercial (Invitrogen, EUA), en cada ensayo se realizó un control de RT-.

El nivel de expresión transcripcional del gen *Bmvdac* se corroboró con un análisis de RT-PCR cuantitativo, para lo cual se realizaron reacciones para ensayos de RT-PCRq con el ARN de los seis tiempos post-repleción utilizando un kit comercial QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, ARM). Los datos fueron normalizados con una curva estándar de 1×10^8 a 1×10^2 copias/ μ l del gen de esterasa que fue utilizado como control endógeno. La longitud del producto amplificado fue estimado mediante la comparación con un marcador de talla molecular GeneRuler 100pb DNA leader (Thermo Fisher, EUA).

9.5. Clonación de una secuencia parcial del gen *Bmvdac* en el vector de expresión pCold I

La localización de la proteína BmVDAC en tejido de garrapata se realizó mediante los ensayos de Western blot e inmunofluorescencia: Para realizar estos ensayos, primero se obtuvo la proteína recombinante y posteriormente se produjeron los anticuerpos anti-BmVDAC. Una secuencia parcial del gen *Bmvdac* de 675 nucleótidos (codifica para un péptido de 225 aminoácidos con peso molecular de ~24.7 kDa) fue amplificada con los siguientes oligonucleótidos específicos: sentido *Bmvdacf* 5'-CGC**GGATCCCC**GTGCTACGCAGACTTG-3' y anti-sentido *Bmvdacr* 5'-CCCC**AAGCTT**GCTACGCAACCCAGGCCGAATC-3', estos oligonucleótidos fueron diseñados con sitios de restricción (resaltado en negrita) para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III respectivamente, mismos que se localizan en el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pCold I que fue utilizado. El ADN que se usó como templado fue extraído de garrapata mediante

un kit comercial (Gentra systems, EUA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 7 minutos. Tanto el producto amplificado de 675 pb como el vector pCold I fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1%, después fueron escindidos y purificados. Posteriormente fueron cortados con las mismas enzimas de restricción por tres horas. El vector fue tratado con fosfatasa alcalina de camarón (Thermo Fisher, EUA) (para eliminar los fosfatos que quedaron libres después de la restricción), se purificó y cuantificó el producto.

El inserto *Bmvdac* fue ligado al vector pCold (Takara, JPN) y con este se transformaron células *E. coli* BL21 químicamente competentes, que fueron plaqueadas en LB/ampicilina. Como control de expresión se transformaron células BL21 con una construcción que constó del vector pCold y el gen que codifica la proteína ChuA, y un control donde se transformaron células solo con el vector de expresión. A las clonas que crecieron se les extrajo el ADN plasmídico, el cual fue analizado por tamaño y restricción enzimática (con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III) en geles de agarosa al 1% y 2% respectivamente. El inserto fue secuenciado para verificar que se trataba del gen de interés y que se encontrara en marco de lectura.

9.6. Expresión y purificación de la proteína recombinante BmVDAC

Las clonas que contenían el inserto se utilizaron para inducir la expresión de la proteína recombinante. Una clona se seleccionó para hacer un cultivo de 20 ml que se usó para la inducción de la expresión de la proteína recombinante, con 1 mM de IPTG a 15 °C durante 24 horas. La expresión de la proteína BmVDACr se analizó mediante SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie R-250; después de verificar la expresión se realizó un ensayo de solubilidad; para lo cual, se lizaron las células mediante sonicación durante tres periodos de 1 minuto cada uno, con intervalos de 30 segundos y 65% de amplitud, manteniendo la muestra en hielo. La muestra se centrifugó a 5,900 x g durante 20 minutos, se separó el sobrenadante de la pastilla y las dos fracciones fueron corridas en un SDS-PAGE al 12% y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para determinar si la proteína recombinante se encontraba en la fracción soluble o insoluble.

La proteína recombinante fue verificada mediante un Western blot usando anticuerpos anti-tag de histidinas. La proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad usando columnas de Níquel Hitrap™ en un FPLC AKTA prime plus (General Electric, EUA), con un método de replegamiento de la proteína en columna (on column refolding). Mediante este método logramos purificar la proteína recombinante de forma soluble. Esta fue dializada contra PBS y utilizada para inmunizar un conejo Nueva Zelanda, al cual se le extrajo sangre para obtener el suero que se utilizó como control pre-inmune; el conejo fue inmunizado con una primera dosis de 50 µg de la proteína recombinante

BmVDAC, se aplicó una segunda y tercera dosis de 50 µg de proteína con el adyuvante Montanide 70 (Seppic, FRA), con un intervalo de 15 días entre cada inmunización. El conejo fue sacrificado para obtener la sangre, la cual se centrifugó a 1,700 x g durante 20 minutos, el suero fue colectado en un tubo (suero post-inmunización) y analizado mediante un Western blot para determinar si reconocía a la proteína nativa y recombinante BmVDAC.

9.7. Inmunodetección de la proteína BmVDAC en células de intestino de garrapatas infectadas y no infectadas con *B. bigemina*

A) Análisis de Western blot

La proteína BmVDAC fue inmunodetectada en tejido intestinal de garrapatas *R. microplus* infectadas y no infectadas mediante un ensayo de Western blot. Los intestinos extraídos de las garrapatas infectadas y no infectadas de las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-repleción fueron almacenados en viales (100 mg de tejido) y congelados a -20 °C. Los viales fueron descongelados y se agregó inmediatamente 40 µl (2x) de inhibidor de proteasas complete (Roche, CHE) a un total de 1 ml de muestra. Las muestras fueron lavadas tres veces con PBS 1X pH 7.0 (NaCl 0.68 M, NaH₂PO₄·H₂O 0.17 M, Na₂HPO₄ 0.58 Mm), fueron centrifugadas a 9,000 x g durante 5 minutos a 4 °C, cada vez se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 500 µl de TNTE (Tris-HCl [pH 7.4] 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.5%, EDTA 1Mm), y se agregaron 20 µl de inhibidor de proteasas complete (2x). La reacción fue incubada por 15 minutos y

se mezcló en el vórtex, la muestra fue centrifugada a 9,000 x g durante 5 minutos a 4 °C, las proteínas totales de la fase intermedia fueron colectadas cuidadosamente en un tubo nuevo.

La fracción de proteínas obtenida fue cuantificada por espectrofotometría en un NanoDrop (Thermo Fisher, EUA), 19 µg de la proteína fue preparada con amortiguador de carga para proteínas (5X) (Tris HCl pH 6.8 1 M 5 ml, SDS 10% 8 ml, Glicerol 4ml, β-mercaptoetanol 2 ml, azul de bromofenol 0.05%, agua ultrapura 20 ml) y puesta a ebullición por 5 minutos. Estas proteínas posteriormente fueron separadas por SDS-PAGE al 12% y teñidas con colorante azul de Coomassie para verificar el patrón de proteínas. Por otro lado, estas mismas proteínas de los 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-repleción de garrapatas infectadas y no infectadas fueron separadas en una SDS-PAGE al 12% y posteriormente fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa 0.45 µm (Bio-Rad, EUA). Las membranas fueron bloqueada toda la noche con amortiguador TBS-T con leche al 5%, posteriormente se lavaron con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario (suero inmune a una dilución de 1:1000) por una hora y se lavaron con TBS-T cuatro veces por 15 min en agitación. Después se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo HRP (a una dilución 1:3000) (Invitrogen, EUA) por una hora, las membranas se lavaron con TBS-T cuatro veces por 15 minutos en agitación. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-α tubulina (Santa Cruz Biotechnology, EUA), las membranas fueron reveladas con quimioluminiscencia utilizando el sustrato ECL (Bio-Rad, EUA). Las membranas fueron visualizadas el fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad, EUA).

B) Análisis de inmunofluorescencia

El análisis de inmunofluorescencia se realizó con células intestinales de garrapatas infectadas y no infectadas a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-repleción. Las células en suspensión fueron colocadas en un portaobjetos tratado con Poly L lisina utilizando una citocentrífuga (Cytospin), se colocaron 100 µl de la suspensión de células y se centrifugó a 160 x g por 7 minutos a temperatura ambiente y la preparación fue observada al microscopio óptico para verificar el estado de las células. Después de haber obtenido las células impresas en los portaobjetos, se agregó el colorante MitoTracker (Invitrogen, EUA) por 30 minutos a 37 °C, posteriormente fueron lavadas con PBS. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3.6% en PBS pH 7.0 se incubaron a 37 °C por una hora en una cámara húmeda; fueron lavadas con PBS y se permeabilizaron con acetona fría (-20°C) por 5 minutos. Posteriormente fueron lavadas con PBS y las laminillas se bloquearon con BSA al 1% en PBS, durante 30 minutos a 37 °C.

Las células se incubaron con el anticuerpo primario (anti-BmVDAC) a una dilución 1:100 por una hora. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Jackson Immuno Research, EUA); durante 1 hora y se lavaron con PBS. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente y después se montaron con Vectashield más DAPI (Vector laboratories, EUA), sobre el cual se colocó un cubreobjetos y se selló con esmalte transparente, las preparaciones fueron observadas al

microscopio confocal (Leica, ARM). Las imágenes fueron editadas con el programa LAS AF lite de Leica.

9.8. Evaluación de la participación de la proteína BmVDAC durante el proceso de infección de *B. bigemina* a *R. microplus*

La participación de la proteína BmVDAC en la infección del parásito a las células del intestino, fue evaluada mediante un ensayo de bloqueo con anticuerpos anti-BmVDAC en *R. microplus*. El ensayo se llevó a cabo infestando un bovino con 0.5 g de larvas de garrapata de la cepa Media Joya y por otro lado se infectó un bovino con *B. bigemina* de la cepa Chiapas. Las garrapatas semirrepletas fueron colectadas y alimentadas artificialmente con sangre suplementada como se describe en seguida.

9.9. Alimentación artificial de garrapatas

Las garrapatas hembras semirrepletas fueron colectadas a los 21 días pos-infestación y se colectó sangre infectada con *Babesia* del bovino que fue infectado previamente. Las garrapatas se pesaron y solo se seleccionaron aquellas que estuvieron en el rango de peso de 25 a 60 mg, las cuales se colocaron y fijaron en una charola de poliestireno (Gonsioroski., 2011). Las garrapatas que presentaron daño en las partes de la boca y tuvieron un peso de más de 60 mg ó menos de 25 mg fueron descartadas. Posteriormente se les

colocaron sobre la boca tubos capilares de microhematocrito (75 mm x 1.0 mm x 1.5 mm) sin anticoagulante y rellenos con 100 µl de sangre de bovino con citrato de sodio con diferentes suplementos. Las garrapatas se dividieron en 4 grupos experimentales de 9 garrapatas cada uno y fueron alimentadas por 28 hrs (durante la alimentación se mantuvieron a 27°C con 85% de humedad) como se describe a continuación: un grupo fue alimentado solo con sangre de bovino no infectada, otro con sangre infectada suplementada con el suero de conejo, otro grupo se alimentó con sangre infectada suplementada con suero inmune (anticuerpos anti-BmVDA, 1 mg/ml) y por último un grupo se alimentó con sangre infectada con PBS. Después de la alimentación las garrapatas fueron pesadas para determinar la ganancia de peso, se colocaron en una caja de Petri y se incubaron a 28 °C con 85% de humedad y se analizaron los parámetros biológicos.

9.10. Análisis de los parámetros biológicos y transmisión de *B. bigemina*

A) Peso y ovoposición de las garrapatas

El peso incrementado durante la alimentación (mg/garrapata) y la ovoposición (peso de los huevos en mg/garrapata) se compararon entre las garrapatas alimentadas con sangre suplementada con anticuerpos contra BmVDAC y los controles (garrapatas alimentadas con sangre de bovino infectada suplementada con suero pre inmune, PBS y sangre no infectada) mediante una prueba t student's con varianza desigual ($P=0.05$).

B) Cuantificación de quinetos en la hemolinfa de garrapatas por microscopia óptica

La infección por *B. bigemina* en las garrapatas se determinó mediante el análisis de la transmisión del parásito al intestino del vector a las 72 hrs post-repleción, mediante la técnica de la hemolinfa descrita por Gonsioroski y colaboradores (Gonsioroski y cols., 2012). En este estudio se evaluó si ocurrió la transformación de las fases infectantes a quinetos en la hemolinfa de la garrapata a través de una tinción con Giemsa, la cual fue observada en el microscopio óptico.

9.11. Análisis estadístico

Los datos estadísticos de los ensayos de RT-PCR punto final y Western blot fueron expresados como un promedio de $\pm$ SEM de las tres replicas en cada caso. La significancia estadística de la diferencia entre promedios se determinó mediante un análisis ANOVA; por comparación de los promedios usando la prueba Ryan–Einod–Gabriel–Welsch (EGWQ) con $\alpha = 0.05$, con el programa SAS v 9.0.

Debido al uso de bovinos en este estudio, el protocolo requirió la previa autorización por el Comité de Ética de Experimentos con Animales y se desarrollo

en estricta conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en la Universidad de Querétaro.

10. Resultados

10.1. Obtención de intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas con *B. bigemina*

En este trabajo, para determinar el efecto de la infección con *B. bigemina* en el nivel de expresión transcripcional y de la proteína codificada por el gen *Bmvdac* se aislaron intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas con el protozoario. Las muestras biológicas que se utilizaron en los ensayos fueron obtenidas mediante la experimentación con bovinos; para lo cual se infestaron dos bovinos con 0.5 g de larvas de garrapata *R. microplus* de la cepa Media Joya. El día de infestación del bovino se consideró día cero. Uno de los bovinos fue infectado con *B. bigemina* de la cepa Chiapas a los 10 días post-infestación y se le realizó una prueba de parasitosis en sangre, se obtuvo sangre del bovino a los 9 días después de la inoculación con *Babesia* y se hizo un frotis que fue teñido con el colorante Giemsa.

El frotis fue observado al microscopio óptico y se detectaron merozoítos de *B. bigemina* dentro y fuera de los eritrocitos, encontrando una parasitemia del 3% (Figura 8). La hemolinfa de las garrapatas utilizadas en los ensayos fue analizada al tercer y cuarto días post-repleción y observamos la presencia de

quinetos en garrapatas que fueron alimentadas en un bovino infectado con *B. bigemina*, en contraste con la hemolinfa de garrapatas no infectadas, donde no encontramos ningún quinetos (Figura 9).

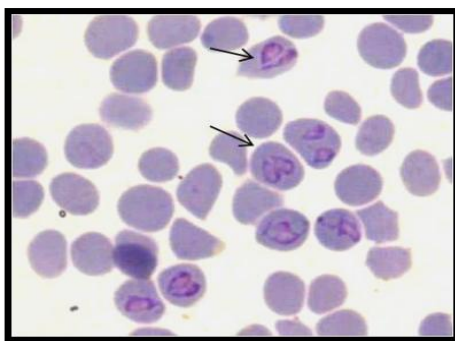


Figura 8. Análisis de la infección con *B. bigemina* en sangre del bovino. Frotis de sangre de bovino infectada con *B. bigemina* de la cepa Chiapas. Las flechas indican algunos de los eritrocitos infectados con merozoítos de *B. bigemina*. Observada en el microscopio con el lente objetivo 100x (aumento total de 1,000x).

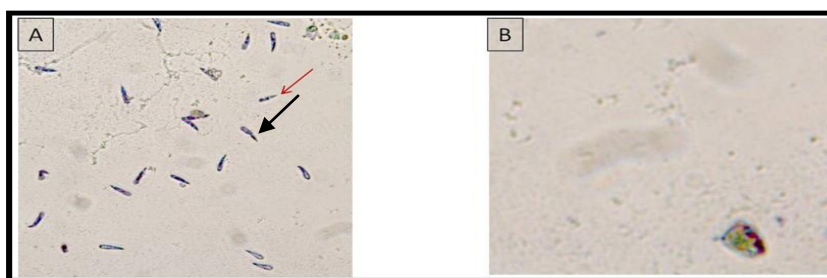


Figura 9. Análisis de la infección con *B. bigemina* en garrapatas mediante la prueba de hemolinfa. Panel A. Hemolinfa de garrapata alimentada en un bovino infectado con *B. bigemina*. Panel B. Hemolinfa de garrapata alimentada en un bovino libre de *Babesia*. Imágenes tomadas en microscopio óptico a 100x (aumento total de 1,000x). Con una flecha se señala un quinetos de *B. bigemina*.

10.2. Clonación del gen que codifica para la proteína BmVDAC en el vector TOPO TA

Hasta el momento de este estudio no se conocía la secuencia del gen *vdac* de *R. microplus*, por lo que fue de nuestro interés clonar y reportar la secuencia en la base de datos del NCBI con la finalidad de realizar una caracterización completa. Un fragmento del gen *Bmvdac* fue amplificado mediante la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 3); obtuvimos un amplicón de aproximadamente 800 pb, mismo que fue clonado en el vector TOPO TA. En la figura 10 se muestra el ADN plasmídico purificado de 16 clonas seleccionadas, separados en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente se seleccionaron dos plásmidos para investigar por restricción enzimática si contenían el inserto *Bmvdac* clonado; los dos plásmidos contenían el inserto. En la figura 11 se muestra la electroforesis de las reacciones de degradación con la enzima *EcoRI*, donde se observan las dos clonas que liberaron un inserto en el tamaño esperado de 800 pb, posteriormente este fue secuenciado.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación del gen *Bmvdac*.

Oligonucleótido	Secuencia
Sentido	5'-atggctcctccgtgtacgc-3'
Anti-sentido	5'-cttgtgtcctccctggttgaa-3'

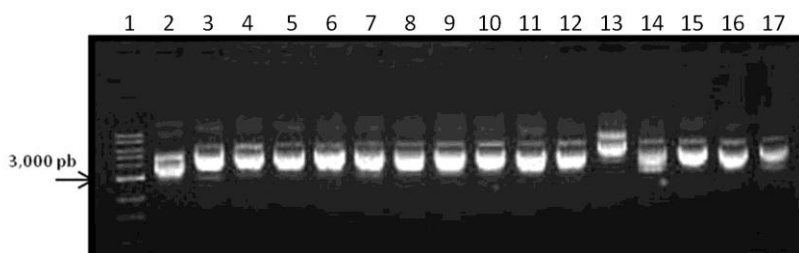


Figura 10. Análisis de las clonas para determinar la presencia del inserto por diferencias en el tamaño del ADN plasmídico. Electroforesis del ADN plasmídico purificado de las clonas transformadas con la construcción TOPO TA-*Bmvdac*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. En el carril 1 se encuentra el marcador de talla molecular de 1 kb y los carriles del 2 al 17 el ADN plasmídico purificado de 16 clonas candidatas.

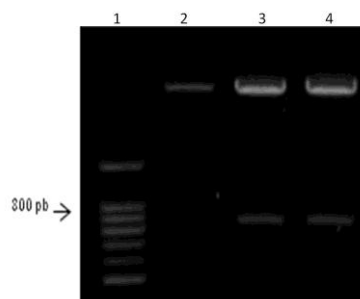


Figura 11. Digestión enzimática de plásmidos para determinar la presencia del inserto. El ADN plasmídico fue digerido con la enzima *EcoRI* y resuelto en un gel de agarosa al 2%, teñido con GelRed. En el carril 1 se muestra el marcador de

talla molecular de y en el carril 2 el vector vacío, en los carriles 3 y 4 se encuentra el ADN digerido con *EcoRI*. El inserto liberado en ambas construcciones tuvo una longitud aparente de 800 pb.

El inserto liberado por digestión enzimática fue purificado de gel y secuenciado. Las secuencias obtenidas se alinearon mediante el software BioEdit Sequence Alignment Editor. En la figura 12 se muestran las secuencias parciales nucleotídica y de aminoácidos del gen *Bmvdac* obtenida de la secuenciación. La secuencia obtenida de 819 nucleótidos, fue traducida en el servidor ExPASy dando como resultado un marco de lectura de 273 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos obtenida se comparó con las secuencias encontradas en la base de datos; el resultado mostró que tiene una identidad del 87% con la secuencia de aminoácidos de la proteína VDAC de la garrapata *I. scapularis* en un análisis blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). La secuencia traducida fue utilizada para realizar un modelaje por homología de su estructura terciaria. La secuencia parcial del gen *Bmvdac* fue reportada en el GenBank NCBI (No. de acceso GU994210). En la figura 13 se muestra el alineamiento múltiple de secuencias de la proteína BmVDAC de varios organismos, en recuadros se indican aminoácidos de la interfase de dimerización putativa y con asteriscos los aminoácidos determinantes para la entrada de voltaje, que se encuentran conservados en la mayoría de los organismos.

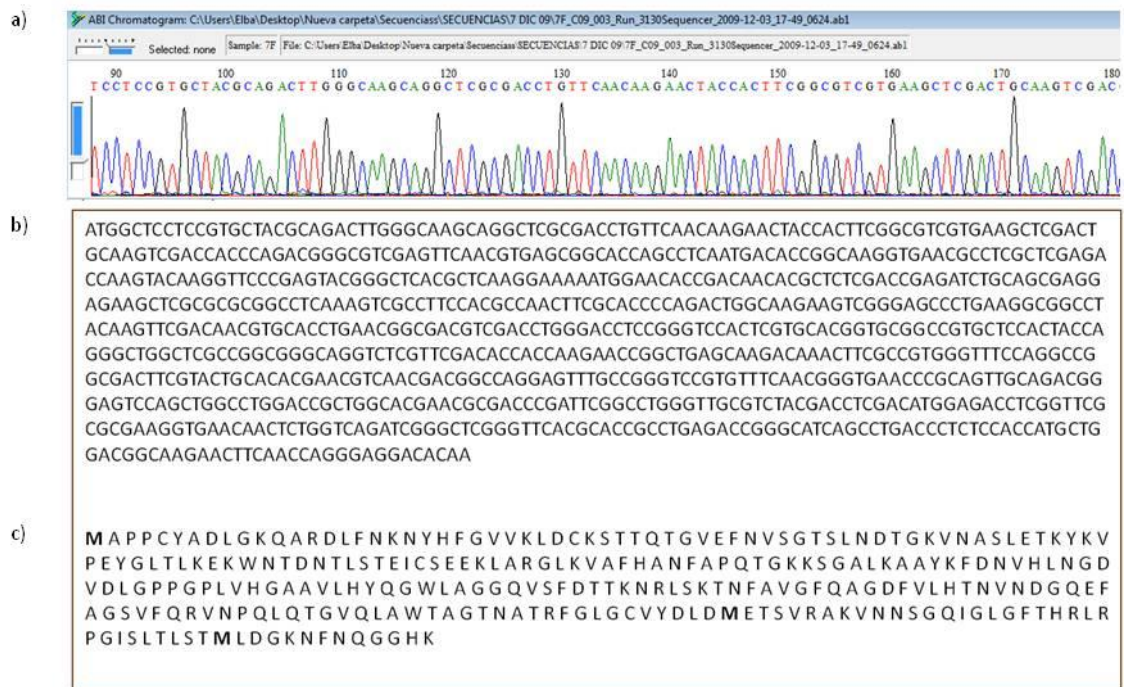


Figura 12. Secuencia parcial obtenida del gen *Bmvdac*. a) Electroferograma representativo de la secuencia del gen *Bmvdac*. b) Secuencia parcial del gen *vdac* de *R. microplus* obtenida y editada mediante el software BioEdit Sequence Alignment Editor. c) Marco de lectura parcial de la proteína VDAC de *R. microplus*.

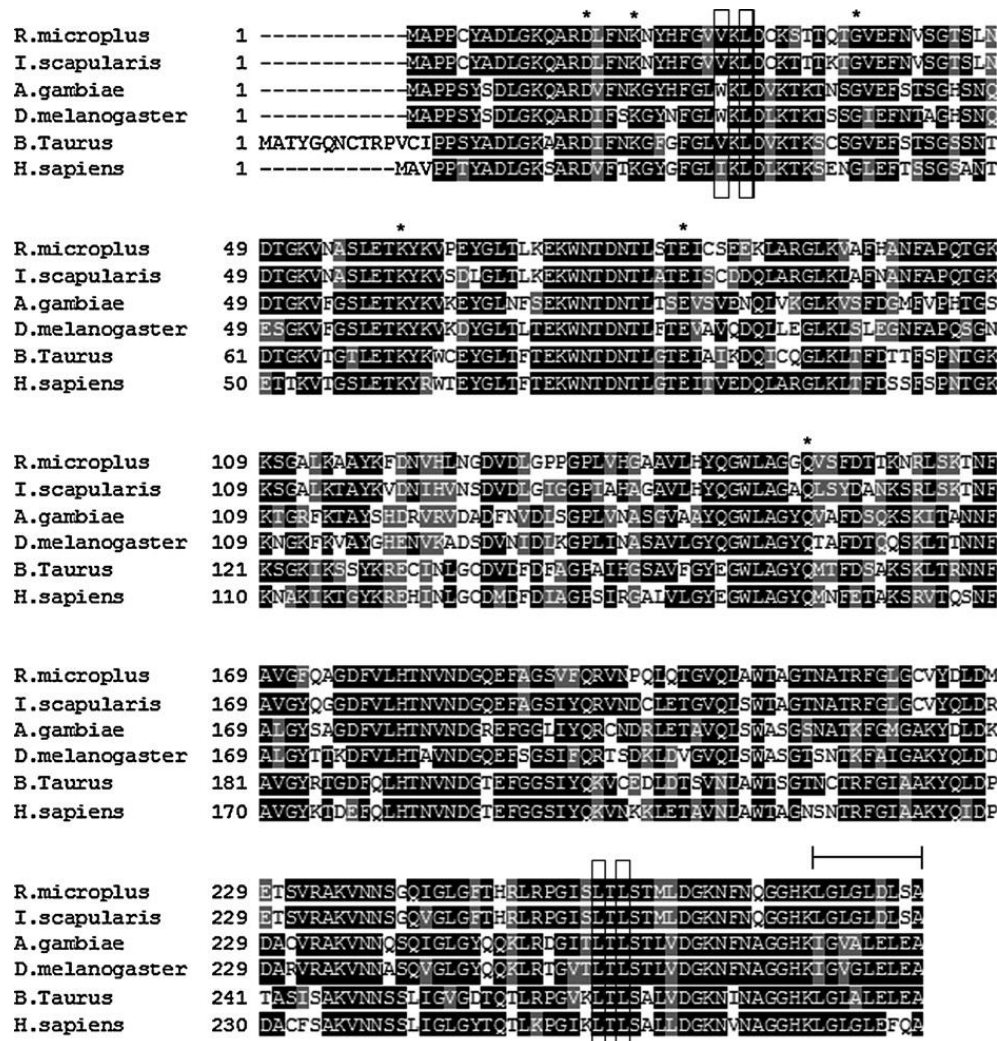


Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína VDAC de diferentes especies. El alineamiento fue realizado con el programa Clustal W <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> con secuencias de la proteína VDAC de organismos pertenecientes a distintos grupos. Los aminoácidos marcados en cajas muestran aminoácidos de la interface de dimerización putativa, y los aminoácidos marcados con asteriscos son aminoácidos determinantes para la entrada de voltaje. Los 9 aminoácidos en el

extremo C-terminal (bajo la línea) fueron obtenidos de la secuencia TC19533 del índice de genes *BmGI*.

La secuencia completa de la proteína BmVDAC fue utilizada para predecir el modelo de su estructura terciaria. El análisis del modelado por homología se realizó con el programa Swiss Model <http://swissmodel.expasy.org>. El programa utilizó como modelo templado la secuencia 4bum.1.A de VDAC de zebrafish que se encuentra cristalizada y reportada en la base de datos. La secuencia de VDAC de *R. microplus* tuvo una identidad de 60.15% con la proteína VDAC de zebrafish, el modelo tuvo un puntaje GMQE de 0.83, lo que indica que ese modelo tiene una alta confiabilidad. En la figura 14 se observa el modelo de la estructura que resulta del análisis, se puede notar que la estructura predicha de VDAC de *R. microplus* contiene 19 laminas β y un α hélice, lo que coincide con la secuencia utilizada como templado; arregladas formando un poro, con un α hélice que se acomoda al interior.

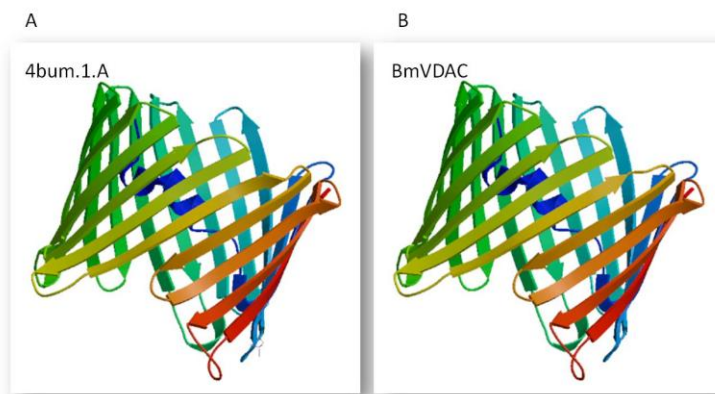


Figura 14. Predicción de la estructura terciaria de la proteína BmVDAC. Panel A. Estructura terciaria de la proteína VDAC de zebrafish (4bum.1.A) utilizada como

templado. Panel B. Modelo de la estructura terciaria predicha de la proteína VDAC de *R. microplus*.

La secuencia parcial del gen *Bmvdac* fue comparada con la secuencia TC19533 contenida en la base de datos del índice de genes *BmiGI* de *R. microplus* la cual fue reportada en el transcurso de este estudio (<http://compbio.dfci.harvard.edu>). El resultado mostró que las secuencias tienen una similitud del 100% y en el extremo 3' de la secuencia TC19533 se localizó un fragmento de 30 nucleótidos incluyendo un codón de paro (CTCGGACTCGGGCTCGACCTATCGGCGTGA) que correspondió al extremo del gen codificante, que no pudimos identificar. De esta manera determinamos que ese fragmento corresponde al extremo 3' del gen *Bmvdac*; también se realizó un alineamiento con las dos secuencia de aminoácidos, donde se observó su identidad y el extremo de 10 aminoácidos que completan la proteína BmVDAC (LGLGLDLA) (Figuras 13 y 15).

```

TC19533      1  TTGGCTTACACATCGCCAACTCAGGCCTCGCAGCTGCCGCCAAGCCGCATCAAAGAAT
vdac         1  -----
TC19533     61  TACCTCGCCATGGCCCCACCGTGCTATGCAGACTTGGGCAGGCAGGCTCGCGACCTGTTG
vdac         1  -----ATGGCTCCTCCGTGCTACGCAGACTTGGGCAGGCAGGCTCGCGACCTGTTG
C19533     121  AACAGAAGTACCACCTTCGGCGTCGTGAAGCTCGACTGCAAGTCGACCACCAGACGGGC
vdac        52  AACAGAAGTACCACCTTCGGCGTCGTGAAGCTCGACTGCAAGTCGACCACCAGACGGGC
TC19533     181  GTGAGTTCAACGTGAGCGGCACACGCTCAATGACACCGGCAAGGTGAACGCCCTCGCTC
vdac       112  GTGAGTTCAACGTGAGCGGCACACGCTCAATGACACCGGCAAGGTGAACGCCCTCGCTC
TC19533     241  GAGACCAAGTACAAGGTTCCCGAGTACGGGCTCAGCTCAAGGAAAAATGGAAACACCGAC
vdac       172  GAGACCAAGTACAAGGTTCCCGAGTACGGGCTCAGCTCAAGGAAAAATGGAAACACCGAC
TC19533     301  AACACGCTCTCGACCGAGATCTGCAGCGAGGAGAGCTCGCGCGCGGCCCTCAAGTCGCC
vdac       232  AACACGCTCTCGACCGAGATCTGCAGCGAGGAGAGCTCGCGCGCGGCCCTCAAGTCGCC
TC19533     361  TTCACGCAACTTCGCACCCAGACTGGCAAGAAGTCGGGAGCCTTGAAAGCGGCCCTAC
vdac       292  TTCACGCAACTTCGCACCCAGACTGGCAAGAAGTCGGGAGCCTTGAAAGCGGCCCTAC
TC19533     421  AAGTTGACACGTGCACTGAACGGCGACGTGACCTGGGACCTCCGGTCCACTCGTG
vdac       352  AAGTTGACACGTGCACTGAACGGCGACGTGACCTGGGACCTCCGGTCCACTCGTG
TC19533     481  CACGGTGCGGCCGTGCTCCACTACGAGGCTGGCTCGCCGGCGGGCAGGTCTCGTTGAC
vdac       412  CACGGTGCGGCCGTGCTCCACTACGAGGCTGGCTCGCCGGCGGGCAGGTCTCGTTGAC
TC19533     541  ACCACCAAGAACCGGCTGAGCAAGACAACTTCGCCGTGGGTTTCAGGCCGGCGACTTC
vdac       472  ACCACCAAGAACCGGCTGAGCAAGACAACTTCGCCGTGGGTTTCAGGCCGGCGACTTC
TC19533     601  GTACTGCACAGAACGTCAACGACGGCCAGGAGTTTGCCGGGTCCGTGTTTCAACGGGTG
vdac       532  GTACTGCACAGAACGTCAACGACGGCCAGGAGTTTGCCGGGTCCGTGTTTCAACGGGTG
TC19533     661  AACCGCAGTTGCAGACGGGAGTCCAGCTGGCTGGACCGCTGGCAGAACCGGACCCGA
vdac       592  AACCGCAGTTGCAGACGGGAGTCCAGCTGGCTGGACCGCTGGCAGAACCGGACCCGA
TC19533     721  TTCGGCTGGGTTGCGTCTACGACCTCGACATGGAGACCTCGGTTCGCGCGAAGGTGAC
vdac       652  TTCGGCTGGGTTGCGTCTACGACCTCGACATGGAGACCTCGGTTCGCGCGAAGGTGAC
TC19533     781  AACTCTGGTCAGATCGGGCTCGGTTACGCAACCGCTGAGACCGGGCATCAGCCTGACC
vdac       712  AACTCTGGTCAGATCGGGCTCGGTTACGCAACCGCTGAGACCGGGCATCAGCCTGACC
TC19533     841  CTCTCCACCATGCTGGACGGCAAGAATTCAAACAGGGAGGACACAAGCTCGGACTCGGG
vdac       772  CTCTCCACCATGCTGGACGGCAAGAATTCAAACAGGGAGGACACAAG-----
TC19533     901  CTCGACCTATCGGCGTGATGCCCAAGTTGGCCGACCTCTGATCGCCGGTGCACCAATT

```

Figura 15. Alineamiento entre las secuencias *Bmvdac* y TC19533. La secuencia parcial del gen fue comparada con una secuencia (TC19533) contenida en la base de datos ESTs del índice de genes *BmiGI* mediante el programa Clustal W.

10.3. Análisis del nivel de expresión del gen *Bmvdac* en intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas

Los cambios en la expresión transcripcional del gen *Bmvdac* entre garrapatas infectadas y no infectadas fueron analizados a seis tiempos post-repleción; para cumplir con este objetivo, realizamos la extracción de ARN de garrapatas infectadas y no infectadas de 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-repleción; amplificamos el gen *Bmvdac* (Tabla 4) y el gen de la esterasa que se utilizó como control endógeno por RT-PCR.

Tabla 4. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes *Bmvdac* y esterasa por RT-PCR punto final.

Oligonucleótido	Secuencia
VDAC tr (F)	5'-GTCGTGAAGCTCGACTGCAA-3'
VDACtr (R)	5'-TGTCGGTGTTCCATTTTCCT -3'
ESTtr (F)	5'-CGCTGAAATGCACCATGAAG-3'
ESTtr (R)	5'-TCAGTCCGGAAAGCCAGTAGA-3'

El análisis de expresión del gen *Bmvdac* reveló que existen cambios en el nivel de expresión del transcrito a diferentes tiempos post-repleción entre garrapatas infectadas y no infectadas, siendo a las 12 y 24 horas los cambios significativos ($p < 0.0001$) donde se observa mayor nivel de expresión en garrapatas infectadas con respecto a las no infectadas (Figura 16 a y b). Es importante mencionar que de acuerdo a la literatura a ese tiempo se puede

observar la invasión de las células intestinales por parte de los oocinetos de *Babesia* sp (Bock y cols., 2004); por lo que los resultados sugieren que los cambios en la expresión podrían ser en respuesta a la invasión de *B. bigemina* a las células intestinales de garrapata.

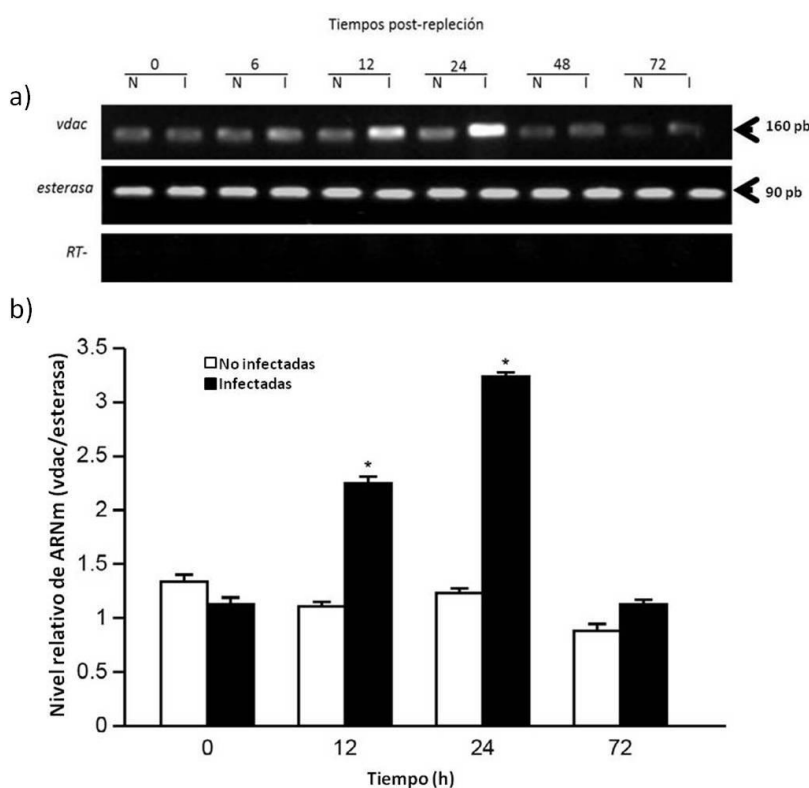


Figura 16. Análisis del nivel de expresión transcrpcional del gen *Bmvdac* en células intestinales de garrapata. a) Ensayo de RT-PCR con ARN de células de intestino de garrapatas infectadas (señalada con la letra I) y no infectadas (señalada con la letra N) con *B. bigemina* a seis tiempos post-repleción que se encuentran señalados sobre las líneas (0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas). La amplificación del gen de la esterasa (utilizado como control endógeno) y el control

RT- . b) Análisis semicuantitativo de la expresión del transcrito *Bmvdac* a cuatro tiempos post-repleción.

Los resultados obtenidos en la RT-PCR punto final fueron cotejados con un ensayo de RT-PCR en tiempo real, sin embargo, no se logró obtener datos concluyentes debido a la falta de muestras para repetir los ensayos. Los resultados de la RT-PCR punto final fueron analizados para determinar de manera semicuantitativa el nivel de expresión del transcrito *Bmvdac*, considerando los cuatro tiempos donde se observó el cambio más evidente. El transcrito fue cuantificado en relación al gen endógeno esterasa, el valor promedio de las tres cuantificaciones fueron graficadas y se determinó el valor relativo del transcrito; en asteriscos se muestra los valores estadísticamente significativos ($p < 0.0001$) figura (Figura 16 b)

En la figura 17 se muestra la amplificación de los genes: *Bmvdac* y *hsp20* de *Babesia* por PCR para determinar la especificidad de los oligonucleótidos (utilizando ADN de *B. bigemina* y *R. microplus* por separado); los resultados muestran que al usar ADNg de *B. bigemina* y los oligonucleótidos del gen *Bmvdac* no hay amplificación, pero si amplifica el gen *hsp20* (530 pb) de *B. bigemina* usado como control. En el caso de las reacciones donde se utilizó el ADNg de *R. microplus* con los mismos oligonucleótidos; se observa la amplificación del gen *Bmvdac* (600 pb aproximadamente). Este resultado demuestra que los oligonucleótidos no amplifican genes inespecíficos al menos a partir de ADNg de *B. bigemina*.

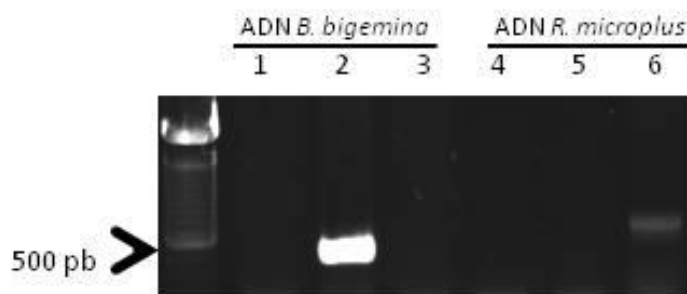


Figura 17. Análisis de especificidad de oligonucleótidos para la amplificación del gen *Bmvdac*. Se usaron oligonucleótidos para amplificar el gen *Bmvdac* de *R. microplus* y *hsp20* de *Babesia*. En el carril 1, 2 y 3, observamos el control de reacción, *hsp20* y *Bmvdac* respectivamente amplificados a partir de ADNg de *B. bigemina*. En el carril 4, 5 y 6 observamos el mismo orden anterior, amplificado a partir de ADNg de *R. microplus*.

10.4. Clonación de una secuencia parcial del gen *Bmvdac* en el vector de expresión pCold I

Un fragmento del gen *Bmvdac* (675 nucleótidos) fue amplificado con oligonucleótidos específicos, éste codifica para un péptido de 225 aminoácidos con un peso molecular aparente de 24.7 kDa. Los oligonucleótidos fueron diseñados con sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Hind*III mismos que se localizan en el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pCold I que fue utilizado (tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos con sitios de restricción para la amplificación del gen que codifica para el péptido BmVDAC de 24.7 kDa.

PRIMER	SECUENCIA
Forward	<i>Bam</i>H1  5'CGCGGATCCCCGTGCTACGCAGACTTG 3'
Reverse	<i>Hind</i>III  5'CCCCCAAGCTTGCTACGCAACCCAGGCCGAATC 3'

Tanto el vector como el inserto fueron digeridos con las mismas enzimas; y en seguida se realizó la ligación del inserto *Bmvdac* en el vector pCold I con sus respectivos controles y se transformaron células *E. coli* BL21. Las clonas que crecieron fueron analizadas por una PCR de colonia y observamos que nueve de ellas contenían el inserto en el tamaño esperado (Figura 18).

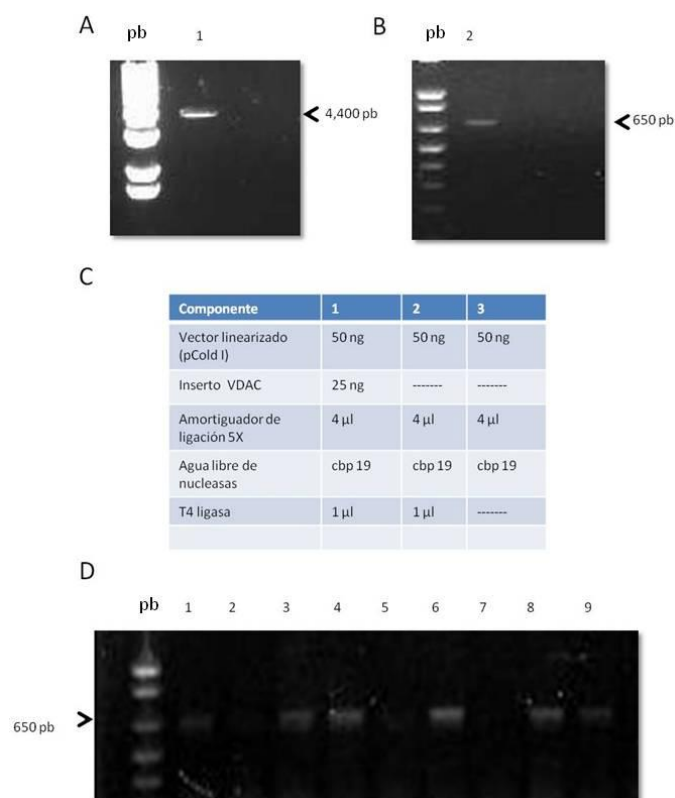


Figura 18. Clonación del fragmento del gen *Bmvdac* y análisis de las colonias por PCR de colonia. A). Electroforesis en gel de agarosa al 1% del vector pCold I linearizado con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del inserto restringido con las mismas enzimas que el vector. C) Protocolo de clonación del inserto con el vector y controles. D) Análisis de las clonas (1-9 clonas analizadas) mediante PCR de colonia. El marcador de talla molecular esta señalado con las letras pb.

10.5. Expresión y purificación de la proteína recombinante BmVDAC

Las clonas positivas fueron utilizadas para inducir la expresión de la proteína BmVDAC recombinante. El cultivo se indujo durante 24 horas a 15°C con 1 mM de IPTG y se analizó el resultado mediante SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie. En la figura 19 se muestran extractos proteicos del ensayo de inducción de la expresión de la proteína recombinante BmVDAC, donde se observa la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 25 kDa (recuadro). También realizamos un Western blot usando anticuerpos anti-tag de histidinas (Figura 20).

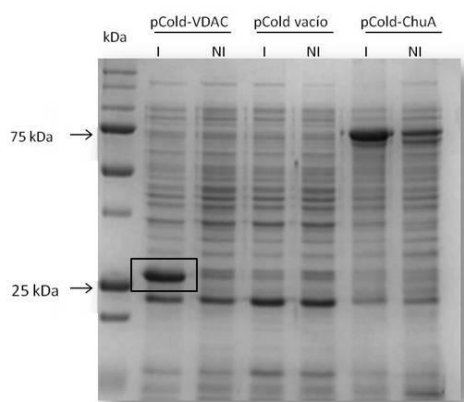


Figura 19. SDS-PAGE de extractos de *E. coli* de cultivo en los que se indujo la expresión de la proteína recombinante BmVDAC. Los extractos proteicos fueron separados mediante SDS-PAGE al 12% y teñido con azul de Coomassie. Los extractos que se muestran son de células con diferentes construcciones: una construcción pCold-BmVDAC, células con el vector vacío y otras con la construcción pCold-ChuA que se utilizó como control; cada una de estas bajo dos

condiciones de cultivo; inducidos con IPTG (I) y otros no inducidos (NI). La proteína expresada de aproximadamente 25 kDa está señalada en un recuadro.

Los extractos proteicos de los cultivos fueron centrifugados y separados mediante una SDS-PAGE al 12% para determinar en qué fracción del extracto se encontraba la proteína recombinante, encontrando una mayor cantidad de proteína expresada en la fracción insoluble (Figura 21). Posteriormente la proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad usando columnas de Níquel Hitrap™ en un FPLC AKTA prime plus (General Electric, EUA) (Figura 22) bajo el programa on column refolding. Las 20 fracciones que obtuvimos de la purificación fueron separadas en una electroforesis SDS-PAGE al 12% y el gel fue teñido con azul de coomassie, para verificar que la proteína se encontraba pura (Figura 23) sólo siete de las fracciones contenían la proteína purificada (fracciones 14-20) con un rendimiento de 60 µg/ml. También, verificamos la identidad de la proteína purificada mediante un Western blot usando anticuerpos anti-tag de histidinas (Figura 24).

10.6. Obtención de anticuerpos policlonales contra BmVDAC

La proteína recombinante fue dializada y utilizada para inmunizar un conejo con una primera dosis de 50 µg, a los 15 días una segunda dosis de 50 µg y dos semanas después una tercera dosis de 50 µg con el adyuvante Montanide 70, se obtuvo el suero pre-inmune y suero post-inmunización para analizarlo

mediante un Western blot, y determinar si se reconocía a la proteína BmVDAC nativa y recombinante.

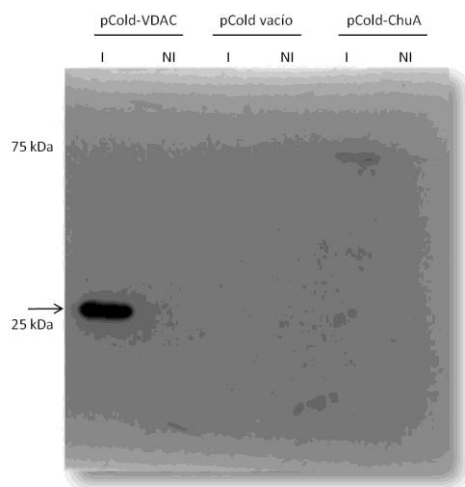


Figura 20. Western blot del extracto proteico usando anticuerpos anti-tag de histidinas. Se analizaron extractos de células con diferentes construcciones: una donde las células contenían la construcción pCold-BmVDAC, otras con el vector vacío y otras con la construcción pCold-ChuA y, cada una de estas con dos condiciones de cultivo, cultivos inducidos con IPTG (I) y no inducidos (NI). En este ensayo se reconoce una proteína de aproximadamente 25 kDa indicada con una flecha.

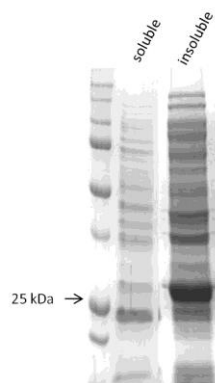


Figura 21. Prueba de solubilidad de la proteína recombinante BmVDAC. SDS-PAGE de los extractos proteicos del cultivo de *E. coli* inducido con 1mM de IPTG.

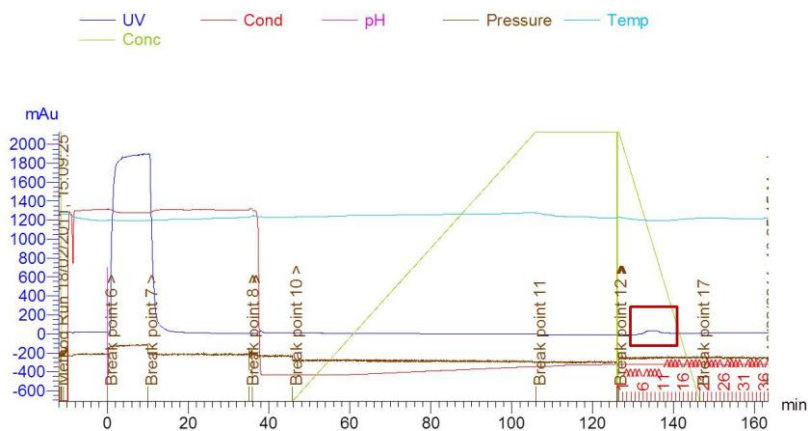


Figura 22. Cromatograma de la purificación de la proteína BmVDACr mediante una columna de níquel. En el cromatograma se observan los picos (lecturas UV) que corresponden a las fracciones de proteína eluida (recuadro rojo).

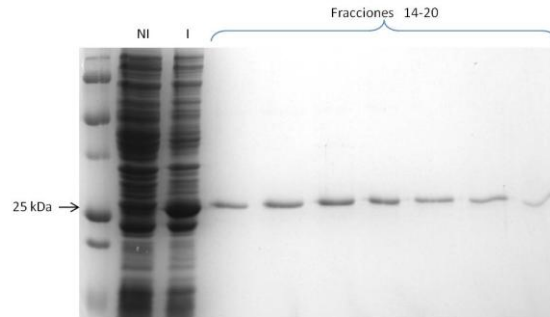


Figura 23. Purificación de la proteína BmVDACr mediante cromatografía de afinidad. SDS-PAGE de las fracciones 14-20 obtenidas de la purificación mediante cromatografía de afinidad y los extractos de proteína de cultivo inducido (I), y no inducido (NI).

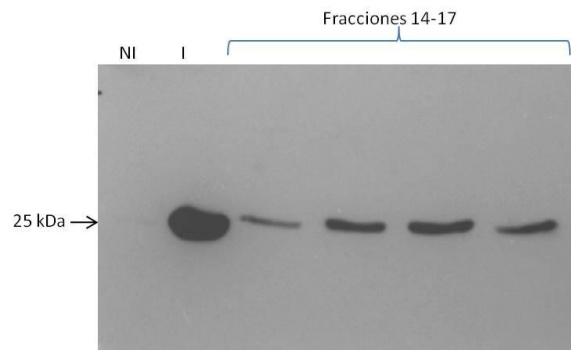


Figura 24. Western blot de las fracciones obtenidas en la purificación de la proteína BmVDACr. La identidad de la proteína recombinante contenida en las fracciones (de la 14 a la 17) fue corroborada mediante un Western blot usando anticuerpos anti-tag de histidinas (1:3000). Fueron usados también extractos de proteínas de cultivo inducido (I) y no inducido (NI).

10.7. Inmunodetección de la proteína BmVDAC en tejido intestinal de garrapata

A) Ensayo de Western blot

La localización de la proteína BmVDAC en tejido de garrapata se investigó mediante ensayos de inmunofluorescencia y Western blot de las células intestinales infectadas y no infectadas a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-repleción.

En los resultados del Western blot de proteínas totales de intestino se observó una sobreexpresión de la proteína BmVDAC en garrapatas infectadas con respecto a las no infectadas a las 12 y 24 hrs post-repleción y no se observa cambios evidentes en los otros tiempos analizados (Figura 25). También se muestra la detección de la alfa tubulina que fue utilizada como control de carga para este ensayo y el suero pre-inmune como control, donde no se observa señal.

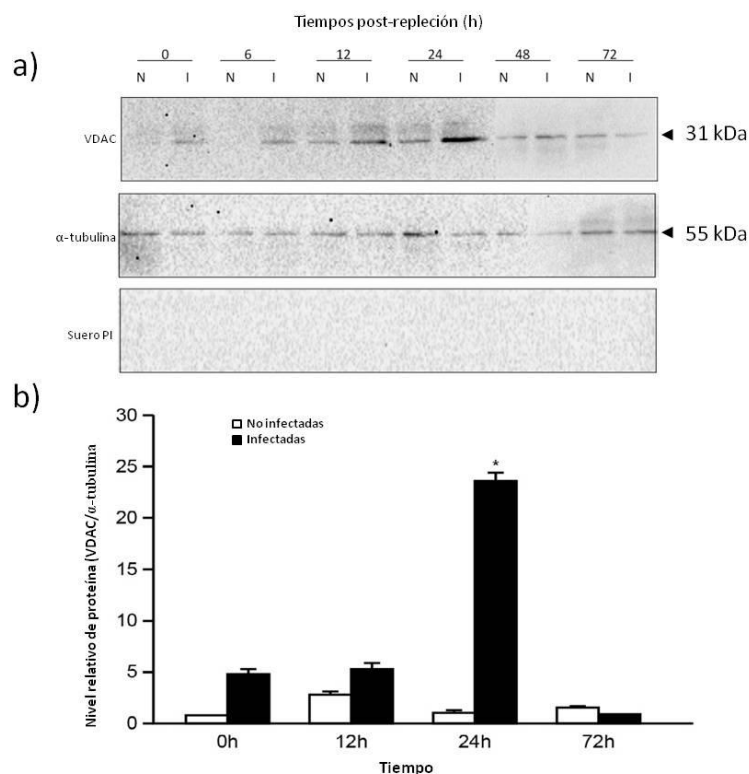


Figura 25. Western blot de extractos totales de células de intestino de la garrapata *R. microplus*. a) Las proteínas de los extractos totales fueron incubadas con anticuerpos anti-BmVDAC, anti- α -tubulina y con el suero pre-inmune respectivamente. El análisis se realizó a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 hrs post-repleción. b) Análisis semicuantitativo del nivel de expresión de la proteína a partir del ensayo del Western blot de cuatro tiempos post-repleción.

Los resultados obtenidos en el ensayo de Western blot fueron analizados para determinar de manera semicuantitativa la cantidad de proteína BmVDAC encontrada en los cuatro tiempos post-repleción en los que se observaron los cambios más evidentes (0, 12, 24 y 72 horas). Las bandas de la proteína BmVDAC observadas en el Western blot fueron cuantificadas por desitometría en

relación a la proteína endógena α -tubulina. En la figura 25 b podemos observar la gráfica de los valores promedio mas el error estándar de la media ($\pm$ SEM) de tres cuantificaciones realizadas (de ensayos independientes); en asteriscos se señalan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) y se observa que existe un cambio significativo en el nivel de expresión de la proteína BmVDAC a las 24 horas, lo cual correlaciona con los análisis realizados por RT-PCR (Figura 25 b).

B) Ensayo de inmunofluorescencia

La localización de la proteína BmVDAC en células intestinales de garrapata fue analizada mediante inmunofluorescencia. El análisis fue realizado con células de intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas a los 0, 6, 12, 24, 48 y 72 hrs post-repleción. Los resultados muestran que existe una marcada diferencia en el nivel de expresión de la proteína entre garrapatas infectadas y no infectadas (Figura 26: A-F); además de que se puede observar claramente que existe un patrón de distribución diferente entre ellas. En general, en las células de garrapatas infectadas se observan agregados visibles en la membrana celular (Figura 26: M-Q), lo que sugiere que la proteína BmVDAC podría dirigirse a sitios estratégicos de la membrana al momento de la invasión, especialmente a las 24, 48 y 72 horas post-repleción (Figura 26).

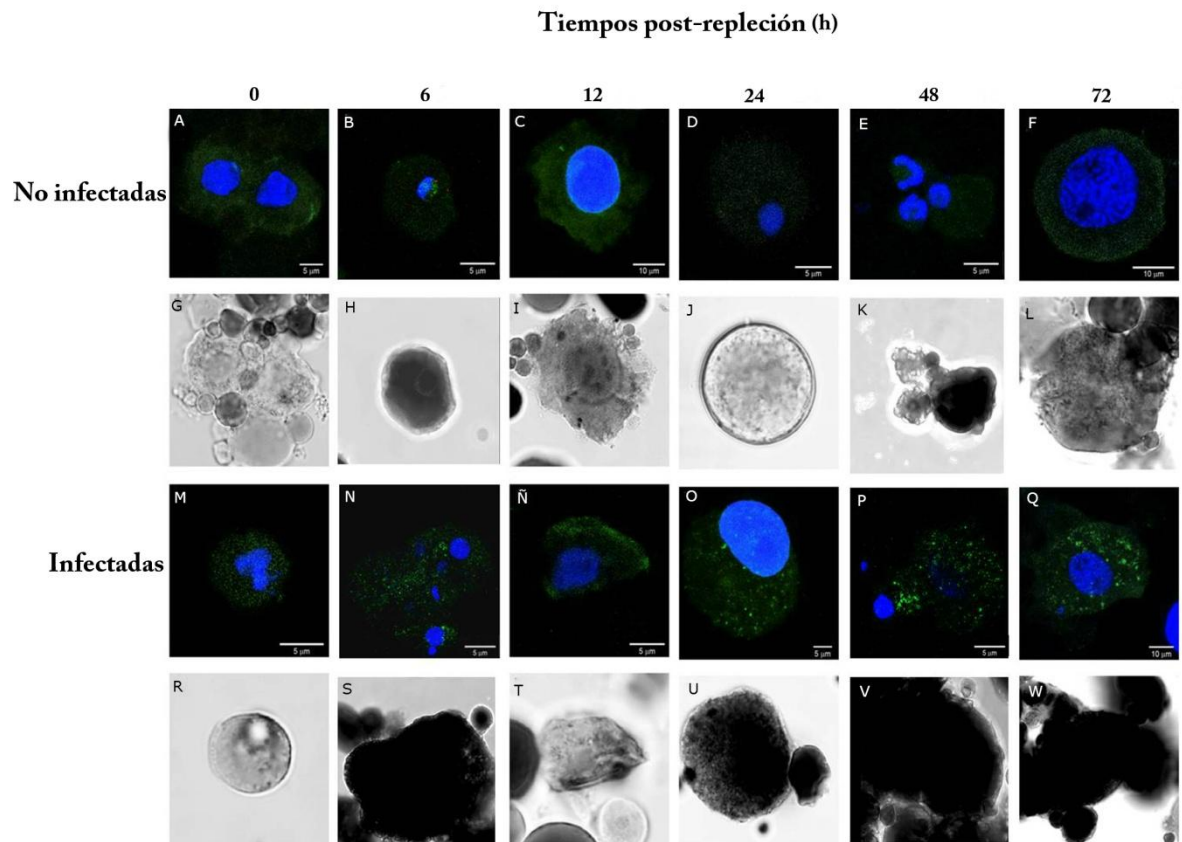


Figura 26. Inmunofluorescencia de células de intestino de garrapatas infectadas y no infectadas con *B. bigemina*. Células de garrapatas no infectadas (fotos de fluorescencia: A-F. Fotos del campo claro: G-L). Células de garrapatas infectadas (fotos de fluorescencia: M-Q. fotos del campo claro: R-W). Ensayo de inmunodetección de la proteína BmVDAC utilizando anticuerpos anti-BmVDAC (verde) y el colorante DAPI (azul). Imágenes tomadas con el microscopio confocal.

10.8. Evaluación de la participación de la proteína BmVDAC durante el proceso de infección de *B. bigemina* a *R. microplus*

10.9. Alimentación artificial de garrapatas

Las garrapatas hembras fueron colectadas, posteriormente se seleccionaron 9 garrapatas en cada grupo experimental y fueron fijadas y alimentadas en una charola como se detalla en la metodología (Figura 27).

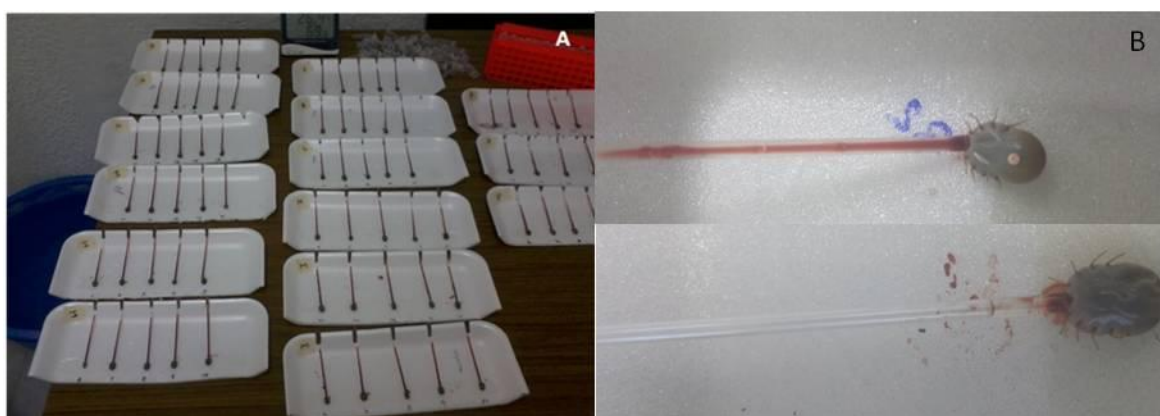


Figura 27. Alimentación artificial de garrapatas. Las garrapatas colectadas se dividieron en 4 grupos de 9 garrapatas cada uno y fueron alimentadas por 28 hrs. En el panel A se muestra la incubación de las garrapatas alimentándose y en el panel B se muestra un acercamiento del proceso.

10.10. Efecto de los anticuerpos contra la proteína BmVDAC en el peso y ovoposición de las garrapatas

El efecto de los anticuerpos contra la proteína BmVDAC en el peso y ovoposición de las garrapatas fue evaluado mediante la alimentación artificial a través de capilares. Cuando las garrapatas fueron alimentadas con sangre de bovino infectada suplementada con anticuerpos anti-BmVDAC ese grupo no muestra reducción significativa en el peso de la garrapata comparado con los grupos control (Figura 28). El peso inicial de las garrapatas fue muy heterogéneo entre todos los grupos y por lo tanto la ganancia de peso también resultó en una alta variabilidad, además de que muchas de las garrapatas no lograron alimentarse. Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas en la ganancia de peso entre los grupos analizados (Figura 28). Tampoco se observaron cambios estadísticamente significativos en la ovoposición de las garrapatas alimentadas con sangre infectada con anticuerpos anti-BmVDAC con respecto al grupo control (pre inmune) (Figuras 29 y 30).

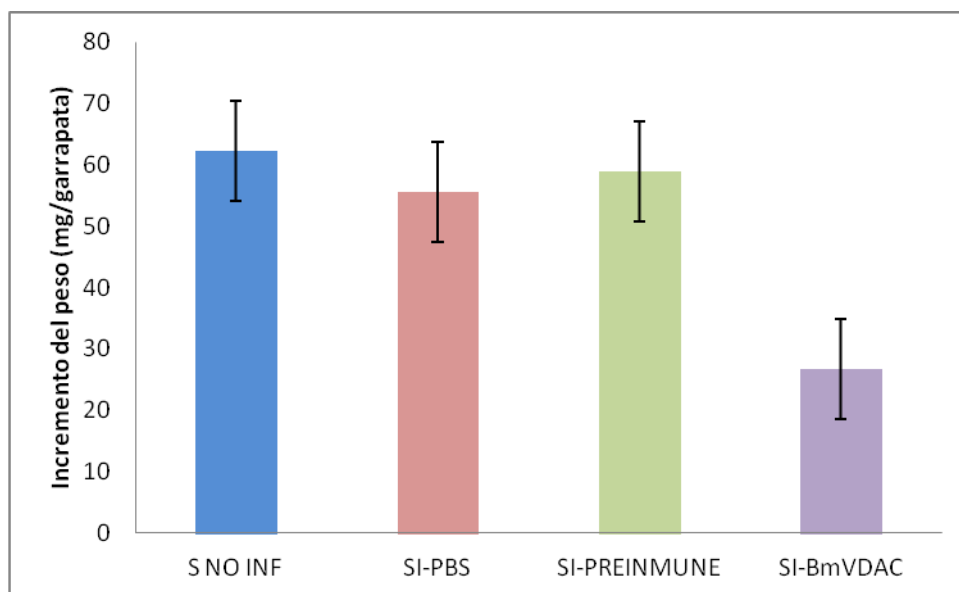


Figura 28. Efecto del anticuerpo en el peso de las garrapatas *R. microplus*.

Garrapatas alimentadas con sangre no infectada (S NO INF), con sangre infectada suplementada con PBS (SI-PBS), sangre infectada con suero preimmune (SI-PREINMUNE) y sangre infectada suplementada con anticuerpos anti-BmVDAC (SI-BmVDAC). Las garrapatas (N=9) fueron pesadas antes y después de la alimentación, el incremento del peso de la garrapata fue calculado como el peso final menos el peso inicial expresado como Ave + ET (mg/garrapata) y comparado entre el grupo con el suero preimmune y los otros grupos por la prueba t de Student ($P < 0.05$).

Las garrapatas de todos los grupos experimentales fueron colocadas de forma individual en cajas para su ovoposición. Posteriormente los huevos fueron pesados y almacenados para su análisis. Aparentemente no hubo diferencias significativas entre los grupos. Tampoco se observaron cambios visibles en el desarrollo de las garrapatas después de ser alimentadas (Figura 29).

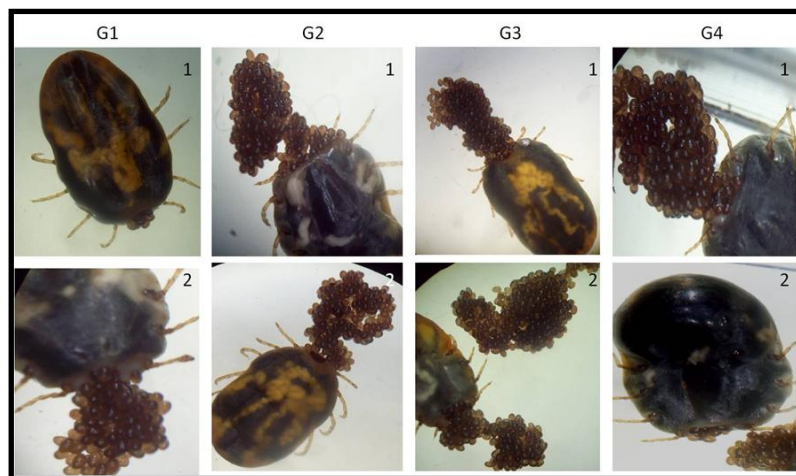


Figura 29. Garrapatas repletas en proceso de ovoposición. Las garrapatas fueron incubadas en condiciones óptimas y los huevos fueron colectados y pesados. Imagen representativa donde se muestran 2 individuos de cada grupo experimental (G1-G4).

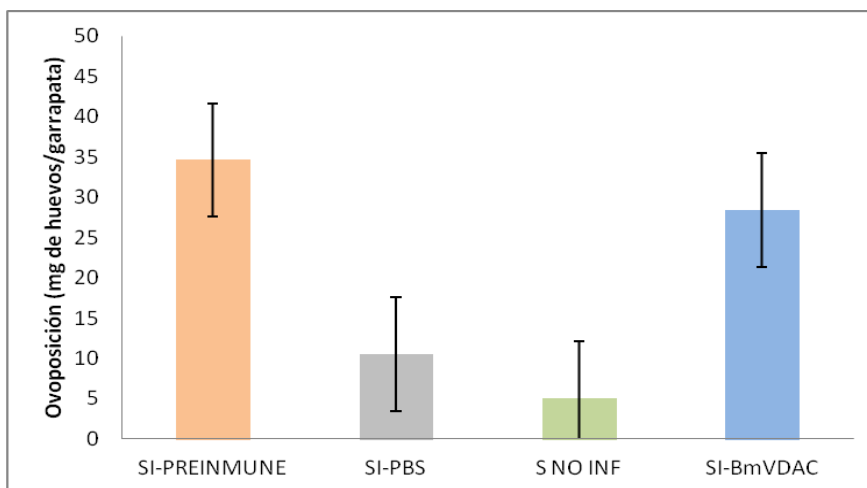


Figura 30. Efecto del anticuerpo en la ovoposición de las garrapatas. Garrapatas alimentadas con sangre no infectada (S NO INF), con sangre infectada suplementada con PBS (SI-PBS), sangre infectada con suero preimmune (SI-

PREINMUNE) y sangre infectada suplementada con anticuerpos anti-BmVDAC (SI-BmVDAC). Las garrapatas (N=9) fueron incubadas para la ovoposición después de la alimentación, el peso de los huevos fue determinada para cada garrapata expresada como Ave + ET (mg de los huevos/garrapata) y comparada entre el grupo con el suero preinmune y los otros grupos por la prueba t de Student ($P < 0.05$).

10.11. Cuantificación de quinetos en la hemolinfa de garrapatas por microscopia óptica

La infección causada por *B. bigemina* dentro de la garrapata fue determinada mediante una prueba de hemolinfa. A cada individuo se le tomo una muestra de hemolinfa que fue colocada en un portaobjetos, posteriormente fue teñido con el colorante Giemsa y observado al microscopio óptico. En la figura 31 observamos la hemolinfa de 4 garrapatas representativas de cada uno de los grupos experimentales; además del grupo control que proviene de garrapatas alimentadas en un bovino infectado (GC), no se encontraron quinetos en ninguno de los grupos experimentales pero si en el grupo GC.

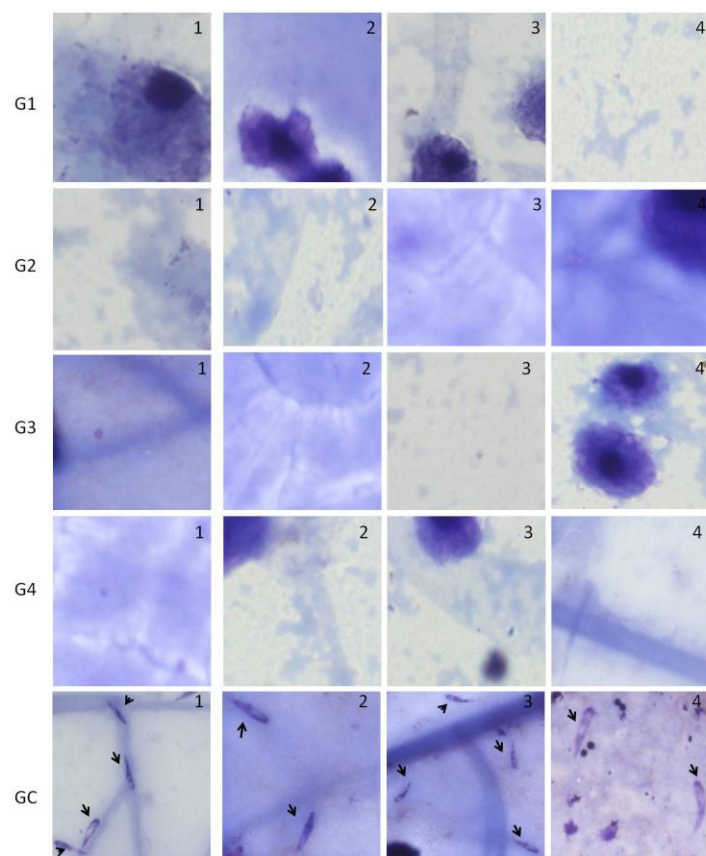


Figura 31. Prueba de hemolinfa para la detección de quinetos de *B. bigemina*. En las fotografías observamos imágenes representativas de la prueba en los cuatro grupos experimentales (G1-G4) y un grupo control que corresponde a garrapatas alimentadas en el bovino infectado con *B. bigemina* (GC). Las flechas indican los quinetos encontrados en la hemolinfa.

11. Discusión de los resultados

En el presente estudio se identificó y caracterizó la expresión de la proteína BmVDAC de *R. microplus* durante la infección con *Babesia bigemina*. La secuencia parcial del gen *Bmvdac* fue reportado en la base de datos y se determinaron los cambios en la expresión del gen y la proteína en garrapatas infectadas con respecto a las no infectadas. Particularmente, el análisis de expresión del gen *Bmvdac* reveló que existen cambios en el nivel de expresión transcripcional a diferentes tiempos post-repleción, siendo a las 12 y 24 horas los cambios más evidentes a esos tiempos se observa un aumento estadísticamente significativo del transcrito del gen *Bmvdac* en garrapatas infectadas con respecto a las no infectadas. Es importante destacar que en la literatura se reporta que las fases móviles del parásito, es decir, los oocinetos, penetran a las células basófilas del intestino medio alrededor de las 24 horas post-repleción (Bock y cols., 2004). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión transcripcional del gen *Bmvdac* podría darse en respuesta a la invasión por el parásito.

La inmunodetección de la proteína BmVDAC en el intestino de las garrapatas se realizó mediante ensayos de Western blot de extractos proteicos totales. En los ensayos se observó una banda en el peso esperado de 31 kDa. En garrapatas infectadas se observó a las 24 horas post-repleción un aumento estadísticamente significativo de la proteína con respecto a garrapatas no infectadas, a los demás tiempo post-repleción no se observan cambios significativos en el nivel de expresión de la proteína. Al usar los anticuerpos anti- α -

tubulina se detecta una banda de aproximadamente 55 kDa que correspondería a la proteína α -tubulina; en contraste con los resultados usando el suero pre-inmune donde no se observan bandas. Estos datos corroboran con los resultados del análisis de expresión del transcrito, con lo que se pudo evidenciar que la sobreexpresión de *Bmvdac* al menos a las 24 horas post-repleción también se refleja a nivel celular, ya que la proteína se encuentra sobreexpresada, lo que hace pensar que tiene una participación muy activa en el evento de infección.

La proteína BmVDAC también fue inmunodetectada en células de intestino, mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Las células intestinales de garrapatas infectadas y no infectadas fueron obtenidas a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-repleción, los resultados de este ensayo demostraron que existe una importante expresión diferencial y redistribución de BmVDAC entre células infectadas y no infectadas. De manera particular, en células de garrapata infectadas con *B. bigemina* la proteína fue localizada en puntos aglomerados en la membrana celular, sugiriendo que puede encontrarse contenida en algún tipo de vesículas, lo cual necesita ser demostrado con experimentos adicionales.

Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron con células en suspensión debido a que se trabajó con cultivos primarios; dichas muestras fueron muy heterogéneas; ya que el intestino de la garrapata está constituido por al menos cinco tipos celulares, lo que limitó el análisis debido a que no todas ellas se infectan y dentro de las infectadas no todas tienen el mismo grado de infección. Otra limitante en los experimentos de este trabajo fue la cantidad de muestra

obtenida; sobre todo en el ensayo de inmunofluorescencia; ya que estas células se trabajaron en suspensión, por lo que son muy pocas las que logramos observar en el microscopio (debido a que se perdían en el proceso de lavado y manipulación). Por lo tanto, las imágenes presentadas se muestran como una amplificación representativa de las células que observamos.

La proteína VDAC inicialmente fue identificada en la membrana mitocondrial y posteriormente se reportó también en la membrana plasmática de diversos tipos celulares (Bathori., 2000), por lo que la distribución que se observó de la proteína BmVDAC en las células de garrapata no es extraña, sugiriendo que esta proteína podría formar agregados tanto en la membrana plasmática como en la mitocondrial como una respuesta a la infección con *B. bigemina*. Recientemente, se reportó que la proteína VDAC une al activador de plasminógeno tisular y promueve la activación de plasminógeno en la superficie celular (Gonzalez-Gronow y cols., 2013). A este respecto, se ha señalado que diversos parásitos interaccionan con el sistema fibrinolítico, especialmente con el plasminógeno, como parte de una compleja relación entre el patógeno y el hospedero (Figuera y cols., 2013). Adicionalmente, se sabe que el plasminógeno es requerido para la diseminación eficiente de la bacteria *Borrelia burgdorferi* en garrapatas, la cual es causante de la enfermedad de Lyme en humanos (Coleman y cols., 1997) y también es necesario para la invasión de los oquinetos de *Plasmodium* sp. hacia las células intestinales del mosquito (Ghosh y cols., 2011). Los agregados de proteína BmVDAC encontrados en la membrana de células intestinales de garrapata a las 24 horas post-repleción podrían resultar del tráfico

de proteínas a la membrana externa, donde posiblemente tienen una función importante en la activación del plasminógeno en respuesta a la invasión por oocinetos de *B. bigemina*. Por lo que, es importante realizar los ensayos funcionales con la proteína BmVDAC, con lo cual podría definirse la importancia de esta porina BmVDAC en la infección y transmisión de *B. bigemina* de manera concreta.

Un claro ejemplo del estudio de la asociación vector-patógeno son los parásitos del género *Plasmodium* sp. que presentan un mecanismo similar de infección a los parásitos del género *Babesia* sp. *Plasmodium* al igual que *Babesia* pertenece al filo Apicomplexa, por lo que comparten características muy similares en varios aspectos; como morfología, organelos, tropismo celular y patogénesis (Schetters y Eling., 1999; Fasila y cols., 2004; Mosqueda y cols., 2004b; Lobo., 2005). Entonces, los avances en la investigación sobre la relación vector-patógeno nos abre una vía para explicar mecanismos fundamentales en esta interacción. La investigación hecha en este sentido permitió la identificación y caracterización de la proteína BmVDAC (Rodríguez-Hernández y cols., 2012; Rodríguez-Hernández y cols., 2015). El canal VDAC es una proteína que se encuentra en la membrana externa mitocondrial y permite el paso de moléculas pequeñas al espacio intermembranal de la mitocondria, además de participar en interacciones complejas regulando el metabolismo y la apoptosis (Young y cols., 2007; Roman y cols., 2006), por lo que esta proteína resulta muy importante para el funcionamiento óptimo de las células. Por otro lado, se ha reportado que ciertos patógenos intracelulares pueden activar o inhibir la apoptosis celular del

hospedero a nivel de mitocondria, a través de la interacción de alguna de sus proteínas con proteínas de la membrana externa mitocondrial entre las que se encuentran VDAC (Boya y cols., 2001), que regula la permeabilidad de ésta; dándole relevancia a los resultados encontrados en este trabajo donde se observa que la proteína VDAC modifica su nivel de expresión en respuesta a la infección con *B. bigemina*, aunque falta demostrar la función específica en la que participa.

Rachisky y colaboradores en el 2007 fueron los primeros en estudiar a nivel proteómico los cambios que sufría el intestino de la garrapata *R. microplus* al ser infectado con *B. bovis*. Mediante electroforesis 2D y espectrometría de masas, analizaron las diferencias en la expresión de proteínas en el intestino de garrapatas infectadas y no infectadas. En el estudio identificaron varias proteínas que cambian su expresión bajo estas condiciones, seis de ellas participan en la transducción de señales (proteínas de unión a calcio), cinco son enzimas metabólicas y algunas otras son componentes del citoesqueleto; los autores sugieren que alguna de estas pueden ser consideradas como proteínas candidatos para el diseño de vacunas contra los vectores (Rachisky y cols., 2007), a pesar de este primer esfuerzo que se realizó para identificar moléculas del intestino involucradas en el mecanismos de invasión de *B. bigemina*, no se logró identificar ningún candidato vacunal prometedor e incluso la proteína BmVDAC no se encuentra dentro de las proteínas que identificaron en ese estudio.

La mitocondria tiene un papel importante en el control de la apoptosis, el incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial permite la liberación

de moléculas que activan la apoptosis como el citocromo c. Como ya se mencionó, los patógenos pueden incrementar o reducir la permeabilidad de la membrana, lo que se traduce a un potencial regulatorio de la apoptosis (Kroemer., 2000). La actividad de VDAC está directamente modulada por proteínas de la familia Bcl-2 (Shimizu y cols., 1999; Priault y cols., 1999). Las proteínas Bax/Bak (las cuales pertenecen a la familia Bcl-2) inducen la liberación del citocromo c de la mitocondria de levaduras nativas, pero no de la mitocondria de levaduras carentes de VDAC-1, esto se realizó usando células y aislados mitocondriales (Priault y cols., 1999; Shimizu y cols., 1999; Shimizu y cols., 2000). Con este antecedente se propuso un modelo donde se involucra a la proteína VDAC con la liberación de citocromo c causando la apoptosis de la célula, además, se ha visto que la micro-inyección de anticuerpos anti-VDAC en estas células impide la liberación del citocromo c inducido por Bax y en consecuencia se inhibe la apoptosis (Shimizu y cols., 1999). La invasión de las células intestinales de *R. microplus* por parte de *B. bigemina* podría modificar el ambiente intracelular a través de la proteína BmVDAC para reducir la permeabilidad de la membrana mitocondrial y de esta manera evitar la activación de la apoptosis en la célula infectada, lo que le permitiría al parásito multiplicarse dentro de la célula y eventualmente salir para infectar otras células. Esta podría ser una hipótesis viable para explicar muchos mecanismos en la interacción *R. microplus*-*B. bigemina*, sin embargo, es necesario realizar ensayos funcionales para confirmarlo.

También se ha demostrado una participación importante de la proteína VDAC en la infección con *Toxoplasma gondii*, el cual es un parásito intracelular

que pertenece al mismo filo Apicomplexa que *Babesia spp.* En la célula hospedera *T. gondii* forma una vacuola parasitófora desde donde sintetiza a la proteína ROP 2 que interacciona con la mitocondria del hospedero (Nelson y cols., 2008) y también se ha reportado que la proteína VDAC se sobreexpresa en respuesta a la infección con el parásito (Boya y cols, 2001, Nelson y cols, 2008). Sin duda la proteína BmVDAC juega un papel importante en la infección con patógenos intracelulares y resulta indispensable determinar la función específica que tiene en el proceso de invasión por patógenos del género *Babesia sp.* y si su función puede verse modificada por moléculas secretadas por este protozoario.

Los resultados demuestran que el uso de la alimentación de garrapatas por capilares tiene algunas limitaciones al querer caracterizar antígenos candidatos contra garrapatas, sin embargo, este es un método probado que permite realizar estudios experimentales lo más cercano posible a la experiencia in vivo. En este trabajo no se pudo determinar si la alimentación con sangre infectada suplementada con anticuerpos BmVDAC tienen un efecto en el peso y la ovoposición de la garrapata y la transmisión de *B. bigemina*; lo cual posiblemente estuvo asociado a diferentes factores como son: la variación en el nivel de infección entre garrapatas, el nivel de parasitemia en sangre que fue usada para la alimentación capilar, el efecto no específico del suero preinmune y diferencias en la infección del patógeno entre garrapatas alimentadas in vitro e in vivo. Para determinar a ciencia cierta los efectos de la alimentación con el anticuerpo BmVDAC en los parámetros analizados en este estudio se deberán repetir los ensayos tratando de optimizar los factores antes mencionados y comparar con

garrapatas alimentadas en un bovino infectado, para determinar con certeza si existen interacción anticuerpo-patógeno y sus efectos reales en el peso y ovoposición de las garrapatas como una primera aproximación a determinar su función.

La relevancia funcional de la proteína BmVDAC en la patogénesis de *B. bigemina* dentro del intestino de *R. microplus*, aún está en investigación y es necesario aportar conocimiento sobre el mecanismo de invasión de este parásito a órganos de la garrapata, como se ha evidenciado en otros patógenos.

12. Conclusiones

1. En este trabajo obtuvimos la secuencia parcial del gen *Bmvdac* de *R. microplus* y fue reportada en la base de datos de genes del NCBI (No. de acceso GU994210), la cual tiene una identidad del 87% con la secuencia VDAC de *I. scapularis*.

2. El nivel de expresión del gen *Bmvdac* se modifica en respuesta a la infección con *B. bigemina*. Los resultados demuestran un aumento (estadísticamente significativo, $p < 0.0001$) en el nivel de expresión del gen *Bmvdac* a las 12 y 24 horas post-repleción en garrapatas infectadas en contraste con garrapatas no infectadas.

3. El nivel de expresión de la proteína BmVDAC se modifica en respuesta a la infección con *B. bigemina*. Los resultados demuestran un aumento estadísticamente significativo en el nivel de expresión de la proteína en garrapatas infectadas a las 24 horas post-repleción en contraste con garrapatas no infectadas lo que correlaciona con el incremento observado en el transcrito *Bmvdac*.

4. Tras la infección con *B. bigemina* al parecer la proteína BmVDAC se localizó aparentemente en la membrana plasmática de células de intestino de la garrapata, en forma de agregados, aglomerados o parches en zonas definidas de la membrana posiblemente como parte de un mecanismo organizado de invasión por parte del parásito.

5. Los resultados en conjunto sugieren que existen cambios significativos en el nivel de expresión transcripcional del gen *Bmvdac* y la proteína BmVDAC en células infectadas. Sin embargo, es necesario realizar ensayos adicionales para demostrar y determinar a ciencia cierta la función de la proteína BmVDAC en la infección con protozoarios del género *Babesia* sp.

13. Perspectivas

1. Es importante realizar ensayos de bloqueo de la proteína BmVDAC a través de la alimentación artificial de las garrapatas con anticuerpos específicos anti-BmVDAC, para determinar la participación de esa proteína en el proceso de infección de *Babesia* sp. al intestino del vector.

2. Analizar la transmisión de *Babesia* en garrapatas alimentadas artificialmente con anticuerpos anti-BmVDAC a través de ensayos de RT-PCR en tiempo real.
3. Realizar ensayos de interferencia del RNA (RNAi), para abatir la expresión de la proteína BmVDAC en el intestino. Este sería un ensayo determinante para describir la verdadera participación de la proteína en este proceso. Esta investigación permitiría un avance importante en el descubrimiento de candidatos vacunales anti-transmisión de *Babesia*.
4. Determinar si la proteína BmVDAC se moviliza a la membrana plasmática e identificar si existen isoformas del gen *Bmvdac* y de ser así investigar si estas se expresan a las 12 y 24 horas post-repleción.

14. Bibliografía

1. Aguirre J, Sobrino L, Santamaria M, Aburto S, Roman E, Hernandez M, Ortiz M, Ortiz Y.A. (1986). Resistencia de garrapatas en México. En: Seminario Internacional de Parasitología Animal, Memorias (ed. Cavazzani, A.H, Garcia Z.), 282–306. Cuernavaca, Morelos, México.
2. Allred D.R. (2003). Babesiosis: persistence in the face of adversity. Trends in parasitology 19:51-55.
3. Anderson R.G. Kamen B.A, Rothberg K.G, Lacey S.W. (1992). Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. Science 255:410–411.

4. Baffi M.A, de Souza G.R, de Sousa C.S, Ceron C.R, Bonetti A.M. (2008). Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). Mol. Biochem. Parasitol 160(1):70-73.
5. 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. Parasitoses Vectors 3:1-11.
6. Bathori G, Parolini I, Szabo I, Tombola F, Messina A, Oliva M, Sargiacomo M, De P, Zaratti M. (2000). Extramitochondrial porins: Facts and Hypotheses. J. Bioenerg. Biomembr 32:79-89.
7. Bayrhuber M, Meins T, Habeck M, Becker S, Giller Karin, Villinger S, Vonrhein C, Griesinger C, Zweckstetter M, Zeth K. (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. PNAS 105(40):15370–15375.
8. Beltran L.G. (1975). National anti-Tick Campaign. Ectoparasites seminar, CIAT.
9. Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. Trends Biochem Sci 26:112-117.
10. Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W. (2004). Babesiosis of cattle. Parasitol 129:s247-s269.
11. Boya P, Roques B, Kroemer G. (2001). Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. The EMBO Journal 20(16):4325-4331.

12. Brayton K.A, Lau A.O, Herndon D.R, Hannick L, Kappmeyer L.S, Berens S.J, Bidwell S.L, Brown W.C, Crabtree J, Fadrosch D. (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. PLoS pathogens 3:1401-1413.
13. Brian Cox, Andrew Emili. (2006). Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. Nature protocols 1(4):1872-1878.
14. Buettner R, Papoutsoglou G, Scemes E, Spray, D.C, Dermietzer R. (2000). Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform. Proc. Natl. Acad. Sci 97:3201-3206.
15. Burgdorfer W. (1970). Hemolymph test: a technique for detection of rickettsiae in ticks. Am. J. Trop. Med. Hyg 19:1010–1014.
16. Carlson A.E, Koteswara R.V, ShiDu Y.S. (2013). From a Cell's Viewpoint: Targeting Mitochondria in Alzheimer's disease. Drug Discov Today Ther Strateg 10(2): e91–e98.
17. Chen A, Seifert H.S. (2013). Structure-Function Studies of the *Neisseria gonorrhoeae* Major Outer Membrane Porin. Infect Immun 81(12):4383–4391.
18. Coleman J.L, Gebbia J.A, Piesman J, Degen J.L, Bugge T.H, Benach J.L. (1997). Plasminogen Is Required for Efficient Dissemination of *B. burgdorferi* in Ticks and for Enhancement of Spirochetemia in Mice. Cell. 89:1111-1119.

19. Cunha R.C, Pérez de León A.A, Leite F.P, Pinto S, Dos Santos Júnior A.G, Andreotti R. (2012). Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology 21(3):254-62.
20. De la Fuente J, Almazán C, Blouin E.F, Naranjo V, Kocan K.M. (2005). RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens Parasitol Res. 96(3):137-41.
21. De la Fuente J, Almazan C, Canales M, Perez de la Lastra J.M, Kocan K.M, Willadsen P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Animal Health Research Reviews 8-(1): 23-28.
22. De la Fuente J, Blouin E.F, Manzano-Roman R, Naranjo V, Almazán C, Pérez de la Lastra J.M, Zivkovic Z, Jongejan F, Kocan K.M. (2007). Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. Genomics 90(6):712-22.
23. De Vries E, Corton C, Harris B, Cornelissen A.W, Berriman M. (2006). Expressed sequence tag (EST) analysis of the erythrocytic stages of *Babesia bovis*. Veterinary parasitology 138:61-74.
24. Dinglasan R.R, Alaganan A, Ghosh A.K, Saito A, van Kuppevelt T.H, Jacobs-Lorena M. (2007a). *Plasmodium falciparum* ookinetes require mosquito midgut chondroitin sulfate proteoglycans for cell invasion. Proc Natl Acad Sci U S A 104(40):15882-7.
25. Dinglasan R.R, Kalume D.E, Kanzok S.M, Ghosh A.K, Muratova O, Pandey A, Jacobs-Lorena M. (2007b). Disruption of *Plasmodium falciparum*

- development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(33):13461-6.
26. Douce R, Neuburger M. (1999). Biochemical dissection of photorespiration. *Curr Opin Plant Biol* 2:214–222.
 27. Dowling S.C, Perryman L.E, Jasmer D.P. (1996). A *Babesia bovis* 225-kilodalton spherical-body protein: localization to the cytoplasmic face of infected erythrocytes after merozoite invasion. *Infection and immunity* 64: 2618-2626.
 28. Fasila R. Gaffar A.P. Yatsuda F.F, Franssen J, de Vries E. (2004). Erythrocyte Invasion by *Babesia bovis* Merozoites Is Inhibited by Polyclonal Antisera Directed against Peptides Derived from a Homologue of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1. *Infect Immun* 72(5):2947–2955.
 29. Fernandez-Echevarria C, Díaz M, Ferrer I, Canerina-Amaro A, Marin R. (2014). A β promotes VDAC1 channel dephosphorylation in neuronal lipid rafts. Relevance to the mechanisms of neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 278:354–366.
 30. Fogaça A.C, Lorenzini D.M, Kaku L.M, Esteves E, Bulet P, Daffre S. (2004). Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev Comp Immunol*. Mar 28(3):191-200.
 31. Garriss G.I. (1991). Control of ticks. *Vet. Clinic North Am* 21(1):173–183.

32. Ghosh A.K, Coppens I, Gårdsvoll H, Ploug M, Jacobs-Lorena M. (2011). Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. Proc Natl Acad Sci U S A 108:17153-17158.
33. Gonsioroski A.V, Bezerra I.A, Utiumi K.U, Driemeier D, Farias S.E, Vaz I.D.S, Masuda A. (2012). Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females, Experimental Parasitology 130(4):359-363.
34. Gonzalez-Gronow M, Ray R, Wang F, Pizzo S.V. (2013). The Voltage-dependent Anion Channel (VDAC) Binds Tissue-type Plasminogen Activator and Promotes Activation of Plasminogen on the Cell Surface. J Biol Chem. 288:498-509.
35. Gottlieb E, Tomlinson I.P. (2005). Mitochondrial tumor suppressors: a genetic and biochemical update. Nature reviews cancer 5: 857-866.
36. Guerrero F, Andreotti R, Perez de Leon A, Moolhuijzen P, Rodriguez-Valle M, Bellgard M. (2011). Genome based selection of anti-cattle tick vaccine candidate antigens. Ticks and tick-borne pathogens, International Conference: Zaragoza, Spain pp: 9-11.
37. Guerrero FD, Miller R.J, Rousseau M.E, Sunkara S, Quackenbush J, Lee Y, Nene V. (2005). BmiGl: a database of cDNAs expressed in *Boophilus microplus*, the tropical/southern cattle tick. Insect Biochem Mol Biol 35(6):585-95.
38. Hacker C, Howell M, Bhella D, Lucocq J. (2014). Strategies for Maximizing ATP Supply in the Microsporidian *E. cuniculi*: Direct Binding of Mitochondria

- to the Parasitophorous Vacuole and Clustering of the Mitochondrial Porin VDAC. *Cellular Microbiology* 16(4):565–579.
39. Hanahan D, Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
 40. He H, Chen A.C, Davey R.B, Ivie G.W, George J.E. (1999). Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem. Biophys. Res. Comm* 261(3): 558-561.
 41. Heekin M.A, Guerrero D.F, Bendele G.K, Saldivar L, Scoles A.G, Dowd E.S, Gondro C, Nene V, Djikeng A, Brayton A.K. (2013). The ovarian transcriptome of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, feeding up on a bovine host infected with *Babesia bovis*. *Parasit Vectors* 6:276.
 42. Hines S.A, Palmer G.H, Jasmer D.P, McGuire T.C, McElwain T.F. (1992). Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. *Molecular and biochemical parasitology* 55:85-94.
 43. Hinsch K.D, De Pinto V, Aires V.A, Schneider X, Messina A, Hinsch E. (2004). Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *J Biol Chem* 279:15281-15288.
 44. Horak I.G, Camicas J.L, Keirans J.E. (2002). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol* 28:27-54.
 45. Jakobs C, Gotz H, Hellmann T, Hellmann K, Reymann S, Florke H, Thinnies, F, Hilschmann N. (1995). Studies on human porin: XIII. The type-1 VDAC

- “porin 31HL” biotinylated at the plasmalemma of trypan blue excluding human B lymphocytes. FEBS Lett. 368:5-9.
46. Jonsson N.N, Matschoss A.L, Pepper P, Green P.E, Albrecht M.S, Hungerford J, Ansell J. (2000). Evaluation of tick-GARD (PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. Veterinary Parasitology 88:275-285.
 47. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev 87:99–163.
 48. Levine N.D, Corliss J.O, Cox F.E, Deroux G, Grain J, Honigberg B.M, Leedale G.F, Loeblich A.R, Lom J, Lynn D, Merinfeld E.G, Page F.C, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool 27:37–58.
 49. Levine N.D. (1971). Taxonomy of the piroplasms. Trans. Amer. Mic. Soc 90:2-33.
 50. Levine N.D. (1988). The protozoan phylum Apicomplexa. CRC Press, Boca Raton, Fla. 2.
 51. Li A.Y, Davey R.B, Miller R.J. (2010). Laboratory evaluation of Verbutin as a synergist of acaricides against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Economic Entomology 103(4):1360-1364.
 52. Lisanti M.P, Scherer P.E, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu Y.H, Cook R.F, Sargiacomo M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. J. Cell Biol 126:11-126.

53. Lobo C.A. (2005). *Babesia divergens* and *Plasmodium falciparum* use common receptors, glycophorins A and B, to invade the human red blood cell. *Infect Immun* 73(1):649-51.
54. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
55. Macaluso K.R, Mulenga A, Simser J.A, Azad A.F. (2003). Differential expression of genes in uninfected and rickettsia-infected *DeBmacentor variabilis* ticks as assessed by differential-display PCR. *Infect Immun* 71(11):6165-70.
56. Mahoney D.F, Wright I.G, Mirre G.B. (1973). Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Ann Trop Med Parasitol* 67(2):197-20.
57. Malia T.J, Wagner G. (2007). NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry* 46:514–525.
58. Martel C, Wang Z, Brenner C. (2014). VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate. *Mitochondrion* 19:69–77.
59. McCosker P.J. (1981). The global importance of babesiosis. En: Ristic M, Kreier J.P (eds). *Babesiosis*. Academic, Press, New York,. pp.1-24.
60. McEnery M.W, Snowman A.M, Trifiletti R.R, Snyder S.H. (1992). Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-

dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. Proc Natl Acad Sci U S A 89:3170-3174.

61. Miller R.J, Li A.Y, Tijerina M, Davey R.B, George J.E. (2008). Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* Acari: Ixodidae) collected in Mexico. J. Med. Entomol 45(5):905-911.
62. Mitchell P, Moyle J. (1965). Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. Nature 208:1205–1206.
63. Mosqueda J, Falcón A, Antonio Álvarez J, Alberto Ramos J, Oropeza-Hernández L.F, Figueroa J.V. (2004). *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. Int J Parasitol 34(11):1229-36.
64. Mosqueda J.J, Ramos J.A, Falcón A, Figueroa J.V, Álvarez J.A. (2004). Babesiosis bovina. Folleto Técnico No. 1, CENID-PAVET, INIFAP.
65. Nelson M, Jones A, Carmen J, Sanai A, Burchmore R, Wastling J. (2008). Modulation of the Host Cell Proteome by the Intracellular Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. Infection and Immunity 76(2):828-844.
66. Nene V, Lee D, Kang'a S, Skilton R, Shah T, de Villiers E, Mwaura S, Taylor D, Quackenbush J, Bishop R. (2004). Genes transcribed in the salivary glands of female *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva*. Insect Biochem Mol Biol 34(10):1117-28.
67. Nijhof A.M, Balk J.A, Postigo M, Jongejan F. (2009). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus* (*Boophilus*)

- microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. BMC Molecular Biology 10:112.
68. Nuñez J, Muñoz M, Moltedo H. (1987). *Boophilus microplus*, la garrapata común del ganado bovino. Hemisferio sur. Buenos Aires. Argentina. p.184.
 69. Ortiz E.M, Santamaria E.M, Fragoso S.H. (1994). Resistencia en garrapatas *Boophilus microplus*, a los ixodicidas en México. In XIV Pan American Congress on Veterinary Sciences, Proceedings (ed. Perez Trujillo, J.M., Gonzales Padilla, E.). 473–474. Acapulco, Guerrero, México.
 70. Pal U, Li X, Wang T, Montgomery R.R, Ramamoorthi N, Desilva A.M, Bao F, Yang X, Pypaert M, Pradhan D, Kantor F.S, Telford S, Anderson J.F, Fikrig E. (2004). TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for *Borrelia burgdorferi*. Cell 119(4):457-68.
 71. Papagianni M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. Biotechnol. Adv 21:465–499.
 72. Parola P, Raoult D. (2001). Molecular tools in the epidemiology of tick-borne bacterial diseases. Ann Biol Clin (Paris) 59(2):177-82.
 73. Pastorino J.G, Hoek J.B y Shulga N. (2005) Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. Cancer Res 65:10545-10554.

74. Peter R.J, Van den Bossche P, Penzhorn B.L, Sharp B. (2005). Tick, fly, and mosquito control--lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasitol* 132(3-4):205-15.
75. Priault M, Chaudhuri B, Clow A, Camougrand N, Manon S. (1999). Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondria membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur. J. Biochem* 260:684-691.
76. Puchelle E, Jacquot J, Fuchey C, Burlet H, Klossek J.M, Gilain I, Triglia J.M, Thinnes F.P, Hilschmann N. (1993). Studies on human porin. IX. Immunolocalization of porin and CFTR channels in human surface respiratory epithelium. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 374:297-304.
77. Rachinsky A, Guerrero F.D, Scoles G.A. (2007). Differential protein expression in ovaries of uninfected and *Babesia*-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 37(12):1291-308.
78. Rachinsky A, Guerrero F.D, Scoles G.A. (2008). Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 152(3-4):294-313.
79. Rahmani Z, Maunoury C, Siddiqui A. (1998). Isolation of a novel human voltage-dependent anion channel gene. *Eur J Hum Genet* 6:337-340.
80. Rajput Z.I, Hu S.H, Chen W.J, Arijo A.G, Xiao C.W. (2006). Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *J Zhejiang Univ Sci B* 7:912-21.

81. Redondo M, Fragoso H, Montero C, Lona J, Medellín J.A, Fria R, Hernandez V, Franco R, Machado H, Rodriguez M, de la Fuente J. (2004). Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Experimental and Applied Acarology* 23: 841-849.
82. Riek R.F. (1964). The life cycle of *Babesia bigemina* (SMITH & KILBORNE., 1983) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Austr. J. Agric. Res* 5:802-821.
83. Riek, R.F. (1968). Babesiosis. In *Infectious blood disease of man and animals*. Vol. 2. Eds D. Weinman and M. Ristic. New York, Academic Press. p. 219–268.
84. Rodríguez-Hernández E, Mosqueda J, Álvarez-Sánchez M.E, Falcón N.A, 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. *Vet. Parasitol* 187(3-4):538-41.
85. Rodríguez-Hernández E, Mosqueda J, León-Ávila G, Castañeda-Ortiz E.J, Álvarez-Sánchez M.E, Camacho A.D, Ramos A, Camacho-Nuez M. (2015). *BmVDAC* upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol* doi: 10.1016/j.vetpar.2015.06.016.
- 86.
87. Rodríguez-Vivas R.I, Ojeda-Chi M.M, Pérez-Cogollo L.C, Rosado-Aguilar J.A. (2011). Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

- en México. Capítulo 33. En: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Editores: Quiroz RH, Figueroa CJA, López AME. AMPAVE. pp: 477-504.
88. Rodríguez-Vivas R.I, Alonso-Díaz M.A, Rodríguez-Arévalo F, Santamaría V.M, Rosario-Cruz R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol* 136(3-4):335-42.
 89. Roman I, Figys J, Zizi M. (2006). Hunting interactomes of a membrane protein: obtaining the largest set of VDAC-interacting protein epitopes. *Molecular and Cellular Proteomics* 5(9):1667-1680.
 90. Rosario-Cruz R, Almazan C, Miller R.J, Dominguez-Garcia D.I, Hernandez-Ortiz R, de la Fuente J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience* 14: 2657-2665.
 91. Roucou X, Prescott M, Devenish R.J, Nagley P. (2000). A cytochrome c-GFP fusión is not released from mitochondria into the cytoplasm upon expression of Bax in yeast cells. *FEBS Lett* 471:235-239.
 92. Roush R.T. (1993). Ocurrance, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol. Today* 9:174-179.
 93. Rudenko N, Golovchenko M, Edwards M.J, Grubhoffer L. (2005). Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *J Med Entomol* 42(1):36-41.
 94. Rudzinska M.A, Lewengrub S, Spielman A, Piesman J. (1983). Invasion of *Babesia microti* into epithelial cells of the tick gut. *J Protozool* 30(2):338-46.

95. Sampson M.J, Lovell R.S, Craigen W.J. (2007). The Murine Voltage-dependent Anion Channel Gene Family. J. Biol. Chem 272(30):18966–18973.
96. Reuter S, Gupta S.C, Park B, Goel A, Aggarwal B.B. (2011). Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. Genes Nutr 6(2):93-108.
97. Sampson M.J, Lovell R.S, and Craigen W.J. (1996). Isolation, characterization, and mapping of two mouse mitochondrial voltage-dependent anion channel isoforms. Genomics 33:283-288.
98. Sampson M.J, Lovell R.S, and Craigen W.J. (1997). The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. J Biol Chem 272:18966-18973.
99. Schetters T.P, Eling W.M. (1999). Can *Babesia* infections be used as a model for cerebral malaria? Parasitol Today 15(12):492-497.
100. Schwarzer C, Becker S, Awni I.A, Cole T, Merker R, Barnikol-Watanabe, S, Thinnes F. and Hilschmann N. (2000). Human voltage-dependent anion-selective channel expressed in the plasmalemma of *Xenopus laevis* oocytes. Int. J. Biochem. Cell Biol 32:1075-1084.
101. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y. (1998). Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. Proc Natl Acad Sci USA 95:1455-1459.

102. Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y. (2000). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and VDAC, which is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem* 275:12321-12325.
103. Shimizu S, Matsuoka Y, shinohara Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y. (2001). Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cell. *J. Cell. Biol* 152(2):237-250.
104. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 34. (1999). family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483-487.
105. Shimizu S, Shinohara Y, Tsujimoto Y. (2000). Bax and Bcl-xl independently to regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19(38):4309-4318.
106. Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D, Admoni L, Krelin Y, Sharan T.S. (2014). The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. *Biochim Biophys Acta* doi: 10.1016/j.bbamem.2014.10.040.
107. Shoshan-Barmatz V, Hadad N, Feng W, Shafir I, Orr I, Varsanyi M, Heilmeyer L.M. (1996). VDAC/porin is present in sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *FEBS Lett* 386:205-210.
108. Solomon, K.R. (1983). Acaricide resistance in ticks. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med* 27: 273-296.
109. Sonenshine D.E. (1991). *Biology of Ticks*, volumes 1 & 2. Oxford University Press, New York, United States of America.

110. Sorgato M.C, Morgan O. (1993) Channels in mitochondrial membranes: Knowns, unknowns, and prospects for the future. *Cri. T REV. Biochem. Mol. Biol* 28:127-171.
111. Temeyer K.B, Pruett J.H, Chen A.C. (2007). R86Q a mutation in BmAChE3 yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate-insensitive acetylcholinesterase. *J. Med. Entomol* 44(6):1013-1018.
112. Tewari D, Ahmed T, Chirasani R, Venkat S.K, Pradeep M.K, Samir S.S, Bera K A. (2015). Modulation of the mitochondrial voltage dependent anion channel (VDAC) by curcumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848:151–158.
113. Thinnes F.P. (2014). Opening up of plasmalemma type-1 VDAC to form apoptotic “find me signal” pathways is essential in early apoptosis — Evidence from the pathogenesis of cystic fibrosis resulting from failure of apoptotic cell clearance followed by sterile inflammation. *Molecular Genetics and Metabolism* 111(4):439–444.
114. Thinnes F.P, Gotz H, Kayser H, Benz R, Schmidt W.E, Kratzin H.D, Hilschmann N. (1989). Identification of human porins. I. Purification of a porin from human B-lymphocytes (porin 31HL) and the topochemical proof of its expression on the plasmalemma of the progenitor cell. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370:1253-1264.
115. Tsujimoto Y, Shimizu S. (2007). Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12:835–840
116. Ullmann A.J, Lima C.M, Guerrero F.D, Piesman J, Black I.V. (2005). Genome size and organization in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis*

- and the Souther cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Mol. Biol 14:217-222.
117. Urch J.E, Hurtado G.R, Brosson D, Liu Z, Eijsink V.G.H, Texier C, et al. (2009). Structural and functional characterization of a putative polysaccharide deacetylase of the human parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Protein Science 18:1197-1209
 118. Van Doorn W.G, Wolthering E.J (2005) Many way to exit? Cell death categories in plants. Trends Plant Sci 10:117–122.
 119. Wikel S.K, Ramachandra R.N, Bergman D.R. (1992). Immunological strategies for expression of vector arthropods: Novel approaches in vector control. Bull. Soc. Vector Ecol 17:10-19.
 120. Willadsen P. (1997). Novel vaccines for ectoparasites. Veterinary Parasitology 71(2-3): 209-222.
 121. Wright I.G. (1973). Observations on the hematology of experimentally induced *Babesia argentina* and *B. bigemina* infections in splenectomised calves. Res Vet Sci 14(1):29-34.
 122. Young M, Bay D, Hausner G, Court D. (2007). The evolutionary history of mitochondrial porins. BMC Evol. Biol 7(31):1-21.
 123. Zeth K, Kozjak-Pavlovic V, Faulstich M, Fraunholz M, Hurwitz R, Kepp O, Rudel T. (2013). Structure and function of the PorB porin from disseminating *Neisseria gonorrhoeae*. Biochem J 454(2):359.
 124. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) Cell 15(87):619-628.

125. Zieler H, Dvorak J.A. (2000). Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21):11516-11521.



Short communication

The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of *Babesia bigemina* sexual stages with *Rhipicephalus microplus* midgut cells

Elba Rodríguez-Hernández^a, Juan Mosqueda^b, María Elizabeth Alvarez-Sánchez^a, Alfonso Falcón Neri^c, Guillermo Mendoza-Hernández^d, Minerva Camacho-Nuez^{a,*}

^a Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo Núm. 290, esquina Roberto Gayol, Colonia del Valle Sur, delegación Benito Juárez, México D.F., C.P. 03100, Mexico

^b Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Juriquilla, C.P. 76230, Mexico

^c Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Carretera Federal Cuernavaca–Cauatla 8534, Colonia Progreso, Jiutepec, Morelos, C.P. 62550, Mexico

^d Facultad de Medicina, UNAM Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, C.P. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2011

Received in revised form 20 January 2012

Accepted 22 January 2012

Keywords:

Rhipicephalus microplus

VDAC

Babesia bigemina

Midgut cells

Apoptosis

ABSTRACT

We investigated the interaction of *Rhipicephalus microplus* midgut cells with *Babesia bigemina* sexual stages using a proteomic approach. A polypeptide from the *R. microplus* midgut that binds to proteins from *B. bigemina* sexual stages was identified and sequenced. Combining 2D overlay and tandem mass spectrometry (MS/MS) techniques, we determined that this polypeptide corresponds to a mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). The *vdac* gene encoding the sequenced polypeptide was identified and sequenced. This is the first report of a VDAC-like protein in *R. microplus*, and a possible role for this protein in the *B. bigemina* infection process is suggested.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus, the cattle tick, is an ectoparasitic arthropod that is found worldwide and is a vector for bovine babesiosis and anaplasmosis (Murrell et al., 2001). In México, both *R. microplus* and *Babesia* spp. are endemic, and they have been responsible for severe economic losses in milk and beef production (Howell et al., 2007). The transmission of babesiosis to a new bovine host depends on the successful infection of the tick midgut epithelium through the sexual stages of the parasite (Howell et al., 2007). However, the molecular mechanisms

of the interaction between the *Babesia* parasite and tick gut cells have not yet been fully elucidated.

The aim of this study was to analyze the molecular interactions between the tick and this pathogen using *R. microplus* midgut cells and *B. bigemina* sexual stages as a model. We used a proteomic approach to identify tick midgut polypeptides that could be involved in the *B. bigemina* infection process.

A *Babesia*-free colony of *R. microplus* (Media Joya strain) was obtained from the laboratory of the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) in Jiutepec, Morelos, México. *R. microplus* larvae isolated from 0.5 g of eggs were placed on a calf, and semi-engorged female ticks were collected 20 days later. Tick midguts and ovaries were dissected to establish a primary cell culture, as described previously

* Corresponding author. Tel.: +52 5511070280x15305; fax: +52 5555575 5805.

E-mail address: mcamachonuez@yahoo.com.mx (M. Camacho-Nuez).

(Mosqueda et al., 2008). The cultures were examined after three days using an inverted microscope (IROSCOPE SI-PH, México).

Sexual stages of *B. bigemina* were obtained as previously described (Mosqueda et al., 2004). Briefly, a splenectomized calf was inoculated with the Chiapas strain of *B. bigemina*, and blood was obtained nine days later. Smears were made and stained with Giemsa (Hycel, Mexico) to corroborate sexual stage induction. *B. bigemina* at the sexual stage were labeled with biotin using the EZ-Link NHS-Chromogenic Biotinylation kit (Thermo Scientific, IL, USA) following the manufacturer's instructions.

For the 1D overlay assay, aliquots of total protein from each of the tick cell extracts were separated by electrophoresis on 12% SDS-acrylamide gels, blotted on a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, CA, USA), incubated with biotinylated sexual *B. bigemina* (1:100 dilution) overnight at 4 °C and developed using the ECL PLUS Blotting Detection System (Bio-Rad, CA, USA). Four protein bands with molecular weights ranging from 24 to 60 kDa were detected (Fig. 1A).

To identify the midgut polypeptides identified in the 1D overlay, a 2D overlay was carried out. A 50 µg aliquot of protein, corresponding to approximately 10^6 *B. microplus* midgut cells, was diluted in 120 µl of rehydration buffer and applied to 7 cm IPG strips (linear pH gradient 3–10; Bio-Rad) by in-gel rehydration. The second dimension resolution was performed on a 12% polyacrylamide gel; the separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and probed with biotinylated SS (diluted 1:100), as described above. One gel was stained with G-250 Coomassie Blue (Bio-Rad, CA, USA), and the other gel was subjected to nitrocellulose membrane transfer, as described above.

The overlay conditions of were the same as those were described for the 1D overlay above. Two protein spots that showed a marked positive reaction (spots 1 and 2, Fig. 1B) were located and carefully excised from the G-250 Coomassie Blue 2D gels, destained, washed and then digested with modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI). Peptide mass spectrometric analysis was carried out with a 3200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada).

Two peptides with a good coverage in the *Ixodes scapularis* database were identified (Table 1). The gene encoding one putative peptide identified in 2D overlay was isolated using PCR. Primers based on the reverse-translated amino acid sequence were synthesized: Bmvdacf 5' ATGGCTCTCCGTGCTACGC 3' and Bmvdacr 5' CTTGTGTCCTCCCTGGTTGAA 3'. DNA was extracted from midgut cells using the Puregene kit (Gentra Systems, MN, USA) following the manufacturer's protocol. The resulting amplicons were cloned into the TOPO TA vector (Invitrogen, CA, USA) and sequenced. Finally, the consensus sequence was obtained and deposited in GenBank (accession number GU994210). The *vdac* gene sequence was compared with the TC19533 sequence of the *R. microplus* gene index (BmGI) (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/tc_report), and its sequence was found to be identical to the recently reported partial sequence. Alignments were performed with ClustalW. We obtained

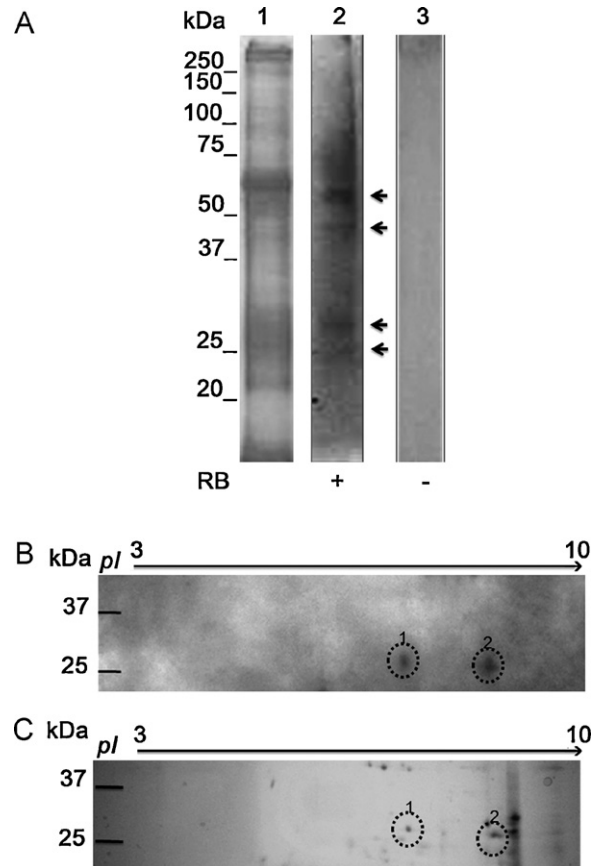


Fig. 1. Proteins from engorged adult ticks. (Panel A) Midgut proteins from ticks (Lane 1). Overlay of midgut proteins with *B. bigemina* ray bodies (Lane 2). Overlay of midgut proteins without ray bodies (Lane 3). Molecular mass standards are indicated in kDa. Interaction of tick midgut cells with sexual stages (SS) of *B. bigemina*. (Panel B) A representative example of a two-dimensional overlay showing the interaction between tick midgut cells and biotinylated sexual *B. bigemina*. (Panel C) Two-dimensional electrophoretic pattern of tick midgut proteins. A second 2D electrophoresis gel was run under the same conditions used in panel A and was stained with Coomassie Blue G250. Spots 1 and 2 identified in (A) were excised from (B), digested and subjected to LC MS/MS2D for identification; the results are presented in Table 1. Molecular masses in kDa are indicated on the left.

the complete gene sequence of *vdac* from *R. microplus* (Fig. 2).

This study used proteomic and molecular biology techniques to demonstrate that some *R. microplus* midgut proteins could interact with sexual *B. bigemina*. This is the first report of a *bmvvac* gene or *BmVDAC*-like protein in *R. microplus*. Whether this tick protein is directly involved in the invasion of *Babesia* parasites into the tick midgut must be demonstrated using additional methodologies in future studies.

There have been no reports of molecules within the tick gut that could be involved in the invasion of *B. bigemina* parasites. Rachinsky et al. (2008) performed a proteomic study to find tick midgut proteins that are differentially expressed in response to infection with *B. bovis*, which was conducted in an attempt to identify proteins that participate in pathogen transmission. Among the proteins they found to be up-regulated in

Table 1

Identified proteins of tick midgut.

Protein	Accession no.	Spot #	MASCOT score	Ion score	Peptide sequences	% coverage ^a
Electron transfer flavoprotein, beta subunit, putative	gi241680571	1	50	20	VIDYAVK	28%
				61	TGVVT DGVKHSNLPF DEIAVEEA VR	
				26	TALAM GADKAHVEV ECK	
				57	IEIVSVEDPP TR	
				49	VES VDellAK	
Voltage-dependent anion-selective channel, putative	gi241061134	2	242	42	APPCYADLG K	33%
				24	DLFNKN	
				42	YHFGVVK	
				56	TTTKTGVFENVSGTSLNDTGKVNASLETK	
				15	S GALK	
				72	VNNSG QVGLGFTHRLRPGISLTLSLST MLDGKNFNQ GKH	

The sequences were obtained from an *Ixodes scapularis* database (Mascot) to which significant peptide sequence similarity was found.

^a % coverage of the respective sequence provided by the identified peptide.

infected ticks, five were metabolic enzymes related to electron and proton transport that may participate in endocytosis/phagocytosis during blood meal uptake. Those five proteins included two mitochondrial proteins, NADH

dehydrogenase (ubiquinone) chain 11 and mitochondrial H(+)-ATP synthase subunit B.

We identified a different mitochondrial protein in the present report, and the voltage-dependent anion channel

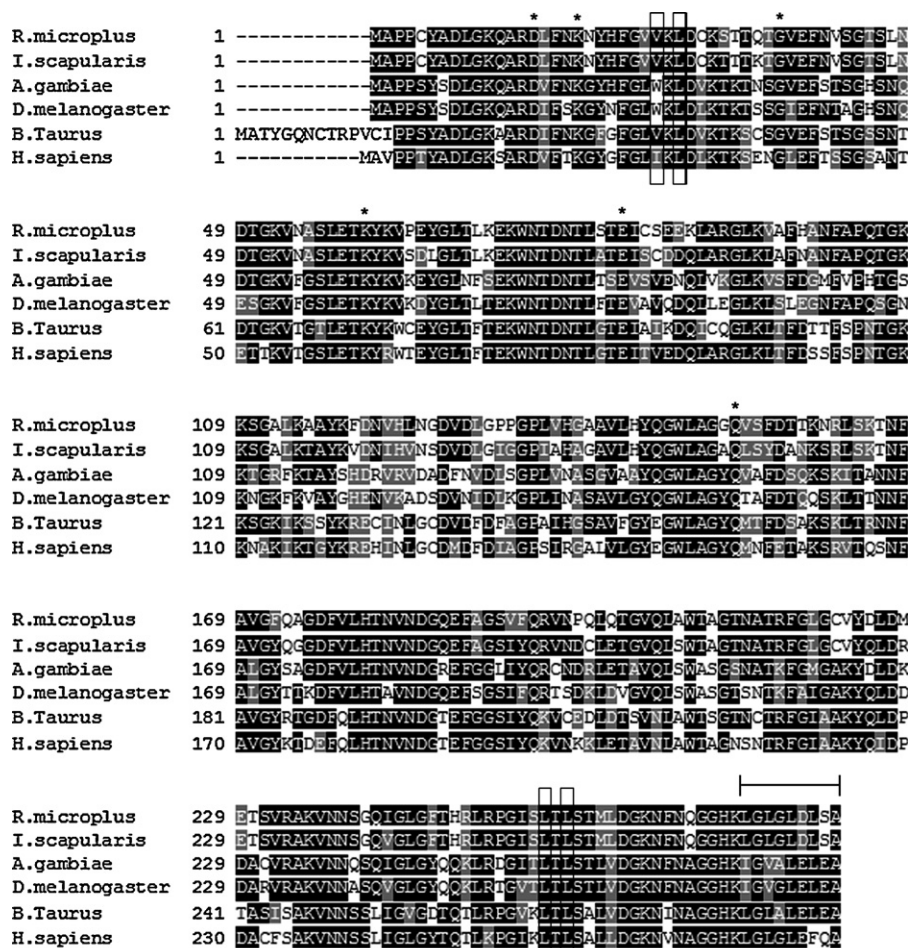


Fig. 2. Sequence alignment comparing the amino acid sequences of VDAC proteins in several species. The sequence alignment was performed in Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Residues within the putative dimerization interface are marked with dashes. Residues that are putative determinants of voltage gating are marked with asterisks. The last 9 amino acid residues at the C-terminus (aligned) of *R. microplus* VDAC were obtained from the TC19533 sequence of the Bmi1 Gene Index dataset version 2.1 (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/tc_report.pl?tc=TC19533&species=B.microplus).

(VDAC) protein, which is similar to several sequences from *I. scapularis*. *R. microplus*, has a large genome (7100 Mb) that has not yet been sequenced; therefore, to obtain the nucleotide sequence of the BmVDAC gene, we amplified and sequenced the gene directly.

VDAC, also known as a mitochondrial porin, is a 30–32 kDa channel-forming protein that localizes to the mitochondrial membrane in all eukaryotes (Colombini et al., 1996) and is a central component of the apoptotic machinery (Shimizu et al., 1999). Several studies have shown that apoptosis induction is accompanied by the up-regulation of VDAC (Ghosh et al., 2007), suggesting that an increase in VDAC levels might promote an increase in the permeability of the outer mitochondrial membrane. It is thought that this could occur through a shift in the VDAC equilibrium to an oligomeric form of the protein that forms large pores and thus permits the release of pro-apoptotic proteins (Shoshan-Barmatz et al., 2010). Furthermore, many viruses encode proteins that act on VDAC to control apoptosis in infected cells (Boya et al., 2003), such as Influenza A and Hepatitis B (Boya et al., 2004). Porins also interact with proteins from intracellular parasites, and the molecules released by these parasites are able to activate or inhibit apoptosis by regulating the permeability of the outer mitochondrial membrane (Boya et al., 2001).

The modulation of apoptosis has emerged as an important issue in the pathogenic process of many intracellular protozoan parasites (Carmen and Sinai, 2007). Whether VDAC function is important during *B. bigemina* invasion, propagation or replication must be determined in the near future.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CONACYT (78921) and ICyT-DF (ICyTDF/321/2009), Mexico. E.R.H. was supported by a scholarship from CONACYT (215464), Mexico. We are grateful to Dr. Raquel Cossío-Bayugar and

Dr. Itzel Quintas Granados for technical assistance, to M.C. Laura Vazquez for technical support and to M.C. Alberto Ramos for providing the ticks.

References

- Boya, P., Pauleau, A.-L., Poncet, D., Gonzalez-Polo, R.-A., Zamzami, N., Kroemer, G., 2004. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *BBA-Bioenergetics* 1659, 178–189.
- Boya, P., Roques, B., Kroemer, G., 2001. Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J.* 20, 4325–4331.
- Boya, P., Roumier, T., Andreau, K., Gonzalez-Polo, R.-A., Zamzami, N., Castedo, M., Kroemer, G., 2003. Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 575–581.
- Carmen, J.C., Sinai, A.P., 2007. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol. Microbiol.* 64, 904–916.
- Colombini, M., Blachly-Dyson, E., Forte, M., 1996. VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels* 4, 169–202.
- Ghosh, T., Pandey, N., Maitra, A., Brahmachari, S.K., Pillai, B., 2007. A role for voltage-dependent anion channel VDAC1 in polyglutamine-mediated neuronal cell death. *PLoS ONE* 2, e1170.
- Howell, J.M., Ueti, M.W., Palmer, G.H., Scoles, G.A., Knowles, D.P., 2007. Transovarial transmission efficiency of *Babesia bovis* tick stages acquired by *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* during acute infection. *J. Clin. Microbiol.* 45, 426–431.
- Mosqueda, J., Cossío-Bayugar, R., Rodríguez, E., Falcón, A., Ramos, A., Figueroa, J.V., Alvarez, A., 2008. Primary midgut, salivary gland, and ovary cultures from *Boophilus microplus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149, 49–52.
- Mosqueda, J., Falcon, A., Antonio Alvarez, J., Alberto Ramos, J., Oropeza-Hernandez, L.F., Figueroa, J.V., 2004. *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *Int. J. Parasitol.* 34, 1229–1236.
- Murrell, A., Campbell, N.J.H., Barker, S.C., 2001. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21, 244–258.
- Rachinsky, A., Guerrero, F.D., Scoles, G.A., 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 152, 294–313.
- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., Tsujimoto, Y., 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487.
- 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. *Mol. Aspects Med.* 31, 227–285.



BmVDAC upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*



Elba Rodríguez-Hernández^a, Juan Mosqueda^b, Gloria León-Ávila^c,
Elizabeth J. Castañeda-Ortiz^a, María Elizabeth Álvarez-Sánchez^a, Alejandro D. Camacho^c,
Alberto Ramos^d, Minerva Camacho-Nuez^{a,*}

^a Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo Núm. 290, esquina Roberto Gayol, colonia del Valle Sur, delegación Benito Juárez, México D.F. C.P. 03100, Mexico

^b Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Av de las Ciencias s/n, Juriquilla Querétaro, C.P. 76230, Mexico

^c Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas, Delegación Miguel Hidalgo, México D.F. C.P. 11340, Mexico

^d Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Carretera Federal Cuernavaca–Cuautla Núm. 8534, Colonia Progreso, Jiutepec, Morelos C.P. 62550, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2014

Received in revised form 12 June 2015

Accepted 15 June 2015

Keywords:

Rhipicephalus microplus

VDAC

Babesia bigemina

Midgut cells

ABSTRACT

The molecular mechanisms involved during the infection of *Rhipicephalus microplus* midgut cells by *Babesia bigemina* are of great relevance and currently unknown. In a previous study, we found a voltage-dependent anion channel (VDAC)-like protein (BmVDAC) that may participate during parasite invasion of midgut cells. In this work, we investigated BmVDAC expression at both mRNA and protein levels and examined BmVDAC localization in midgut cells of ticks infected with *B. bigemina* at different times post-repletion. Based on the RT-PCR results, *Bmvdac* expression levels were significantly higher in infected ticks compared to uninfected ones, reaching their highest values at 24 h post-repletion ($p < 0.0001$). Similar results were obtained at the protein level ($p < 0.0001$). Interestingly, BmVDAC immunolocalization showed that there was an important differential expression and redistribution of BmVDAC protein between the midgut cells of infected and uninfected ticks, which was more evident 24 h post-repletion of infected ticks. This is the first report of BmVDAC upregulation and immunolocalization in *R. microplus* midgut cells during *B. bigemina* infection. Further studies regarding the function of BmVDAC during the infection may provide new insights into the molecular mechanisms between *B. bigemina* and its tick vector and could result in its use as an anti-tick and transmission-blocking vaccine candidate.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rhipicephalus microplus is a vector for the protozoan agents of cattle fever, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* (Peter et al., 2005; Estrada-Peña et al., 2006). Because cattle fever is endemic in Mexico and other countries of the temperate world, this threat has triggered the search for new, environmentally safe and effective strategies for the control of *R. microplus*. Anti-tick vaccines are a potential alternative to chemical control methods, but currently only a small number of tick-protective antigens have been identified (Willadsen et al., 1989; de la Fuente and Kocan, 2006).

Babesia protozoan sexually reproduce in their host vector, giving rise to ray bodies and to zygotes, which penetrate the midgut barrier and are thus adapted to transmit themselves successfully (Bock et al., 2004). Studies on the molecular events that exist in the inter-phase vector-pathogen are important to implement strategies to block the transmission of the disease (de la Fuente and Kocan, 2003). Nevertheless, protein interactions between the midgut cells of *Rhipicephalus* ticks and sexual stages of *Babesia* have not been widely explored. Our group, by means of a proteomics strategy, previously identified a mitochondrial protein in the midgut of the *R. microplus* tick that interacts with *B. bigemina* sexual stages and which has a high similarity to the mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel (BmVDAC) (Rodríguez-Hernández et al., 2012).

The mitochondrion has an important role in the control of apoptosis, through the permeability of its membrane, which allows the release of molecules that activate apoptosis, such as the

* Corresponding author at: Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo Núm. 290, esquina Roberto Gayol, colonia del Valle Sur, delegación Benito Juárez, México D.F. C.P. 03100, Mexico.
E-mail address: mcamachonuez@yahoo.com.mx (M. Camacho-Nuez).

cytochrome c. Pathogens can induce or inhibit the permeability of the mitochondrial membrane, which is understood as a potential regulator of the apoptotic process (Kroemer et al., 2007). The voltage-dependent anion channel (VDAC) is a protein that is found in the external mitochondrial membrane and allows the flux of small molecules into the mitochondrial intermembrane space; it also participates in the complex interactions regulating the metabolism and the apoptosis of cells (Roman et al., 2006; Young et al., 2007). The VDAC porins were initially identified in the external membrane of mitochondria; they are channels with a molecular weight of 30–35 kDa (Sorgato and Moran, 1993), and have been found in plants, fungi, bacteria, protozoa and human, in which they are involved in apoptotic processes. The VDAC channel is an integral protein of the membrane, and it consists of a polypeptide having unfolded alternating hydrophobic and hydrophilic amino acids, forming from 13 to 19 transmembrane β chains composed of a single α -helix at the amino terminus. This conformation provides a means to separate an apolar environment from a polar one, forming a barrel that is inserted into the membrane forming the pore (Bayrhuber et al., 2008). Humans, as well as rats and mice, have three different types of *vdac* genes that codify different isoforms expressed in different tissues (Sampson et al., 1997). The role of the VDAC-1 isoform has been studied and its participation in the permeability transition pore (PTP) has been demonstrated (Shimizu et al., 1999; Bernardi et al., 2001). The activity of VDAC is directly modulated by proteins of the Bcl-2 family (Shimizu et al., 1999; Priault et al., 1999). The Bax/Bak proteins (members of the family Bcl-2) have been discovered to induce the release of cytochrome c in native yeast cells, but not in the mitochondria of yeast cells lacking VDAC-1 (Shimizu et al., 1999; Priault et al., 1999; Shimizu et al., 2000). The presence of porins on extra mitochondrial membranes was initially reported by Thinnes et al. (1989) and, since then, the research and study of the possible existence of porins in domains, organelles and membranes of different cellular types has intensified in order to explain the function of this protein in those compartments.

Currently, it is known that certain intracellular pathogens can activate or inhibit the apoptosis of the host cell at the mitochondrial level through the interaction of any of its proteins with the proteins of the external mitochondrial membrane in which the VDAC, which regulates the permeability of the mitochondrial membrane, is found (Boya et al., 2001).

This study is focused on determining the expression and localization of the BmVDAC protein in the midgut cells of the tick *R. microplus* during the process of invasion by *B. bigemina*.

2. Materials and methods

2.1. Ticks

A *Babesia*-free colony of *R. microplus* (Media Joya strain) was maintained under laboratory conditions at the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) in Morelos, México. *R. microplus* larvae hatched from 0.5 g of eggs were placed on a calf and 21 days later replete female ticks were collected. In order to obtain infected ticks, concurrently, *R. microplus* larvae from 0.5 g of eggs were placed on a splenectomized calf. Fourteen days later, the calf was inoculated intravenously with 5 ml of blood infected with *B. bigemina* (Chiapas strain) previously maintained in liquid nitrogen and 21 days later replete female ticks were collected. Replete female ticks fed on infected or uninfected blood were collected and dissected to obtain their midguts at 0, 12, 24, and 72 h post-repletion. To confirm infection, hemolymph smears were examined from 30 females 72 h post-repletion (Burgdorfer, 1970). For confocal microscopy assays, tick midguts were dissected to establish a primary cell culture as

described previously (Mosqueda et al., 2008). The cultures were examined after three days using an inverted microscope (IROSCOPE SI-PH, MX).

The protocol for handling and bleeding the cattle and tick collection was approved by the “Comité de Bioética” de la Facultad de Ciencias Naturales, México.

2.2. Transcription analysis by RT-PCR

Total RNA was isolated from uninfected and infected midgut ticks at 0, 12, 24, and 72 h post-repletion using TRIzol (Invitrogen, USA). Then, 2 μ g of total RNA were reverse transcribed and used for amplification with SuperScript One Step with Platinum Taq (Invitrogen, USA) and gene specific primers. RT-PCR conditions were 55 °C for 30 min, 95 °C for 2 min; 30 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and a final extension of 72 °C for 7 min. The primer sequences were: for the *Bmvdac* gene, primer forward 5'-CGC GGA TCC CCG TGC GCA GAC TTG-3' and primer reverse 5'-CCC CCA AGC TTG CTA CGC AAC CCA GGC CGA ATC-3'; for the esterase gene used as control: ESTr forward 5'-CCA TCT ACC ACG ACG CAT TC-3', ESTr reverse 5'-GGG CAG GAG ATC TGG CTT C-3'. The “housekeeping” esterase gene was selected from a reference study because it did not vary in the presence of any of the tested conditions (Cossío-Bayúgar et al., 2009).

2.3. Tissue dissection and protein extraction

To obtain midguts from infected or uninfected ticks, replete females were held in place for dissection with wax in Petri dishes and dissected under Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen, USA). The ventral cuticle was excised with a scalpel, the midguts were removed, rinsed in sterile HBSS and groups of ten ticks per tube were either placed in TRIzol reagent for RNA isolation or held on ice to obtain cells. Proteins were isolated using TNTE (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton and 1 mM EDTA). Protein isolation was performed in duplicates using midgut tissue from a total of 60 control ticks and 60 infected ticks from all post-repletion times. Then, 0.2 ml of pooled midgut tissue was mixed with 0.5 ml of TNTE containing 0.04 ml (25 $\times$) protease inhibitor cocktail complete (Roche, DE). Midgut tissue was homogenized on ice, incubated for 15 min at room temperature and centrifuged at 5000 $\times$ g for 5 min at 4 °C. Proteins obtained from the interphase were re-suspended in 5 $\times$ sample buffer.

2.4. Expression and purification of recombinant BmVDAC

A 675 base pair internal region of the *Bmvdac* gene (GenBank no. **GU994210**) was PCR-amplified from *R. microplus* genomic DNA using Forward (5'-CGCGGATCCCCGTGCTACGCACTTG-3') and reverse (5'-CCCCCAAGCTTGCTACGCAACCCAGGCCGAATC-3') primers. *Bam*HI and *Hind*III restriction sites are in bold. Amplification conditions were: 95 °C for 5 min; 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and a final extension of 72 °C for 7 min. The amplified PCR fragments were cloned into pCold I expression vector (Takara, Japan) using *Bam*HI and *Hind*III sites. The constructions were verified by sequencing using a 3130 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystem). Recombinant BmVDAC protein was expressed as His6x-fusion polypeptide in *Escherichia coli* strain BL21 using 1 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 24 h at 15 °C. Cells were disrupted by sonication and insoluble BmVDAC protein was purified under denaturalized conditions with HisTrap HP affinity columns (GE Healthcare, SE) in an AKTA prime Plus FPLC System (GE Healthcare, SE). Recombinant protein concentration was determined by Bradford protein assay (Bradford, 1976) and sample purity was assayed by 12% SDS-PAGE.

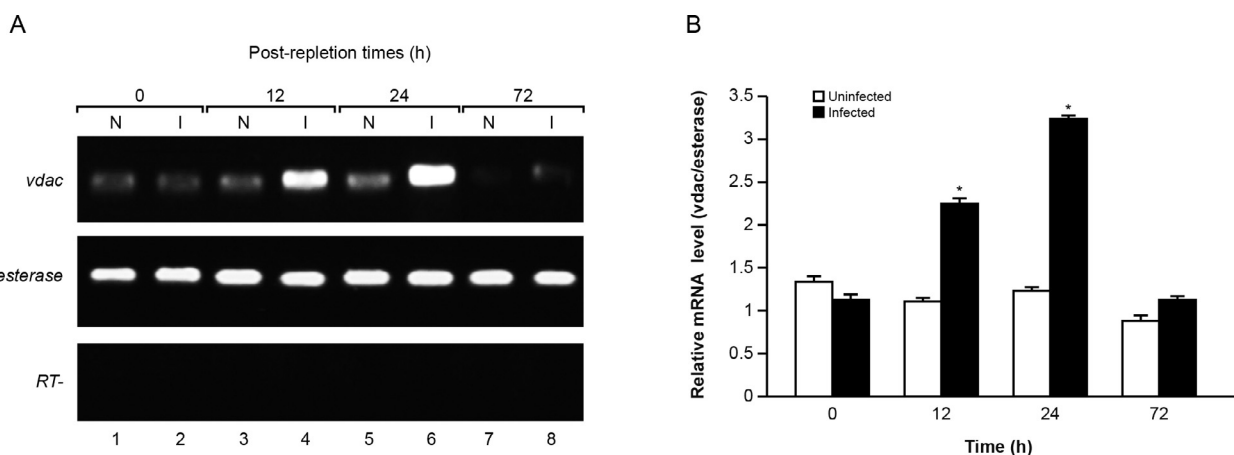


Fig. 1. Expression of *Bmvdac* gene in infected and uninfected *R. microplus* midguts. Two groups of ticks were fed on infected and uninfected bovines, respectively, until repletion. Midguts of each group of ticks were dissected at 0, 12, 24 and 72 h post repletion. Semiquantitative RT-PCR analysis was performed to detect the expression of *Bmvdac* gene at transcriptional level. (A) The upper panel shows specific *Bmvdac* RT-PCR amplicon in infected (I) and uninfected (N) ticks at 0, 12, 24 and 72 h post-repletion, the middle panel shows the reference sterase gene amplification in the same conditions as above, and the lower one corresponds to RT(–) controls. (B) Semiquantitative analysis of RT-PCR assays. Transcripts of *Bmvdac* gene were quantified in relation to the esterase gene. Mean values $\pm$ SEM of three quantifications are represented. The asterisks indicate the values significantly different from the control ($p < 0.0001$).

2.5. Production of polyclonal antibodies

An initial dose of 50 μ g of recombinant protein (rBmVDAC) in Montanide ISA 71VG adjuvant (Seppic) was injected subcutaneously into two New Zealand rabbits. Three more doses of 50 μ g each, were injected using the same method at 21-day intervals. Two weeks after the last immunization the rabbits were bled and the antiserum was collected. The specificity of the serum was assayed by Western blot using the recombinant polypeptide and total midgut extract of ticks separated on 12% SDS-PAGE (19 μ g per lane) and electro transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with the immune serum (1:1000) in 1% non-fat dried milk, 0.05% Tween-20 in PBS pH 7.4 for 1 h. The protein was developed using peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:3000, Invitrogen, USA) and detected using ECL-Plus Blotting Detection System (Bio-Rad, USA). Pre immune serum was tested as well.

2.6. Expression analysis by Western blotting (WB)

Extracts of midgut cell protein (19 μ g) of 0, 12, 24, and 72 h post-repletion of uninfected and infected ticks were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels. A prestained protein standard (Bio-Rad, USA) was used to allow molecular mass estimation of separated proteins. Proteins were subsequently electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, USA). Non-specific binding was blocked by incubating the membranes for 1 h at room temperature in 5% non-fat dried milk in PBS containing 0.05% Tween-20% (PBS-T). The membranes were then washed and incubated overnight at 4 °C with rabbit antiserum anti rBmVDAC protein diluted 1:1000 in PBS-T containing 1% non-fat dried milk or rabbit anti α -tubulin antibodies (Santa Cruz, Biotechnology, USA) diluted 1:500. Membranes were washed again and subsequently incubated with 1:3000 dilution of a peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen, USA) for 1 h at room temperature. After further washing with PBS-T, proteins of interest were detected by chemiluminescence by using ECL-Plus Blotting Detection System (Bio-Rad, USA). Preimmune serum was used as a negative control diluted 1:1000.

2.7. Confocal microscopy analysis of infected and uninfected midgut ticks

Tick midguts were dissected in PBS and cells were obtained as described previously (Mosqueda et al., 2008). One hun-

dred microliters of a cell suspension (10^4 cell/ml) were adhered to poly-L-lysine coated slides, using Cytospin, fixed with 3.6% paraformaldehyde in PBS and permeabilized adding 100–200 μ l of acetone per slide at -20 °C for 5 min, then washed with PBS and blocked with 1% BSA in PBS pH 7.4 before antibody incubations. Primary antibodies to rBmVDAC were incubated with the fixed midgut cells for 1 h at room temperature at a 1:300 dilution in blocking buffer. Preimmune rabbit serum was used as a control. The slides were incubated with anti-mouse immunoglobulin conjugated with fluorescein isothiocyanate (Jackson Immuno Research, USA) at a 1:90 dilution for 1 h at room temperature, washed, mounted with Vectashield-DAPI mounting solution as a counterstain and to differentiate nuclei (VectoLab, USA) for 5 min at room temperature, and observed with a laser confocal microscope (Leica, DMLS).

2.8. Statistical analysis

All data for semiquantitative RT-PCR and WB were expressed as the means $\pm$ SEM from three replicas in each case. The significance of the difference between means was determined by ANOVA one-way followed by comparison of the means using Ryan–Einod–Gabriel–Welsch (EGWQ) test, with $\alpha = 0.05$, using SAS v.9 software.

3. Results

In order to test the infection of ticks by *B. bigemina*, we analyzed the presence of kinetes of *B. bigemina* in hemolymph of 30 female ticks collected during the third and fourth days post-repletion. The presence of kinetes was observed only in the hemolymph of those ticks that fed on cattle infected with *Babesia*, in contrast to the hemolymph of uninfected ticks, in which we did not find any kinetes.

3.1. Upregulation of *Bmvdac* gene expression in midgut of *R. microplus* in response to *B. bigemina* infection.

To identify potential changes in *Bmvdac* mRNA level during *B. bigemina* infection, we performed RT-PCR assays using RNA of *R. microplus* midguts at four post-repletion times: 0, 12, 24 and 72 h. The esterase gene of *R. microplus* was used as an endogenous control. The level of *Bmvdac* mRNA increased significantly ($p < 0.0001$), doubling and then tripling in the midguts of infected ticks at 12

and 24 h post-repletion, respectively (Fig. 1A, lanes 4 and 6, Fig. 1B) compared with uninfected ticks at the same post-repletion times (Fig. 1A, lanes 3 and 5). The highest level of *Bmvdac* mRNA was observed in infected ticks at 24 h post-repletion. There were not evident changes in mRNA expression between infected and uninfected ticks at 0 h and 72 h post-repletion (Fig. 1A, lanes 1, 2, 7, 8). Infection with *B. bigemina* did not alter the expression of esterase, which was used as a loading control, at any post-repletion time (Fig. 1A, middle panel).

3.2. Infection with *B. bigemina* affects the BmVDAC expression in midgut of *R. microplus* at 12 and 24 post-repletion

To test the expression of BmVDAC protein in midgut of infected and uninfected ticks, we performed a Western blot at the same post-repletion times as described above.

To obtain specific antibodies against rBmVDAC protein of *R. microplus*, we cloned and expressed a recombinant fragment of the protein and a rabbit was immunized. In Fig. 2A, we show the specificity of the anti-rBmVDAC antiserum. The recombinant protein was expressed, purified and tested with an anti-Histidine tagged antibody (Fig. 2A, upper panel, lanes 1–3, respectively). The specificity of the antibody was tested against a total extract of midgut proteins (Fig. 2A, upper panel, lane 5). The antibodies recognized a protein with an apparent molecular weight of 31 kDa in midgut extracts, the same molecular weight reported for BmVDAC (Rodríguez-Hernández et al., 2012).

When the intestinal extracts, at 0, 12, 24, and 72 h post-repletion, were incubated with antibodies anti-rBmVDAC, a band in the expected weight of 31 kDa is observed in both infected and uninfected tick tissue (Fig. 2B). We detected a significant increase ($p < 0.0001$) in the protein level in infected midgut extracts at 12 and 24 h post-repletion (Fig. 2B, upper panel, lanes 4 and 6, Fig. 2C), compared with uninfected ticks at the same post-repletion times (Fig. 2B, upper panel, lanes 3 and 5). In infected ticks the protein level did not show any evident changes at 0 h and 72 h post-repletion (Fig. 2B, upper panel, lanes 2 and 8). We did not find any expression of the BmVDAC protein at 0 h in midgut of uninfected ticks (Fig. 2B, upper panel, lane 1). Infection with *B. bigemina* did not alter the expression of α -tubulin, which was used as a loading control at any post-repletion time (Fig. 2B, middle panel, lanes 1–8 middle panel). No proteins were detected when the preimmune serum was used as negative control (Fig. 2B, lower panel).

3.3. Midgut cells of *R. microplus* infected with *B. bigemina* show a different pattern of BmVDAC distribution compared with uninfected tick cells

To identify if the changes of the expression of the *Bmvdac* gene at mRNA and protein levels could have any potential effect in the subcellular distribution of the protein during the infection, we analyzed the immunolocalization of BmVDAC by confocal microscopy of the intestinal cells of both infected and uninfected ticks at 0, 12, 24, and 72 h post-repletion. The immunofluorescence analysis of permeabilized cells revealed that the expression of BmVDAC in cells obtained from uninfected ticks was scattered throughout the cytoplasm without any difference among different times and the staining was very faint (Fig. 3A–D). In contrast, the fluorescence was brighter in cells from infected ticks at 24 and 72 h post-repletion (Fig. 3K and L). The protein BmVDAC was visualized as homogeneous dots clustered in infected cells starting at 24 h and were more evident at 72 h post-repletion (Fig. 3K and L).

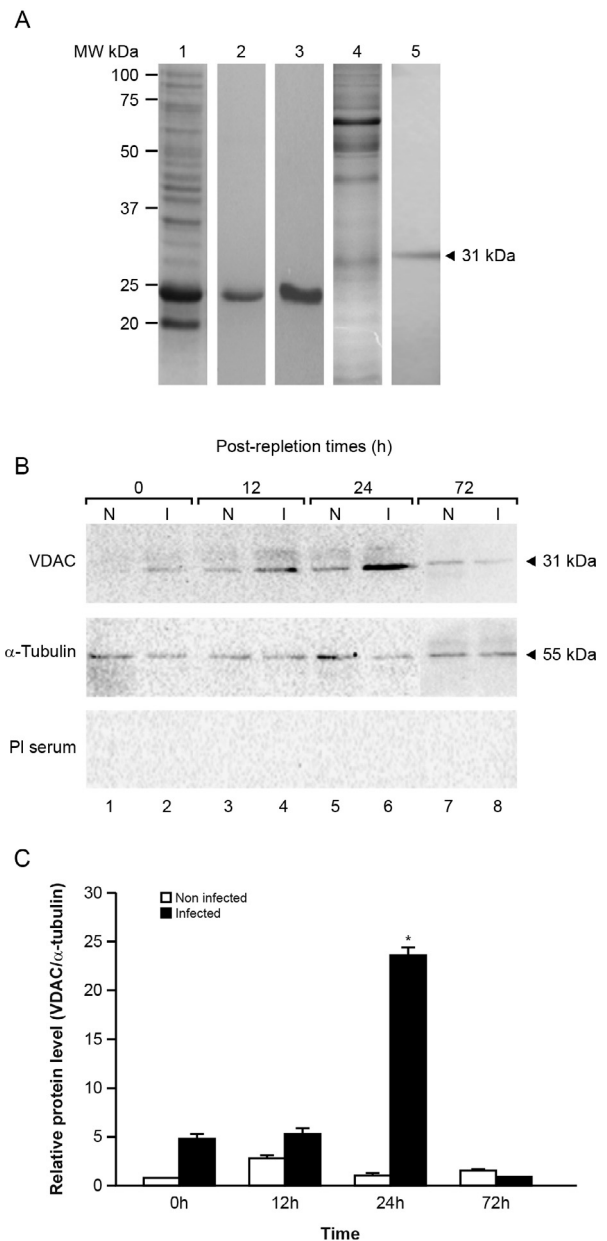


Fig. 2. BmVDAC expression at different post-repletion times in midguts of infected and uninfected ticks. (A) A recombinant BmVDAC protein was obtained and specific serum against it was tested. Line 1. rBmVDAC was expressed in pCold vector, total protein extracts of IPTG induced culture. Line 2. rBmVDAC was purified by affinity chromatography on HiTrap column. Line 3. The rBmVDAC protein was verified by Western blot using an anti-histidine tagged antibody (1:3000). Line 4. 12% SDS-polyacrylamide gel of total extract of midgut cells. Lane 5. The anti-rBmVDAC antibody (1:1000) was tested with native protein of midgut total protein extract. The molecular weight standards are shown on the left side. (B) Western blot of midgut total protein extract of infected (I) and uninfected (N) ticks using anti-rBmVDAC antibodies. The samples were separated on SDS-PAGE 12% and blotted onto nitrocellulose membranes and probed with the anti-rBmVDAC serum. The samples were analyzed at different post-repletion times: 0 h (lanes 1 and 2); 12 h (lanes 3 and 4); 24 h (lanes 5 and 6) and 72 h (lanes 7 and 8) (upper panel). The preimmune normal rabbit serum (PI serum diluted 1:1000) was used as a negative control (lower panel) and anti α -tubulin antibodies (1:500) as internal loading control (middle panel). (C) Semiquantitative analysis of BmVDAC expression. The BmVDAC protein bands were quantified in relation to α -tubulin. Means value $\pm$ SEM of three quantifications are represented. The asterisk indicates the value significantly different from the control ($p < 0.0001$).

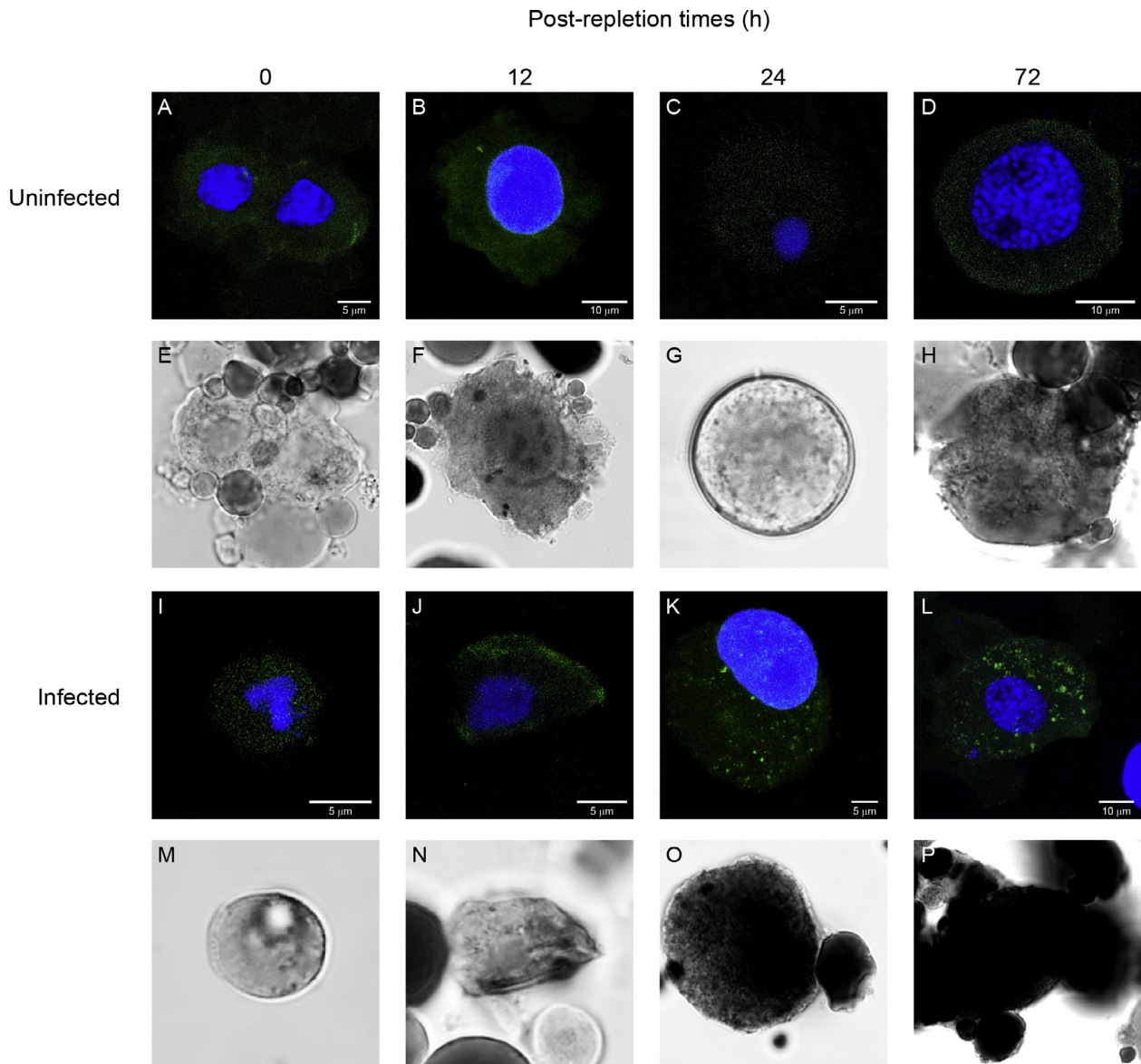


Fig. 3. BmVDAC redistribution in midgut cells of infected ticks. Replete female ticks fed on infected or uninfected bovine were collected and dissected to obtain the midguts at 0, 12, 24, and 72 h post-repletion. Midgut cells of uninfected (a–d) and infected (i–l) ticks were fixed, permeabilized and incubated with the polyclonal rabbit anti-rBmVDAC serum, followed by an anti-rabbit conjugated FITC antibody. The nuclei were stained with DAPI. As a negative control, permeabilized midgut cells were incubated with PI serum (data not shown). DIC images correspond to e–h and m–p.

4. Discussion

The limited availability of information about the molecular mechanisms at the vector-parasite interface, during the infection of *Babesia* toward the organs of the ticks has been, up to now, an obstacle to understanding the complex relationship during this phase of the life cycle. The first point of contact between *Babesia* and the vector are the gut epithelial cells of *R. microplus* and this is a critical step for the establishment and further development of the parasite.

As we previously reported that a BmVDAC-like protein is involved in the interaction of *B. bigemina* sexual stages with *R. microplus* midgut cells (Rodríguez-Hernández et al., 2012), we therefore, focused in this study on investigating the effect of infection of *B. bigemina* on the expression of the *R. microplus* BmVDAC protein in midgut of uninfected and infected ticks at different post-repletion times. Our research showed that *Bmvdac* gene expression significantly increased in transcription and translation levels in infected *R. microplus* midgut cells compared with uninfected ticks

at 24 h post-repletion. Notably, it has been previously reported that the invasion of the intestinal cells of ticks by *Babesia* ookinetes occurs 24 h post-repletion (Bock et al., 2004). Therefore, our results suggest that changes in the expression may be due to the invasion of *B. bigemina* into the intestinal cells of the tick.

VDAC, also known as mitochondrial porin, is a protein found in the external mitochondrial membrane that permits small molecules to pass through the intermembrane space into the mitochondria, in addition to participating in complex interactions regulating both cellular metabolism and apoptosis (Roman et al., 2006; Young et al., 2007). Certain intracellular pathogens, to infect and survive in host cells, can activate or inhibit cellular apoptosis of the host at the mitochondrial level, through the interaction of some of its proteins with the proteins of the external mitochondrial membrane in which the VDAC is found and permits its permeability (Boya et al., 2001).

It has been proved the critical participation of VDAC in *Toxoplasma gondii* infection. *T. gondii* is an intracellular parasite that

is part of the Phylum Apicomplexa, such as *Babesia* spp. It has been observed that VDAC expression in infected cells is modified in contrast to the uninfected cells (Boya et al., 2001; Nelson et al., 2008). VDAC up regulation has been related to apoptosis induction (Voehringer et al., 2000; Godbole et al., 2003; Ghosh et al., 2007). The over-expression of BmVDAC in midgut of *R. microplus* infected with *B. bigemina* could be related with apoptosis however this hypothesis should be demonstrated. In *Plasmodium* it has reported that the ookinetes invading the midgut epithelium of the mosquito vector trigger the apoptosis/necrosis of the cells (Baton and Ranford-Cartwright, 2007).

Our results of BmVDAC immunolocalization on permeabilized cells showed that there was an important differential expression and redistribution of the protein between midgut cells of infected and uninfected ticks, and it was more evident after 24 h post-repletion. The visualization of BmVDAC in dots clustered in the membrane of the cells could mean that the protein may be in some type of vesicle or in the mitochondria but this still needs to be demonstrated. It is important to note that the assay was carried out with a complex mix of cells.

The protein VDAC was first described in the mitochondrial membrane and later was reported to be found in the plasmatic membrane of different cellular types. Additionally, it can be detected in caveolae and caveolae-related domains (Thinnes et al., 1989; Jakob et al., 1995; Bãthori et al., 1999; Bãthori et al., 2000). It has been published that VDAC binds tissue-type plasminogen activator and promotes the activation of plasminogen on the cell surface (Gonzalez-Gronow et al., 2013). It has been found that several parasites interact with the fibrinolytic system, specifically with its plasminogen molecule as a part a complex relationship between pathogen and host (Figuera et al., 2013). Notably, there are reports that plasminogen is required for the efficient dissemination of *Borrelia burgdorferi* in ticks (Coleman et al., 1997) and the invasion of the mosquito midgut by *Plasmodium* ookinetes (Ghosh et al., 2011). The BmVDAC clustered dots that were observed 24 h post-repletion may result from protein trafficking to the external membrane to play an active role activating the plasminogen for *B. bigemina* kinete invasion, though this still needs to be proved.

The functional participation of the BmVDAC protein in the pathogenesis of *Babesia* in the midgut of *R. microplus* is still under study. It is important to solve how *Babesia* invades tick organs, as has been performed for other pathogens previously mentioned. The differential expression of BmVDAC in response of *B. bigemina* infection suggests that this protein may play an important role during the parasite invasion.

Acknowledgements

We thank Laura Vazquez M.Sc. and Eduardo Carrillo M.Sc. for excellent technical assistance and Alfredo Padilla Barberi for the help with figures. This work was supported by grants from the CONACyT 78921 and 167129. We also thank to Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal, México. Elba Rodríguez Hernández received fellowships from ICYT-DF (179/2011) and UACM.

References

- Bãthori, G., Parolini, I., Szabò, I., Tombola, F., Messina, A., Oliva, M., Sargiacomo, M., De, P., Zaratti, M., 2000. Extramitochondrial porins: facts and hypotheses. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 79–89.
- Bãthori, G., Parolini, I., Tombola, F., Szabò, I., Messina, A., Oliva, M., De Pinto, V., Lisanti, M., Sargiacomo, M., Zoratti, M., 1999. Porin is present in the plasma membrane where it is concentrated in caveolae and caveolae-related domains. *J. Biol. Chem.* 274, 29607–29612.
- Baton, L.A., Ranford-Cartwright, L.C., 2007. Morphological evidence for proliferative regeneration of the *Anopheles stephensi* midgut epithelium following *Plasmodium falciparum* ookinete invasion. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 244–254.
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vonnheim, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Zeth, K., 2008. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 15370–15375.
- Bernardi, Petronilli, V., Di Lisa, F., Forte, M., 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 26, 112–117.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., Jorgensen, W., 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129, S247–S269.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Burgdorfer, W., 1970. Hemolymph test: a technique for detection of rickettsiae in ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 1010–1014.
- Boya, P., Roques, B., Kroemer, G., 2001. Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J.* 16, 4325–4331.
- Coleman, J.L., Gebbia, J.A., Piesman, J., Degen, J.L., Bugge, T.H., Benach, J.L., 1997. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* 89, 1111–1119.
- Cossio-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Salgado Portilla, D., Osorio Miranda, J., 2009. Quantitative PCR detection of cholinesterase and carboxylesterase expression levels in acaricide resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *J. Entomol.* 6, 117–123.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 28, 275–283.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev. Vaccines* 2, 583–593.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Guglielmon, A., Horak, I., Jongejan, F., Latif, A., Pegram, R., Walker, A.R., 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp. Appl. Acarol.* 38, 219–235.
- Figuera, Gómez-Arreaza, A., Avilán, L., 2013. Parasitism in optima forma: exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Trop.* 128, 116–123.
- Ghosh, A.K., Coppens, I., Gårdsvoll, H., Ploug, M., Jacobs-Lorena, M., 2011. Plasmodium ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17153–17158.
- Ghosh, T., Pandey, N., Maitra, A., Brahmachari, S.K., Pillai, B., 2007. A role for voltage-dependent anion channel Vdac1 in polyglutamine-mediated neuronal cell death. *PLoS One* 2 (11), e1170.
- Godbole, A., Varghese, J., Sarin, A., Mathew, M.K., 2003. VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1642, 87–96.
- Gonzalez-Gronow, M., Ray, R., Wang, F., Pizzo, S.V., 2013. The voltage-dependent anion channel (VDAC) binds tissue-type plasminogen activator and promotes activation of plasminogen on the cell surface. *J. Biol. Chem.* 288, 498–509.
- Jakob, C., Gotz, H., Hellmann, T., Hellmann, K., Reymann, S., Florke, H., Thinnes, F., Hilschmann, N., 1995. Studies on human porin: XIII. The type-1 VDAC porin 31HL biotinylated at the plasmalemma of trypan blue excluding human B lymphocytes. *FEBS Lett.* 368, 5–9.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163.
- Mosqueda, J., Cossio-Bayugar, R., Rodríguez, E., Falcón, A., Ramos, A., Figueroa, J.V., Alvarez, A., 2008. Primary midgut, salivary gland, and ovary cultures from *Boophilus microplus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149, 49–52.
- Nelson, M., Jones, A., Carmen, J., Sanaí, A., Burchmore, R., Wastling, J., 2008. Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 76, 828–844.
- Peter, R.J., Van den Bossche, P., Penzhorn, B.L., Sharp, B., 2005. Tick, fly, and mosquito control-lessons from the past, solutions for the future. *Vet. Parasitol.* 132, 205–215.
- Priault, M., Chaudhuri, B., Clow, A., Camougrand, N., Manon, S., 1999. Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria permeability of mitochondria membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur. J. Biochem.* 260, 684–691.
- Rodríguez-Hernández, Mosqueda, J., Álvarez-Sánchez, M.E., Falcón Neri, A., 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. *Vet. Parasitol.* 187, 538–541.
- Roman, I., Figs, J., Zizi, M., 2006. Hunting interactomes of a membrane protein: obtaining the largest set of VDAC – interacting protein epitopes. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1667–1680.
- Sampson, M.J., Lovell, R.S., Craigen, W.J., 1997. The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. *J. Biol. Chem.* 272, 18966–18973.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., Tsujimoto, Y., 2000. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and VDAC, which is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 275, 12321–12325.
- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y., 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487.
- Sorgato, M.C., Moran, O., 1993. Channels in mitochondrial membranes: knowns, unknowns, and prospects for the future. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 127–171.
- Thinnes, F.P., Gotz, H., Kayser, H., Benz, R., Schmidt, W.E., Kratzin, H.D., Hilschmann, N., 1989. Identification of human porins. I. Purification of a porin from human B-lymphocytes (porin 31HL) and the topochemical proof of its

- expression on the plasmalemma of the progenitor cell. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 370, 1253–1264.
- Voehringer, D.W., Hirschberg, D.L., Xiao, J., Lu, Q., Roederer, M., Lock, C.B., Herzenberg, L.A., Steinman, L., Herzenberg, L.A., 2000. *Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2680–2685.
- Willadsen, P., Riding, G.A., McKenna, R.V., Kemp, D.H., Tellam, R.L., Nielsen, J.N., Lahstein, J., Cobon, G.S., Gough, J.M., 1989. *Immunological control of a parasitic arthropod: identification of a protective antigen from *Boophilus microplus**. *J. Immunol.* 143, 1346–1351.
- Young, M., Bay, D., Hausner, G., Court, D., 2007. *The evolutionary history of mitochondrial porins*. *BMC Evol.* 7, 1–21.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 23 de noviembre de 2015, en la Ciudad de México D.F. para obtener el Grado de Doctora en Ciencias Genómicas, a la M. en C. Elba Rodríguez Hernández.

Dra. Minerva Camacho Nuez

Presidenta

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

Secretaria

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Vocal

Dra. Gloria León Ávila

Vocal suplente

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Vocal suplente
