



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología

**Interactoma de proteínas de *Rhipicephalus sanguineus*, con antígenos de
Rickettsia rickettsii.**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Microbiología

Presenta:

Ana Karen Hernández Juárez

Dirigido por:

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Querétaro, Qro. Noviembre, 2021.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología

Interactoma de proteínas de *Rhipicephalus sanguineus*, con antígenos de *Rickettsia rickettsii*.

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en
Microbiología

Presenta:

Ana Karen Hernández Juárez

Dirigido por:

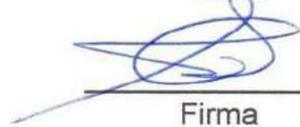
Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez
Presidente



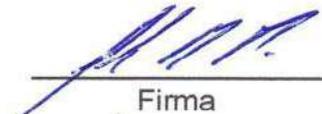
Firma

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Secretario



Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Vocal



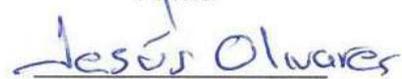
Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Vocal



Firma

Dr. José de Jesús Olivares Trejo
Vocal



Firma

Querétaro, Qro.
Noviembre, 2021.
México

DEDICATORIAS

A mis padres Alicia Juárez y José Luis Hernández y a mi abuelo Daniel Juárez, quienes siempre han estado para mí, para amarme, apoyarme e impulsarme a cumplir mis sueños. Son el motivo de mi inspiración día a día, sin ustedes esto no hubiera sido posible. A mis hermanos, Luis Hernández y Eduardo Hernández, quienes me han brindado su apoyo, los amo.

A mis tíos Emma Juárez y Moises Garcia, por su apoyo y consejos. Por ser mis ejemplos a seguir siempre.

A mi directora de tesis, la Doctora Bertha Carvajal, por todo el apoyo, paciencia y tiempo brindado desde antes de iniciar con este proyecto. Quién me inspira y motiva siempre para ser mejor cada día como persona y profesionista, muchas gracias por su confianza e incondicional apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Alicia Juárez y José Luis Hernández por su incondicional apoyo y cariño a lo largo de mi vida.

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), mi máxima casa de estudios desde mi educación media superior y Licenciatura en Microbiología, gracias por brindarme la oportunidad de formar parte de una de las mejores universidades.

A todos mis profesores de la Licenciatura en Microbiología, quienes contribuyeron en mi formación académica.

A mi directora de tesis, la Doctora Bertha Carvajal, por confiarme su proyecto, por compartir sus enseñanzas, por ser mi guía, por impulsarme y ser motivo de inspiración para dedicar mi vida a la ciencia. Por darme la oportunidad de vivir este gran logro.

Al Doctor Juan Mosqueda, por darme el apoyo y la oportunidad de trabajar en su laboratorio. A todos mis sinodales por contribuir en este proyecto. A la Doctora Angelina Rodríguez que además fue parte fundamental en mi formación académica a lo largo de la carrera. Al Doctor Antonio Cervantes, por su guía y enseñanza. Al Doctor José Olivares por su apoyo. A la Doctora Rosita Pérez por permitirme trabajar en su laboratorio para continuar con el proyecto.

A todos y cada uno de los miembros que forman parte del Laboratorio de Inmunología y Vacunas. En especial al Doctor Diego Hernández que me ha brindado su apoyo y enseñanza en todo momento cuando más lo necesité. A los maestros Miguel Mercado, Susana Mejía, Edwin Hernández y Minerva Estrada, que además de ser mis amigos, me han brindado su apoyo y consejos para ser mejor cada día. Al maestro Aldo Pavón por contribuir con su apoyo a este proyecto.

A mis amigas, por su amistad, cariño, consejos, apoyo incondicional. A la Maestra Gabriela Ramírez, por compartir su conocimiento y experiencia en el laboratorio, por inspirarme a ser mejor. A la Licenciada Fernanda Reyes, quien ha estado a mi lado cursando la carrera y fue parte fundamental para concluir esta etapa. A Fernanda Peña, por todo tu apoyo, comprensión y paciencia brindada desde hace mucho tiempo.

ÍNDICE

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Importancia de las garrapatas como vectores de patógenos.....	5
2.2 Garrapata <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	6
2.2.1 Ciclo biológico.....	9
2.2.2 Fijación y alimentación.....	13
2.2.3 Patógenos y enfermedades que transmite.....	15
2.3 Prevalencia de enfermedades en México.....	17
2.4 <i>Rickettsia rickettsii</i>	18
2.4.1 Taxonomía.....	19
2.4.2 Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), descubrimiento.....	20
2.4.3 Transmisión.....	21
2.5 Patología causada por <i>Rickettsia</i>	22
2.5.1 Patogenia e interacción con el huésped.....	24
2.5.2 Signos y síntomas de la FMMR.....	28
2.6 Distribución de FMMR transmitida por <i>Rhipicephalus sanguineus</i> en México.....	29
III. HIPÓTESIS.....	31
IV. OBJETIVOS.....	31
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
5.1 Cepa <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	32
5.2 Obtención de la muestra.....	32
5.2.1 Extracción de proteínas del intestino de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	32
5.2.2 Purificación de las proteínas del intestino de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	32
5.3 Cuantificación por Bradford.....	33
5.4 Electroforesis SDS-PAGE en 1D.....	33

5.5 Electroforesis 2DE.....	34
5.5.1 Gel SDS-PAGE 2DE.....	34
5.6 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	35
5.7 Biotinilado de proteínas.....	35
5.8 Revelado de membrana.....	36
VI. RESULTADOS.....	37
6.1 Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....	37
6.2 Integridad de proteínas electroforesis SDS-PAGE.....	38
6.3 Electroforesis 2DE.....	39
6.4 Biotinilado de antígenos de <i>Rickettsia rickettsii</i>	41
6.5 Interactoma de las proteínas antigénicas de <i>R. rickettsii</i> y proteínas totales del intestino de <i>R. sanguineus</i>	43
VII. DISCUSIÓN.....	46
VIII. CONCLUSIONES.....	49
IX. LITERATURA CITADA.....	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	9
Cuadro 2. Patógenos que afectan al perro y humano transmitidos por <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	16
Cuadro 3. Enfermedades transmitidas por <i>Rhipicephalus sanguineus</i> reportadas en diversas regiones de México.....	17
Cuadro 4. Genoma de referencia <i>Rickettsia rickettsii</i> str. <i>Iowa</i>	19
Cuadro 5. Taxonomía de <i>Rickettsia rickettsii</i>	19
Cuadro 6. Características de la FMMR causada por <i>Rickettsia rickettsii</i>	21
Cuadro 7. Vectores que transmiten <i>Rickettsia rickettsii</i> en América.....	22
Cuadro 8. Pasos patogénicos de <i>Rickettsia</i>	23
Cuadro 9. Cuadro clínico de la FMMR.....	28
Cuadro 10. Concentración de proteína de intestinos de <i>Rhipicephalus. sanguineus</i>	38
Cuadro 11. Spots de proteínas de Intestinos de <i>R. sanguineus</i> que se encontraron en electroforesis 2D.....	40
Cuadro 12. Concentración de 10 eluciones de proteínas biotiniladas de <i>R. rickettsii</i>	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	7
Figura 2. Morfología de garrapatas hembras adultas <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	8
Figura 3. Morfología de garrapatas macho adultas <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	8
Figura 4. Desarrollo biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , oviposición de garrapatas hembras.....	10
Figura 5. Desarrollo biológico de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> : fase inmadura y adulta.....	11
Figura 6. Ciclo de vida de <i>R. sanguineus</i> y transmisión de <i>R. rickettsii</i>	13
Figura 7. Sitios de fijación de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> en el perro.....	14
Figura 8. Adherencia de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> a un perro.....	15
Figura 9. Morfología de <i>Rickettsia rickettsii</i> Tinción Giménez.....	18
Figura 10. Proceso de infección de <i>Rickettsia</i>	26
Figura 11. Respuesta inmune contra <i>Rickettsia</i>	27
Figura 12. Sarpullido a pacientes causado por la FMMR.....	29
Figura 13. Disección de intestinos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> para extracción de proteínas.....	37
Figura 14. Curva estándar para la cuantificación de proteínas de intestino de <i>R. sanguineus</i>	38
Figura 15. Análisis de la integridad de las proteínas de intestinos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	39
Figura 16. Electroforesis 2D en gel SDS-PAGE al 12% de intestinos de <i>R. sanguineus</i> , rango de pH 3-10 teñido con azul de Coomassie G-250.....	40
Figura 17. Curva estándar para la cuantificación de proteínas biotiniladas de <i>Rickettsia rickettsii</i>	41
Figura 18. Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie G-250 de eluciones de proteínas biotiniladas de <i>Rickettsia rickettsii</i>	43
Figura 19. Interactoma de las proteínas antigénicas de <i>R. rickettsii</i> y proteínas totales del intestino de <i>R. sanguineus</i>	44
Figura 20. Comparación de la membrana con spots de proteínas <i>R. sanguineus</i> con <i>R. rickettsii</i> con el gel teñido de azul de Coomassie con proteínas de <i>R. sanguineus</i>	45

RESUMEN

La garrapata café, *Rhipicephalus sanguineus* es el ectoparásito de perro de mayor importancia, ya que es vector responsable de la transmisión de una variedad de patógenos, como: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis* y *Coxiella burnetii*. La Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) es causada por la bacteria intracelular *Rickettsia rickettsii*. Es una enfermedad que afecta a animales y a humanos, la cual no tiene una vacuna disponible y es difícil diagnosticar, debido a la presencia de un cuadro inespecífico, para su tratamiento. Actualmente se desconoce la interacción molecular entre *R. rickettsii* y su vector la garrapata café. El proteoma de *R. sanguineus* se desconoce, lo que dificulta comprender interacciones proteína-proteína para esclarecer el mecanismo de infección de la enfermedad. Se proponen estudios proteómicos para detectar proteínas de importancia que podrían ser candidatos vacunales y así comprender la etiología de distintas enfermedades. El objetivo de este trabajo fue determinar el interactoma de proteínas del intestino de *R. sanguineus* y antígenos de *R. rickettsii*. Los resultados de la electroforesis en 2DE, usando tiras IPG pH de 3 a 10 y geles SDS-PAGE al 12 % teñidos con Azul de Coomassie, la identificación de 12 manchas o spots de proteínas en diferentes puntos isoeléctricos (pI) y pesos moleculares (PM). Posteriormente se realizó una transferencia a membrana de nitrocelulosa para incubar con los antígenos biotinilados de *R. rickettsii*. Al revelar la membrana se identificaron ~28 spots en un rango de peso molecular, entre los 270- 130 kDa y un pI pH de 4-9. Al hacer la comparación de la membrana y el gel teñido se observan spots de proteínas *R. sanguineus* - *R. rickettsii* en un rango de pH 4 -9 y peso molecular de 270- 130 kDa. Con estos datos se sugiere que existe la interacción proteína-proteína entre *R. sanguineus* - *R. rickettsii*. Al ser el primer estudio que determina este interactoma, permite conocer y caracterizar proteínas de interés que se encuentren involucradas en la patogenicidad de *R. rickettsia*.

Palabras clave: *Rhipicephalus sanguineus*, *Rickettsia rickettsii*, Intestinos, Interactoma, Proteómica.

ABSTRACT

The brown tick, *Rhipicephalus sanguineus*, is the most important dog ectoparasite, since it is a vector responsible for the transmission of a variety of pathogens, such as: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis* and *Coxiella burnetii*. Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF) is caused by the intracellular bacterium *Rickettsia rickettsii*. It is a disease that affects animals and humans, which does not have a vaccine available and it is difficult to diagnose, due to the presence of a non-specific condition, for its treatment. The molecular interaction between *R. rickettsii* and its vector the brown tick is currently unknown. The proteome of *R. sanguineus* is unknown, making it difficult to understand protein-protein interactions to clarify the mechanism of infection of the disease. Proteomic studies are proposed to detect important proteins that could be vaccine candidates and thus understand the etiology of different diseases. The objective of this work was to determine the interactome of *R. sanguineus* intestine proteins and *R. rickettsii* antigens. The results of 2DE electrophoresis, using IPG pH 3 to 10 strips and 12% SDS-PAGE gels stained with Coomassie Blue, the identification of 12 spots or protein spots at different isoelectric points (pI) and molecular weights (P.M). Subsequently, a transfer was made to a nitrocellulose membrane to incubate with the biotinylated antigens of *R. rickettsii*. When revealing the membrane, ~ 28 spots were identified in a molecular weight range, between 270-130 kDa and a pI pH of 4-9. When comparing the membrane and the stained gel, spots of *R. sanguineus* - *R. rickettsii* proteins were observed in a range of pH 4-9 and molecular weight of 270-130 kDa. With these data it is suggested that there is a protein-protein interaction between *R. sanguineus* - *R. rickettsii*. Being the first study to determine this interactome, it allows us to know and characterize proteins of interest that are involved in the pathogenicity of *R. rickettsia*.

Key words: *Rhipicephalus sanguineus*, *Rickettsia rickettsii*, Intestines, Interactome, Proteomics.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades zoonóticas que son transmitidas por vectores artrópodos son una amenaza que compromete la vida de las mascotas y del ser humano, debido a la estrecha relación que tienen. Actualmente, el estudio sobre los vectores que transmiten enfermedades, ha ido en aumento, sin embargo, no se ha ampliado lo suficiente para evitarlas, tratarlas o erradicarlas. Es necesario saber características específicas que ayuden a comprender la relación de vectores con sus hospederos (Maggi *et al.*, 2019). Las garrapatas son artrópodos, ectoparásitos, hematófagos de gran importancia en el área veterinaria, debido a que no solo afectan animales de ganado y de compañía, también comprometen la salud humana. Son considerados los vectores transmisores de patógenos más importantes, por debajo de los mosquitos (Álvarez *et al.*, 2020).

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* transmite una amplia variedad de patógenos causantes de distintas enfermedades que son de importancia veterinaria y en la salud clínica para el humano. Entre las enfermedades que transmite y afectan al humano se encuentran las siguientes: Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) causada por *Rickettsia rickettsii*, Fiebre manchada (FM) causada por *Rickettsia massiliae*, Fiebre maculosa mediterránea (fiebre botonosa) causada por *Rickettsia conorii*. Ehrlichiosis monocítica causada por *Ehrlichia canis*, Fiebre Q causada por *Coxiella burnetii* (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Rickettsia rickettsii es una bacteria intracelular que invade células endoteliales de los diferentes hospederos que alberga y de artrópodos como las garrapatas (Baron, 1996).

Es el agente etiológico responsable de causar la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), una infección en humanos considerada como una de las más virulentas, la cual se transmite por medio de garrapatas ixódidas (Ammerman *et al.*, 2008).

Infecciones causadas por rickettsias provoca daño a células endoteliales de capilares de diferentes órganos incrementando la permeabilidad vascular. Como consecuencia se produce afecciones al líquido presente en torrentes sanguíneos, como edema, que es la acumulación de tejido e hipovolemia, que es la disminución de volumen en líquidos. El edema daña principalmente a cerebro y pulmones, debido a la acumulación de líquido que no puede ser eliminado. El cerebro comienza a inflamarse evitando un correcto flujo sanguíneo, lo que provoca desecación en el mismo. La presencia de líquido entre los espacios de los pulmones afecta la regulación de oxígeno, lo cual desencadena la hipoxemia. Por otro lado, la hipovolemia causa daños a los riñones, ya que una disminución sanguínea altera la perfusión provocando alteración renal. (Walker *et al.*, 2003).

Las lesiones vasculares que se producen y el edema causan oscurecimiento del tejido, lo que conduce a la aparición de exantema (erupciones en la piel causadas por infecciones sistémicas) (Palacios-López *et al.*, 2015). La FMMR se caracteriza por la presencia de sarpullido maculo en las extremidades, sin embargo, los signos y síntomas al inicio no son propios de la enfermedad, ya que se presenta fiebre, dolor de cabeza y abdominal. Si no es atendida correctamente, se convierte en una enfermedad grave, ya que los pacientes que sobreviven a ella, adquieren graves secuelas, complicaciones neurológicas, daño permanente en los órganos, amputación de extremidades por necrosis. Aproximadamente entre el 20 y el 25 % de los casos llega a ser mortal (CDC, 2019).

En México la tasa de letalidad por FMMR es de ~ 30 al 80 %, ocasionado por brotes que han afectado a diferentes comunidades de los estados de Sonora, Sinaloa, Durango y Coahuila. Y en menor medida en estados como Baja California Sur, Chihuahua, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Querétaro, Nuevo León, Sinaloa, Yucatán y Zacatecas. Los brotes letales de FMMR han estado relacionado con la presencia de *R. sanguineus*. En el año 2014 se reportaron 3 casos por cada 100,000 habitantes en el estado de Coahuila Los perros que se encuentran libremente en las calles fueron considerados por tener un papel muy importante en la diseminación de esta enfermedad, tanto entre las comunidades como en los países (Ortega *et al.*, 2019). Actualmente no hay una vacuna para tratar la rickettsiosis causada por *R. rickettsii* y se desconoce el mecanismo molecular por el cual se encuentra asociado a su vector, *R. sanguineus*; por lo que este trabajo tiene como objetivo determinar la interacción entre las proteínas presentes en el extracto de intestinos de *Rhipicephalus sanguineus* y proteínas de *Rickettsia rickettsii*, por medio de la proteómica.

II. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de las garrapatas como vectores de patógenos.

Las enfermedades zoonóticas transmitidas por vectores artrópodos, que parasitan animales de compañía, son una amenaza que compromete la vida de las mascotas y del ser humano, debido a la estrecha relación que tienen. Actualmente, tanto la importancia como el conocimiento que se posee sobre los vectores que transmiten enfermedades, ha ido en aumento, sin embargo, no se ha ampliado lo suficiente para evitarlas, tratarlas o erradicarlas. Por lo que es necesario saber características específicas que ayuden a comprender la relación de vectores con sus hospederos. (Maggi *et al.*, 2019).

Las garrapatas son artrópodos, ectoparásitos, hematófagos de gran importancia en el área veterinaria, debido a que no solo afectan animales de ganado y de compañía, también comprometen la salud humana. Son considerados los vectores más importantes, sólo por debajo de los mosquitos. Esto debido a la gran variedad de patógenos que transmiten, como son: bacterias, parásitos, virus y helmintos. Además, de causar daño directo a su hospedero por medio de la mordedura debido a que se alimentan de sangre y liberan toxinas a través de la saliva. En la última década, las garrapatas han sobresalido debido a su importancia clínica veterinaria y humana y por su notable incremento en la prevalencia e incidencia (Álvarez *et al.*, 2020).

Actualmente, las enfermedades transmitidas por garrapatas toman relevancia debido al aumento y alteración de: factores demográficos, industriales, ecológicos, el comercio internacional y la adaptación de los microorganismos a cambios medioambientales. El crecimiento de la población a nivel mundial propicia tener un mayor contacto con los vectores, generando un incremento en el contagio entre personas. Además, el flujo migratorio en ciudades o países desarrollados, genera nuevos casos epidemiológicos, ya que las personas que migran actúan como reservorios de enfermedades y/o vectores de enfermedades que no existían o que habían sido erradicados. Por lo que la población receptiva se ve afectada a causa de no presentar inmunidad ante agentes infecciosos nuevos. Adicionalmente, la globalización ha surgido por la necesidad de adquirir nuevas tecnologías, que como consecuencia causa un desequilibrio en el medio ambiente, contribuyendo a la adaptación de las garrapatas a condiciones ambientales, distintas a las estudiadas. Adicionalmente, la contaminación de agua, aire, suelo y la alteración de nichos

ecológicos a causa de la tala indiscriminada de bosques, provoca la migración de fauna silvestre, por lo que en muchas ocasiones el ser humano participa como intermediario de los agentes patógenos de los animales que afectan. Las enfermedades infecciosas se diseminan fácilmente y se ha visto que han aumentado por medio del comercio internacional. Cada día una gran cantidad de personas se mueven por el mundo, como: turistas, comerciantes y empresarios. Lo que provoca que el intercambio entre culturas altere y/o dañe la salud del hombre y de los animales que conforman el entorno con el cual se tiene contacto. Por lo que surge la necesidad de adaptación y resistencia de los microorganismos para su supervivencia, que eventualmente se convierte en un problema considerable en el área de la salud para contener las enfermedades que se transmiten y causan vectores como lo son las garrapatas (Suárez *et al.*, 2000).

2.2 Garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

Rhipicephalus sanguineus conocida como “garrapata marrón del perro” o “garrapata de perro café”. En un inicio fue descrita como *Ixodes sanguineus* por Latreille en 1806. Poco se sabe sobre su origen, pero se cree que es una especie típica africana, ya que el género *Rhipicephalus* es originario de esa región (Dantas-Torres, 2008).

Pertenece a la familia Ixodidae **Cuadro 1**, la cual alberga 702 especies en 14 géneros (*Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Cornupalpatum*, *Compluriscutula*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* y *Rhipicephalus*) (Horak *et al.*, 2002).

Todas las garrapatas que pertenecen a esta familia se conocen como garrapatas duras, ya que presentan una lámina dura en la parte dorsal del cuerpo. En los machos cubre por completo el dorso, mientras que en las hembras solo cubre la mitad. Por esta razón al alimentarse, las hembras son anatómicamente más grandes que los machos (Sonenshine *et al.*, 2014).

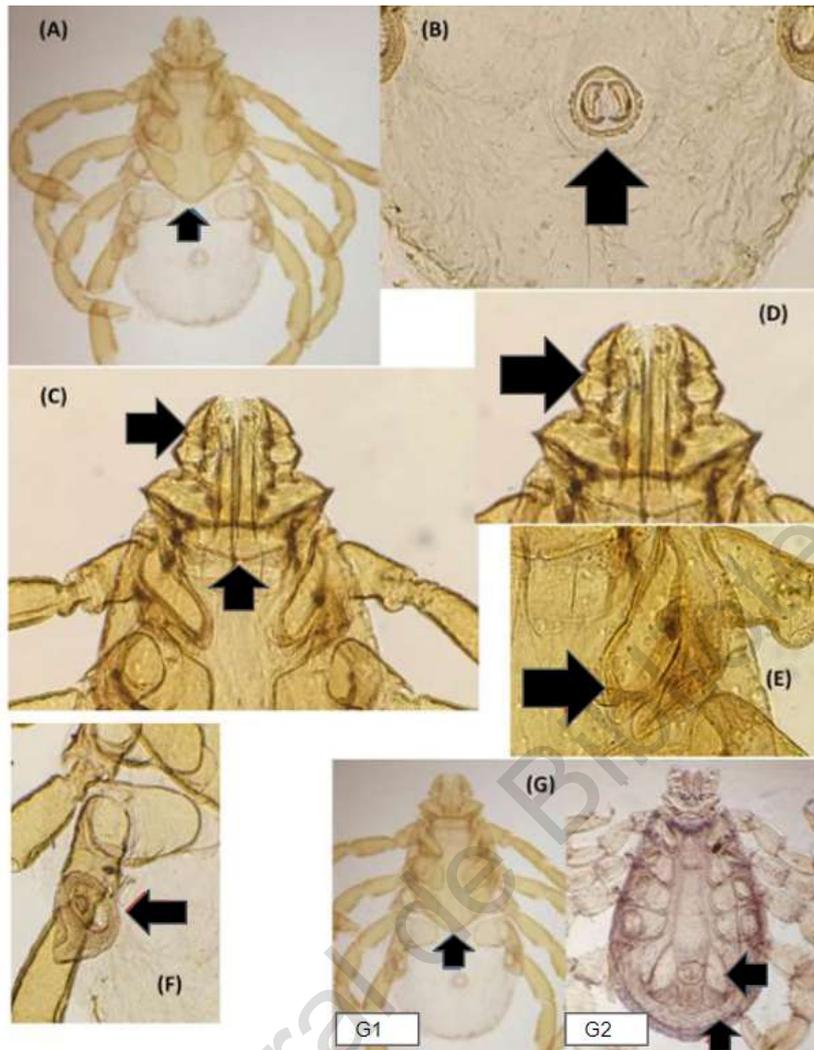


Figura 1. Estructura de *Rhipicephalus sanguineus*. Se observa la estructura de garrapatas adultas, en el panel a) la flecha señala el capítulo y el escudo, b) vista ventral de la garrapata, la flecha señala el surco anal posterior, c) vista dorsal, las flechas señalan piezas bucales, y base del capítulo hexagonal respectivamente, d) vista ventral, la flecha señala palpos e hipostoma, e) la flecha señala coxa dividida de las primeras patas, f) vista ventral, la flecha señala la placa espicular, g) escudo quitinoso g1) el escudo cubre la superficie dorsal en un 50 % de la hembra adulta, g2) las flechas señalan placas adanales en macho adulto y el escudo que cubre el 100% del dorso. Tomado y modificado de (Cervantes *et al.*, 2020).

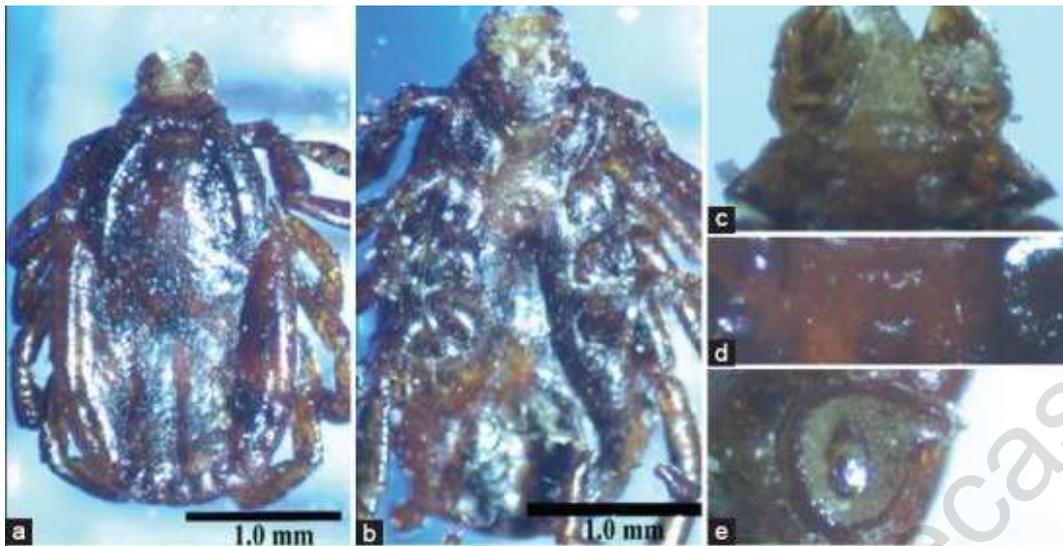


Figura 2. Morfología de garrapatas hembras adultas *Rhipicephalus sanguineus*. En el panel a) se muestra con vista dorsal, b) vista ventral, c) gnatosoma, d) orificio genital y e) placa espicular. Barra negra igual a 1.0 mm (Abdullah *et al.*, 2016).

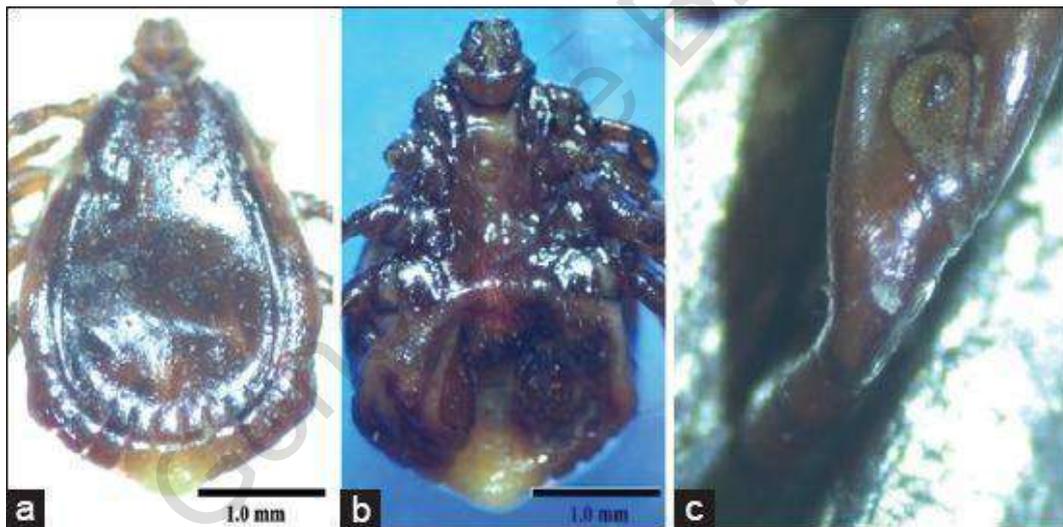


Figura 3. Morfología de garrapatas macho adultas *Rhipicephalus sanguineus*. En el panel a) se muestra con vista dorsal, b) vista ventral y c) placa espicular. Barra negra igual a 1.0 mm (Abdullah *et al.*, 2016).

Es el principal ectoparásito, artrópodo, hematófago que afecta a los perros. Sin embargo, tiene afinidad por otros mamíferos domésticos y silvestres, además de afectar al humano. Tiene una amplia distribución porque su presencia abarca distintas zonas urbanas y rurales. *R. sanguineus* es responsable de diseminar diversos patógenos como lo son helmintos, virus, protozoos y bacterias, que afectan a especies animales y humanos. *R. Sanguineus* es

de las garrapatas más estudiadas en la actualidad, debido a la importancia y relevancia en clínica veterinaria y de salud pública que representa (Dantas-Torres, 2010).

Reino	Animalia
Infrareino	Protostomia
Superphylum	Ecdysozoa
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Chelicerata
Clase	Arachnida
Superorden	Parasitiformes
Orden	Ixodida
Superfamilia	Ixodoidea
Familia	Ixodidae
Género	Rhipicephalus
Especie	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>

Cuadro 1. Taxonomía de *Rhipicephalus sanguineus* (Schoch et al., 2020).

2.2.1 Ciclo biológico.

Rhipicephalus sanguineus lleva a cabo cuatro etapas de desarrollo a lo largo de su ciclo biológico: huevo, larva, ninfa y la fase adulta. **(Figuras 4 y 5)**. Las características morfológicas y el tamaño que presentan las garrapatas en cada etapa de desarrollo varían entre sí, sin embargo, son muy conservadas. Los huevos son color café oscuro y esféricos. Las larvas tienen 3 patas y miden de largo 0.54 mm de largo y 0.39 mm de ancho. Las ninfas se encuentran más desarrolladas morfológicamente, pero son inmaduras sexualmente, tienen 8 patas, miden de largo entre 1.1 a 1.3 mm, y de 0.57 a 0.66 mm de

ancho. Los adultos, al igual que las ninfas tienen 8 patas, ya son sexualmente maduros y son más grandes. Los machos son de color café rojizo, miden de 2.28 a 3.18 mm de largo y de 1,11 a 1.68 mm de ancho. Las hembras adultas, antes de que completen la ingurgitación se parecen a los machos en color y tamaño, miden de 2.4 a 2.7 mm de largo y de 1.44 a 1.68 mm de ancho. Después de la ingesta de sangre aumenta su tamaño, llegan a medir 11.5 mm de largo y 7.5 mm de ancho. (Dantas-Torres, 2008).



Figura 4. Desarrollo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*, oviposición de garrapatas hembras. En el panel a) se observan varias hembras poniendo huevos, b) acercamiento de panel a en donde se aprecian los huevos (Dantas-Torres, 2010).

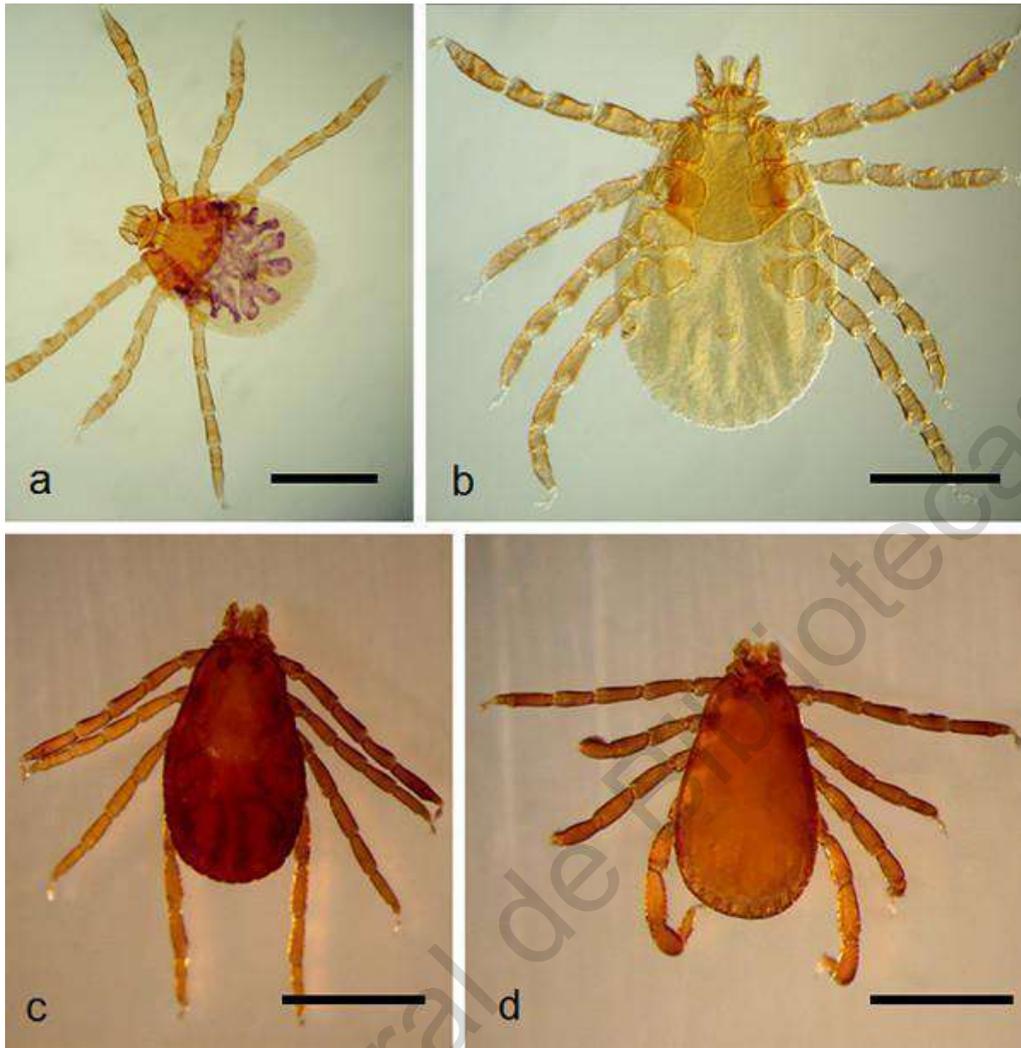


Figura 5. Desarrollo biológico de *Rhipicephalus sanguineus*: fase inmadura y adulta. En el panel a) se observa fase de larva (barra= 400 μ m), b) fase de ninfa (barra = 0,5 mm), c) fase adulta, hembra (barra = 1 mm) y d) fase adulta, macho (barra = 1 mm). (Dantas-Torres, 2010).

Rhipicephalus sanguineus prevalece todo el año en áreas tropicales y subtropicales, si se encuentra en regiones de clima templado, prevalece entre la primavera y principios del otoño. Las garrapatas adultas pueden sobrevivir en condiciones de clima frío, pero muy difícilmente se completará la eclosión de los huevos, la muda de larvas y ninfas. Si las condiciones del medio ambiente son favorables, (temperaturas de 20-35 °C, humedad de 35- 95% y disponibilidad de huésped) pueden presentarse de 3 a 4 generaciones de garrapatas en un año (Dantas-Torres, 2010).

Para que *R. sanguineus* complete su ciclo requiere de tres huéspedes, uno por cada etapa de desarrollo; y cada vez que mude, lo hará en el medio ambiente **Figura 6**. El ciclo

comienza con la alimentación de las hembras adultas, la cual dura de 5 a 21 días sobre su hospedero. Una vez que la fase de alimentación termina, se desprende para poder poner los huevos en un lugar seguro como grietas, hendiduras. Presenta un periodo de preoviposición (3 a 2 semanas), posterior a eso la fase de oviposición dura de 2 a 3 semanas, las hembras pueden depositar de 4000 a 7000 huevos. El tiempo que los huevos duran en incubación es de 6 a 3 semanas. Las larvas eclosionan y suben al hospedero para alimentarse durante 3 a 10 días y antes de desprenderse mudan a ninfa, la cual dura de 5 a 15 días. Las ninfas se alimentan durante 3 a 11 días antes de dejar su hospedero el perro, para convertirse en adulto, la muda dura de 9 a 47 días. Si no se alimentan, las larvas pueden vivir aproximadamente 8 meses, las ninfas y los adultos pueden vivir de 6 a 19 meses. El ciclo de vida de *R. sanguineus* se completa en 63 a 91 días, si las condiciones son adecuadas (Dantas-Torres, 2008).

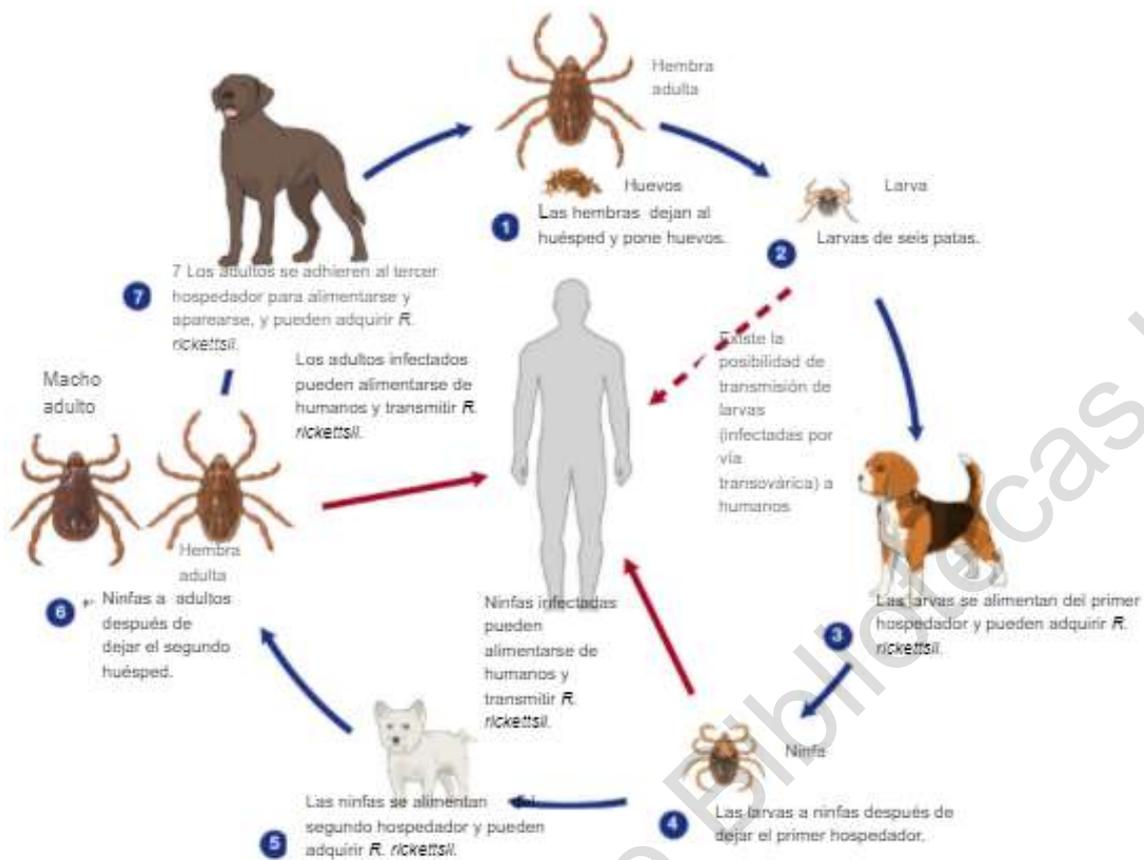


Figura 6. Ciclo de vida de *R. sanguineus* y transmisión de *R. rickettsii*. Desarrollo de *R. rickettsii* y su vector *R. sanguineus*. Se muestra el ciclo biológico: 1. La hembra cae para la oviposición de huevos; 2. pasa a fase larvaria; 3. La garrapata en su fase larvaria se alimenta de su primer hospedero; 4. Las larvas mudan a ninfas después de dejar al primer hospedero. Las ninfas infectadas pueden transmitir *R. rickettsii* a humanos; 5. Las ninfas se alimentan del segundo hospedero y pueden adquirir *R. rickettsii*; 6. Las ninfas mudan a adultas, macho o hembra después de dejar el segundo hospedero. Las garrapatas adultas infectadas pueden transmitir *R. rickettsii* a humanos; 7. Garrapatas adultas se aparean en su tercer hospedero y pueden adquirir *R. rickettsii* (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Zoonóticas y Emergentes, 2021).

2.2.2 Fijación y alimentación.

La garrapata *R. sanguineus* puede adherirse prácticamente a cualquier zona del perro, a excepción de la cabeza. Sin embargo, los sitios en los que mayormente se presentan son: las orejas, la espalda, en los espacios interdigitales y en la región inguinal y axilar **Figura 7**. Cuando la garrapata se encuentra sobre el perro, perfora la piel de su huésped por medio de una estructura parecida a una mandíbula externa llamada quelíceros; posteriormente

inserta el hipostoma el cual tiene pequeños ganchos que le permite fijarse **Figura 8**. El hipostoma junto con los quelíceros forman parte del sistema bucal de la garrapata. Una vez fijada a la epidermis, secreta una sustancia que le permitirá formar un pequeño cono que llega hasta el estrato córneo, el cual ayuda a contener la sangre que succiona. De esta manera es como *R. sanguineus* succiona la sangre de su hospedero para alimentarse. El periodo en el que se alimenta varía de acuerdo a la etapa de desarrollo en el que se encuentre, por ejemplo, las ninfas requieren de más tiempo que las larvas para poder alimentarse (Dantas-Torres, 2010).

Gracias a que la saliva de la garrapata tiene componentes con propiedades inmunomoduladoras, le permite alimentarse durante mucho tiempo, alterando la respuesta inmune del huésped (Dantas-Torres, 2008).



Figura 7. Sitios de fijación de *Rhipicephalus sanguineus* en el perro. En el panel a) se observan tres garrapatas adultas fijadas en la oreja de un perro, b) dos hembras fijadas a la axila de un perro y c) una ninfa en la región interdital de un perro. Tomado de (Dantas-Torres, 2010).

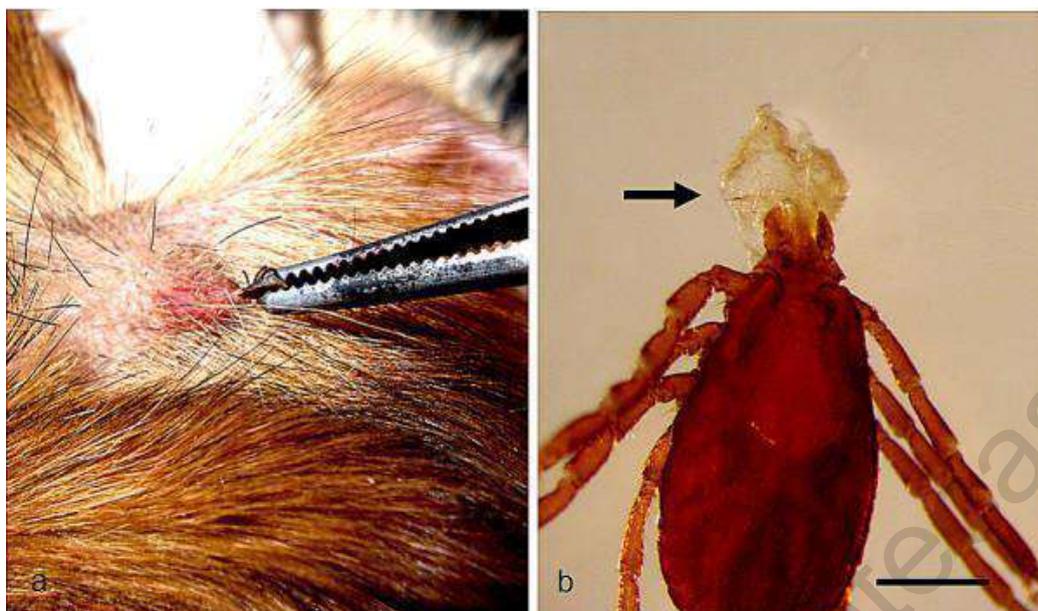


Figura 8. Adherencia de *Rhipicephalus sanguineus* a un perro. En el panel a) se observa una garrapata macho adulta adherida a la piel del perro, b) garrapata hembra adulta, la flecha negra indica que entre sus piezas bucales sostiene un trozo de piel de perro. Tomado de (Dantas-Torres, 2010).

2.2.3 Patógenos y enfermedades que transmite.

Debido a su naturaleza hematófaga, posee características que le permiten desempeñar un papel importante para la transmisión de diversos patógenos, las cuales se nombran a continuación:

1. El largo periodo para alimentarse beneficia la transmisión de patógenos entre su hospedero.
2. El proceso de digestión intracelular de la sangre que ingiere.
3. La transmisión de patógenos entre estadios de desarrollo y de la hembra a la siguiente generación de garrapatas.
4. La capacidad que tiene para alimentarse de diferentes hospederos le permite la diseminación de patógenos entre especies.
5. El tiempo que dura fijado a la piel de su hospedero.
6. La capacidad de la hembra para poner miles de huevos.
7. La capacidad para mantenerse vivas en condiciones desfavorables.

(Márquez-Jiménez *et al.*, 2005).

Rhipicephalus sanguineus transmite una amplia variedad de patógenos causantes de distintas enfermedades que son de importancia veterinaria y en la salud clínica para el humano **Cuadro 2** (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Enfermedad	Patógeno	Potencial zoonótico
Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Si
Fiebre Manchada	<i>Rickettsia massiliae</i>	Si
Fiebre Manchada mediterránea (fiebre botonosa)	<i>Rickettsia conorii</i>	Si
Leishmaniosis visceral	<i>Leishmania infantum</i>	Si
Ehrlichiosis monocítica	<i>Ehrlichia canis</i>	Si
Trombocitopenia cíclica infecciosa	canina <i>Ehrlichia platys</i>	Si
Fiebre Q	<i>Coxiella burnetii</i>	Si
Babesiosis	<i>Babesia gibsoni</i>	No
Babesiosis	<i>Babesia vogeli</i>	No
Hepatozoonosis	<i>Hepatozoon canis</i>	No
Hemobartonelosis	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	No
Filariosis subcutánea	<i>Cercopithifilaria grassii</i>	No
Filariosis subcutánea	<i>Cercopithifilaria bainaie</i>	No

Cuadro 2. Patógenos que afectan al perro y humano transmitidos por *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres *et al.*, 2015).

2.3 Prevalencia de enfermedades en México.

Países que pertenecen a Latinoamérica incluido México, poseen una gran biodiversidad a nivel mundial, por lo que conduce a la prevalencia de poblaciones hospederas de diversos patógenos. Además, la falta de cuidados a animales de compañía, el bajo control de las sobrepoblaciones y descuido por parte de los dueños hacia las mascotas que deambulan libremente en las calles. En México se han reportado casos de algunas enfermedades transmitidas por: *R. sanguineus*, como son: babesiosis, leishmaniosis visceral y ehrlichiosis en perros y Fiebre manchada de las Montañas Rocosas en humano causada por *Rickettsia rickettsii* **Cuadro 3** (Maggi *et al.*, 2019).

Enfermedad	Estado	Prevalencia
Babesiosis	Morelos	13.6%
	Veracruz	10%
Leishmaniosis visceral	Quintana Roo	6.1%
	Yucatán	11.9%
	Chiapas	19%
Ehrlichiosis	Yucatán	8.7 - 44.1%
	Sinaloa	74.3%
	Oaxaca	37%

Cuadro 3. Enfermedades transmitidas por *Rhipicephalus sanguineus* reportadas en diversas regiones de México (Maggi *et al.*, 2019).

2.4 *Rickettsia rickettsii*.

Rickettsia rickettsii es una proteobacteria, cocobacilo que mide aproximadamente de 0.7 a 2.0 μm de largo y de 0.3 a 0.5 μm de ancho, gramnegativo con una triple capa en la pared celular (membrana interna, peptidoglicano y membrana externa) de genoma pequeño (1.1 a 2.1 Mb) **Cuadro 4** de la familia *Rickettsiaceae* **Cuadro 5**. Dicha familia es responsable de causar rickettsiosis, conjunto de enfermedades febriles. El género *Rickettsia* se divide en cuatro grupos: el grupo de fiebre manchada (*R. rickettsii* y *Rickettsia conorii*), grupo tifus (*Rickettsia prowazekii* y *R. typhi*) (Sekeyova, 2001) grupo de transición (*R. felis*, *R. akari* y *R. australis*) y un cuarto grupo que no se considera patógeno, grupo ancestral (*Rickettsia bellii* y *Rickettsia canadensis*) (Murray *et al.*, 2016). Para poder visualizarse requiere de tinciones Giménez y Giemsa **Figura 9**. Crece en presencia de oxígeno (aeróbico), es una bacteria mesófila, hábitat asociado al anfitrión (Novakova *et al.*, 2016).

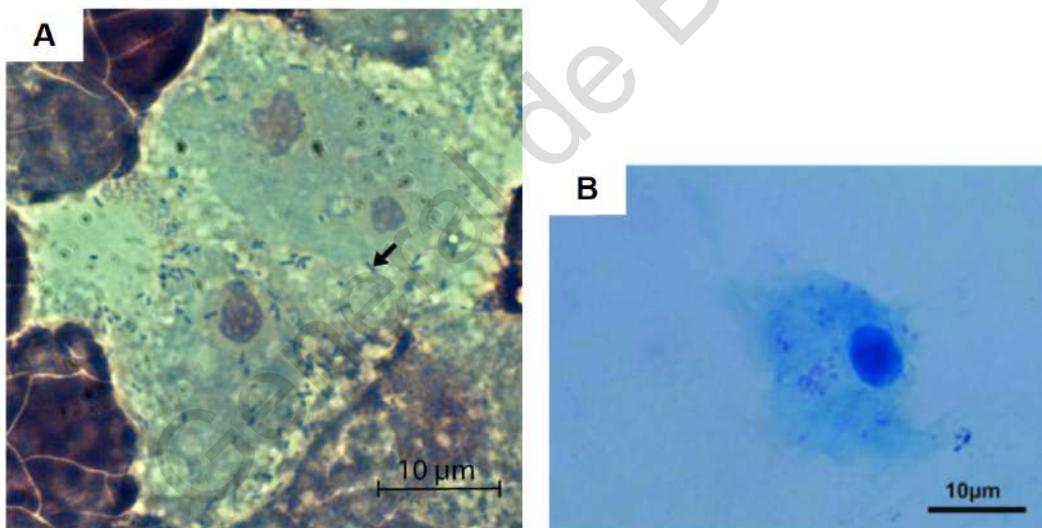


Figura 9. Morfología de *Rickettsia rickettsii* Tinción Giménez. Identificación en dos tipos de células. Paneles: a) se observan células Vero 76 infectadas con *R. rickettsii*, la flecha indica una bacteria individual, b) hemocito de *R. sanguineus* infectado con *R. rickettsii*. Tomado y modificado de (Ammerman *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2011).

Tamaño (Mb)	1.27
GC%	32.4
Proteínas	1230
ARNr	3
ARNt	34
Otros ARN	4
Genes	1433
Pseudogenes	162

Cuadro 4. Genoma de referencia *Rickettsia rickettsii* str. Iowa (NCBI, 2

Es una bacteria intracelular que invade células endoteliales de los diferentes hospederos que alberga y de artrópodos como las garrapatas. *R. rickettsii* no se puede cultivar en agar o caldo, requiere de líneas celulares eucariotas o animales para su crecimiento (Baron, 1996).

R. rickettsii es el agente etiológico responsable de causar la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMRR), una infección en humanos considerada como una de las más virulentas, la cual se transmite por medio de garrapatas ixódidas (Ammerman *et al.*, 2008).

2.4.1 Taxonomía

Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Alpha proteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	Rickettsiaceae
Género	Rickettsia

Especie	<i>Rickettsia rickettsii</i>
----------------	------------------------------

Cuadro 5. Taxonomía de *Rickettsia rickettsii* (Schoch CL, et al., 2020).

2.4.2 Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR), descubrimiento.

La descripción e identificación de rickettsias ocurrió en los años 1900, sin embargo, desde años atrás ya se tenía conocimiento sobre las enfermedades que ocasionan. El primer registro que se tiene documentado data en el año 1896 en Idaho, Estados Unidos de América. En un principio se identificó como sarampión negro, por las características patológicas que presentaba. Tres años después, Edward Maxey hace la primera descripción clínica de la enfermedad, describiéndola como “una enfermedad febril caracterizada clínicamente por hipertermia moderada, constante, la cual se acompaña de una profusa erupción caracterizada por ser, primero de color rojo púrpura, la cual progresa hasta volverse de color negro. Esta erupción inicialmente aparece en los tobillos, muñecas y frente, la cual rápidamente se esparce por todo el cuerpo”. La nombró como Fiebre Manchada de Idaho. Para el año de 1900 en regiones como Washington, California, Arizona, Montana y Nuevo México, ya se tenían registros de esa misma enfermedad (Barba, 2009).

Louis Wilson y William Chowning en 1904 estudiaron poco más de 100 casos clínicos. Llegaron a la conclusión de que se transmite por medio de garrapatas del género *Dermacentor* y no por contacto entre personas, ni por consumo de alimentos o agua (Dantas, 2007).

En 1908 McCalla demuestra que la mordedura por garrapatas a humanos es el medio por el cual se transmite la enfermedad (Silver, 1996).

Howard Taylor Ricketts, entre los años 1906 a 1919 identifica el agente causal de la enfermedad: *Rickettsia rickettsii*. Establece que la enfermedad es infecciosa y es transmisible por animales de laboratorio. Gracias a su investigación, fue posible comprender la patogenia y progreso de la enfermedad. Burt Wolback dio a conocer la morfología de *Dermacentroxenus rickettsii* (originalmente llamada así) en lesiones vasculares, debido a la presencia de la bacteria en células endoteliales. Más tarde el término *Dermacentroxenus* fue cambiado al género *Rickettsia* en honor a Howard Taylor Ricketts. Finalmente, en 1922, Brumpt propuso el nombre *Rickettsia rickettsii*. La FMMR ha sido reportada al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) desde 1920 (Barba, 2009).

2.4.3 Transmisión.

La FMMR es una enfermedad grave, que se caracteriza por la presencia de fiebre, dolor de cabeza y sarpullido, puede ser mortal si no se trata adecuadamente **Cuadro 6** (Miranda *et al.*, 2017). A pesar de tener presencia en distintas partes del mundo, la enfermedad a menudo se presenta con frecuencia en varias regiones del continente americano (Estados Unidos, Canadá, México, centro y sur América). La presencia de *R. rickettsii* depende de la distribución de su hospedero **Cuadro 7** (Ammerman *et al.*, 2008).

Agente causal	<i>Rickettsia rickettsii</i>
Entidad Clínica	Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas.
Vector	Garrapatas Ixódidas
Hospederos	Mamíferos silvestres y domésticos incluido el perro
Distribución	Europa y América
Escala	No
Exantema	Maculopapuloso afectando plantas y palmas

Cuadro 6. Características de la FMMR causada por *Rickettsia rickettsii* (Barba, 2009).

R. rickettsii se transmite por mordedura de garrapatas (reservorio natural), pertenecientes a la familia ixodidae. *R. rickettsii* también puede encontrarse en animales de compañía infectados, como los perros que actúan como reservorios de la infección para el humano (Barba, 2009).

Garrapatas vectores	Región
<i>Dermacentor variabilis</i> <i>Dermacentor andersoni</i>	Estados Unidos de América y Sur de Canadá
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	México
<i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma ovale</i> <i>Amblyomma aureolatum</i> <i>Amblyomma mixtum</i>	Centro y Sur América.

Cuadro 7. Vectores que transmiten *Rickettsia rickettsii* en América. (Miranda *et al.*, 2017).

2.5 Patología causada por *Rickettsia*.

R. rickettsii al igual que todas las rickettsias se disemina en el cuerpo evadiendo el sistema inmune del hospedero, para invadir las células y órganos. Causa daños graves al hospedero por medio de un mecanismo de lesión celular, que daña el tejido, los órganos y al hospedero en general. La patogénesis de una bacteria de carácter intracelular obligada es la siguiente:

a) Transmisión., b) Entrada., c) Diseminación., e) Contacto con la célula blanco., f) Supervivencia en el hospedero y g) Extensión del nicho **Cuadro 8** (Barba, 2009).

Paso patogénico	Observaciones
Transmisión	Inoculación salival por garrapatas (p. Ej., RMSF, MSF), ácaros (rickettsialpox) o pulgas (tifus murino). Deposición en las heces de piojos (tifus epidémico) o pulgas (tifus murino). Aerosol (especialmente tifus epidémico, tifus murino, FMMR, MSF).
Entrada	Piel Membranas mucosas Pulmones
Propagación	Vasos linfáticos Flujo sanguíneo a todos los órganos.
Células/órganos diana	Endotelio> macrófagos>? Hepatocitos Infección endotelial diseminada de todos los órganos. Afecta críticamente cerebro y pulmones.
Evasión de las defensas del anfitrión	Escape del fagosoma Selección de resistencia a IFN- γ Latencia (<i>R. prowazekii</i>) Propagación de célula a célula (rickettsias SFG)

Cuadro 8. Pasos patogénicos de *Rickettsia*. (Barba, 2009).

Las bacterias que pertenecen a las rickettsias son microorganismos intracelulares obligados. Dentro de este grupo se encuentran los géneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia*, *Neorickettsia*, *Orientia* y *Rickettsia* (Weisburg *et al.*, 1989).

Al encontrarse en el citosol de la célula del hospedero, *Rickettsia* adquiere compuestos como: lípidos, azúcares, nucleótidos y aminoácidos, que necesita por medio de mecanismos de transporte. Por ejemplo, por medio de un sistema de translocación, obtiene el ATP del huésped utilizando un intercambio de ADP (Sahni *et al.*, 2019).

La patología causada por rickettsias inicia cuando ingresan al organismo por medio de la mordedura de su vector. Una vez dentro, células como las CD68+ actúan como células

diana para iniciar la infección (Walker *et al.*, 1999). La diseminación de *Rickettsia* comienza en ganglios linfáticos por medio de los vasos linfáticos, para posteriormente transportarse al torrente sanguíneo de todo el cuerpo e infectar células endoteliales y algunos órganos (cerebro, pulmones, riñones, piel, hígado, corazón), provocando vasculitis (Sahni *et al.*, 2019).

La infección causada por rickettsias provoca daño a células endoteliales de capilares de diversos órganos, lo que da como resultado el aumento en la permeabilidad vascular. Como consecuencia se produce afecciones al líquido presente en torrentes sanguíneos, como: su acumulación en tejidos (edema), disminución de volumen (hipovolemia). El edema afecta principalmente órganos como cerebro y pulmones, ya que la presencia de líquido no puede ser eliminada. El cerebro se inflama y evita que haya un correcto flujo sanguíneo, lo que provoca desecación en el mismo. Si los pulmones presentan líquido entre los espacios, afecta la regulación de oxígeno, lo cual desencadena la hipoxemia. Por otro lado, la hipovolemia causa daños a los riñones, ya que una disminución sanguínea altera la perfusión provocando alteración renal. (Walker *et al.*, 2003). Las lesiones vasculares que se producen y el edema causan oscurecimiento del tejido, lo que conduce a la aparición de exantema (erupciones en la piel causadas por infecciones sistémicas) (Palacios-López *et al.*, 2015) causando diversos daños cutáneos progresivos desde máculas (manchas de piel planas) a maculopápulas (con cúmulos de edema) y finalmente petequiales (con presencia de sangre). El hígado presenta vasculitis, y regiones con daño hepatocelular. En el corazón se observan cúmulos de histiocitos y linfocitos inducidos por el sistema inmune en respuesta a la infección (Sahni *et al.*, 2019).

2.5.1 Patogenia e interacción con el huésped.

El proceso patogénico de rickettsiosis no se conoce por completo, sin embargo, en la bibliografía se reporta que el sistema inmune se encuentra involucrado de forma importante. **(Figuras 10 y 11)**. Estudios previos realizados en humanos y en modelos animales comprueban que una gran diversidad de células y elementos inmunes, como lo son: macrófagos, células endoteliales, células natural Killer (NK), células T CD8, las células T CD4, anticuerpos, citocinas, quimiocinas inflamatorias y la señalización de inmune innata; participan para contener y erradicar infecciones causadas por rickettsias; mediante mecanismos que conducen a su muerte. Por otro lado, si el sistema inmune presenta deficiencia, o si la respuesta inmune de las células es modificada o alterada; favorece que la

enfermedad se desarrolle con consecuencias graves. Por ejemplo, las células T reguladoras inducen la patogénesis y la progresión de la infección (Sahni *et al.*, 2019).

Las células de los vasos sanguíneos son células diana para *R. rickettsii*. Son captadas por endocitosis pero por medio de lisis endosomal logran escapar rápido del endosoma para replicarse en el citosol y poder liberarse (Silverman *et al.*, 1992).

Los genes presentes en *Rickettsia pld* y *thy* codifican fosfolipasa D y hemolisina C, los cuales ayudan al rompimiento de la membrana del fagosoma (Driskell *et al.*, 2009).

La subunidad de proteína quinasa dependiente de ADN Ku70, ubicada en el citoplasma y membrana plasmática actúa como receptor de rickettsias. *Rickettsia* posee diferentes proteínas que ayudan a mediar la entrada, adhesión e invasión a células de su hospedero. La proteína de membrana externa OmpB es ligando de Ku70, por lo que el complejo Ku70-OmpB permite la invasión. Además, expresa las proteínas de adhesión OmpA, Sca1 y Sca2 (Martinez *et al.*, 2005).

De acuerdo al tipo de *Rickettsia* es el mecanismo empleado para la salida. Por ejemplo, se cree que *R. rickettsii* causa una lisis focal de la membrana de la célula sin destruirla. (Osterloh, 2017). De esta manera es como se propaga la infección a otras células y comenzará el proceso de respuesta inmune inflamatorio, ya que células infectadas, liberan macrófagos, citocinas, quimiocinas (Sahni *et al.*, 2009).

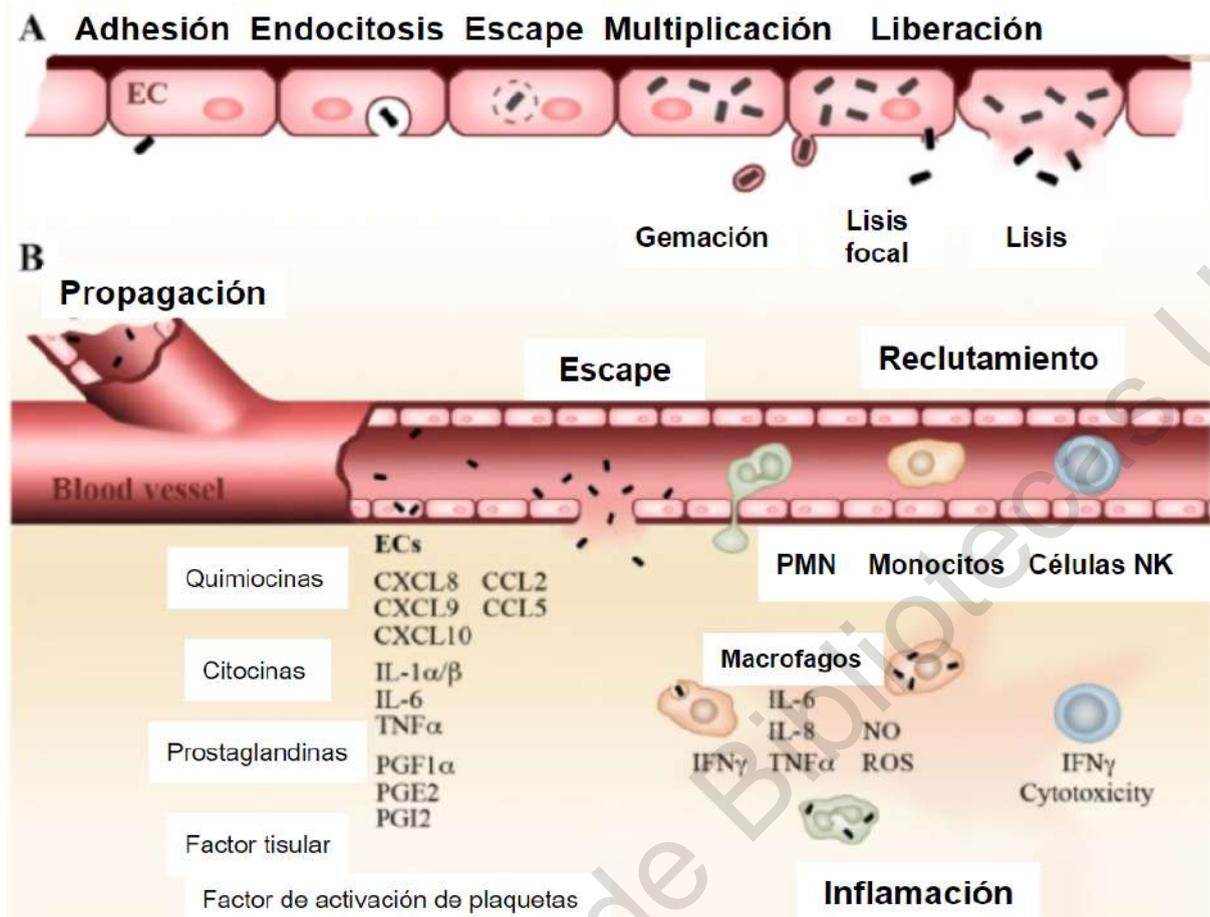


Figura 10. Proceso de infección de *Rickettsia*. Invasión de *Rickettsia* a células endoteliales y respuesta inflamatoria. En el panel a) se observa la entrada de rickettsias a células endoteliales por endocitosis, escapan del endosoma para replicarse en el citosol y liberarse por diferentes mecanismos. *R. rickettsii* se libera por medio de lisis focal, otras rickettsias se liberan por medio de lisis y gemación. b) Las rickettsias se propagan a otras células, viajan por medio del torrente sanguíneo. Se van a liberar quimiocinas, citocinas, prostaglandinas y otros factores, que atraen células inmunes como macrófagos y neutrófilos, que una vez infectados por medio de IFN γ liberan ROS y NO. Se produce TNF α , citocina inflamatoria por macrófagos, células T y NK para la inflamación. Tomada y modificada de (Osterloh, 2017). *R. rickettsii* infecta células endoteliales que producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan las membranas de las células del huésped por medio de peroxidación lipídica (Silverman *et al.*, 1988).

Las lesiones de células endoteliales por estrés oxidativo están asociadas con la deficiencia de compuestos como glutatión, elevación de catalasa (aumento de peróxido de hidrógeno) y reducción de enzimas importantes para la defensa del huésped contra ROS, como: glutatión

peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y catalasa (Hong *et al.*, 1998). La importancia de daños por ROS es porque junto con otras moléculas antioxidantes causan daño; como por ejemplo se ha visto con la fosfolipasa A2 (Walker *et al.*, 1983).

Estudios han demostrado que la fosfolipasa A2 de *Rickettsia* es responsable de la entrada a la célula, la salida del fagosoma y lisis celular (Rahman *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se ha visto que la eliminación de células infectadas por *Rickettsia* es mediante la necrosis, sin embargo linfocitos T citotóxicos inducen apoptosis contra células infectadas. Clifton y colaboradores demostraron que *R. rickettsii* inhibe la apoptosis por medio de un mecanismo a través de la activación de NF- κ B (Clifton *et al.*, 1998).

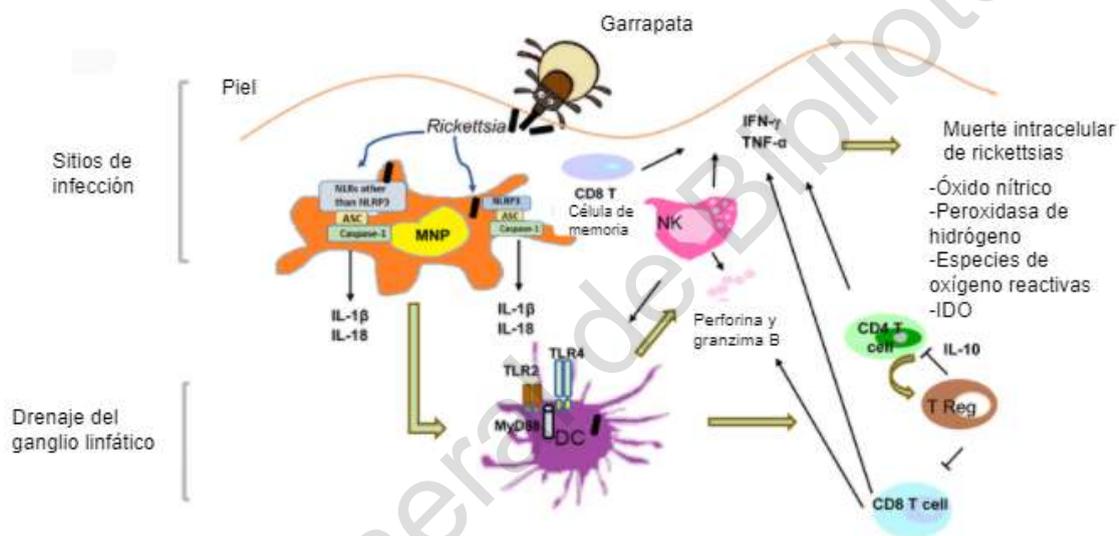


Figura 11. Respuesta inmune contra *Rickettsia*. Invasión y eliminación de rickettsias. Una vez que las rickettsias ingresan al sistema por medio de la mordedura de la garrapata, comienza la infección. Dentro, se dirigen a fagocitos mononucleares (MNP) en donde la caspasa 1 escinde IL-1 β para activar células dendríticas (CD), antígenos de rickettsias serán presentados por las CD para activar a las células NK, células T CD8 y las células T CD4. Al mismo tiempo se generan células T reguladoras (T Reg CD4 + CD25 +) que producen IL-10, provocando una respuesta inmunosupresora. (Sahni *et al.*, 2019). Las Células NK, T CD8, T CD4 inducen la producción de citocinas como IFN- γ , IL-1 β , RANTES y TNF- α . provocando la muerte intracelular de rickettsias por tres mecanismos diferentes: ROS, óxido nítrico, limitación de la disponibilidad del triptófano por degradación de indolamina-2,3-dioxigenasa. (IDO) (Sahni *et al.*, 2009).

2.5.2 Signos y síntomas de la FMMR.

La FMMR se caracteriza por la aparición de sarpullido maculo en las extremidades **Figura 12** pero los signos y síntomas iniciales no son propios de la enfermedad, ya que se presenta fiebre, dolor de cabeza y abdominal. Sin embargo, si no es atendida correctamente, se convierte en una enfermedad grave, ya que los pacientes sobrevivientes presentan graves secuelas, complicaciones neurológicas, daño permanente en los órganos, amputación de extremidades por necrosis. Aproximadamente entre el 20 y el 25 % de los casos llega a ser mortal. El periodo de incubación posterior a la mordida de garrapata infectada es de 3 a 12 días (CDC, 2019).

Días durante la enfermedad	Signos y síntomas
Días 1- 2	Fiebre, dolor de cabeza, malestar
Días 2-4	Aparición de sarpullido maculoso leve en muñecas y pies Dolor abdominal, náuseas, vómitos. Edema
Días 5-7	Complicación de síntomas. Fiebres de 40 °C Empeora cuadro respiratorio, dolor abdominal. Sarpullido petequiral
Días 7-9	Sarpullido púrpura Necrosis choque séptico Miocarditis Edema pulmonar y cerebral Estado mental alterado Coma Convulsiones

Cuadro 9. Cuadro clínico de la FMMR. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Zoonóticas y Emergentes (NCEZID)(CDC, 2019).



Figura 12. Sarpullido a pacientes causado por la FMMR. En el panel a) se observa la pierna de un paciente con sarpullido maculoso en la pierna, b) paciente con sarpullido petequial avanzado en pie, c) paciente con necrosis y gangrena en el brazo, estado más grave de la FMMR. (NCEZID, CDC, 2019).

2.6 Distribución de FMMR transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* en México.

Los primeros casos de FMMR en México reportados fueron en los años 1940, en los estados de Sonora, Sinaloa, Durango y Coahuila (Zavala-Castro et al., 2006).

En México la tasa de letalidad es de ~ 30 al 80 %, ocasionado por brotes que han afectado a diferentes comunidades de los estados de Sonora, Sinaloa, Durango y Coahuila. Y en menor medida en estados como Baja California Sur, Chihuahua, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Querétaro, Nuevo León, Sinaloa, Yucatán y Zacatecas. Los brotes letales de FMMR han estado relacionado con la presencia de *R. sanguineus*. En 2014 se reportaron 3 casos por cada 100,000 habitantes en el estado de Coahuila. Los perros que se encuentran libremente en las calles fueron considerados por tener un papel muy importante en la diseminación de esta enfermedad, tanto entre las comunidades como en los países (Ortega et al., 2019).

En México se cuenta con la NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.

En la cual se establecen todos los criterios de manejo y prevención para enfermedades que se transmiten por vectores.

El Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) del ministerio de Salud Pública de México lanzó una emergencia epidemiológica en abril del 2015 contra la FMMR al norte de México, en los estados de Baja California y Sonora. Una de las estrategias importantes era eliminar la presencia de la garrapata *R. sanguineus* (Álvarez *et al.*, 2017).

En 2016 el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y el Laboratorio Estatal De Salud Pública (LESP) reportaron 267 casos de rickettsiosis en México. Los estados con mayor número de casos fueron Sinaloa y Sonora con 51 y 41 casos respectivamente. De los 267 casos confirmados, 185 fueron identificados con *R. typhi*, 52 con *R. rickettsii* y 30 con *Rickettsia sp.* (InDRE, 2016) (LESP, 2016).

De los 52 casos de rickettsiosis causados por *R. rickettsii* se encontraron presentes 13 en el estado de Sonora, 6 en Nuevo León, 5 en Sinaloa y Morelos, 4 en Veracruz y Baja California, 3 en Jalisco, Tamaulipas y Chihuahua, y 1 en Michoacán, Baja California Sur, Campeche y Chiapas (InDRE, 2016), (LESP, 2016).

III. HIPÓTESIS

Las proteínas del intestino de *Rhipicephalus sanguineus* interactúan con proteínas de *Rickettsia rickettsii*.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el interactoma de las proteínas presentes en el extracto de intestinos de *Rhipicephalus sanguineus* y proteínas de *Rickettsia rickettsii*.

ESPECÍFICOS

- Obtener el proteoma de intestinos de *Rhipicephalus sanguineus*.
- Obtener proteínas de *Rickettsia rickettsii* biotinilados.
- Determinar el interactoma de los intestinos de *R. sanguineus* con proteínas de *Rickettsia rickettsii*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Cepa *Rhipicephalus sanguineus*.

Se colectaron garrapatas adultas semi repletas de *Rhipicephalus sanguineus* de Ciudad Victoria Tamaulipas, México. Todas las garrapatas colectadas y el material de disección fueron lavados con solución benzal al 10% por 15 min.

5.2 Obtención de la muestra.

Para el estudio proteómico se disectaron los intestinos de garrapatas del perro café. Se colocaron las garrapatas en cajas petri y con ayuda de un microscopio estereoscopio Leica, se realizó un corte transversal usando bisturí en opistosoma, por encima de los festones, cuidando de no cortar parte de los intestinos. Se separó la parte cortada, para extraer los intestinos con ayuda de pinzas de disección. Para evitar la desecación de los intestinos se colocaron 50 µl de solución salina tamponada con fosfato, PBS x1 por sus siglas en inglés con pH 7.4, 4 °C. Cada intestino se colocó en tubos de 1.5 ml con 100 µl de inhibidor de proteasas (complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Cat. No. 11836170001 ROCHE) preparado con PBS pH 7.4, 4 °C. Se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.2.1 Extracción de proteínas del intestino de *Rhipicephalus sanguineus*.

Para extraer el total de proteínas de los intestinos se tomó un vial y se descongeló a 4°C. Se realizaron 5 lavados con 1 ml de la solución inhibidor de proteasas y PBS x1 pH 7.4, cada lavado se centrifugó a 13000 rpm a 4° C por 5 minutos, se decantó el sobrenadante cada vez. Finalmente, las muestras se dejaron con 100 µl de inhibidor de proteasas y PBS x1 pH 7.4. Las muestras se sometieron a una lisis física con sonicador en baño de hielo, 3 pulsaciones de 5 segundos cada uno, a 80% de amplitud

5.2.2 Purificación de las proteínas del intestino de *Rhipicephalus sanguineus*.

La purificación de proteínas se realizó con el kit ReadyPrep™ 2-D Cleanup, Cat. No. 1632130, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tomó un vial de proteínas en un volumen final de 100 µl, primero adicionamos 400 µl del agente precipitante 1 y se mezcló bien por vortex durante 30 segundos las muestras se incubaron por 15 minutos en hielo. Después, añadimos 400 µl de agente precipitante 2, se mezcló 30 segundos en vortex y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos a 4° C. Se colocó inmediatamente el tubo en hielo y se desechó el sobrenadante, se centrifugó como en el paso anterior. Posteriormente, se

agregaron 40 μ l del agente de lavado 1 en la punta del pellet y se centrifugó nuevamente, se retiró y desechó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de reactivo de lavado 2 (enfriado a -20°C durante 1 hora) y 5 μ l del aditivo de lavado 2 y se incubaron a -20°C por 30 minutos (cada 10 minutos se vortexear el tubo durante 30 segundos). Después del periodo de incubación se centrifugaron y se desechó el sobrenadante. El pellet formado se dejó secar al aire libre a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos. Finalmente se suspendió la muestra en 200 μ l de buffer 2-D rehidratación (CHAPS 4% w/v, UREA 7M, DTT 50mM y azul de bromofenol 1%) y se guardó a -20°C hasta su uso.

5.3 Cuantificación por Bradford.

Para determinar la cantidad de proteína en las muestras, se realizó el método colorimétrico Bradford. En micro placa de 96 pozos se colocaron 5 μ l de la curva estándar con 7 diluciones de albúmina de suero bovino BSA de BioRad Cat. No. 5000207, (0.125–2.0 mg/ml). El ensayo se realizó por duplicado, se colocaron 5 μ l de la muestra a cuantificar y 250 μ l del reactivo Bradford en cada pozo. La placa se cubrió con papel aluminio y se incubó a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la lectura se realizó con el software Microplate Manager a 595 nm.

5.4 Electroforesis SDS-PAGE en 1D.

Para observar y determinar la integridad de proteínas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE por sus siglas en inglés. El gel separador se preparó al 12% (1.6 ml de agua destilada, 2.0 ml Acrilamida 30%, 1.3 ml Tris 1,5 M pH 8,8, 0.05 ml SDS 10%, 0.05 ml persulfato de amonio 10% y 5 μ L TEMED) y el concentrador al 5% (1.4 ml agua destilada, 0.33 ml acrilamida 30%, 0.25 ml Tris 1.0 M pH 6,8, 0.2 ml SDS 10%, 0.2 ml persulfato de amonio 10% y 4 μ l TEMED). Se cargaron 7 μ l de la muestra que contenía 10 μ g de proteína con 7 μ l de buffer de carga Laemmli x1 y 3 μ l del marcador de peso molecular de 116 kDa - 14.4 kDa (Thermo Scientific™ Pierce™ Unstained Protein MW Marker 26610 Cat. No. 11882114).

La electroforesis se realizó a 100V durante 120 minutos, usando buffer de corrida x1 pH 8.3 (Tris-base 24 mM, SDS 0.1%, Glicina 192 mM). Una vez terminada la electroforesis, los geles se enjuagaron con agua destilada y se tiñeron con coomassie azul brillante G-250 Bio Rad Cat. No. 1610406 durante 30 min en agitación y se destiñeron con un solución de desteñido (metanol, ácido acético glacial) por 1 hora en agitación. Los geles se visualizaron en el fotodocumentador UV de BioRad y se analizaron con el programa Image Lab.

5.5 Electroforesis 2DE.

La electroforesis en segunda dimensión (2DE) se realizó usando tiras de pH 3-10 de 7 cm (ReadyStrip™ IPG Strips de Bio Rad. Cat. No. 1632000). La rehidratación pasiva de las tiras fue de 16 a 18 h. Se cargaron 2 tiras con 75 μ l, 3 μ l de anfolinas (100x BioLyte® 3/10 Bio Rad Cat. No.1632094) y ambas tiras se aforaron a 125 μ l de buffer 2-D rehidratación. Las tiras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se cubrieron con 2 ml de aceite mineral de 16 a 18 h. Al finalizar la rehidratación de las tiras se retiró el exceso de aceite mineral con ayuda de una sanita sin tocar el gel de la tira, se colocó en la charola del isoelectroenfoco (IEF) papel filtro húmedo con agua destilada esteril en cada electrodo. Se colocaron las tiras y se cubrieron con 2 ml de aceite mineral.

El IEF se realizó en el equipo PROTEAN IEF CELL de Bio Rad, con el siguiente programa:

Paso 1: 250 V durante 40 minutos, lineal. Paso 2: 4000 V durante 3 horas, lineal. Paso 3: 4000 V durante 10,000 V/hr, rápido, a 20 ° C y 50 μ A. Una vez terminada la separación de IEF, se retiró el exceso de aceite mineral y se realizó un equilibrado con las tiras, el primer lavado de 15 minutos en agitación lenta con DTT al 1 % Dithiothreitol Cat. No. 1610611 de Bio Rad (15 mg/ml 0.075g- 5ml) y el segundo lavado también por 15 minutos en agitación con IAA al 2.5 % Iodoacetamide Cat. No. 1632109 de Bio Rad (37 mg/ml 0.187g-5ml).

5.5.1 Gel SDS-PAGE 2DE.

Las proteínas se separaron en segunda dimensión mediante SDS-PAGE Las tiras se lavaron en buffer de corrida filtrado y se montaron en geles de acrilamida solo con el gel separador al 12 %, las características de la electroforesis se realizaron bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. La tira se colocó en la parte superior del gel con el polo positivo a la derecha, del otro lado se colocó un trozo de papel filtro con 3 μ l de marcador de peso molecular de 270 kDa - 6.5kDa (Opti-Protein Ultra Marker Cat. No. G623). Cada tira se selló con agarosa de superposición del kit ReadyPrep™ 2-D Starter Cat. No. 1632105 de Bio Rad. Los geles se corrieron 100 V durante 120 minutos. No de los geles se enjuagó con agua destilada y se tiñó con coomassie azul brillante G-250 Bio Rad Cat. No. 1610406 durante 30 min en agitación y se destiñó con un solución de desteñido (metanol, ácido acético glacial) por 1 hora en agitación. El gel se visualizó en el fotodocumentador UV de BioRad y se analizó con el programa Image Lab.

5.6 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.

La transferencia de uno de los geles DSD-PAGE 2D se llevó a cabo en cámara semi seca (Biorad®) y se corrió a 15 V por 15 minutos. En el centro se colocó papel filtro humedecido con buffer de transferencia x1 (Trizma- base 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20%) se colocó al centro de la cámara un papel filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel y un segundo papel filtro.

Uno de los geles SDS-PAGE, espejo, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Colocando papel filtro humedecido con buffer de transferencia, la membrana, el gel y un segundo papel filtro con buffer de transferencia. Se colocó al centro del equipo y corrió a 15 V por 15 minutos. Posteriormente, la membrana fue teñida con rojo de Ponceau para verificar la transferencia. Posteriormente, la membrana se lavó 5 veces con PBS 1x, desechando el sobrenadante en cada lavado, hasta que la membrana quede desteñida. Después, se realizó el bloqueo de la membrana con leche descremada al 5% preparada con PBS 1x pH 7.4, incubado en agitación lenta a 4°C durante toda la noche (O.N), al día siguiente la membrana se lavó con PBS 1x, la membrana se guardó en papel filtro seco y nuevo envueltos en papel de aluminio y se guardan a -20°C.

5.7 Biotinilado de proteínas.

Para realizar la interacción de proteínas de intestino de *R. sanguineus*, se realizó el biotinilado (ROCHE Biotin Protein Labeling Kit Cat. No. 11418165001) del vial antígenos de *Rickettsia rickettsii* Cat. No. 2296 lot 130019 CDC. Se realizó la rehidratación del vial con 0.5 ml de agua destilada estéril, se tomaron 100 µl y el resto se almacenó a -20 ° C. Los antígenos se procesaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor de la siguiente forma: a los 100 µl se le agregó 1 ml de solución PBS y 7.6 µl de biotina-7-NHS, Se incubó durante 2 horas a temperatura 15 - 25 ° C. Una vez que terminó la incubación se procedió a preparar las columnas, se fijó una de las columnas con un soporte, y se colocó un vaso de precipitado 100 ml debajo. Se abrió la parte superior e inferior de la columna y agregaron 5 ml de la solución de bloqueo. Una vez que la solución de bloqueo atravesó la columna, se enjugó 6 veces con 5 ml de PBS (30 ml en total). Nota: no debe secarse la columna, por lo que es importante agregar la solución continuamente. Colocar el vial de la muestra (100 µl antígenos, 7.6 µl de biotina-7-NHS, 1 ml PBS) a la columna y dejarla fluir, posteriormente agregar lo restante de PBS para un volumen final de 2.5 ml, eluir la proteína con 3.5 ml de PBS. Posteriormente en tubos de 1.5 ml recolectar grupos de 10 gotas en cada vial.

Realizar cuantificación por el método de Bradford y un gel SDS-PAGE para determinar integridad. Seguir especificaciones anteriormente descritas.

5.8 Revelado de membrana.

Para realizar la interacción con los antígenos de *Rickettsia rickettsii* biotinilados. Se realizó el bloqueo de la membrana con leche descremada al 5% preparada con PBS 1x pH 7.4, incubado en agitación lenta a 4°C durante toda la noche (O.N). Posteriormente se lavó la membrana para quitar el exceso de leche usando PBS pH 7.4. La membrana se dejó incubando en agitación lenta a 4°C durante toda la noche (O.N) con los antígenos de *R. rickettsii* biotinilados, (se usó el vial de la muestra aforado a 10 ml). Al día siguiente la membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBS en agitación a temperatura ambiente. Una vez lavada la membrana se colocó la estreptavidina HRP (Streptavidin, horseradish peroxidase conjugate Cat. No S911 Invitrogen™) en una dilución 1:5000, en total se colocaron 6 µl de la estreptavidina HRP en 24 ml de PBS, se cubrió con papel aluminio y se dejó incubando en agitación lenta a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se realizaron 10 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-tween en agitación a temperatura ambiente. Al finalizar los lavados la membrana se colocó en un acetato y se ECL se tomaron 250 µl de cada reactivo y se bañó la membrana asegurándose de cubrir toda la superficie, finalmente la membrana se lavó con PBS-tween para leerla en el fotodocumentador de Bio Rad®.

VI. RESULTADOS

6.1 Cuantificación de proteínas por el método Bradford.

Los intestinos de garrapatas hembras adultas semi repletas *R. sanguineus*, provenientes de Ciudad Victoria, Tamaulipas México, se disectaron, para realizar la extracción de proteínas de intestinos **Figura 13**. Una vez que se obtuvieron los intestinos, se colocaron dos porciones en cada tubo de 1.5 ml con 100 μ l de inhibidor de proteasas y se almacenaron a -20° C. Antes de realizar la cuantificación, se purificaron las muestras con el sistema Clean up Bio Rad®.



Figura 13. Disección de intestinos de *Rhipicephalus sanguineus* para extracción de proteínas.

Del vial purificado de proteínas de intestinos, se tomó una alícuota de 5 μ l y se colocó por duplicado en la microplaca, el resto se almacenó a -20° C. Se procedió a realizar la cuantificación en placa por el método colorimétrico Bradford anteriormente descrito, y se trabajó con una curva de calibración con estándares de BSA desde 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 hasta 0.125 mg/mL, la curva se colocó por triplicado. El resultado de la curva estándar fue de $r^2=0.96$ **Figura 14**.

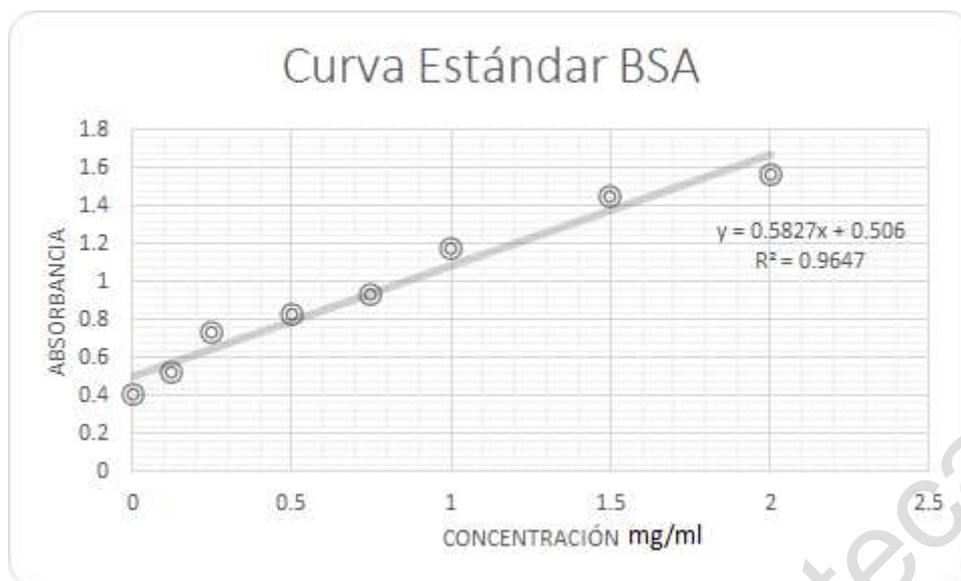


Figura 14. Curva estándar para la cuantificación de proteínas de intestino de *R. sanguineus*. Concentraciones de 0.125 hasta 2.0 mg/ml. Regresión lineal de $r^2=0.96$.

	mg/ml	µg/µl
Concentración	1.43814433	143

Cuadro 10. Concentración de proteína de intestinos de *Rhipicephalus sanguineus*.

En la muestra analizada se obtuvo una concentración de 143 µg/µl de proteína obtenida de intestinos a partir de intestinos de *R. sanguineus*, cantidad suficiente para realizar análisis proteómico, debido a que necesitamos hasta 100 µg para hidratar una tira ipg. **Cuadro 10.**

6.2 Integridad de proteínas electroforesis SDS-PAGE.

Una vez realizada la cuantificación, se realizó un análisis de la integridad de las proteínas de intestino de *R. sanguineus* por medio de electroforesis en 1D SDS-PAGE. De acuerdo a la cuantificación previa, se cargaron 7 µl de la muestra, en la cual había una concentración de proteína de 10 µg al analizar el gel en el fotodocumentador Bio Rad **Figura 15** se observaron bandas de proteínas de distintos pesos moleculares, íntegras para realizar la electroforesis en 2DE.

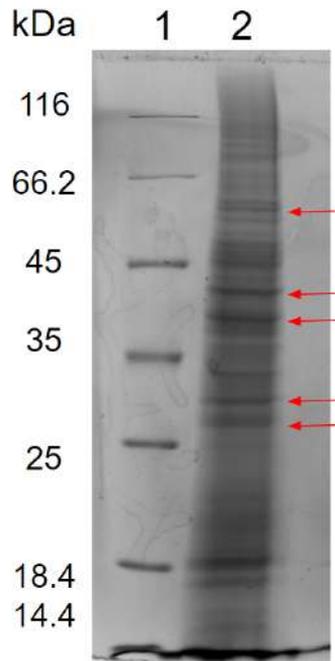


Figura 15. Análisis de la integridad de las proteínas de intestinos de *Rhipicephalus sanguineus*. Se realizó un gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie G-250. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de 116 kDa. En el carril 2 se cargaron 7 μ l con 10 μ g de proteína. Las flechas rojas muestran bandas de proteínas de diferente peso molecular del extracto de intestinos de *R. sanguineus*.

6.3 Electroforesis 2DE.

Para realizar el análisis 2DE del extracto de proteínas de intestinos de *R. sanguineus*, la separación en primera dimensión se hizo mediante tiras con gradiente de pH inmovilizado 3 a 10 de 7 cm. El isoelectroenfoco (IEF) separa las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI). La electroforesis 2D se hizo posterior al IEF y del equilibrado de las tiras en geles SDS-PAGE al 12% para separar ahora las proteínas por medio de su peso molecular. De los dos geles que se corrieron, uno fue teñido con azul de Coomassie y se analizó por medio del fotodocumentador de Bio Rad. El otro gel fue transferido a membrana de nitrocelulosa.

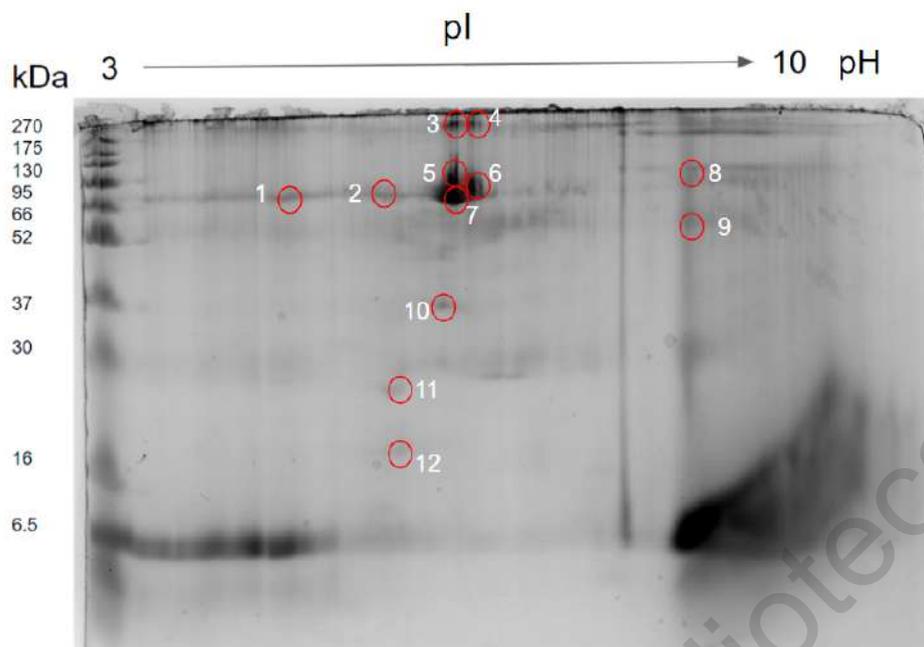


Figura 16. Electroforesis 2D en gel SDS-PAGE al 12% de intestinos de *R. sanguineus*, rango de pH 3-10 teñido con azul de Coomassie G-250. Los círculos rojos numerados contienen spots de proteínas de distintos pI y peso molecular (PM). Mostrando 12 spots en total.

Después de que el gel se tiñó y se analizó en el fotodocumentador de Bio Rad se observaron manchas que corresponden a spots de proteínas que se encuentran presentes en los intestinos de *R. sanguineus*. Se hizo un conteo general sobre las manchas y se encontraron 12 aproximadamente distribuidas en todo el gel, lo que indica que la mayoría son proteínas que pesan entre 52 y 130 kDa, con un rango de pI pH de 4-9. El **Cuadro 11**, muestra el análisis de peso molecular y punto isoeléctrico, de los spots encontrados.

pI (pH)	Spots	PM kDa	Spots
4 - 5	1	270 - 175	3, 4
5 - 6	2, 10, 11, 12	130 - 52	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9
6 - 7	3, 4, 5, 6, 7	37 - 30	10
8 - 9	8, 9	30 - 16	11, 12

Cuadro 11. Spots de proteínas de Intestinos de *R. sanguineus* que se encontraron en electroforesis 2D. El resultado sugiere que la mayoría de las proteínas se separaron en un rango de pH de 5 a 7 y en un peso de 270 a 52 kDa.

6.4 Biotinilado de antígenos de *Rickettsia rickettsii*.

El biotinilado de antígenos de *R. rickettsii* se realizó por medio del kit Biotin Protein Labeling, se tomaron 100 μ l de muestra de antígenos de *R. rickettsii*, siguiendo las instrucciones del proveedor. Las eluciones de proteínas biotiniladas se colectaron en tubos de 1.5 ml, cada tubo con 10 gotas cada, uno hasta reunir toda la muestra. Posteriormente, se realizó una cuantificación en placa por el método colorimétrico Bradford anteriormente descrito de 10 eluciones. El resultado de la curva estándar fue de $r^2=0.97$ **Figura 17**.

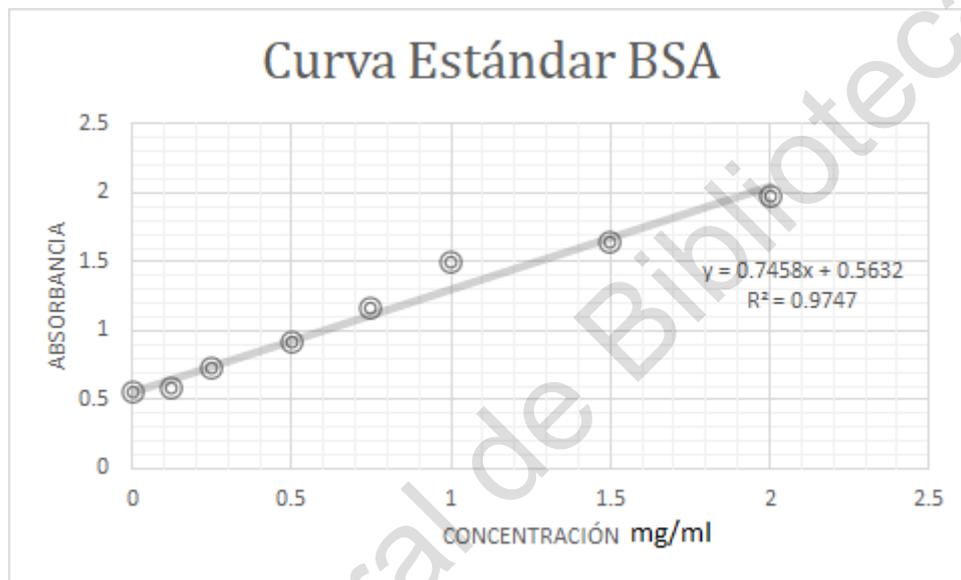


Figura 17. Curva estándar para la cuantificación de proteínas biotiniladas de *Rickettsia rickettsii*. Concentraciones de 0.125 hasta 2.0 mg/ml. Regresión lineal de $r^2=0.97$.

Eluciones	mg/ml	µg/µl
1	-0.034	-
2	0.924	924
3	0.425	425
4	0.523	523
5	0.462	462
6	0.499	499
7	0.391	391
8	-0.087	-
9	-0.070	-
10	-0.099	-

Cuadro 12. Concentración de 10 eluciones de proteínas biotiniladas de *R. rickettsii*.

De las muestras analizadas se obtuvieron concentraciones de 924, 425, 523, 462, 499, 391 µg/µl, obtenidas de proteínas biotiniladas de *R. rickettsii*. **Cuadro 12.**

Para verificar la integridad de las proteínas se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12%. Se analizaron 10 µl de las 9 muestras obtenidas. El resultado mostró un patrón de bandas íntegras, en las primeras 7 eluciones, con un rango de peso molecular entre 66 y 45 kDa **Figura 18.**

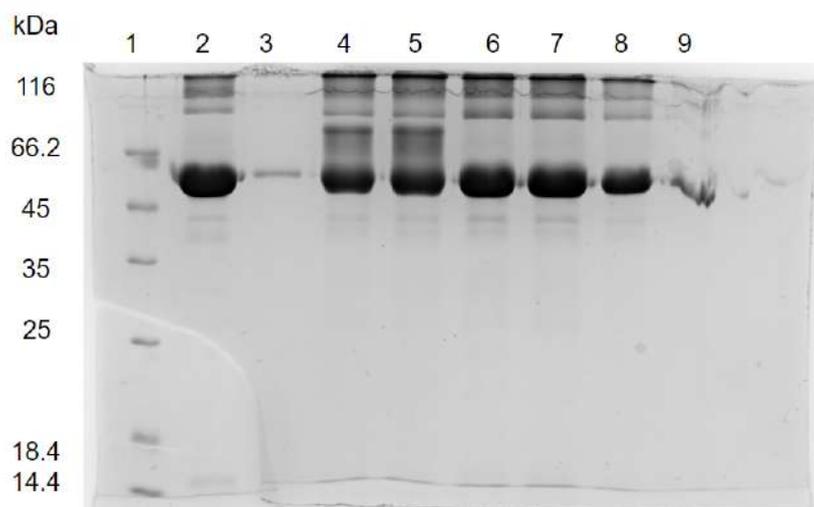


Figura 18. Gel SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de eluciones de proteínas biotiniladas de *Rickettsia rickettsii*. En el carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: elución 2 con 92 µg, carril 3: elución 1, carril 4: elución 3 con 42 µg, carril 5: elución 4 con 52 µg, carril 6: elución 5 con 46 µg, carril 7: elución 6 con 49 µg, carril 8: elución 7 con 39 µg, carril 9: elución 8.

6.5 Interactoma de las proteínas antigénicas de *R. rickettsii* y proteínas totales del intestino de *R. sanguineus*.

Para obtener el interactoma de las proteínas de intestino de *R. sanguineus* y antígenos de *R. rickettsii* primero se incubó la membrana del proteoma de *R. sanguineus* con los antígenos biotinilados de *R. rickettsii*. Posteriormente la membrana se incubó con estreptavidina HRP conjugada para identificar la biotina de los antígenos de *R. rickettsii* y poder revelar en fotodocumentador de Bio Rad. Al analizar la membrana se identificaron spots de proteínas de alto peso molecular. **Figura 19.** Se hizo una comparación del gel teñido de azul de coomassie que contiene proteínas provenientes de intestinos de *R. sanguineus* con la membrana de proteínas de la interacción de proteínas de *R. sanguineus* y *R. rickettsii*.

El resultado mostró interacción proteína-proteína, en ~28 proteínas, en un rango de peso molecular de 250-75 kDa. Este resultado, comparado con el gel en 2DE teñido con azul de Coomassie detecta una mayor cantidad de proteínas, esto puede deberse a que la tinción con azul de Coomassie no tiene la misma sensibilidad que el revelado con ECL, la sensibilidad del reactivo varía entre 0.1-10 g de proteína. En estudios a futuro se sugiere realizar un gel 2DE espejo y teñido con plata, el cual tiene una sensibilidad de 10-100 ng de

proteína. El resultado de la interacción sugiere que las proteínas antigénicas de *R. rickettsii* son capaces de interactuar con proteínas del intestino de la garrapata.

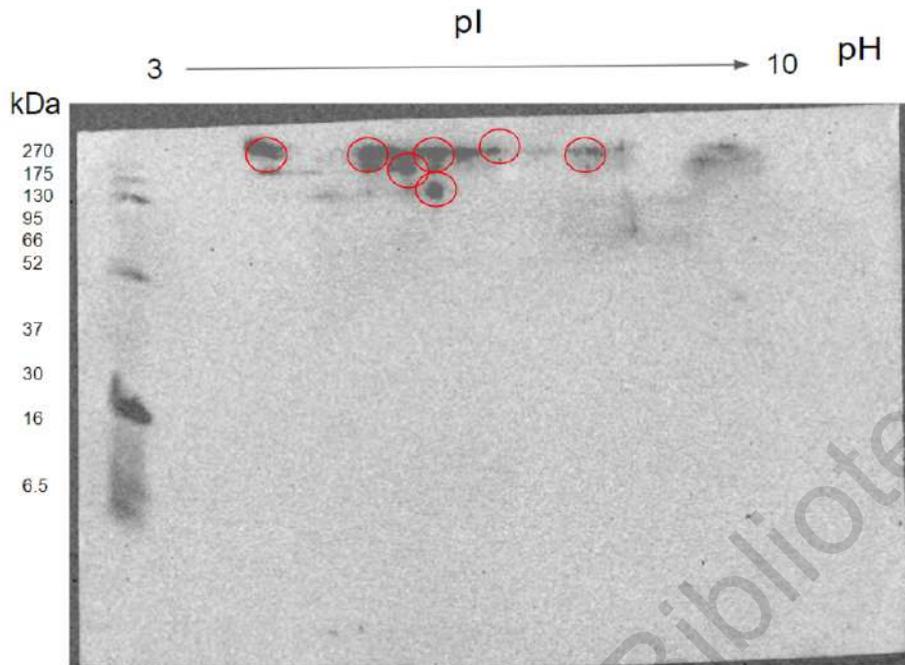


Figura 19. Interactoma de las proteínas antigénicas de *R. rickettsii* y proteínas totales del intestino de *R. sanguineus*. Membrana de nitrocelulosa con proteínas de *R. sanguineus* y *R. rickettsii*. Los spots se muestran en los círculos rojos. El total de spots son 28 en un rango de peso molecular, entre los 270- 130 kDa y un pI pH de 4-9.

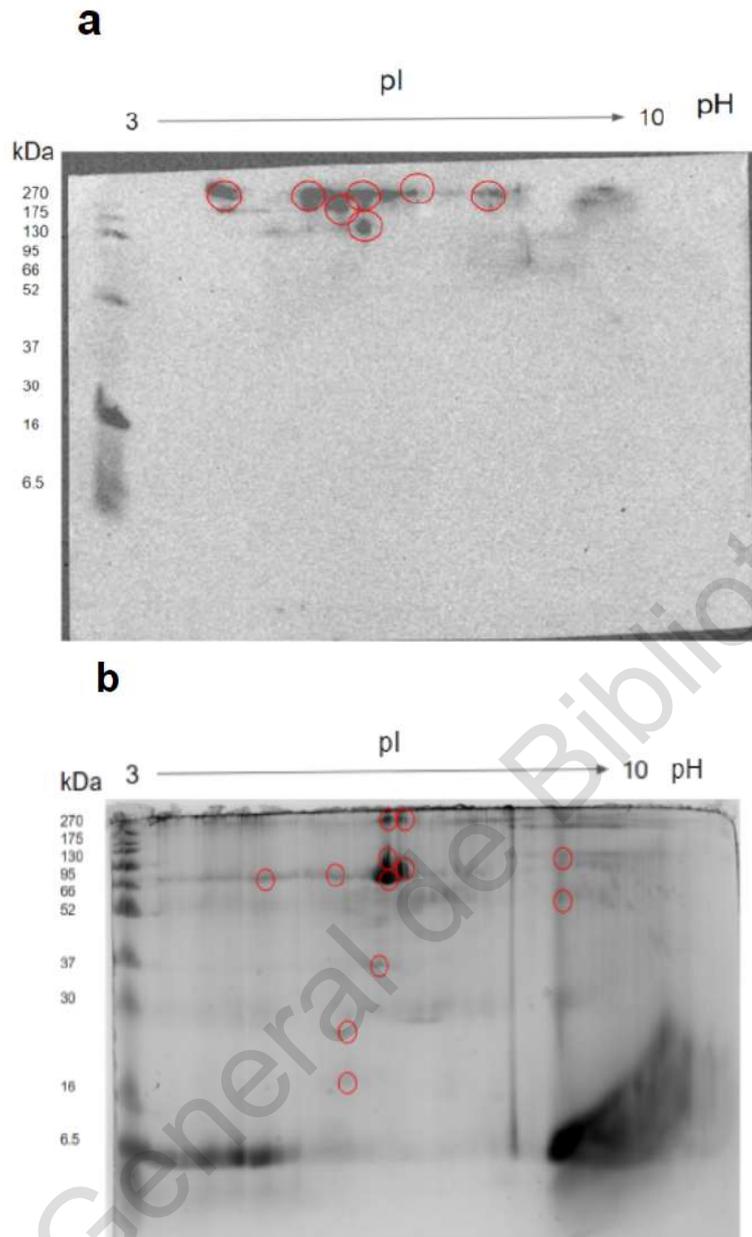


Figura 20. Comparación de la membrana con spots de proteínas *R. sanguineus* con *R. rickettsii* con el gel teñido de azul de Coomassie con proteínas de *R. sanguineus*.

Al hacer la comparación entre la membrana y el gel **Figura 20** se observan spots de proteínas *R. sanguineus* - *R. rickettsii* en un rango de pH 4 -9 y peso molecular de 270-130 kDa. Al igual que en el gel, la mayoría de los spots identificados fueron en un rango de pH 4-9. Con estos datos se puede confirmar la interacción proteína-proteína entre *R. sanguineus* - *R. rickettsii*.

VII. DISCUSIÓN

En la actualidad las enfermedades que se transmiten por medio de vectores son aproximadamente el 17%, de todas las enfermedades infecciosas (OMS, 2020). Una amplia diversidad de microorganismos es transportada por diferentes vectores, que son causantes de estas enfermedades, como bacterias, virus y parásitos. Se estima que estos microorganismos causan cada año aproximadamente más de 700 000 muertes. Un vector está definido como el organismo responsable de transmitir patógenos, ya sea entre personas o de animal a persona. La mayoría de estos vectores son insectos hematófagos, es decir se alimentan de la sangre de su hospedero. Este es el medio por el cual se transmiten las infecciones, al alimentarse se ingiere sangre infectada y se transmite a un nuevo portador. Dentro de los vectores que transmiten agentes patógenos se encuentran mosquitos y garrapatas. En Estados Unidos se ha reportado aumento en la incidencia de las enfermedades que transmiten vectores como mosquitos y garrapatas de 27,388 casos en 2004 ha aumentado a 96,075 en 2016 (Petersen *et al.*, 2019). Los mosquitos transmiten enfermedades como fiebre chikungunya, Dengue, filariasis linfática, fiebre amarilla, Zika. Se sabe que las garrapatas son responsables de la diseminación de distintas enfermedades como lo son fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, enfermedad de Lyme, borreliosis, Rickettsiosis, encefalitis por garrapatas y tuleramia. (OMS, 2020). En los últimos 13 años las enfermedades transmitidas por garrapatas han aumentado más del doble. Son responsables del 77% del total de enfermedades transmitidas por vectores. Enfermedades como Fiebre manchada, causada por *Rickettsia*, babesiosis y ehrlichiosis han aumentado los casos (Rosenberg *et al.*, 2018).

La garrapata de perro *Rhipicephalus sanguineus* transmite patógenos que afectan tanto al perro como la humano, como ejemplo, *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* y *Rickettsia rickettsii* (Dantas-Torres *et al.*, 2018).

R. rickettsii es el agente etiológico responsable de causar una de las infecciones más virulentas en humanos FMMR (Ammerman *et al.*, 2008). Si la enfermedad no es tratada a tiempo puede ser grave, ya que los pacientes desarrollan secuelas de por vida el 20-25% de los casos pueden llegar a ser mortales (CDC, 2019). Por este motivo diferentes campañas y programas han trabajado en fortalecer las estrategias para prevenir, diagnosticar y tratar la enfermedad de forma oportuna. De manera interesante, hasta la fecha no se ha desarrollado una vacuna, para el perro o el humano y evitar la diseminación de la enfermedad. Para poder proponer un candidato vacunal se requiere conocer el mecanismo de la infección (en la garrapata y el humano), y las moléculas que

participan en este proceso. Sin embargo, pocos trabajos se han desarrollado para dilucidar dichos mecanismos. Existe una vacuna a partir de una proteína presente en el intestino de *Rhipicephalus microplus*, la Bm86 codificada por el gen *bm86*. De manera interesante, se han realizado estudios que proponen la conservación de este gen en diferentes especies de garrapatas, incluida *Rhipicephalus sanguineus* (Peconick *et al.*, 2008).

Los estudios proteómicos han permitido avances importantes en el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad o en la búsqueda de candidatos vacunales para tratar distintas enfermedades infecciosas. Se han realizado estudios proteómicos de vesículas de membrana externa en bacterias como *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* (Pando-Robles *et al.*, 2009) ya que se desconoce el papel que estas tienen en el huésped, por lo que estudios sugieren que son importantes para suministrar toxinas a las células del huésped, comunicación, transferencia de proteínas y material genético entre células (Lee *et al.*, 2008).

En la actualidad se desconoce el proceso molecular en que la bacteria *R. rickettsii* reside en la garrapata *R. sanguineus*, para poder ser transmitida a diferentes hospederos. Es decir, no se conoce el proteoma, presente en los intestinos de *R. sanguineus*, que permita entender dicha interacción. Este es el primer estudio proteómico realizado en los intestinos de la garrapata y muestra una aproximación para comprender la interacción entre la bacteria *R. rickettsii* y la garrapata *R. sanguineus*. Los resultados muestran que es una interacción proteína - proteína entre ambos. Estudios de interacción proteína-proteína se han realizado en *Rhipicephalus microplus*, parásita ganado bovino, los avances de estos estudios han permitido proponer candidatos vacunales, con fines prometedores. Un ejemplo, son la proteína reguladora de voltaje VDAC, un polipéptido presente en el intestino de la garrapata que interacciona con las fases sexuales para el desarrollo de *Babesia bigemina*. Estudios sugieren que si este polipéptido se bloquea, se inhibe el desarrollo de babesia y evita la transmisión del mismo (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015).

Por otra parte, al procesar los extractos de los intestinos para obtener las proteínas, cuantificar, verificar la integridad de las mismas, los resultados muestran que se encuentran presentes 143 µg/µl de proteína en intestinos. Cantidad suficiente para obtener el proteoma por medio de electroforesis en 2DE, aquí las proteínas se separan por punto isoeléctrico (pI) y peso molecular, nos muestra que son proteínas que llegan a su pI a un pH de 7 aproximadamente y que son proteínas de alto peso molecular.

Los antígenos biotinilados de *R. rickettsii* se unieron a las proteínas de *R. sanguineus* en proteínas de alto peso molecular. Este resultado podría sugerir que las proteínas de alto peso molecular encontradas podrían tratarse de antígenos de *R. rickettsii* también de alto peso molecular, por ejemplo las proteínas de membrana externas OmpA y OmpB que tienen un peso de 120 - 240 kDa, se sabe que estas proteínas participan en la invasión y adhesión de la célula huésped (Martinez- Miranda *et al.*, 2019). Este tipo de estudio proteómico que muestra interacción entre proteínas de la bacteria con su hospedero es el primer paso para entender el mecanismo molecular por lo que esto ocurre. Como perspectivas se pretende identificar las proteínas encontradas por medio de espectrometría de masas para dilucidar la identidad de las proteínas y entender la forma de interacción. Por ejemplo, la función de las proteínas involucradas en la infección de *R. rickettsii*.

VIII. CONCLUSIONES.

El análisis proteómico de las proteínas de los intestinos de la garrapata *R. sanguineus* y los antígenos de la bacteria *R. rickettsii* muestran una interacción proteína-proteína, lo que sugiere ser unos de los pasos iniciales en el proceso de invasión por *R. rickettsii* en la garrapata café. Conocer y caracterizar estas moléculas permitirán proponer estrategias que eviten esta interacción, inhibiendo el proceso de infección de *R. rickettsia* en *R. sanguineus*.

Como perspectiva del estudio, las proteínas inmunodetectadas serán analizadas por espectrometría de masas para conocer la identidad de estas. De esta manera podremos conocer el nombre de cada proteína involucrada en este proceso de interacción y sugerir su posible participación en el mecanismo de patogenicidad de *R. rickettsii* a las células del intestino de *R. sanguineus*.

IX. LITERATURA CITADA.

Abdullah, H. H., El-Molla, A., Salib, F. A., Allam, N. A., Ghazy, A. A., & Abdel-Shafy, S. (2016). Morphological and molecular identification of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) vectors of Rickettsioses in Egypt. *Veterinary world*, 9(10), 1087–1101. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1087-1101>

Alvarez, D. O., Corona-González, B., Rodríguez-Mallón, A., Rodríguez Gonzalez, I., Alfonso, P., Noda Ramos, A. A., Díaz-Sánchez, A. A., González Navarrete, M., Rodríguez Fernández, R., Méndez Mellor, L., Catanese, H. N., Peláez, M., Gainza, Y. A., Marrero-Perera, R., Roblejo-Arias, L., Lobo-Rivero, E., Silva, C. B., Fonseca, A. H., López, E. R., & Cabezas-Cruz, A. (2020). Ticks and Tick-Borne Diseases in Cuba, Half a Century of Scientific Research. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(8), 616. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080616>

Álvarez-Hernández, G. González, J. Hernández, N. Lash, R. Paddock, C.. (2017). Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. febrero 2020, de The Lancet Infectious Diseases Sitio web: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)

Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2008). Laboratory maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Current protocols in microbiology, Chapter 3, Unit–3A.5*. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc03a05s11>

Barba, J. (2009). Fiebre manchada de las Montañas Rocosas. Sitio web: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2009/pt093e.pdf>

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Zoonóticas y Emergentes, <https://www.cdc.gov/>, 2021

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Zoonóticas y Emergentes (NCEZID).

Clifton, D. R., Goss, R. A., Sahni, S. K., van Antwerp, D., Baggs, R. B., Marder, V. J., Silverman, D. J., & Sporn, L. A. (1998). NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is

essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4646–4651. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4646>

Dantas-Torres F. (2007). Rocky Mountain spotted fever. *The Lancet. Infectious diseases*, 7(11), 724–732. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70261-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70261-X)

Dantas-Torres F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary parasitology*, 152(3-4), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>

Dantas-Torres F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & vectors*, 3, 26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>

Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in parasitology*, 28(10), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>

Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2015). Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Veterinary parasitology*, 208(1-2), 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.014>

da Silva Costa, L. F., Nunes, P. H., Soares, J. F., Labruna, M. B., & Camargo-Mathias, M. I. (2011). Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae). *Parasites & vectors*, 4, 222. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-222>

Driskell, L. O., Yu, X. J., Zhang, L., Liu, Y., Popov, V. L., Walker, D. H., Tucker, A. M., & Wood, D. O. (2009). Directed mutagenesis of the *Rickettsia prowazekii* *pld* gene encoding phospholipase D. *Infection and immunity*, 77(8), 3244–3248. <https://doi.org/10.1128/IAI.00395-09>

Hong JE, Santucci LA, Tian X, Silverman DJ. Superoxide dismutase-dependent, catalase-sensitive peroxides in human endothelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*. *Infect Immun*. 1998 Apr;66(4):1293-8. doi: 10.1128/IAI.66.4.1293-1298.1998. PMID: 9529045; PMCID: PMC108052. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.4.1293-1298.1998>.

Horak, I. G., Camicas, J. L., & Keirans, J. E. (2002). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental & applied acarology*, 28(1-4), 27–54. <https://doi.org/10.1023/a:1025381712339>

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos InDRE 2016.

Lee, E. Y., Choi, D. S., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2008). Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass spectrometry reviews*, 27(6), 535–555. <https://doi.org/10.1002/mas.20175>

Maggi, R. G., & Krämer, F. (2019). A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites & vectors*, 12(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>

Martinez, J. J., Seveau, S., Veiga, E., Matsuyama, S., & Cossart, P. (2005). Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell*, 123(6), 1013–1023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.046>

Martínez-Miranda, Harold Antonio, Balam-Romero, Javier Benjamín, & Dzul-Rosado, Karla Rossanet. (2019). Importancia de las proteínas OmpA y OmpB en el desarrollo de vacunas contra la Rickettsiosis. *Revista biomédica*, 30(2), 73-81. Epub 06 de septiembre de 2019. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v30i2.664>

Márquez-Jiménez, J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodríguez-Liévana, J & Muniain-Ezcurra, M.. (2005). Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España., de Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica Sitio web: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X05749156>

Miguel Cervantes, S, Deysi Masgo, C, Ramírez V, Leyla, Álvarez M, Grecia, Li E, Olga, Vasquez Ydrogo, Alvaro, Gomez Puerta, Luis A., & Hoyos S, Luis. (2020). Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (*Canis lupus familiaris*) con ehrlichiosis en Chiclayo, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2), e17820. <https://dx.doi.org/10.15381/rivp.v31i2.17820> (Cervantes *et al.*, 2020).

Miranda, J., Mattar, S., & Gonzalez, M.. (2017). Rickettsiosis. Sitio web: <https://www.redalyc.org/journal/693/69353273021/html/#gt1>

Murray, G. G., Weinert, L. A., Rhule, E. L., & Welch, J. J. (2016). The Phylogeny of Rickettsia Using Different Evolutionary Signatures: How Tree-Like is Bacterial Evolution?. *Systematic biology*, 65(2), 265–279. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syv084>

Novakova, M., Costa, F. B., Krause, F., Literak, I., & Labruna, M. B. (2016). Rickettsia vini n. sp. (Rickettsiaceae) infecting the tick Ixodes arboricola (Acari: Ixodidae). *Parasites & vectors*, 9(1), 469. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1742-8>

Ortega-Morales, A. I., Nava-Reyna, E., Ávila-Rodríguez, V., González- Álvarez, V. H., Castillo-Martínez, A., Siller-Rodríguez, Q. K., ... Almazán, C. (2019). Detection of Rickettsia spp. in Rhipicephalus sanguineus (sensu lato) collected from free-roaming dogs in Coahuila state, northern Mexico. *Parasites & vectors*, 12(1), 130. doi:10.1186/s13071-019-3377-z

Osterloh A. (2017). Immune response against rickettsiae: lessons from murine infection models. *Medical microbiology and immunology*, 206(6), 403–417. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0514-1>

Palacios-López, Carolina Guadalupe, Durán-Mckinster, Carola, Orozco-Covarrubias, Luz, Saéz-de-Ocariz, Marimar, García-Romero, María Teresa, & Ruiz-Maldonado, Ramón. (2015). Exantemas en pediatría. *Acta pediátrica de México*, 36(5), 412-423. de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912015000500412&lng=es&tlng=es.

Pando-Robles, Rosa Victoria, Lanz-Mendoza, Humberto, RV, Pando-Robles, & H, Lanz-Mendoza. (2009). La importancia de la proteómica en la salud pública: The significance of proteomics in public health. *Salud Pública de México*, 51(Supl. 3), s386-s394. de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900004&lng=es&tlng=es.

Peconick, A. P., Sossai, S., Medeiros, C. L., Carvalho, G. D., Vargas, M. I., & Patarroyo, J. H. (2008). Análise molecular da sequência antigênica (SBm7462®) da BM86 do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E similaridade com *Rhipicephalus sanguineus* E *Hyalomma anatolicum anatolicum* [Molecular analysis of the antigenic sequence (SBm7462®) from Bm86 of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and similarity with *Rhipicephalus sanguineus* and *Hyalomma anatolicum anatolicum*]. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 17 Suppl 1, 18–23.

Petersen, L. R., Beard, C. B., & Visser, S. N. (2019). Combatting the Increasing Threat of Vector-Borne Disease in the United States with a National Vector-Borne Disease Prevention and Control System. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 100(2), 242–245. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0841>

Rahman, M. S., Gillespie, J. J., Kaur, S. J., Sears, K. T., Ceraul, S. M., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2013). *Rickettsia typhi* possesses phospholipase A2 enzymes that are involved in infection of host cells. *PLoS pathogens*, 9(6), e1003399. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003399>

Rosenberg, R., Lindsey, N. P., Fischer, M., Gregory, C. J., Hinckley, A. F., Mead, P. S., Paz-Bailey, G., Waterman, S. H., Drexler, N. A., Kersh, G. J., Hooks, H., Partridge, S. K., Visser, S. N., Beard, C. B., & Petersen, L. R. (2018). Vital Signs: Trends in Reported Vectorborne Disease Cases - United States and Territories, 2004-2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 67(17), 496–501. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6717e1>

Sahni, A., Fang, R., Sahni, S. K., & Walker, D. H. (2019). Pathogenesis of Rickettsial Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. *Annual review of pathology*, 14, 127–152. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800>

Sahni, S. K., & Rydkina, E. (2009). Host-cell interactions with pathogenic *Rickettsia* species. *Future microbiology*, 4(3), 323–339. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.6>

Schoch CL, et al. Taxonomía del NCBI: una actualización completa sobre conservación, recursos y herramientas. Base de datos (Oxford). 2020: baaa062 . PubMed: 32761142
PMC: PMC7408187

Sekeyova, Z., Roux, V., & Raoult, D. (2001). Phylogeny of Rickettsia spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(Pt 4), 1353–1360.

Silber J. L. (1996). Rocky Mountain spotted fever. *Clinics in dermatology*, 14(3), 245–258.
[https://doi.org/10.1016/0738-081x\(96\)00009-0](https://doi.org/10.1016/0738-081x(96)00009-0)

Silverman, D. J., & Santucci, L. A. (1988). Potential for free radical-induced lipid peroxidation as a cause of endothelial cell injury in Rocky Mountain spotted fever. *Infection and immunity*, 56(12), 3110–3115.
<https://doi.org/10.1128/iai.56.12.3110-3115.1988>

Silverman, D. J., Santucci, L. A., Meyers, N., & Sekeyova, Z. (1992). Penetration of host cells by Rickettsia rickettsii appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin. *Infection and immunity*, 60(7), 2733–2740.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2733-2740.1992>

Sonenshine, Daniel E. y Roe, R. Michael, "Biology of ticks" (second edition)" (2014). *Libros de la Facultad de Ciencias Biológicas* . 1.

Suárez Larreinaga, Carmen Luisa, & Berdasquera Corcho, Denis. (2000). Enfermedades emergentes y reemergentes: factores causales y vigilancia. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 16(6), 593-597. de
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252000000600011&lng=es&tlng=es.

Walker, D. H., Firth, W. T., Ballard, J. G., & Hegarty, B. C. (1983). Role of phospholipase-associated penetration mechanism in cell injury by Rickettsia rickettsii. *Infection and immunity*, 40(2), 840–842. <https://doi.org/10.1128/iai.40.2.840-842.1983>

Walker, D. H., Hudnall, S. D., Szaniawski, W. K., & Feng, H. M. (1999). Monoclonal antibody-based immunohistochemical diagnosis of rickettsialpox: the macrophage is the

principal target. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 12(5), 529–533.

Walker, D. H., Valbuena, G. A., & Olano, J. P. (2003). Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07331.x>

Weisburg, W. G., Dobson, M. E., Samuel, J. E., Dasch, G. A., Mallavia, L. P., Baca, O., Mandelco, L., Sechrest, J. E., Weiss, E., & Woese, C. R. (1989). Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. *Journal of bacteriology*, 171(8), 4202–4206. <https://doi.org/10.1128/jb.171.8.4202-4206.1989>

Zavala-Castro, J. E., Zavala-Velázquez, J. E., Walker, D. H., Ruiz Arcila, E. E., Laviada-Molina, H., Olano, J. P., Ruiz-Sosa, J. A., Small, M. A., & Dzul-Rosado, K. R. (2006). Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 12(4), 672–674. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051282>