

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Licenciatura en Microbiología, Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro



Estandarización de la técnica de fraccionamiento celular
para el estudio de BmVDAC en células de
intestino de *R. microplus* a distintos tiempos post repleción

Tesis

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

Por: Mario Gahel Montiel González

Directores de tesis

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dra. Minerva Camacho Nuez



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Estandarización de la técnica de fraccionamiento celular para el estudio de BmVDAC en células de intestino de *R. microplus* a distintos tiempos post repleción

Tesis Individual

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

Presenta:

Mario Gahel Montiel González

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dra. Minerva Camacho Nuez

Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Minerva Camacho Nuez

Secretario

Diego Josimar Hernández Silva

Sinodal

Angelina Rodríguez Torres

Vocal

Edwin Esaú Hernández Arvizu

Vocal

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Enero de 2023
México

Este proyecto se realizó en el laboratorio 1 del Posgrado de ciencias genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 283344), en el Laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Así mismo se contó con una beca por parte del mismo proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y con un apoyo económico por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). De antemano un agradecimiento especial para estas instituciones.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología
COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Profesor investigador

Facultad de Ciencias Naturales, UAQ

CO- DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesora investigadora

Posgrado de Ciencias Genómicas, UACM

ASESORES

Dr. Diego Josimar Hernández Silva

Profesor investigador

Facultad de Ciencias Naturales, UAQ

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Profesora investigadora

Facultad de Ciencias Naturales, UAQ

MCB. Edwin Esaú Hernández Arvizu

Posgrado: Doctorado en Ciencias biológicas

Facultad de Ciencias Naturales, UAQ

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de cursar y concluir mis estudios de licenciatura, también aprovecho para agradecer a los profesores que fueron parte de mi formación académica durante este proceso ya sea de manera directa o indirecta.

Un agradecimiento especial a mis padres por brindarme su apoyo incondicional para cumplir mis objetivos y por ayudarme a crecer personalmente, con su ayuda y cariño me motivó a superar mis metas, también por proveer el apoyo económico para no distraerme de mis estudios.

A la Dra Minerva Camacho Nuez por haberme invitado a trabajar en su proyecto, por su disposición, dedicación y paciencia, sin sus correcciones precisas con base a su experiencia no hubiera logrado concluir este proyecto tan anhelado. Gracias por sus consejos.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito le agradezco por creer en mi durante toda esta etapa, por sus palabras de aliento que ayudaron a permanecer motivado para culminar con este logro

A mis asesores el Dr. Diego Josimar Hernández Silva, la Dra. Angelina Rodríguez Torres y el MCB. Edwin Esaú Hernández Arvizu por sus consejos y valiosa colaboración en el desarrollo de este proyecto

Por último, queda agradecer a mis amigos que estuvieron presentes apoyándome, siempre estuvieron dispuestos a escuchar y aconsejarme tanto personal como académicamente.

Dedicatoria

**A mi familia que siempre me ha brindado su cariño y amor,
por darme un buen ejemplo de perseverancia y crecimiento personal**

Índice

Resumen.....	1
Introducción	3
Babesiosis bovina.....	6
Clasificación	7
Ciclo de vida.....	7
Proteínas implicadas en la infección de <i>B. bigemina</i> al eritrocito	9
Diagnóstico de la babesiosis bovina.....	11
Diagnóstico molecular.....	12
Control de la Babesiosis bovina	14
<i>R. microplus</i>	17
Distribución geográfica	18
Movilidad y exportación.....	18
Panorama actual en México de <i>R. microplus</i>	19
Taxonomía	20
Morfología.....	21
Ciclo de vida.....	22
Control de <i>R. microplus</i>	23
Resistencia a tratamientos	24
Vacunas y candidatos vacunales para el control de <i>R. microplus</i>	25
Proteínas de <i>R. microplus</i> que interactúan con <i>B. bigemina</i>	27
Proteínas de importancia en <i>R. microplus</i> como candidatos vacunales.....	29
Características de VDAC	32
VDAC y su papel en la Apoptosis celular	33
Papel de VDAC en microorganismos patógenos.....	34
Localización de VDAC	35
BmVDAC e infección.....	36
BmVDAC como candidato vacunal.....	38
Justificación	39
Hipótesis.....	41
Objetivo general	41
Objetivo particular	41
Estrategia experimental.....	41

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología

Metodología:	45
Obtención de intestinos de garrapata <i>R. microplus</i> :.....	45
Establecimiento de cultivo celular primario de intestino de garrapata.....	45
Fijación en suspensión de cultivo celular primario de células intestino de garrapata.	46
Detección de <i>B. bigemina</i> en células de intestino de garrapata infectadas mediante PCR.....	47
Preparación de muestras para microscopía confocal	48
Estandarización de Western Blot y fraccionamiento celular de intestinos de <i>R. microplus</i> colectadas en campo.....	49
Extracción de proteínas totales de intestinos de garrapatas <i>R. microplus</i>	49
Western Blot de extracto de proteínas totales de intestino de garrapata con sueros de Bm-86, BmVDAC y cadherina	50
Estandarización de extracción de fracciones celulares a partir de intestinos de <i>R. microplus</i> colectados en campo	52
Análisis de fracciones celulares mediante Western Blot	54
Resultados	55
Discusión	73
Conclusión	76
Referencias:.....	78

Resumen

BmVDAC es una proteína de *Rhipicephalus microplus* que se ha demostrado se sobreexpresa y relocaliza en células de intestino de las garrapatas infectadas con *Babesia bigemina* a diferentes tiempos post repleción, además en experimentos de vacunación de bovinos infectados y no infectados con el parásito, se evidenció un alto porcentaje de protección fundamentalmente en la fertilidad de las garrapatas colectadas de los animales vacunados, sin embargo no se conoce la función que podría estar jugando esta proteína durante la infección de *B. bigemina*. Uno de los aspectos importantes para profundizar y conocer la función de cualquier proteína es estudiar donde se localiza, en humanos VDAC que es una proteína mitocondrial también se ha localizado en la membrana plasmática. El objetivo del presente trabajo fue la estandarización de la técnica de fraccionamiento celular a partir de intestinos de *R. microplus*, para el estudio de la localización de la proteína BmVDAC durante la infección con *B. bigemina* a distintos tiempos post repleción. Las condiciones de la estandarización de la extracción de fracciones fue la ruptura celular, lavados entre la extracción de fracciones y anticuerpos específicos como marcadores de fracciones, fueron establecidas usando extractos de membrana de garrapatas colectadas en el campo. Una vez establecidas las condiciones, se colectaron garrapatas de bovinos infectados y no infectados con *B. bigemina* y se extrajeron los intestinos a las 0, 24 y 72 horas post repleción. Una parte de los intestinos se usó para realizar un cultivo primario para la inmunolocalización por microscopía confocal y a la otra parte se les hizo la extracción y análisis de fracciones celulares. Las diferentes fracciones fueron analizadas en geles SDS-PAGE al 10%, transferidas a membranas de nitrocelulosa y reveladas con anticuerpos anti-BmVDAC y anti-Bm86 como marcador de membrana. Los resultados de esta investigación sugieren que la proteína BmVDAC se encuentra únicamente en la fracción membranal, aunque una de las limitaciones del fraccionamiento realizado es que la fracción membranal incluye tanto la membrana citoplasmática como mitocondrial, por ello es necesario determinar si la proteína

BmVDAC se relocaliza a la membrana citoplasmática en consecuencia de la infección por *B. bigemina* con ensayos de microscopía confocal. Este proyecto se realizó durante la pandemia de Covid- 19, lo que complico e hizo imposible realizar la inmunolocalización de BmVDAC mediante microscopia por la limitación en disposición de las instalaciones y los equipos.

Introducción

México ocupa el séptimo lugar en países productores de ganado, tan sólo en el 2014 se reportó que hubo una producción de 28.4 millones de cabezas de bovinos a nivel nacional, por ello infecciones parasitarias significan una desventaja para la industria de producción de ganado, debido las pérdidas económicas asociadas a las enfermedades del ganado como las infestaciones por garrapatas como *R. microplus*. Los estados que encabezan la producción de ganado son Veracruz, Jalisco y Chihuahua, en donde en donde las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de *R. microplus* (Narciso et al., 2013; Rodríguez-Vivas et al., 2017).

La garrapata del ganado *R. microplus* es uno de los ectoparásitos más comunes que afectan bovinos y es el principal transmisor enfermedades a bovinos de importancia veterinaria. La babesiosis bovina es un ejemplo destacado de enfermedades transmitidas por garrapatas, esta enfermedad es causada por géneros del protozooario *Babesia spp.* la cual prevalece en lugares con climas tropicales y subtropicales. Aproximadamente el 80% de las poblaciones de bovinos está expuesta a la infestación por garrapatas, las pérdidas económicas anuales por garrapatas a nivel mundial oscilan entre 13,9 mil millones y 18,7 mil millones de dólares, en México se estima que tan solo la pérdida generada por *R. microplus* y las enfermedades que transmiten como la babesiosis en el hato lechero, es de \$ 68'878,694 dólares, mientras que la pérdida total en el hato de ganado se calcula que es de \$ 573'608,076 dólares (Rodríguez-Vivas et al., 2017). La sola presencia de la garrapata en los bovinos tiene impactos considerables, debido a que daña la piel, deteriorando la calidad del cuero, también afecta a la calidad de otros productos obtenidos de los bovinos como la carne y leche. (Tabor et al., 2017).

Los métodos de control están basados principalmente en químicos acaricidas organofosforados o piretroides, aunque lamentablemente el uso desmedido y prolongado de estos químicos puede tener como consecuencia la generación de

poblaciones de garrapatas resistentes y a la disminución de la diversidad de otros organismos debido a su poca especificidad (Rodríguez *et al.*, 2014). También existen métodos de control no químicos como las vacunas contra garrapatas, hoy en día solo existe una vacuna patentada llamada Gavac la cual está dirigida contra Bm86, una proteína presente en la superficie de células del intestino de *R. microplus*. Esta proteína está implicada en la interacción con *B. bigemina* porque ayuda en la penetración de las fases sexuales de *B. bigemina* hacia el epitelio intestinal de las garrapatas (Rodríguez *et al.*, 2014). Otras proteínas de *R. microplus* propuestas como blancos vacunales son la Subolesina y BmVDAC, esta última, en ensayos de vacunación logra interferir con el desarrollo del ectoparásito, adicionalmente esta proteína está relacionada con el proceso de infección de *B. bigemina*, por lo que probablemente la vacuna interfiere con la transmisión de este patógeno (Lu *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2019).

Las vacunas anti-garrapatas deben ser eficaces en interrumpir algún estadio de desarrollo del ectoparásito y además preferiblemente interrumpir o bloquear la transmisión de patógenos que transmite. De forma general un candidato vacunal ideal contra garrapatas debe: 1) Ser inmunogénica, 2) Múltiples especies de garrapatas deben expresar proteínas homólogas altamente conservadas, 3) Los anticuerpos generados contra este antígeno deben controlar las infestaciones en la población de bovinos 4) bloquear la transmisión de los patógenos de patógenos en la garrapata vector.

Por lo anterior diversos grupos de investigación se han enfocado al estudio de proteínas claves en diferentes procesos como son la adhesión de la garrapata al huésped, alimentación y homeostasis del agua, vacunas dirigidas contra el sistema inmune innato de la garrapata, vacunas dirigidas contra la defensa de las garrapatas contra el sistema inmune del hospedero y vacunas contra la transmisión de patógenos (van Oosterwijk JG, 2020).

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología

Nuestro trabajo de tesis está centrado en el estudio de una proteína, la cual juega una función en la interacción vector-parásito (*R. microplus-B. bigemina*) y que es un potencial candidato vacunal para el control de las infestaciones por garrapatas y además la transmisión de la babesiosis bovina.

Babesiosis bovina

La babesiosis bovina es una enfermedad parasitaria causada por protozoos intraeritrocíticos del género *Babesia spp.* Esta enfermedad es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus spp.* Afecta principalmente a bovinos generando considerables pérdidas económicas en la industria ganadera. Las especies más sobresalientes son *Babesia bovis*, *Babesia divergens* y *B. bigemina*, estas especies se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales (Jacob et al., 2020; Terkawi et al., 2011).

B. bigemina y *B. bovis* corresponden a las especies más estudiadas y sobre todo prevalentes en todo el mundo, con una tasa de mortalidad en animales sin tratamiento del 30% y 70% respectivamente, estas especies se distribuyen en Asia, África, Australia, Centro y Sudamérica y Sur de Europa, la distribución de la babesiosis depende de la presencia del vector en estas regiones (Jacob et al., 2020).

La principal característica de esta enfermedad es su capacidad de lisar eritrocitos causando anemia hemolítica debido a la naturaleza de su ciclo de vida. Después de que un bovino es expuesto a *B. bigemina* los signos se presentan en un lapso de 12 a 14 días, iniciando con una temperatura mayor a 40° C, conforme la enfermedad avanza el parásito se reproduce rápidamente lisando eritrocitos y aumentando el porcentaje de parasitemia, para el caso de *B. bigemina* el porcentaje puede tener un rango de 10 % a 30 %, provocando la aparición de otros signos como, anemia hemolítica, ictericia, hemoglobinemia y hemoglobinuria, lo que provoca menor consumo de alimento, deshidratación, postración y en algunos casos la muerte del bovino (Mosqueda et al., 2012). Acoplado a la infección existe una serie de efectos a causa de la babesiosis tales como la esplenomegalia. Inflamación del hígado y vesícula biliar distendida, lo que explica la sintomatología (Yusuf J. 2017).

Clasificación

El género *Babesia spp.* pertenece al Phylum: Apicomplexa a la clase Sporozoa, subclase Piroplasmae, familia Babesiidae. Estos parásitos protozoarios se reproducen sexual y asexualmente en su vector y hospedero bovino respectivamente, además presentan un complejo apical semidesarrollado, y se alimentan por pinocitosis. El parásito *P. falciparum* por ser del phylum Apicompleza, comparte características estructurales e incluso clínicas y patológicas con *B. bigemina* y *B. bovis*, por su cercanía filogenética, a pesar de las diferencias en el tamaño de su genoma (Brayton *et al.*, 2007).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Babesia ssp.* (Figura 1 panel A) es complejo ya que depende de dos hospederos para completarlo, para el caso de *B. bovis* se requiere tanto de la garrapata como del bovino para llevar a cabo su fase sexual como asexual respectivamente. El ciclo inicia cuando un esporozoito invade un eritrocito bovino, transformándose a un trofozoíto, el cual se observa en forma de anillo, posteriormente se generan dos merozoítos a partir de un trofozoíto mediante fisión binaria, la morfología de los merozoítos hasta este punto es en forma de pera unidas entre sí por el ángulo agudo (Figura 1 panel B). Una vez que los merozoítos maduran, se separan y emergen del eritrocito, una parte de estos merozoítos que recién emergieron pueden invadir otros eritrocitos para convertirse en merozoítos de y seguir perpetuándose dentro del bovino, mientras que otros merozoítos son succionados e ingeridos por las garrapatas adultas (*R. microplus*) y continuar su ciclo de vida en el huésped invertebrado. Para que *B. Bigemina* lleve a cabo su fase sexual, se liberan de los eritrocitos las etapas sexuales dentro del intestino de la garrapata y da lugar a la formación de gametocitos, y se diferencian en gametos masculinos y femeninos, estos se fusionan para dar lugar a un cigoto (Mosqueda *et al.*, 2012).

El cigoto ya es una etapa infecciosa en la garrapata y penetra las células intestinales, una vez dentro, se forman cuerpos de fisión y posteriormente se desarrollan quinetos móviles, estos últimos destruyen las células intestinales, se infiltran a la hemolinfa, a partir de aquí se distribuyen a diferentes tipos de células y tejidos, incluyendo los ovarios, cabe destacar que al infectar los ovarios también las células embrionarias se encuentran infectadas por los quinetos y da paso a la transmisión transovárica. Cuando la garrapata oviposita sus huevos ya están infectados, una vez que la larva eclosiona y se adhiere al bovino, los quinetos migran a las glándulas salivales y forman un esporoblasto, y posteriormente se desarrollan miles de esporozoítos. Como las garrapatas se alimentan de sangre bovina, los esporozoítos se liberan con la saliva hacia el sistema circulatorio del bovino (Mosqueda *et al.*, 2012).

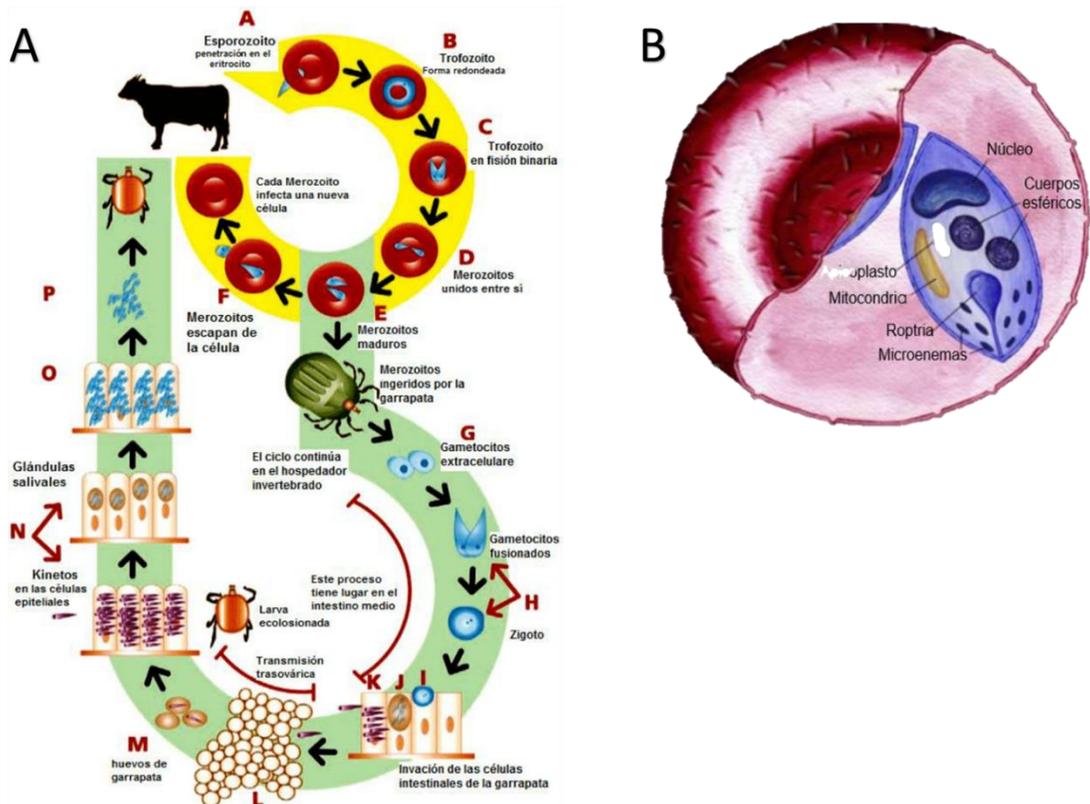


Figura 1: (A) Representación esquemática del ciclo biológico de *B. bovis*. En verde se representa el desarrollo de *B. bovis* en su fase sexual dentro de la garrapata vector. En amarillo su desarrollo asexual dentro del hospedero bovino (Mosqueda

et. al, 2012). (B) Estructura de un merozoíto de *Babesia spp.* infectando a un eritrocito donde resaltan sus estructuras apicales como las roptrias y micronemas (Gohil *et al.* 2010).

Proteínas implicadas en la infección de *B. bigemina* al eritrocito

Los parásitos del género *Babesia* durante su fase asexual utilizan una serie de proteínas específicas en el proceso de invasión a los eritrocitos, durante esta etapa se dan interacciones moleculares específicas entre los eritrocitos del hospedero y los merozoítos (Figura 2). En el caso de *B. bovis* se conocen al menos 5 glicoproteínas presentes en la superficie de los merozoítos y de los esporozoítos denominadas antígenos variables de superficie de merozoítos (VMSA), conservados en las especies de *Babesia spp.* los miembros de esta familia de proteínas nombradas como antígeno de superficie de merozoito 1 (MSA-1: 42 kDa), MSA-2a1, MSA-2a2, MSA-2b y MSA-2c, participan en la invasión del parásito al eritrocito, además se ha comprobado que anticuerpos contra los miembros de esta familia inhiben la unión de los merozoítos a los eritrocitos (Yokoyama *et al.*, 2006).

Una vez que estas proteínas se unen al eritrocito, el parásito comienza a reorientarse para que las proteínas apicales interactúen e inicie la penetración a la membrana del eritrocito. Después del contacto se propone que algunos orgánulos apicales como las roptrias y micronemas, secretan proteínas que participan en la invasión, hasta el momento se ha identificado un componente como la proteína asociado a roptria (RAP-1) de 60 kDa secretada por la roptria en el momento de la invasión, y que probablemente interactúa con glicosaminoglicanos sulfatados (GAG siglas en inglés) un ligando presente en los eritrocitos justo después de la reorientasen del parásito, RAP-1 se ha identificado en *B. bovis* en la zona apical de los merozoítos y es un antígeno detectable por inmunoensayos, porque contiene distintos epítomos capaces de generar inmunidad humoral del huésped, además está presente en esporozoítos y su estructura es conservada entre aislados de *B. bovis* (Yokoyama *et al.*, 2006).

Las otras proteínas que participan en la invasión son secretadas por los micronemas de *B. bovis*, una de estas proteínas se describe como un homólogo del antígeno de membrana apical (AMA-1) nombrada BbAMA-1 y la otra proteína es homóloga de la proteína anónima relacionada con trombospondina (TRAP) a la cual se les denominó como BbTRAP. BbAMA-1 tiene un peso molecular de 82 kDa y se localiza en la zona media apical de los merozoítos, el estudio de anticuerpos contra esta proteína mostró reducir la invasión de los merozoítos de *B. bovis* a los eritrocitos, mientras que BbTRAP se describe como una proteína transmembranal de 75 kDa, localizada en la zona apical de los merozoítos y al igual que BbAMA-1 el uso de anticuerpos reducen la invasión al eritrocito, en *P. falciparum* TRAP se une a GAG de los hepatocitos, por ello existe la posibilidad de la unión de BbTRAP con GAG de los eritrocitos del huésped (Yokoyama *et al.*, 2006).

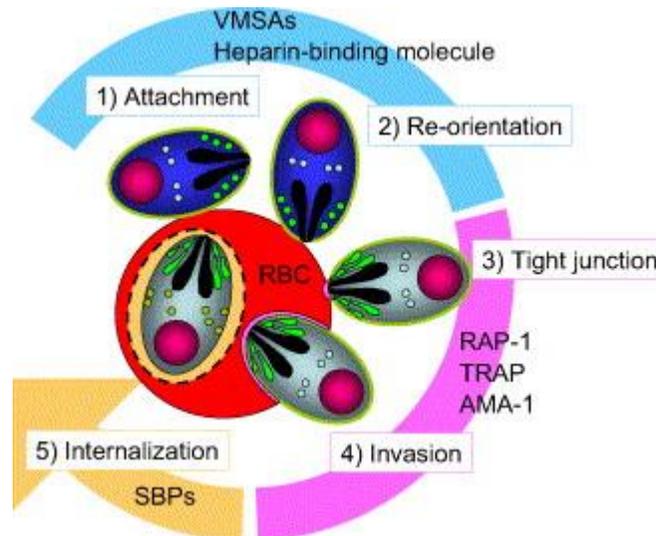


Figura 2: Proteínas que están implicadas en cada uno de los procesos de invasión al eritrocito por *B. bovis* (Yokoyama *et al.*, 2006).

Las últimas proteínas que participan en el proceso de invasión al eritrocito son secretadas por los cuerpos esféricos de *B. bovis*, este organelo está situado en la zona apical al igual que las roptrias y los micronemas, solo que interviene en el

proceso una vez que el parásito se encuentra dentro del eritrocito, en la actualidad, se han identificado tres proteínas en *B. bovis* llamadas proteínas de cuerpo esférico por sus siglas en inglés SBP-1, SBP-2 y SBP-3 las cuales tienen un peso molecular que varía de 77 a 80 kDa, hasta el momento se sabe que estas proteínas son liberadas en el citoplasma de eritrocitos infectados y debido a que poseen péptido señal probablemente estén relacionadas con la interacción de componentes membranales del eritrocito con componentes del parásito (Yokoyama *et al.*, 2006).

Diagnóstico de la babesiosis bovina

La babesiosis bovina puede ser diagnosticada por distintos métodos, uno de los más comunes es la tinción con Giemsa o con naranja de acridina que se realizan a partir de un frotis sanguíneo de un bovino que presenta sintomatología común de babesiosis, el examen microscópico de tinción Giemsa se basa en la mezcla de colorantes ácidos y básicos (azul de metileno y eosina), los cuales tiñen ácidos nucleicos junto con otras estructuras celulares de azul y hemoglobina y gránulos de eosinófilos de rosa, lo cual permite la diferenciación de los componentes de la sangre e identificación de la presencia de parásitos intracelulares como *B. bigemina*. La desventaja de este método de diagnóstico es que depende de la habilidad del analista para observar y determinar la positividad de la prueba, la prueba es poco sensible debido a que puede detectar falsos negativos (Alvarez *et al.*, 2019). Al momento de observar un frotis sanguíneo de un animal diagnosticado con babesiosis, se pueden detectar tres parásitos causantes de esta enfermedad *B. bovis* y *B. bigemina* los cuales se diferencian por tamaño y morfología, por ejemplo *B. bovis* se observa dentro del eritrocito como dos estructuras pareadas unidas (Figura 3 panel B) con un tamaño de 1 a 1.5 μm ancho y 0.5 a 1 μm de longitud, mientras que *B. bigemina* se observa igualmente en el eritrocito su merozoito en forma de pera, su tamaño varía entre 1 a 1.5 μm ancho y 3 a 3.5 μm de longitud (Figura 3 panel A) (Yusuf, J. J. 2017).

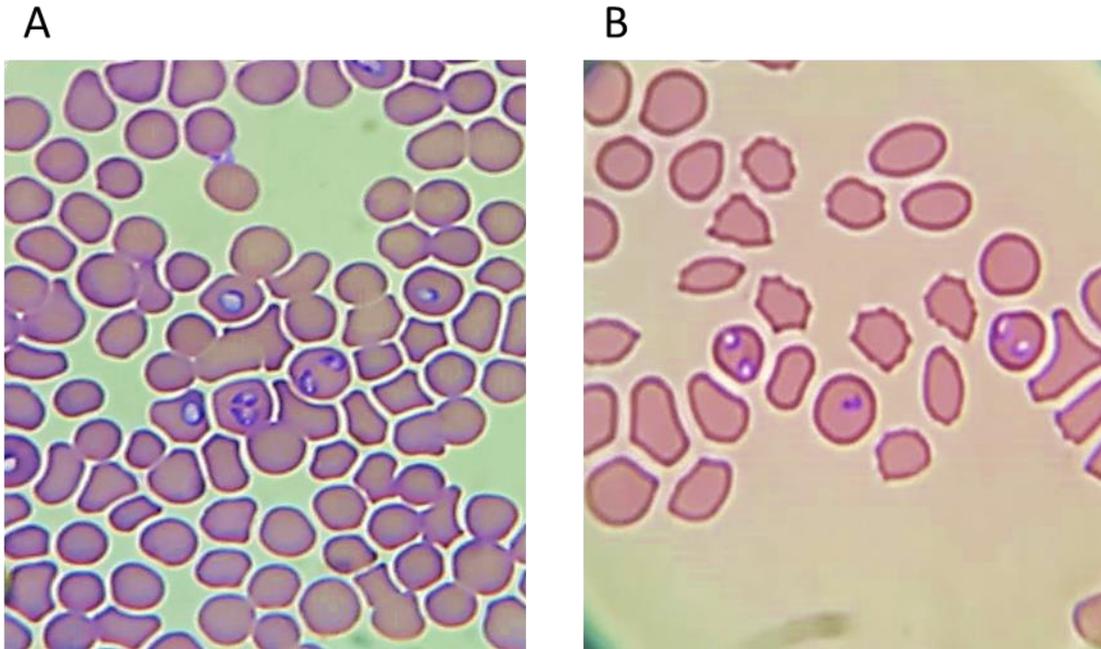


Figura 3: (A) frotis sanguíneo infectado con *B. bigemina*. (B) frotis sanguíneo con *B. bovis*. Ambas imágenes se aprecian eritrocitos infectados teñidos con colorante de Giemsa y observados en microscopio a 100x. Fotografías tomadas por MCB. Edwin Esaú Hernández Arvizu

Diagnóstico molecular

Reacción de la cadena polimerasa (PCR)

Los análisis para la detección de *B. bigemina* y *B. bovis* mediante PCR han demostrado ser una técnica más sensible y específica que detecta la presencia de estos parásitos incluso en bovinos asintomáticos, debido a que en estos animales el porcentaje de parasitemia es bajo y difícilmente pueden ser diagnosticados con un examen microscópico, el uso de esta técnica molecular puede evidenciar la presencia de Babesia ssp a partir de un bajo número de copias de ADN, detectando fragmentos cortos específicos e incluso es una técnica más rápida, aunque una desventaja es que en algunos casos la prueba es poco específica por consiguiente el PCR convencional se utiliza principalmente para el diagnóstico de la babesiosis,

para este caso si se busca especificidad del agente causal, generalmente se secuencia el amplicón obtenido de esta prueba (Chaudhry *et al.*, 2010).

La PCR anidada ha demostrado ser una prueba más específica, que elimina el ruido de fondo de la amplificación de la PCR convencional, en esta prueba se utilizan dos pares de cebadores y dos rondas de reacción de PCR, donde el producto de amplificación de la primera reacción se utiliza como DNA molde para la segunda reacción con el segundo par de cebadores, aumentando la sensibilidad de detección, la desventaja es que el analista requiere conocimientos fundamentales de esta prueba y los equipos e insumos que se requieren suelen tener un costo elevado (Ganzinelli *et al.*, 2020).

ELISA

La detección serológica de la babesiosis se encuentra dentro de los métodos de detección indirecta, el examen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) denominado así por sus siglas en ingles es un examen de diagnóstico que detecta antígenos o anticuerpos en el caso de la babesiosis, inicialmente se utilizaba como antígeno fracciones de merozoitos o se usaba la detección de anticuerpos contra *B. bigemina* y *B. bovis*, el problema de este método es que existe reacción cruzada entre estos dos parásitos por lo tanto su especificidad es menor y es una buena prueba para diagnosticar la babesiosis pero no para determinar la especie del parásito que la causa, aparte el titulo alto de anticuerpos no necesariamente evidencia una infección activa (Álvarez *et al.*, 2019). Por ello existen pruebas ELISA específicas de antígenos tanto de *B. bigemina* como de *B. bovis* que son específicas y no generan reacción cruzada entre parásitos de este género, teniendo en cuenta que los epítomos utilizados son diferentes para cada uno de estos parásitos, por ejemplo AMA-1 un antígeno de superficie de *B. bigemina* se ha propuesto como un antígeno candidato para pruebas de diagnóstico ya que se comprobó que es un antígeno inmunogénico que puede ser reconocido por anticuerpos contra *B. bigemina* (Torina *et al.*, 2016).

Control de la Babesiosis bovina

En la actualidad los métodos de control propuestos están dirigidos al bloqueo del ciclo de vida de *B. bigemina* para lo cual se han implementado fármacos como tratamiento quimio terapéutico, vacunación y el control del vector.

La eficacia de los tratamientos depende de un diagnóstico oportuno y de la administración necesaria de dosis específicas, en áreas endémicas se administran fármacos antiparasitarios como profilácticos a animales expuestos a la babesiosis, es importante medicar a los bovinos antes de que la babesiosis genere anemia severa, debido a que pone en riesgo la vida del animal. Los fármacos más comunes administrados a bovinos diagnosticados con babesiosis son el imidocarb y el aceturato de diminazeno (Mosqueda *et al.*, 2012).

El imidocarb es un fármaco derivado de carbanilida, utilizado por su efecto anti protozario ya que elimina por periodos prolongados a los parásitos del huésped, inclusive en bovinos no infectados pero expuestos se les dosifica este fármaco porque les confiere protección contra el parásito semanas después de la aplicación. El mecanismo de acción hasta el momento se desconoce, no obstante, se han propuesto dos mecanismos que justifican su efectividad como la interferencia o utilización de poliaminas que conlleva a la inhibición del ingreso al inositol de los eritrocitos, el otro mecanismo es la inhibición de la glucólisis y de la síntesis de ácidos nucleicos del parásito ya que se bloquea la síntesis de purinas y pirimidinas, lo que culmina en la degeneración estructural del parásito (Checa *et al.*, 2017)

El efecto de larga duración del imidocarb ayuda a la exposición del parásito con el sistema inmune del bovino y a la generación de anticuerpos, a pesar de ello se ha reportado el almacenamiento de imidocarb en productos de consumo como carne y leche debido a una baja tasa de eliminación e interacción con componentes nucleares de hepatocitos acumulándose en el núcleo de estas células (Mosqueda *et al.*, 2012).

El Aceturato de diminazeno es un fármaco derivado del Surfen, este agente es principalmente anti-tripanosómico y ha sido utilizado para el tratamiento de la babesiosis bovina, la acción de este fármaco se basa en inhibición de la glicólisis y en la unión irreversible con el ADN de doble cadena del cinetoplasto, en sitios ricos de adenina y timina, alterando la replicación y fusión del cinetoplasto, inclusive inhibe la topoisomerasa II mitocondrial, la única desventaja es que no confiere protección duradera y funciona bien con *B. bigemina* pero es menos efectivo con *B. bigemina* (Mosqueda *et al.*, 2012).

Vacunas contra *B. bigemina* para el bloqueo de la transmisión

Uno de los métodos alternativos para disminuir la transmisión de la babesiosis bovina son las vacunas, las cuales van principalmente dirigidas a bloquear algún paso determinante en el ciclo de vida del parásito. En el bovino las especies de *Babesia* pasan por una etapa extracelular en la que son vulnerables a los componentes inmunológicos del bovino, por ello se han explorado vacunas con parásitos vivos atenuados o muertos de *B. bigemina* y *B. bovis*.

En México se utilizan vacunas atenuadas a base de una cepa de *B. bigemina* denominada "BIS", para la cual se utilizan distintos métodos de atenuación como pases continuos del cultivo *in vitro*, se ha visto que este procedimiento no genera cambios en los hematocritos de los bovinos inoculados y los anticuerpos confieren protección a la exposición con garrapatas infectadas. El otro método de atenuación es irradiación, se ha visto que esta manera de atenuación reduce la población de patógenos quedando un alto porcentaje de parásitos con baja virulencia, cabe señalar que los mismos procedimientos se han llevado a cabo con *B. bovis* con la cepa denominada "BOR", la ventaja de estas vacunas radica en su bajo riesgo de contaminación por otros patógenos, la suspensión inoculada tiene un alto porcentaje de parasitemia por lo cual es altamente inmunogénica. Una de las

desventajas de estas vacunas es la reversión de la virulencia de estos parásitos en algunos bovinos viejos (Rojas Ramírez *et al.*, 2011).

Los nuevos candidatos vacunales tienen como objetivo controlar el desarrollo de la babesiosis bovina, así como su transmisión por ejemplo la proteína BbiKSP se expresa en los quinetos de *B. bigemina* en su etapa sexual, tomando en cuenta que *B. bigemina* no es el único agente causal de la babesiosis bovina los blancos vacunales deben de ser conservados entre las distintas especies de *Babesia* (Bohaliga *et al.*, 2019).

Otros candidatos vacunales se encuentran en la superficie de merozoitos, como son las proteínas implicadas en el proceso de invasión al eritrocito descritas anteriormente llamadas MSA-2c, RAP-1 y AMA-1, estas proteínas han sido blancos antigénicos para el desarrollo de vacunas, aunque aún hace falta evaluar su eficacia ya que no todos los blancos vacunales logran inducir una inmunidad protectora contra esta enfermedad (Yokoyama *et al.*, 2006).

En la Tabla 1 se ejemplifican algunos de los blancos vacúnales propuestos que pueden generar efectos protectores en contra de la infección por este parásito.

Tabla 1: Blancos vacúnales propuestos contra *B. bigemina*

Candidato vacunal	Estadio	Referencia
BbiKSP	Proteína presente en Quinetos de <i>B. bigemina</i> (fase infectiva en las garrapatas) candidato para el bloqueo de la transmisión transovárica	(Bohaliga <i>et al.</i> , 2019)
RmVgR (receptor de vitelogenina)	El silenciamiento de este gen interfiere con la transmisión transovárica de <i>B. bigemina</i> y afecta el desarrollo de los	(Hussein <i>et al.</i> , 2019)

	ovocitos y la maduración de los huevos de garrapata.	
AMA-1	Reducción del pico de parasitemia, y en el proceso de invasión de los merozoitos a eritrocitos.	(AbouLaila <i>et al.</i> , 2019)
GP-45	Glicoproteína que se encuentra en la membrana del eritrocito, no se ha probado su efecto como antígeno blanco vacunal	(Fisher <i>et al.</i> , 2016)

Control del vector transmisor.

La implementación del control de las garrapatas es una de las medidas que se han tomado para el control de la Babesiosis bovina. *R. microplus* es uno de los principales vectores transmisores de esta enfermedad y un hospedero vital para el desarrollo de este parásito, por lo que las medidas de control en México están dirigidas fundamentalmente a esta especie de garrapata y consisten en el control químico, biológico y vacunal, los cuales se describen más adelante.

R. microplus

Las garrapatas de la especie *R. microplus* son ectoparásitos hematófagos de gran importancia para la industria ganadera, la picadura de esta garrapata causa daños en la piel, favoreciendo la inflamación local, dañando la calidad del cuero, también afecta a la ganancia de peso de los animales, lo que deriva en una carente calidad en la obtención de productos de bovino como la leche y carne. Al mismo tiempo la infestación por *R. microplus* también conlleva a la transmisión de enfermedades infecciosas como ya se describió anteriormente (Tabor *et al.*, 2017).

Distribución geográfica

R. microplus se encuentra distribuida en América Latina, Medio Oriente, Asia, África oriental y Sudáfrica, está presente principalmente en regiones tropicales y subtropicales, en el continente africano *R. microplus* se encuentra establecida a lo largo de las costas del Sur y Este de África de las provincias del Cabo Occidental y Oriental hasta las regiones de la costa de Mozambique Tanzania (Lynen *et al.*, 2008).

México ocupa el séptimo lugar en países productores de ganado, tan sólo en el 2014 se reportó que hubo una producción de 28.4 millones de cabezas de bovinos a nivel nacional, por ello infecciones parasitarias significan una desventaja para la industria de producción de ganado por el efecto que estas puedan tener en la obtención de productos derivados de los bovinos. Los estados que encabezan la producción de ganado son Veracruz, Jalisco y Chihuahua, donde las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo del vector *R. microplus* (Narciso *et al.*, 2013; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

Movilidad y exportación

La presencia de *R. microplus* afecta económicamente a la ganadería mexicana debido a que los bovinos infestados de garrapatas no pueden ser exportados a otros países, lo que provoca la pérdida considerable de 700 millones de dólares anualmente, los lineamientos de exportación internacional decretan que los bovinos deben de llegar libres de todo tipo de garrapatas a los puertos fronterizos con Estados Unidos de América (EUA). En este punto, aquellos bovinos infestados de garrapatas son puestos en cuarentena, tan sólo en el 2019 se registró un total de 419 lotes de bovinos en cuarentena a causa de la presencia de garrapatas (González Sáenz Pardo *et al.*, 2012).

A nivel nacional, si se detecta la presencia de garrapatas en zonas de México que se encuentran libres de garrapatas, los bovinos infestados son puestos en

cuarentena hasta que se confirme la ausencia de *R. microplus*. Aunque cabe destacar que la movilización nacional del ganado dentro de una misma área geográfica con un esquema de distribución de *R. microplus* similar o igual, será libre sin ninguna restricción. Las medidas de erradicación de esta garrapata están dirigidas principalmente a aquellas zonas donde es ecológicamente posible, ya que en las zonas tropicales y subtropicales es complicada o imposible la erradicación porque las condiciones climáticas benefician al ectoparásito (Panorama nacional de garrapata *Boophilus spp*, SENASICA, 2021).

Panorama actual en México de *R. microplus*

En México el género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) spp. se encuentra presente en el 69.4 % del territorio nacional esto según datos publicados por SENASICA el 23 junio del 2021, en el territorio restante lo que corresponde a los estados del norte, donde se encuentra erradicada, en general su distribución responde a factores ambientales como la humedad, temperatura, vegetación y sobre todo la presencia de su hospedero vertebrado (Figura 4).

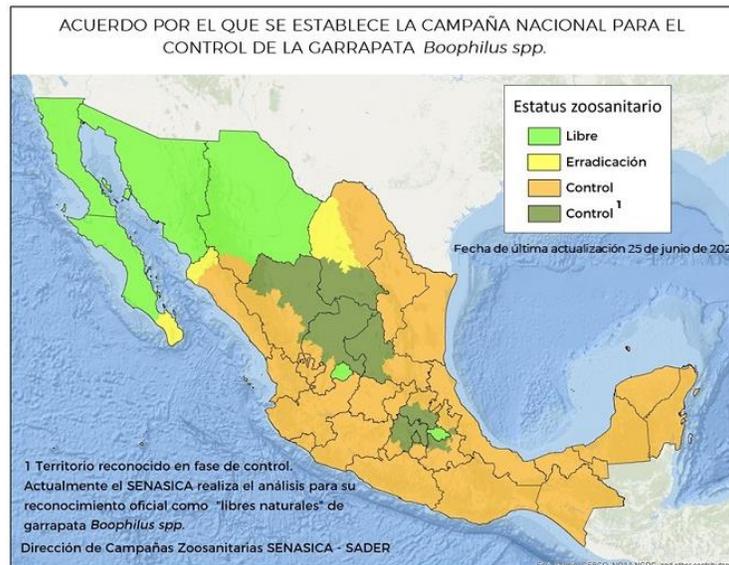


Figura 4: Distribución de las garrapatas del género *Boophilus spp.* en México (SENASICA 2021).

En particular la especie *R. microplus* está presente en el 53 % del territorio nacional y es una de las especies de garrapatas a la que van principalmente dirigidas las medidas de control por su impacto económico en la industria ganadera, ya que la presencia de este ectoparásito afecta la movilización y comercialización de los bovinos (Lynen *et al.*, 2008). En la figura 5, se muestra un mapa de la distribución de esta especie de garrapatas en México.



Figura 5: Distribución de *R. microplus* en México (SAGARPA, SENASICA 2011).

Taxonomía

R. microplus es una de las especies de garrapatas más importantes para el ganado bovino, anteriormente se clasificaban para *R. (Boophilus) microplus* y *R. (Boophilus) australis* en la misma especie, pero la evidencia reciente afirma el establecimiento de estas garrapatas como dos especies distintas debido a diferencias moleculares y morfológicas (Berry, 2017).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Tabla 1: Clasificación taxonómica

Reino	Anima
Phylum	Artropoda
Sub-Phylum	Chelicera
Clase	Aracnida
Grupo	Parasitiforme
Orden	Acarina
Sub-orden	Ixodoidea (garrapatas duras)
Familia	Ixodidae
Género	Rhipicephalus

Morfología

R. microplus pertenece a la familia Ixodidae que son garrapatas duras, las hembras poseen un escudo dorsal llamado scutum con forma ovalada siendo más ancho en la porción posterior y un aparato bucal llamado capitulum, el cual tiene una forma hexagonal y los pedipalpos son comprimidos de pequeño tamaño. Los machos son menos ovalados, tienen placas adanales y accesorias, con surco anal ausente en hembras, pero en los machos es definido y visible (Figura 6). Una característica de estas garrapatas es la ausencia de festones y ornamentos; las patas de esta especie son amarillentas, con una separación significativa entre el primer par de patas delanteras y el hipostoma, este último es corto y derecho (Walker *et al.*, 2003).

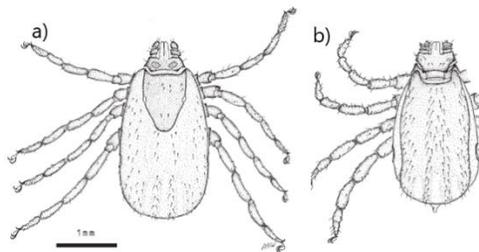


Figura 6: Características morfológicas de la garrapata *R. microplus* (a) se muestra una garrapata hembra, (b) garrapata macho de la misma especie (Walker *et al.*, 2003).

Ciclo de vida

Una de las características de estas garrapatas es que pueden llevar a cabo todos sus estadios en un solo hospedero desarrollándose principalmente en bovinos, aunque también puede encontrarse en animales domésticos y salvajes (Brites-Neto *et al.*, 2015).

El ciclo de vida de estas garrapatas se compone de 7 etapas, adulto en preovoposición, adulto en ovoposición, huevos en incubación, larva buscadora, larva adherida a hospedero, ninfa y adulto. Una vez que las garrapatas adultas están listas para la ovoposición, caen al suelo para soltar los huevos y mueren, posteriormente nace una larva, la cual migra a la zona apical de la vegetación hasta encontrar un hospedero adecuado, las larvas en este estadio pueden sobrevivir hasta 15 días, una vez que las larvas se establecen en el hospedero, maduran a sus tres etapas de larva, ninfa y adulto (Figura 7). En estos últimos tres estadios, *R. microplus* es un parásito hematófago, excepto los machos adultos, justo en su estadio hematófago es cuando las garrapatas pueden transmitir las enfermedades anteriormente mencionadas (Leal *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2020).

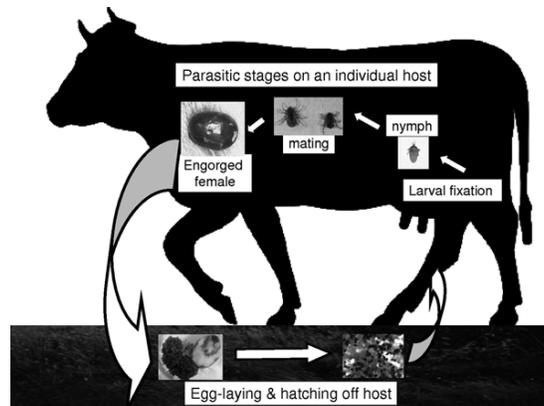


Figura 7: Ciclo de vida de *R. microplus*, se observa que la mayoría de sus estadios se llevan a cabo en su huésped (Chevillon *et al.*, 2012).

Control de *R. microplus*

Los métodos de control actual se basan en interrupción del ciclo de vida de *R. microplus* los cuales incluyen métodos químicos como biológicos y también existen candidatos vacunales que pretenden interferir con el desarrollo del vector de *B. bigemina* (Solorio-Rivera *et al.*, 1997).

Los métodos químicos para el control del vector *R. microplus* son la inmersión, aspersión y derrame dorsal con acaricidas organofosforados o piretroides un ejemplo de los acaricidas son cipermetrina y deltametrina, los cuales combaten eficazmente la infestación por garrapatas, sin embargo el uso inadecuado y frecuente puede conllevar a la generación de poblaciones de garrapatas resistentes a los acaricidas, también el uso de estos químicos se ha asociado con la disminución de la diversidad y abundancia de escarabajos estercoleros (Rodríguez *et al.*, 2014).

La cipermetrina es un insecticida piretroide sintético utilizado en la industria ganadera para el control de garrapatas por su baja toxicidad para los mamíferos, este fármaco actúa manteniendo la apertura de los canales de sodio en axones, provocando que los iones de sodio y potasio interactúen, lo que provoca una desregulación del impulso eléctrico dentro de las neuronas ya que genera hiper excitación, a causa de esto se crea agotamiento celular y muscular, culminando en parálisis y muerte del insecto. El uso de este insecticida ha aumentado en los últimos años por su efectividad contra garrapatas, sin embargo, la poca especificidad del producto afecta otras poblaciones de insectos como abejas e incluso peces o fauna acuática (Rodríguez *et al.*, 2014; Paravani *et al.*, 2019)

La ivermectina es un fármaco que pertenece al grupo de lactonas macrocíclicas derivadas de avermectina, utilizado como acaricida y antihelmíntico por lo tanto es suministrado al bovino para el tratamiento de la infestación por *R. microplus*. La

ivermectina actúa paralizando al patógeno provocando su muerte, por el efecto que tiene en células musculares y nerviosas, como consecuencia de la liberación de un exceso de ácido gamma-aminobutírico (GABA) conduciendo a un bloqueo de receptores en terminaciones nerviosas, también estimula la apertura de canales de cloro y la hiperpolarización neuronal, lo que culmina en la muerte del parásito por parálisis (Piper *et al.*, 2009).

Otros métodos de control consisten en la introducción de hospederos resistentes como la especie de bovinos *Bos indicus*, en algunas zonas tropicales que es donde abunda el vector, se ha sustituido el hospedero susceptible *Bos tauros*, por *B. indicus*, el cual probablemente debe su resistencia a la capacidad de generar una respuesta inmune protectora contra las garrapatas, aunque su resistencia puede variar incluso en miembros de la misma raza (Piper *et al.*, 2009).

Los procesos no químicos que ayudan a controlar la propagación de *R. microplus*, el control biológico es una alternativa que utiliza depredadores naturales o patógenos que se enfocan en reducir las poblaciones de otro organismo en específico, este utiliza organismos como hormigas, bacterias, hongos entomopatógenos, de los cuales se conoce su eficacia en el control de ectoparásitos. Por ejemplo, se ha comprobado la eficacia de hongos como *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* para regular las poblaciones de *R. microplus* evitando el uso de químicos reduciendo la generación de resistencia de las garrapatas y el impacto ambiental que el uso de estos químicos tiene (Ojeda-chi *et al* 2011).

Resistencia a tratamientos

El uso habitual de acaricidas para controlar las infestaciones por *R. microplus* en bovinos ha dado como resultado el desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes a los acaricidas comunes como el Amitraz y cipermetrina, por lo regular la aplicación de estos químicos consiste en la inmersión en volúmenes altos de

estos químicos, aspersion o por inyección. Rodríguez-Vivas y colaboradores definen la resistencia como “una característica heredada en una población de garrapatas seleccionado como resultado del contacto de la población con un acaricida, lo que da como resultado, un aumento en la población que sobrevive después de la exposición a una determinada concentración a es acaricida”, existen reportes de poblaciones de garrapatas que resistentes a una dosis letal de acaricidas en comparación de un grupo de garrapatas susceptibles (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

Los cambios genotípicos que se han encontrado en poblaciones resistentes de *R. microplus*, consisten en una mutación en la secuencia de un gen que codifica a un canal de sodio, esta mutación tiene como consecuencia el cambio del aminoácido fenilalanina por Isoleucina en un dominio conservado de este canal de sodio, mutaciones similares se han encontrado en distintas proteínas, estas mutaciones probablemente son responsables de la resistencia a los químicos utilizados para el control de *R. microplus* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

En el 2012 Fernández-Salas y colaboradores reportaron la resistencia a Amitraz y cipermetrina en poblaciones de *R. microplus* colectadas de distintas localidades de Veracruz donde había fincas ganaderas, ellos encontraron que el 90.6 % de garrapatas fueron resistentes a la cipermetrina, mientras que 54.7 % fue resistente al Amitraz, y el 47.2 % fueron resistentes a ambos acaricidas, esto probablemente se debe a la frecuencia con la que estos químicos se aplican ya que en estas zonas los ganaderos aplican más de 10 veces al año y a causa de esto es importante la búsqueda de métodos de control efectivos y no químicos que no generen resistencia en garrapatas y ayuden al control de *R. microplus* (Fernández-Salas *et al.*, 2012)

Vacunas y candidatos vacunales para el control de *R. microplus*

Las vacunas recientemente han sido uno de los candidatos más destacados para el control de *R. microplus*, aunque actualmente existen dos vacunas comerciales

contra garrapatas llamadas Ixovac y Tick Gard, estas vacunas están diseñadas para reconocer al antígeno Bm86, esta proteína presente en las células del intestino de la garrapatas, la cual es una glicoproteína de membrana expresada mayormente en la superficie del tracto digestivo de las hembras de *R. microplus*, participa en el proceso de endocitosis de *B. bigemina*. Por la similitud de sus dominios con el factor de crecimiento epidérmico o EGF por sus siglas en inglés, se piensa que puede estar involucrada en la coagulación de la sangre y crecimiento celular, por lo tanto, es un blanco vacunal para controlar la infestación de garrapatas y la transmisión de la Babesiosis (Bastos *et al.*, 2010).

En México se aplica la vacuna Ixovac, la cual está hecha con antígenos recombinantes de Bm86, su aplicación reduce la infestación por garrapatas, la vacuna genera una respuesta inmune en el bovino que posterior a una infestación por *R. microplus*, afecta la repleción de las garrapatas y su reproducción, aquellas hembras que se repletan tienen menor porcentaje de ovoposición y las larvas eclosionadas reducen su viabilidad (Quintanilla *et al.*, 2020).

Los anticuerpos anti-Bm86 se unen al antígeno presente en la superficie de células epiteliales del intestino de la garrapata, aunque también se encuentra en huevos, larvas, linfas, machos y hembras, la consecuencia de esta unión es el bloqueo de la endocitosis, promoviendo la lisis de estas células interrumpiendo el ciclo de vida de la garrapata y su desarrollo, aunque lamentablemente su acción no es inmediata debido a que tarda en matar al vector (Rodríguez *et al.*, 2014).

La Subolesina es una proteína citoplasmática que se encuentra en células del intestino de garrapatas, estudios sugieren que esta proteína puede ser un blanco vacunal eficaz para la interrupción de la propagación del vector, estudios con ARNi de Subolesina demostraron una reducción en la infestación de *R. microplus* junto con una baja en la ovoposición y alimentación, lo que se reflejó en el peso, por otro lado, la vacuna anti-Subolesina tuvo como efecto la disminución de la tasa de infestación y la ovoposición (Lu *et al.*, 2016).

Las vacunas a base de proteínas recombinantes han sido una táctica adicional para el control inmunológico de las garrapatas, el uso de más de un blanco antigénico probablemente tiene una mayor eficacia que las vacunas de un solo antígeno. Parizi y colaboradores proponen una vacuna multiantigénica dirigida contra cisteína endopeptidasa degradante de vitelina (VTDCE) y procatepsinade yema boófilo (BYC) antígenos de *R. microplus* y Glutathion S-Transferasa de *Haemaphysalis longicornis*, este grupo de investigación reporta títulos de anticuerpos en bovinos inmunizados de cada una de las proteína, en cuanto a la infestación experimental se observó una disminución en la presencia de hembras semi-repletas en comparación al control y la disminución de la infestación correlaciono con la ganancia de peso en bovinos inmunizados (Parizi *et al.*, 2012).

De manera similar, la vacunación contra antígenos conjuntos de Bm86 y subolesina ha mostrado correlación entre los títulos de anticuerpos y la disminución en la infestación por garrapatas, de forma independiente los anticuerpos anti-Bm86 interfieren con la alimentación de las garrapatas y probablemente la ingurgitación de las garrapatas, mientras que los anticuerpos anti-subolesina solos no muestran cambios en la alimentación o infestación. Estos antígenos juntos tienen un efecto sinérgico, juntos reducen hasta un 67% la alimentación de las garrapatas probablemente es porque aumentan el daño a las células epiteliales (Trentelman *et al.*, 2019).

Proteínas de *R. microplus* que interactúan con *B. bigemina*

El estudio de las interacciones entre hospedero y huésped son de vital importancia para la búsqueda de candidatos vacunales como medida de control, hasta el momento se han identificado algunos componentes de la garrapata *R. microplus* que están implicados en la interacción con *Babesia spp.* esta interacción inicia cuando las garrapatas se alimentan de un bovino infectado con *Babesia*, los eritrocitos infectados llegan al intestino medio de la garrapata y *Babesia* comienza

con cambios conformacionales que dan pie a gametocitos, posteriormente iniciando la formación del cigoto, en esta fase *Babesia* expresa proteínas como glicosilfosfatidilinositol (GPI), el cual interactúa con ligandos presentes en células epiteliales. *Bm86* es una proteína presente en la membrana del epitelio del intestino medio identificada en *R. microplus*, que interactúa con *B. bigemina*, ayudando a la endocitosis del parásito, la ausencia de *Bm86* tiene impacto en la reducción de la infección y transmisión transovárica de *Babesia* (Antunes *et al.*, 2017).

La proteína TROSPA fue descrita en *Ixodes scapularis* como un receptor y regulador de infecciones bacterianas, en *R. annulatus* se encontró un ortólogo del gen *TROSPA*, además se observó la sobreexpresión del gen durante la infección por *B. bigemina*, por ello se piensa esta proteína interactúa con cigotos de *Babesia*. En *R. microplus* la delección de este gen redujo en un 70 % los niveles de infección por *B. bigemina*, el mismo efecto se observó en *R. annulatus* con una reducción de la infección del 83 %, adicionalmente en *R. annulatus* se evidenció la presencia de esta proteína en glándulas salivales y Ovarios. Posterior al cambio de *B. bigemina* de cigoto a quinetos, los cuales interactúan con *BmVDAC* una proteína descrita como una porina mitocondrial que interactúa con fases sexuales de *B. bigemina* aunado a la capacidad de *VDAC* de unirse a un inductor de plasminógeno tisular y probablemente ayuda al paso *B. bigemina* a hemolinfa. Otra proteína presente en el intestino medio de garrapatas es la Subolesina, hasta el momento se ha correlacionado el silenciamiento de esta proteína en *R. microplus* con una reducción en la infección por *B. bigemina* (Antunes *et al.*, 2017).

Durante el proceso de invasión a *R. microplus*, *B. bigemina* debe de enfrentarse a las respuestas inmunitarias innatas de la garrapata como defensinas, longicina, péptidos antimicrobianos como microplusina, aquellos parásitos que logran evadir la defensa de la garrapata migran a hemolinfa y posteriormente a glándulas salivales y ovarios (Antunes *et al.*, 2017).

En las células del intestino, *Babesia* se transforma a su fase móvil de oocinetos, la cual perfora las células intestinales para invadir los otros tejidos como ovarios y glándulas salivales, en los ovarios es donde logra infectar a los huevos de garrapatas. En un estudio proteómico de *R. microplus* infectado con *B. bovis*, se observó la expresión al alza de calreticulina, la glutamina sintetasa y una familia de inhibidores de la serina proteasa mientras que proteínas como lisozimas y péptidos antimicrobianos se encontraban menos expresados, estas proteínas probablemente están reguladas por algún componente del parásito. El receptor de vitelogenina está relacionado con la transmisión transovárica, estudios en *Haemaphysalis longicornis* reportaron que la ausencia de este receptor interrumpe la infección de *B. gibsoni*, *Babesia* tiene ligandos de unión a este receptor lo ayuda a la invasión al ovocito. En las glándulas salivales, se han descrito proteínas que probablemente están involucradas en la infección con *B. bigemina* como la proteína amiloide sérica A, se ha visto que la ausencia del gen que codifica a esa proteína logra reducir hasta un 66 % la infección de *B. bigemina* en *R. microplus*. Otra proteína es la calreticulina, aunque su papel en la infección con *Babesia* no está claro del todo, se piensa que la regulación de calcio por esta proteína probablemente favorece la infección de *Babesia*. Por último, se ha reportado que TROSPA funciona como receptor en glándulas salivales para los parásitos.

Proteínas de importancia en *R. microplus* como candidatos vacunales

La adhesión de las garrapatas al huésped bovino está regulada por una serie de proteínas específicas determinantes para la infestación, las garrapatas secretan una proteína llamada 64P, mayormente conocida como proteína de cemento (15 KDa) sus funciones son anclarse a la piel del huésped y mantener un canal de alimentación, su estructura es similar a la de la queratina y colágeno (Havlíková, S *et al.*, 2009). En animales inmunizados con la proteína recombinante de 64P, se observó la interrupción de la alimentación de garrapatas de *Rhipicephalus*

appendiculatus adicionalmente la inmunización tuvo reacción cruzada con *Ixodes ricinus* donde tuvo como efecto la interrupción de la alimentación, también generó el desprendimiento de las garrapatas, de esta manera se interrumpe el desarrollo y propagación (Rego *et al.*, 2019).

La saliva de la garrapata contiene compuestos vasodilatadores, anticoagulantes y antiinflamatorios, así como antihistamínicos e Inmunomoduladores los cuales inhiben la unión de células NK a su blanco, producción de interferón tipo I y supresión de la activación del complemento, adicionalmente las proteínas presentes en la saliva tienen un papel fundamental en el metabolismo de hierro y agua en la garrapata, por ello, se han estudiado los candidatos vacunales relacionados con la salivación en garrapatas. El 75 % del agua ingerida por la garrapata, es devuelta al huésped mediante proteínas de membrana llamadas acuaporinas, la inhibición de la función de estas proteínas, afecta a la alimentación de la garrapata por lo tanto interrumpe el desarrollo de los estadios y la transmisión de patógenos. Una vacuna recombinante con antígenos de acuaporinas utilizada en *R. microplus*, tuvo mayor eficacia en terneros infectados con *B. bovis* y se observó una reducción del 68 % de garrapatas que se alimentaban, por último, esta vacuna mostró reacción cruzada con *R. sanguineus*, *I. ricinus* y *Ornithodoros erraticus*.

El proceso de la infección de *B. bigemina* en las garrapatas, implica una interacción con componentes específicos presentes en el intestino de la garrapata entre otros órganos, las moléculas implicadas en este proceso son objeto de estudio debido que pueden ser determinantes en la infección e interacción con este parásito. Inicialmente *B. bigemina* debe de interactuar con moléculas presentes en las células que componen el intestino de la garrapata, ayudando al reconocimiento y la adhesión (Bastos *et al.*, 2010).

La subolesina es una proteína conservada en varios géneros de garrapatas, se expresa en los distintos estadios de la garrapata y en tejidos como intestino, glándulas salivales y ovarios, Además se ha demostrado que el bloqueo mediante

ARNi, causa esterilidad en garrapatas junto con la degeneración de tejidos en los que esta proteína está presente, por ello se le considera un buen candidato antigénico capaz controlar las poblaciones de garrapatas y a los patógenos que transmiten (Merino-Charrez *et al.*, 20019).

Otra proteína que se ha estudiado como candidato vacunal es BmVDAC, que fue identificada por nuestro grupo de investigación en ensayos de overlay utilizando fases sexuales de *B. bigemina* inducidas in vitro y marcadas con biotina sobre proteínas de intestinos de *R. microplus* corridas en geles 2D. En la figura 8 se muestran los resultados del overlay en 2D (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012).

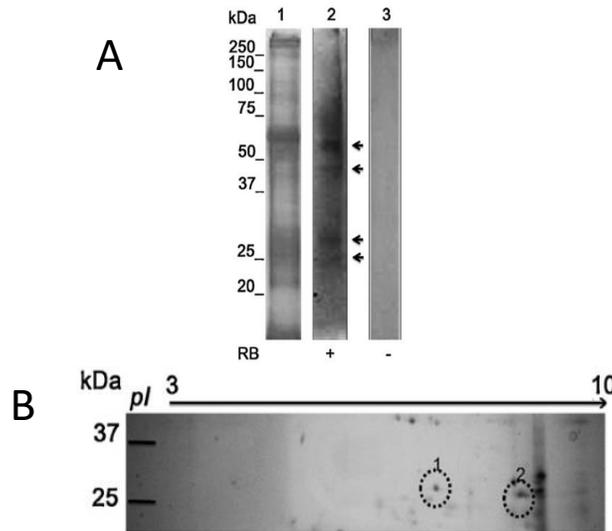


Figura 8: En el panel “A” se muestra (1) SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 12 % con extracto de proteínas totales de intestino de garrapatas, (2) membrana de nitrocelulosa que muestra la interacción de las proteínas totales de intestino de *R. microplus* con las fases sexuales de *B. bigemina*, se observan bandas con un peso de 24 a 60 KDa, (3) control negativo sin bandas de interacción. El panel “B” muestra los spots resultados del “2D overlay”, los puntos señalados 1 y 2 se analizaron por espectrometría de masas (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012).

Los resultados de espectrometría de masas del spot 2 (figura 9) identificó una proteína de *B. microplus* con un 33% de identidad con VDAC de *I. scapularis*, con

esta información se diseñaron oligos para amplificar y secuenciar el gen en *R. microplus*, este estudio describe por primera vez a BmVDAC y su posible papel en la infección de *B. bigemina* (Rodríguez-Hernández et al., 2012).

Características de VDAC

Los primeros reportes del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en protozoos fueron realizados por SJ Schein y colaboradores quienes identificaron esta proteína en la membrana mitocondrial externa de *Paramecium Aurelia* (Schein et al., 1976). Posteriormente se comenzaron a identificar proteínas con características similares en las mitocondrias de múltiples organismos eucariontes, estas características coincidían tanto estructurales como funcionalmente, son muy abundantes en las mitocondrias y se encuentran mediando el intercambio metabólico entre la mitocondria y el citoplasma (Young et al., 2007).

VDAC es una proteína que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria, algunas Isoformas están presentes en varios organismos como plantas, hongos, bacterias, protozoos y humanos, esta proteína tiene un peso molecular de 30 a 35 KDa, está formado por una hélice alfa, acompañada de 13 plegamientos beta transmembranales, el dominio N-terminal se encuentra en el lumen de la porina. Este poro tiene de 2.5 a 3 nm de diámetro (Bayrhuber et al., 2008). VDAC funge como una vía importante en el transporte de aniones, cationes, moléculas de ATP y metabolitos dentro y fuera de la mitocondria, aunado a esto tiene un papel fundamental en la regulación fisiológica mitocondrial debido a su participación en la muerte celular programada (Shoshan-Barmatz et al., 2003).

En cuanto a la dependencia de voltaje, se ha descrito que VDAC a tensiones menores a 10 mV el canal se encuentra en su estado de conducción más alta, con una apertura de larga duración y presenta selectividad a aniones sobre cationes, mientras que a voltajes mayores a 40 mV el canal pasa a un estado de conducción más bajo con diferentes estados de permeabilidad y selectividad a los cationes sobre aniones, la variabilidad en los cambios de voltaje de VDAC permite el paso y

el control del flujo a través de la membrana externa haciendo la selectiva a iones pequeños como Cl^- , K^+ , Na^+ , y aniones grandes como el glutamato y ATP, también regula el paso de aniones como la acetilcolina y dopamina (Gincel *et al.*, 2000).

VDAC y su papel en la Apoptosis celular

La mitocondria juega un papel importante en la regulación de la energía y metabolitos sustanciales para la célula, junto con la activación de la muerte celular. Cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial puede tener como respuesta la liberación de factores promotores de apoptosis, este proceso implica una serie de eventos controlados que consisten en la conservación de la integridad de la membrana celular, la condensación y fragmentación del ADN y la principal característica de este proceso es que depende de caspasas (Yan *et al.*, 2020).

VDAC está relacionado con la liberación de factores pro apoptóticos, esta proteína probablemente interactúa con los miembros de la familia Bcl-2, Bid, Bax, y Bcl-XL, debido a esta interacción, se propone que la liberación del Citocromo C implica la apertura o el cierre de VDAC (Yuan *et al.*, 2021). La vía de apoptosis mitocondrial inicialmente libera proteínas como el citocromo C al espacio intermembranal, el cual se une a una proteína adaptadora apoptótica activador de peptidasa 1 (APAF1), lo que culmina en la formación del apoptosoma, el cual activa a la caspasa 9. La desregulación mitocondrial también estimula la liberación de SMAC y OMI proteínas que bloquean al inhibidor de caspasas XIAP (Yan *et al.*, 2020). La formación del apoptosoma activa el iniciador de la caspasa 9 que escinde y activa la caspasa 3 y la caspasa 7 lo que lleva a un punto de no retorno hacia la apoptosis, lo que culmina en la degradación de proteínas, ADN y muerte celular (Bock *et al.*, 2020).

Estudios recientes asocian un alza de la expresión de VDAC con la inducción de la apoptosis, por ejemplo, se ha caracterizado que el receptor de Plasminógeno "Kringle" 5 (K5), reduce la angiogénesis al promover la apoptosis de células

endoteliales, debido a que aumenta la expresión de VDAC e inhibe la degradación dependiente de ubiquitina de VDAC a través de la fosforilación de AKT-GSK3. Esto relacionado a la oligomerización de VDAC, en condiciones normales las solo moléculas de 5KDa máximo pueden atravesar VDAC, el citocromo C tiene un tamaño de 12 KDa, Shoshan-Barmatz y colaboradores proponen que la oligomerización de VDAC forma un canal más grande permitiendo el paso de moléculas más grandes, entre ellas las promotoras de apoptosis (Shoshan-Barmatz *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2014).

Papel de VDAC en microorganismos patógenos

El canal aniónico dependiente de voltaje VDAC ha sido descrito como una proteína que es regulada por microorganismos patógenos como *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium avium*, incluso está presente en virus como el virus del Dengue. El parásito intraeritrocitario *P. falciparum* utiliza proteínas de membrana para regular e intercambio de nutrientes y desechos metabólicos dentro del eritrocito. En condiciones fisiológicas normales los canales aniónicos presentes en los eritrocitos están de forma inactiva, cuando *P. falciparum* infecta a los eritrocitos, promueve la activación de proteínas relacionadas con el aumento de la conductancia aniónica, asegurando el flujo de nutrientes al parásito, el aumento en la conductancia probablemente esta mediado por la oligomerización de VDAC con otras proteínas de membrana presentes en el eritrocito, regulando positivamente al eritrocito y generando nuevas vías de permeabilidad de la membrana a causa de la infección por este parásito (Bouyer *et al.*, 2011).

En *Toxoplasma gondii* se ha identificado VDAC en la mitocondria de este parásito, la cual participa en la transferencia de metabolitos necesarios para la supervivencia, en este caso VDAC es fundamental para el crecimiento de *T. gondii*, la inhibición de VDAC en este parásito resultó en cambios en la morfología mitocondrial, metabólicamente se observó una reducción en los niveles de ATP y ADP, por ello se relaciona a VDAC con el transporte de estos nucleótidos, otro efecto fue la

acumulación de moléculas implicadas en la biosíntesis de la pirimidina (Mallo *et al.*, 2020).

El papel de VDAC en bacterias también ha sido estudiado, un claro ejemplo de esto es la infección por *M. avium* un patógeno oportunista intracelular que infecta macrófagos, su mecanismo de supervivencia incluye la formación de vacuolas citoplasmáticas y la inducción de apoptosis para poder propagarse a más células dificultando su eliminación. Danelishvil y colaboradores mencionan que algunos componentes presentes en las vacuolas citoplasmáticas que contienen las bacterias son componentes mitocondriales, en los cuales se encuentra VDAC que probablemente participa en el transporte de componentes derivados de las bacterias y la unión de VDAC a ATPasas bacterianas entre otros componentes, también describen que VDAC está relacionado con la supervivencia de *M. avium* (Danelishvil *et al.*, 2017).

En cuanto a virus, se sabe que algunas proteínas del virus del Dengue interactúan con componentes celulares del huésped, cabe mencionar que este virus es envuelto, en general su ciclo de replicación requiere la liberación de la nucleocápside en el citoplasma, su información genética codifica a proteínas virales estructurales y no estructurales. La interacción de componentes virales y celulares (huésped) es parte de la estrategia viral para asegurar su replicación en la célula, Jitobaom y colaboradores demostraron la relocalización de VDAC cerca de los sitios de replicación en células de mamífero infectadas con virus del dengue, también se comprobó que el silenciamiento de VDAC con ARNi, reduce la expresión de proteínas virales estructurales y no estructurales (Jitobaom *et al.*, 2016).

Localización de VDAC

Como se mencionó anteriormente, VDAC es una proteína localizada en la membrana mitocondrial, aunque hallazgos recientes reportan que esta proteína también puede encontrarse en otros compartimentos celulares, VDAC 1 es una

isoforma descrita en células humanas como los linfocitos B, que se ha localizado en la membrana citoplasmática, inclusive se ha encontrado a VDAC en caveolas las cuales están implicadas en el transporte de proteínas entre la membrana citoplasmática y la célula, lo que probablemente explica la localización no mitocondrial de VDAC (De Pinto *et al.*, 2010).

En células endoteliales humanas, VDAC cuando se encuentra en la membrana citoplasmática funge como un receptor de plasminógeno el cual tiene dominios estructurales denominados Kringles. Kringle 5 es un dominio de plasminógeno que interactúa con VDAC, la unión de Kringle 5 es inhibida por anticuerpos anti-VDAC que se unen a la región de unión de este dominio en VDAC, por lo tanto, la interacción entre el plasminógeno y VDAC es específica, dentro de las funciones de este dominio de plasminógeno se piensa que regula la translocación de VDAC 1 y la regulación de la apoptosis (anteriormente descrita) (Zhang J. *et al.*, 2022). Por último, los niveles de expresión de VDAC en la membrana citoplasmática se ha visto que son regulados en condiciones patológicas, por ejemplo, VDAC 1 en la membrana plasmática está relacionada con el desarrollo de cáncer, los estudios reportan la regulación de los niveles de hipoxia en células de melanoma murino (B16F10) por VDAC, en cáncer de páncreas los niveles de expresión de VDAC 1 y VDAC 2 en la membrana citoplasmática se encuentra al alza (De Pinto *et al.*, 2010).

BmVDAC e infección

En un estudio posterior se observó la regulación de la expresión de VDAC en intestino de *R. microplus* infectado con *B. bigemina* mediante un análisis semicuantitativo de RT-PCR (Figura 10 panel A), a partir de ARN extraído de intestino medio de garrapata *R. microplus* a las 0, 12, 24 y 72 horas post repleción, se observó que la infección por *B. bigemina* induce la expresión de ARNm a las 12 y 24 horas post repleción y que el nivel más alto de expresión fue a las 24 horas, el patrón de expresión de proteínas (Figura 10 panel B) fue el mismo que el de expresión del tránsito, siendo significativamente mayor la expresión en 12 y 24 horas post repleción, en cambio a las 0 y 72 horas post repleción, no se observó

algún cambio significativo en la expresión de proteínas en garrapatas infectadas (Rodríguez-Hernández et al., 2015).

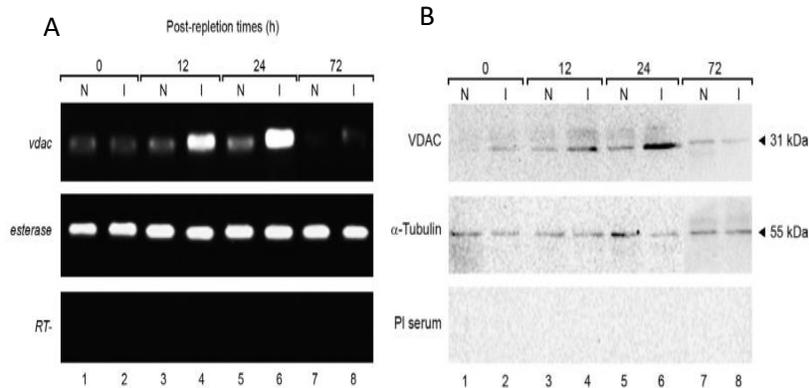


Figura 10: Análisis de la regulación de BmVDAC de intestino medio de *R. microplus* infectado con *B. bigemina*, garrapatas infectadas (I) y no infectadas (N), disectadas a las 0, 12, 24 y 72 horas post repleción. (A) análisis semicuantitativo de RT-PCR de la expresión del gen *bmvdac*, como referencia se utilizó el gen de esterasa. (B) Análisis de expresión semi cuantitativo por Western blot de extracto de proteínas totales de intestino de *R. microplus* a distintos tiempos post repleción (Rodríguez-Hernández et al., 2015).

También se analizó el patrón de distribución de BmVDAC en células de intestino de *R. microplus* infectado con *B. bigemina* mediante microscopía confocal (figura 11), en este estudio observaron reagrupaciones correspondientes a BmVDAC en células infectadas a las 24 y 72 horas post repleción, en comparación del grupo control en donde observaron un disperso de puntos sin cambios en todos los grupos (Rodríguez-Hernández et al., 2015).

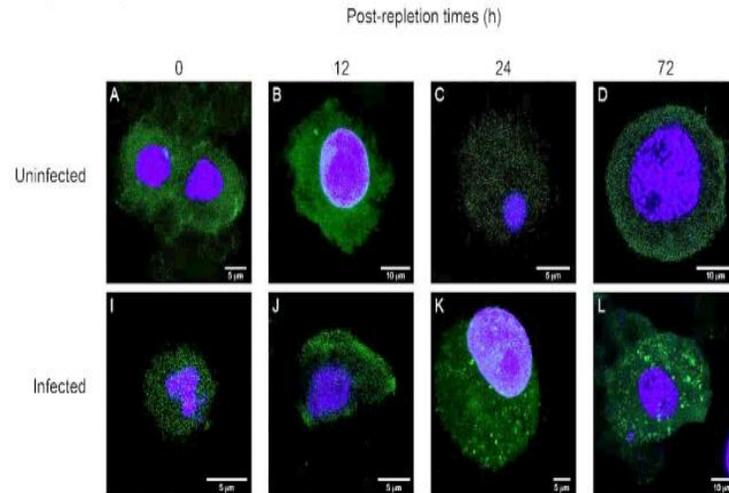


Figura 11: Inmunolocalización de BmVDAC en células de intestino de garrapata *R. microplus* a las 0, 12, 24 y 72 horas post repleción, infectadas y no infectadas con *B. bigemina*. La fila superior corresponde al grupo control de células no infectadas con *B. bigemina*, fila inferior, células infectadas con *B. bigemina*. Los puntos verdes corresponden a BmVDAC (Rodríguez-Hernández et al., 2015).

BmVDAC como candidato vacunal

En la búsqueda de nuevos candidatos vacunales que funcionen para el control inmunológico de la babesiosis, BmVDAC ha sido probado por Sánchez-Ortega y colaboradores como un candidato para la evaluación de anticuerpos contra la BmVDAC en el proceso de infección de *B. bigemina* en garrapatas *R. microplus* (Sánchez et al., 2019).

Las garrapatas colectadas de bovinos inmunizados contra BmVDAC e infectados con *B. bigemina*, tuvieron un menor peso en comparación al grupo control libre de Babesia, esto probablemente se debe a que la expresión de BmVDAC aumenta cuando las garrapatas se encuentran infectadas por *B. bigemina*, en el grupo control

hay menos expresión de esta proteína y por esa razón no se observa el mismo efecto. En cuanto a la ovoposición, notaron que, en bovinos inmunizados, infectados con *B. bigemina* e infestados con *R. microplus* (grupo 2) hubo un aumento de 26.37 % de la ovoposición en comparación del grupo control (grupo 1), mientras que en el grupo inmunizado e infestado y libre de *B. bigemina* (grupo 3) encontraron una disminución del 37.34 % de la ovoposición, esto se puede deber a que los anticuerpos contra BmVDAC interfieren en la correcta digestión de la sangre y movilización de proteínas vitales para la ovoposición como la vitelogenina. Otro indicador utilizado para ponderar la eficacia de la vacuna anti BmVDAC en este estudio fue la reducción de la fertilidad, en el grupo 2 reportaron una disminución de la fertilidad de 32.12 %, mientras que en el grupo 3 hubo una reducción del 55.80 % en comparación del grupo control. En general la eficacia de la vacuna contra BmVDAC en el grupo 2 fue de 23 % y en el grupo 3 de un 88 %, cabe destacar que posiblemente *B. bigemina* tiene un papel en la eficacia de la vacunación (Sánchez et al., 2019).

Parte de la caracterización de BmVDAC es conocer su localización dentro de la célula para así dilucidar sobre la participación de esta proteína que ha demostrado ser un buen candidato vacunal contra *R. microplus*, y que adicionalmente interactúa con las fases sexuales de *B. bigemina*.

Justificación

Las garrapatas de la especie *R. microplus* son ectoparásitos que afectan al ganado bovino, poniendo en riesgo la salud de estos animales y a la industria ganadera, la sola presencia de esta garrapata afecta la calidad de los productos obtenidos de los bovinos como la leche, carne y cuero. Adicionalmente, *R. microplus* es un vector de enfermedades de importancia ganadera como la anaplasmosis y la babesiosis bovina. En la actualidad los métodos de control contra *R. microplus* se basan en productos químicos organofosforados o piretroides, los cuales tienen un gran impacto ambiental por su carente especificidad y la generación de poblaciones resistentes a acaricidas, por esta razón se han desarrollado métodos de control alternativos como las vacunas, actualmente las únicas vacunas disponibles contra garrapatas están dirigidas al antígeno que es Bm86, existen otros candidatos vacúnales como la Subolesina y BmVDAC. El canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) es una proteína que se encuentra en la membrana externa de la mitocondria, aunque también se puede ver expresada en la membrana citoplasmática en células de humano, bajo ciertas condiciones como la activación del plasminógeno por la invasión celular de patógenos. BmVDAC es una proteína descrita en *R. microplus* que se ve regulada por las fases sexuales de *B. bigemina* en el intestino de la garrapata, de la cual se desconoce su función en la infección con este parásito, por esta razón es importante estudiar la localización de BmVDAC mediante el análisis de fracciones celulares de intestinos de *R. microplus* a distintos tiempos post repleción durante la infección con *B. bigemina* para así conocer el papel que tiene proteína y su posible función.

Hipótesis

La proteína BmVDAC se relocaliza entre fracciones celulares de intestino de *R. microplus* a distintos tiempos post repleción durante la infección de *B. bigemina*.

Objetivo general

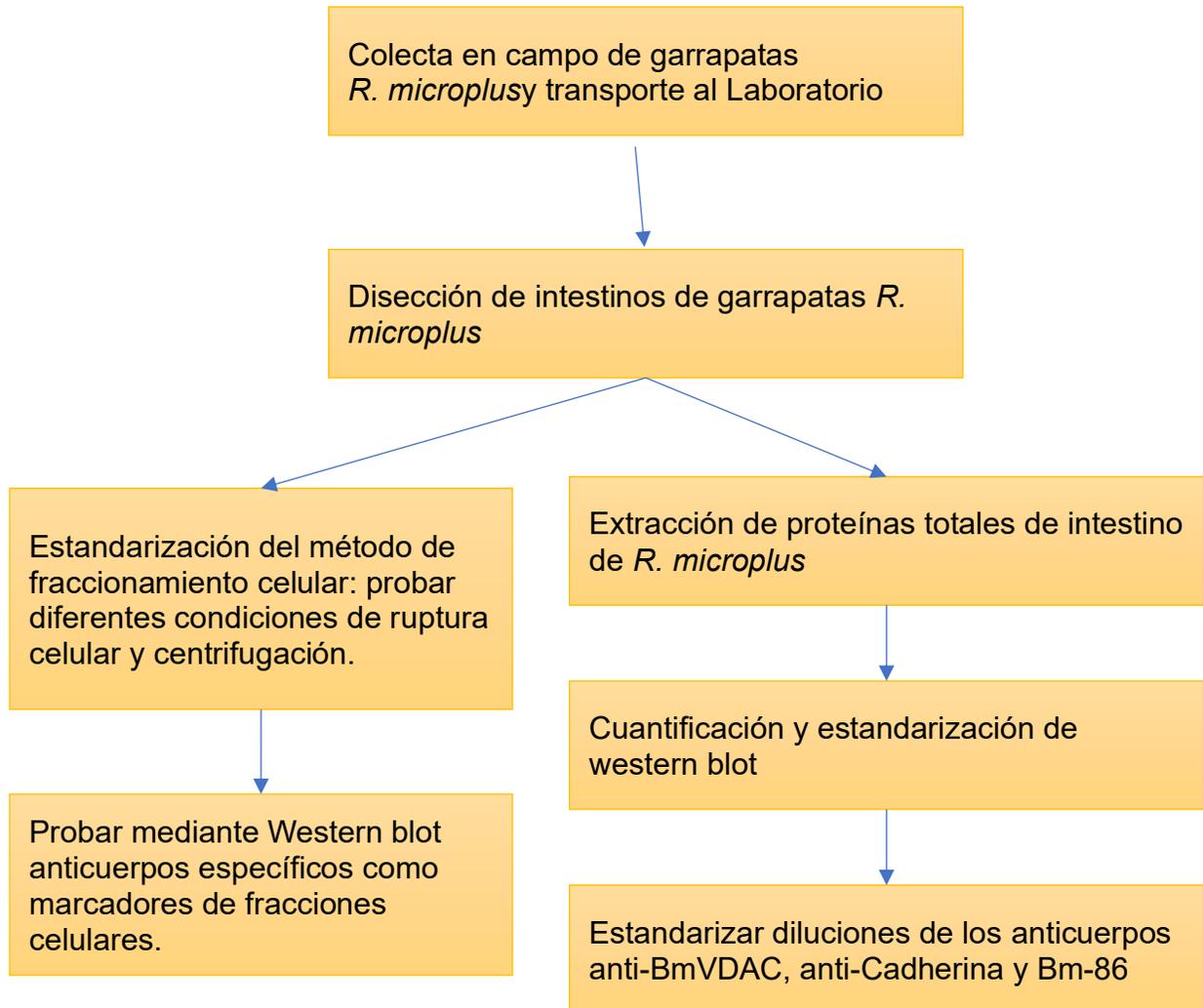
Estandarizar la técnica de fraccionamiento celular a partir de intestinos de garrapata *R. microplus* para el estudio de la localización de la proteína BmVDAC en garrapatas infectadas y no infectadas con *B. bigemina* distintos tiempos post repleción

Objetivo particular

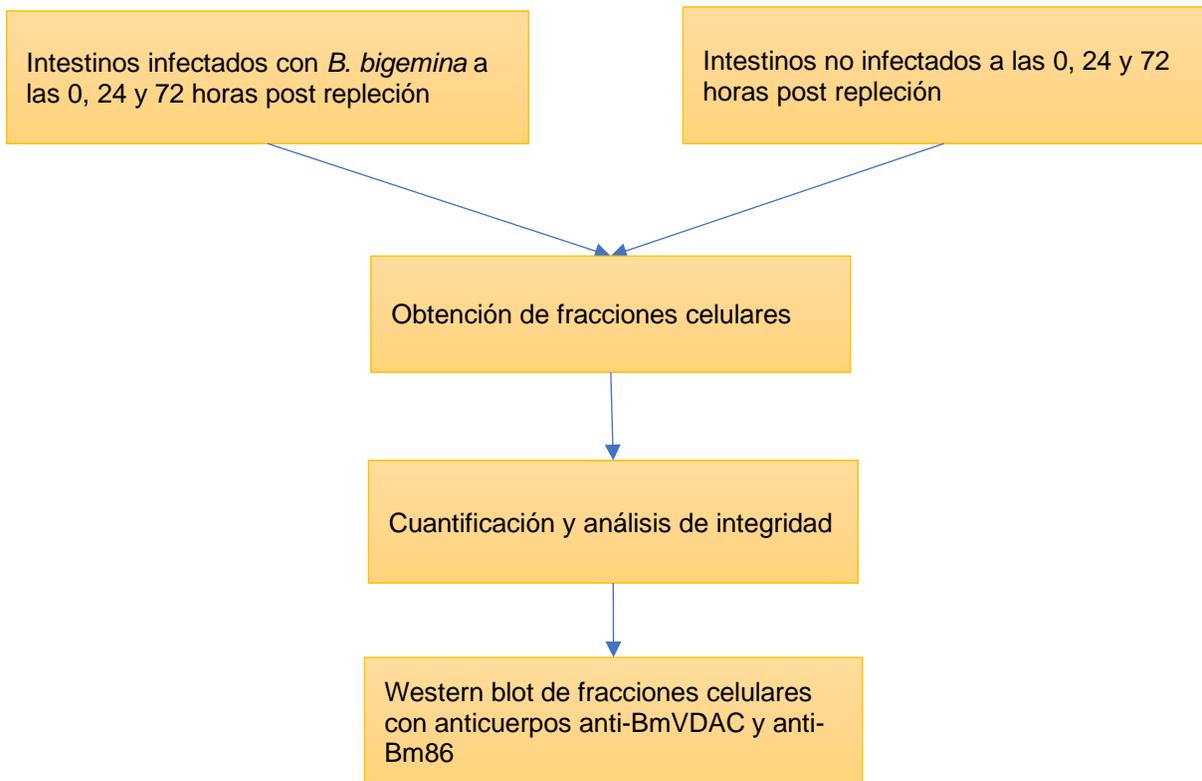
1. Estandarización de la técnica de fraccionamiento celular y western blot a partir de muestras de intestino de *R. microplus* colectadas en campo.
2. Determinar la localización de BmVDAC en muestras de fracciones celulares de intestinos de garrapatas infectados y no infectados con *B. bigemina* a las 0, 24 y 72 horas post repleción.
3. Determinar la localización de BmVDAC en muestras de cultivo celular primario de intestino de *R. microplus* a las 0 y 72 horas post repleción de células infectadas y no infectadas con *B. bigemina* mediante microscopía confocal.

Estrategia experimental

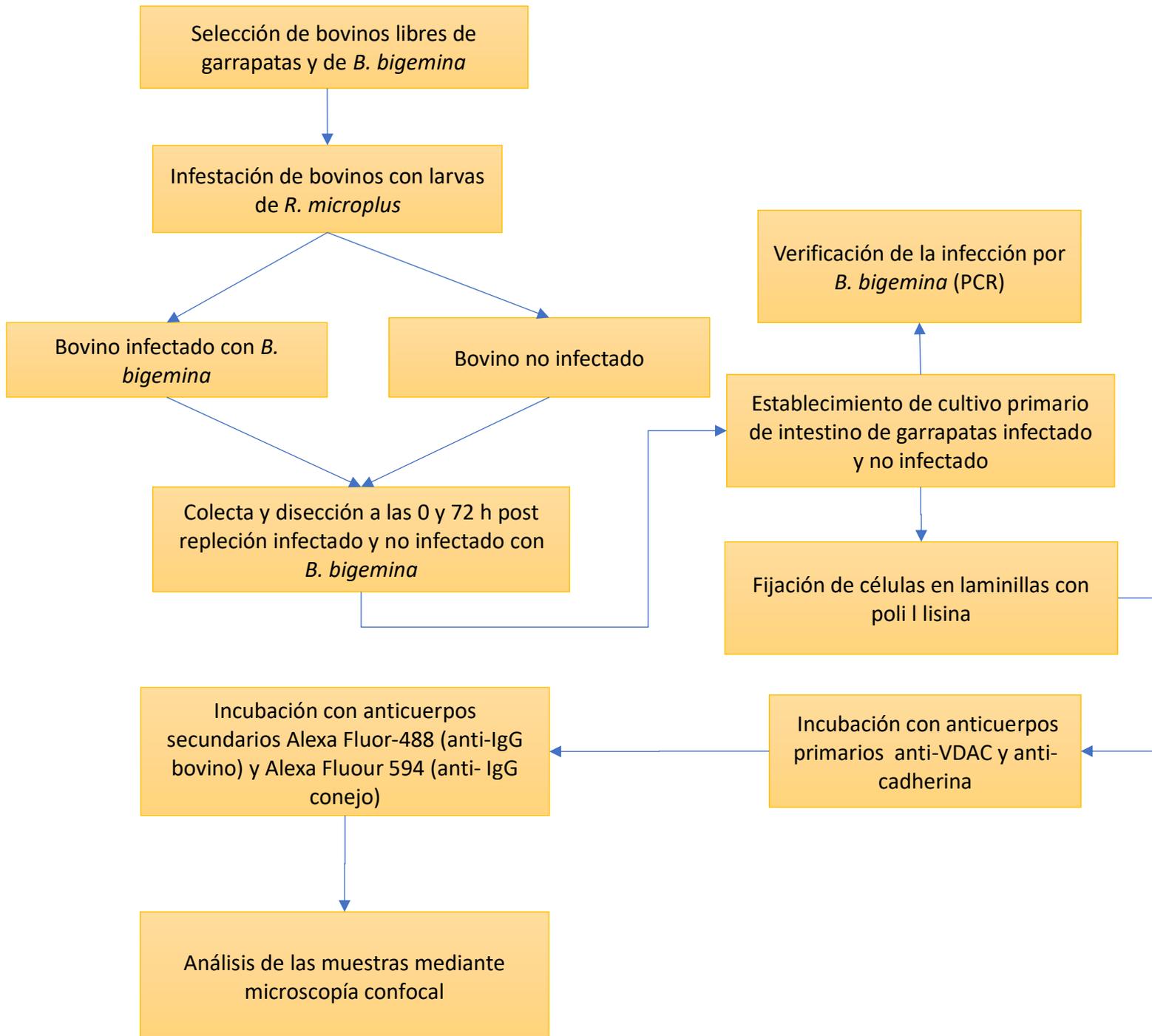
Objetivo 1: Estandarización de la técnica de fraccionamiento celular y western blot a partir de muestras de intestino de *R. microplus* colectadas en campo.



Objetivo 2: Determinar la localización de BmVDAC en muestras de fracciones celulares de intestinos de garrapatas infectados y no infectados con *B. bigemina* a las 0, 24 y 72 horas post repleción.



Objetivo 3: Determinar la localización de BmVDAC en muestras de cultivo celular primario de intestinos de *R. microplus* a las 0 y 72 horas post repleción de células infectadas y no infectadas con *B. bigemina* mediante microscopía confocal



Metodología:

Obtención de intestinos de garrapata *R. microplus*:

Para el establecimiento del cultivo celular primario de intestino de *R. microplus* se utilizaron garrapatas adultas a las 0 y 72 horas post repleción infectadas y no infectadas con *B. bigemina* para esto se infestaron 2 bovinos con 5 gramos de larvas de garrapatas cada uno. Un bovino fue esplenectomizado e inoculado con eritrocitos infectados con merozoitos de *B. bigemina*, la infección se hizo con un vial de 5 ml de eritrocitos con 1×10^8 de parasitemia el día 14 post infestación con larvas de garrapatas. Las garrapatas de ambos bovinos fueron colectadas 21 días post infestación. Las garrapatas de *R. microplus* media joya fueron donadas por el Laboratorio de Inmunología y vacunas (LINVAS) de la Universidad Autónoma de Querétaro. El otro bovino pertenece al grupo control y solo se infestó. De ambos grupos sólo se colectaron garrapatas repletas para llevar a cabo la disección y extracción de intestinos a las 0 y 72 horas post repleción. Las garrapatas del grupo 0 horas post repleción se disectaron inmediatamente después de su colecta, mientras que las garrapatas de los grupos de 72 horas, se almacenaron en cámara húmeda a 28° C y se disectaron después de las 72 horas post colecta.

Establecimiento de cultivo celular primario de intestino de garrapata

Los intestinos de las garrapatas tanto del grupo infectado como del grupo no infectado con *B. bigemina*, fueron disectados para realizar cultivo celular primario a las 0 y 72 h post repleción, siguiendo el protocolo de Mosqueda y colaboradores (2008), el cual consistió en lo siguiente: las garrapatas colectadas fueron lavadas con agua corriente y desinfectadas con Cloruro de benzalconio al 10% durante 10 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril. Bajo un estereoscopio en las mejores condiciones asépticas, se extirpó la cutícula dorsal y se extrajo únicamente intestino, el cual se sumergió en una gota de solución salina de Hank (HBSS) (GIBCO™; Invitrogen, Carlsbad, CA), con solución de antibiótico-antimicótico (penicilina 100 U / ml, estreptomycin 100 µg / ml, anfotericina B 0,25 µg / ml;

GIBCO), a un pH de 7.0 Los intestinos se cortaron con navajas de bisturí estériles en trozos de aproximadamente 4 mm, y fueron colectados en tubos de polipropileno estériles de 50 ml.

Posteriormente se procedió a la degradación enzimática del tejido con Tripsina, para esto los intestinos fueron lavados de tres a cuatro veces para retirar el exceso de hemoglobina, centrifugando a 500 x g por 3 minutos, retirando el sobrenadante en cada lavado, después del último lavado se quitó todo el sobrenadante y se agregó Tripsina (0,25%) en HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (1 ml de tripsina por cada 100 mg de tejido), una vez añadida la tripsina, se colocó la muestra 30 minutos a 4° C y posteriormente se incubó a 37° C durante 2.5 horas en agitación a 75 rpm. Pasado el tiempo de incubación, la muestra se lavó tres veces con 15 ml de solución HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} centrifugado a 500 x g durante 5 min, descartando el sobrenadante en cada lavado, posteriormente el sedimento que contiene a las células de intestino, fue pasado por un colador de células de 70 μm (BD Falcon, Bedford, MA), las células que pasaron por el colador se volvieron a centrifugar a 500 x g por 5 minuto, se retiró el sobrenadante y se reemplazó por medio de cultivo, posteriormente las células fueron puestas en placas de cultivo celular de 24 pozos. Las placas se incubaron a 28°C con una saturación del 5% de CO_2 . El medio de cultivo consistió en partes iguales de medio Leibovits-15 (L-15; GIBCO) y medio esencial mínimo con Sales de Hank (MEM; GIBCO), suplementadas con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), inactivado a 56 ° C durante 45 min, caldo de fosfato de triptosa al 10% (Sigma-Aldrich Co., St.), y fracción de albúmina bovina al 0,1% (GIBCO) con un antibiótico-antimicótico al 1 %.

Fijación en suspensión de cultivo celular primario de células intestino de garrapata.

Para la fijación de las células en suspensión, se sacaron las células de la placa de cultivo y se depositaron en microtubos de 1.5 ml, la muestra se centrifugó a 500 x g por 5 minutos, y se retiró el sobrenadante, después se agregó PBS estéril pH 7.4,

y se realizó el mismo lavado, posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregó PBS pH 7.4 con paraformaldehído al 3.7%, las células se incubaron durante 1 hora a 37° C en agitación suave a 75 rpm, las muestras se centrifugaron a 500 x g por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó PBS estéril, Por último, se almacenaron en refrigeración a 4° C hasta su uso.

Detección de *B. bigemina* en células de intestino de garrapata infectadas mediante PCR

El ADN se extrajo de células de intestino de garrapata que se encontraban fijadas en paraformaldehído, de los grupos de 0 y 72 horas post repleción infectadas y no infectadas con *B. bigemina*, también se extrajo AND total de garrapata *R. microplus*, la cual antes de la extracción se pulverizó con nitrógeno líquido y pistilo.

Para todas las extracciones de ADN de todas las muestras se utilizó el Kit “DNeasy Blood & Tissue Kit” (Cat: 69504). Como pretratamiento las muestras se lavaron con PBS estéril pH 7.4 centrifugando a 500 x g por 5 minutos retirando la mayor cantidad posible de sobrenadante. Posteriormente se agregó a las células 200 µl de proteinasa K y se dejó incubando toda la noche a 56°C en agitación. Posteriormente se siguió el protocolo del kit de extracción. Para determinar la integridad del DNA se corrió un gel de Agarosa al 1% a 100 volts por 1 hora y se cuantificó en el nanodrop (Thermo Fisher, EUA).

Se utilizó PCR anidada debido a que esta técnica es muy útil para el diagnóstico de *B. bigemina* dada su sensibilidad y especificidad, se utilizaron los cebadores diseñados por Bhat y colaboradores (Bhat *et al.*, 2017), los cuales amplifican el gen *bilA* (Bhat *et al.*, 2017). El primer par de oligonucleótidos es el siguiente; 5' -CAT CTA ATT TCT CTC CAT ACC CCT CC- 3', Externo antisentido 5' -CCT CGG CTT CAA CTC TGA TGC CAA AG- 3'. Para la primera reacción se usó un volumen de 25 µl, con los siguientes componentes de reacción: Master mix (MyTac Bioline 25042) 12.5 µl, ADN 5 µl, Oligonucleótido sentido 1 µl, Oligonucleótido antisentido

1 μ l, Agua grado biología molecular 5.5 μ l. Con las siguientes condiciones 95° C x 3 minutos (1 ciclo), 95° C x 30 segundos, 52° C x 30 segundos, 72° C x 30 segundos (30 ciclos) y 72° C x 7 minutos (1 ciclo). Para la segunda reacción de PCR se usaron los siguientes pares de oligonucleótidos Interno sentido 5' -CGC AAG CCC AGC ACG CCC CGG TGC- 3', Interno antisentido 5' -CCG ACC TGG ATA GGC TGT GTG ATG- 3'. Con un volumen total de 25 μ l con los siguientes componentes: Máster mix (MyTac Bioline 25042) 12.5 μ l, Producto de la primera PCR 2 μ l, Oligonucleótido sentido 1 μ l, Oligonucleótido antisentido 1 μ l, Agua grado biología molecular 8.5 μ l. Con las siguientes condiciones 95° C x 3 minutos (1 ciclo), 95° C x 30 segundos, 54° C x 30 segundos, 72° C x 30 segundos (30 ciclos) y 72° C x 7 minutos (1 ciclo). Por último, se corrió un gel de Agarosa al 1 % para observar los productos de PCR

El gen *bmvdc* se amplificó utilizando los Oligos reportados, sentido: 5'-ATG GCT CCT CCG TGC TAC GC-3' y la siguiente secuencia anti sentido: 5'-CTT GTG TCC TCC CTG GTT GAA-3' (Rodríguez-Hernández et al., 2012). Se utilizó un volumen final de 25 μ l por reacción el cual consistió en 12.5 μ l de Master mix (MyTaq™ Mix, cat: BIO-25041:), 5 μ l DNA 50 ng/ μ l, 1 μ l de oligo Sentido, 1 μ l de oligo antisentido y 5.5 μ l de agua grado biología molecular con las siguientes condiciones para la reacción 95° C x 3 minutos (1 ciclo), 95° C x 30 segundos, 57.5 ° C x 40 segundos, 72° C x 30 segundos (30 ciclos), 72° C x 7 minutos (1 ciclo). Por último, se realizó un gel de agarosa al 1.5 % para observar los productos de PCR.

Preparación de muestras para microscopía confocal

Las células que se encontraban preservadas con paraformaldehído de los grupos de 0 y 72 horas post repleción infectadas y no infectadas con *B. bigemina*, fueron fijadas a laminillas de poli-l-lisina con cytospin a 2000 rpm por 3 minutos, en cada laminilla se realizó la fijación por pares de cada grupo. Posteriormente en cámara húmeda, se agregaron gotas de acetona pura sobre las laminillas, teniendo cuidado de cubrir por completo las zonas donde se encontraban las célula, adicionalmente, para evitar la evaporación de la acetona, las laminillas fueron cubiertas con Parafilm,

y se incubaron durante 30 minutos a 4° C, posteriormente se realizó un bloqueo con PBS pH 7.4 con 1 % de albúmina de suero bovino (BSA, cat: W23134), en cámara húmeda a 37° C durante 1 hora y nuevamente se cubrió la laminilla con Parafilm. Pasado el tiempo, se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos en cámara húmeda a 37° C.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios, suero bovino anti-VDAC (1:40), anti-cadherina conejo (1:10), suero pre inmune bovino (1:40) diluidos en PBS 1 % BSA. Las muestras fueron cubiertas con Parafilm e incubadas a 37° C durante 1 hora en cámara húmeda. Después se realizaron 3 lavados con PBS por 5 minutos entre lavados en cámara húmeda. Posteriormente, se incubaron las laminillas con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor-488 conjugado con afrin pure goat, anti-IgG bovino (Cat: 131259), y Alexa Fluor 594 conjugado afrin pure goat Anti-IgG conejo (Cat: 142848), ambos anticuerpos secundarios fueron utilizados a una dilución 1:100 en PBS 1 % BSA, y se incubaron durante 1 hora a 37° C en cámara húmeda, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos en cámara húmeda. Por último, se retiró el exceso de líquido de las laminillas y se agregó VECTASHIELD+DAPI, y se colocó cubre objetos. Las laminillas se analizaron en microscopio de fluorescencia.

Estandarización de Western Blot y fraccionamiento celular de intestinos de *R. microplus* colectadas en campo

Extracción de proteínas totales de intestinos de garrapatas *R. microplus*

Para la estandarización de las condiciones del fraccionamiento celular, se extrajeron las proteínas totales de intestinos de *R. microplus* de campo, para esto se realizó la disección de garrapatas y se extrajeron los intestinos, los cuales se almacenaron en tubos de 1.5 ml (5 intestinos por tubo) en PBS pH 7.4 con 1x de inhibidor de proteasas (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free, cat: 11873580001) y se almacenaron en ultra congelador hasta su uso. Cuando se utilizaron los intestinos, se dejaron descongelar en hielo, los intestinos se lavaron de 8 a 10 veces con PBS

pH 7.4 1x inhibidor de proteasas centrifugando a 10,000 x g por 5 minutos, hasta retirar el exceso de hemoglobina de la muestra, en el último lavado se retiró todo el PBS y se añadió 500 µl de buffer TNE (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5 % Triton x100) con 1x inhibidor de proteasas), las muestras se agitaron en vórtex y se incubaron en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se sonicaron con las siguientes condiciones, 3 minutos (80% amplitud, 30 segundos de pulso, 30 segundos de pausa) y se centrifugaron a 2200 x g por 5 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante tubo estéril, y se almacenó a -20 °C, las muestras se cuantificaron mediante Bradford el cual se realizó según el manual del fabricante (Quick Start™ Bradford Protein Assay, cat: 5000002)

Para observar la integridad de las muestras, se preparó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 % (Gel separador: agua destilada 2 ml, tris pH 8.8 más SDS 10 % 1.25 ml, Poliacrilamida 1.67, TEMED 5 µl, PSA 10 % 50 µl. Gel concentrador: Agua destilada 2.97 ml, Tris pH 6.8 más SDS 10 % 1.25 ml, Poliacrilamida .67 ml TEMED 5 µl, PSA 10 % 50 µl). Las muestras se calentaron a 95 °C en buffer de carga 6x (372 mM HCl-tris, 9 % SDS, 50 % Glicerol, 0.003 % Azul de bromofenol). El gel se corrió a 100 volts durante 2 horas en buffer de corrida (25 mM Tris-base, 190 mM Glicina, 0.1 % SDS) y se tiñó con azul Comassie (10 % Ácido acético, 45 % Metanol, 0.25 % Azul de Comassie) en agitación durante 24 horas, posteriormente se destiñó con solución de desteñido (40 % Metanol, 10 % Ácido acético), se enjuago con agua destilada hasta quitar el exceso de solución de desteñido y se observó en ChemiDoc MP Imaging System.

Western Blot de extracto de proteínas totales de intestino de garrapata con anticuerpos de antiBm86, anti-BmVDAC y anti-cadherina

Se hizo un gel preparativo de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 % con extracto de proteínas totales de intestino de *R. microplus* de campo y se corrió a 100 volts por aproximadamente 2 horas, posteriormente se realizó una transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa a 100 volts durante 1 hora, la membrana se tiñó con rojo de ponceau y posteriormente se lavó con TBS-T (20 mM Tris base, 150 mM

NaCl, Tween-20 0.1%, pH 7.6), se dejó bloqueando una noche en TBS-T con leche al 5 % (leche Carnation instant nonfat dry milk) en agitación a 4 °C toda la noche, al siguiente día la membrana se lavó con TBS-T, sobre un papel filtro se recortaron tiras verticales de 5 mm de ancho con un bisturí estéril, y se probaron los anticuerpos primarios diluidos en TBS-T con leche al 1 % a las siguientes concentraciones de anticuerpos anti-BmVDAC Bovino (1:100, 1:200, 1:400, 1:500), anti-Bm86 Bovino (1:250, 1:500, 1:1000) y anti-cadherina Conejo (1:250, 1:500, 1:1000), el anticuerpo primario se dejó en agitación (100 rpm) a temperatura ambiente durante una hora, posteriormente se realizaron 5 Lavados a las membranas con TBS-T leche al 0.1 % los lavados fueron de 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. En aquellas membranas incubadas con anticuerpos anti-BmVDAC y anti-Bm86 se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG bovino conjugado con peroxidasa (Jackson Inmuno Research cat:101-035-003) a una concentración 1:1000 diluido en TBS-T con leche al 1 %. Mientras que, a las membranas con el anticuerpo anti-cadherina, se le adicionó el anticuerpo secundario Anti-IgG conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz biotechnology, sc-2004, lot F2116) a una concentración 1:5000 diluido en TBS-T con leche al 1 %, los anticuerpos secundarios se dejaron incubar en agitación durante una hora a temperatura ambiente, por último, se realizaron 5 lavados con TBS-T de 10 minutos en agitación a temperatura ambiente, las membranas se acomodaron sobre un acetato y se les agregó luminol (ECL western blottingRef: W1001) y se revelaron en ChemiDoc MP Imaging System.

Las diluciones de los anticuerpos primarios que se decidieron utilizar al observar los resultados de la estandarización fueron: anti-BmVDAC (1:400), anti-Bm86 (1:500) y anti-cadherina (1:100), las diluciones de los anticuerpos secundarios fueron las mismas anteriormente mencionadas.

Siguiendo los mismos pasos del procedimiento de Western blot, con extracto de proteínas totales de intestinos de garrapatas de campo se probaron los siguientes anticuerpos bovinos anti-BmVDAC obtenidos en los experimentos de vacunación y donados por el Laboratorio de inmunología y Vacunas (Sánchez *et al.*, 2019) a las

siguientes diluciones 8148 (1:100, 1:200, 1:400, 1:500), 7513 (1:100, 1:200, 1:400, 1:500), 7479 (1:100, 1:200, 1:500), 7483 (1:100, 1:200, 1:500), Control positivo 7316 (1:400).

Estandarización de extracción de fracciones celulares a partir de intestinos de *R. microplus* colectados en campo

Para la obtención de fracciones celulares se utilizó el kit “Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues” (CAT:87790) el cual permite la obtención de extracto citoplasmático, extracto membranal, fracción nuclear soluble y extracto nuclear ligado a cromatina a partir de tejidos, en este caso se utilizaron intestinos de garrapata *R. microplus* colectadas en campo a las 0 horas post-repleción. Los intestinos se extrajeron y se sumergieron en PBS pH 7.4 con 1x de inhibidor de proteasas y se congelaron a -80 °C hasta su uso. Las muestras se lavaron de 8 a 10 veces con PBS pH 7.4 1x de inhibidor de proteasas, centrifugando a 10,000 x g por 5 minutos a 4° C, hasta que el sobrenadante se observaba translucido y sin presencia de hemoglobina. Se pesaron 200 mg de tejido y se le adicionaron 2000 µl de Buffer CEB (Incluido en el kit), para la estandarización se probaron diferentes métodos de homogenización de tejido: Sonicador 3 minutos (80% amplitud, 30 segundos de pulso, segundos de pausa), Politrón velocidad 2 por 10 segundos, pistilo en un microtubo de 1.5 ml, el tejido se rompió hasta verlo homogenizado, posteriormente el tejido de cada uno de los métodos de homogenización fue pasado por separado un colador puesto en un tubo de propileno de 15 ml y se centrifugó a 500 x g por 5 minutos a 4 ° C, el sobrenadante (fracción citoplasmática) se recuperó en un tubo de 1.5 estéril, al sedimento se le hicieron 3 lavados con PBS 1 x inhibidor de proteasas y centrifugando a 500 x g por 5 minutos a 4° C. Después se retiró todo el PBS y se añadieron 1300 µl de Buffer MEB más 13 µl de inhibidor de proteasas 100x, el precipitado se homogenizó en vórtex durante 15 segundos a velocidad máxima y se incubó en agitación a 4°C durante 10 minutos, pasado el tiempo, las muestras se centrifugaron a 3000 x g por 5 minutos a 4° C, el sobrenadante (Fracción membranal) se recuperó en un tubo estéril, mientras que al sedimento se

Se realizaron 3 lavados con PBS 1 x conteniendo inhibidor de proteasas a 3000 x g por 5 minutos a 4° C, posteriormente se adicionaron 400 µl de buffer NEB con 4.5 µl de inhibidor de proteasas 100x, se homogenizó en vórtex 15 segundos a velocidad máxima, las muestras se incubaron por 30 minutos a 4 °C en agitación, luego se centrifugó a 5000 x g por 5 minutos a 4° C, el sobrenadante (fracción nuclear soluble) se colocó en un tubo estéril nuevo, mientras que al sedimento se le realizaron 3 lavados con PBS 1x inhibidor de proteasas, centrifugando a 5000 x g por 5 minutos a 4° C, luego del último lavado se agregó al sedimento 340 µl de buffer NEB, 17 µl de CaCl₂, 10.2 µl de nucleasa micrococcal y 3.7 µl de inhibidor de proteasas 100x, las muestras se homogenizaron 15 segundos en vórtex, y se incubaron a 37° C, durante 15 minutos, las muestras se sacaron del baño y se homogenizaron en vórtex 15 segundos a velocidad máxima, después las muestras se centrifugaron a 16000 x g por 5 minutos a 4° C, se recuperó el sobrenadante (fracción nuclear ligado a cromatina) a un tubo estéril, el sedimento se lavó 3 veces con PBS 1x conteniendo inhibidor de proteasas a 16000 x g por 5 minutos a 4 °C. Por último, se añadió 250 µl de buffer PEB más 2.5 µl de inhibidor de proteasas 100x a las muestras, se agitó en vórtex a velocidad máxima durante 15 segundos y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación y se centrifugó a 16000 x g por 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante (fracción de citoesqueleto) se recuperó en un tubo estéril.

Las fracciones celulares obtenidas se alicuotaron en volúmenes pequeños y congelaron a -20° C hasta su uso. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, se corrió un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10 % para corroborar la integridad de las proteínas, en el gel se cargaron 19 µg/mL de cada una de las fracciones. También se realizó un análisis de western blot (anteriormente estandarizado) de las fracciones citoplasmática y membranal, utilizando los anticuerpos anti-BmVDAC, anti- Bm86 y anti-Cadherina.

El método que se decidió utilizar para la extracción de las fracciones celulares de las muestras 0, 24 y 72 horas infectadas y no infectadas con *B. bigemina*. fue la homogenización con politrón 10 segundos a velocidad 2.

Análisis de fracciones celulares mediante Western Blot

La extracción de fracciones celulares de las muestras de intestinos de *R. microplus* de 0, 24 y 72 horas post repleción infectadas y no infectadas con *B. bigemina*, se llevó a cabo utilizando las condiciones anteriormente mencionadas en la estandarización del fraccionamiento celular, después de la extracción de las fracciones se realizó la cuantificación de cada una por el método de Bradford y se realizó un gel SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 %, el cual se corrió a 100 volts, este gel se tiñó con azul de comassie y se observó en ChemiDoc MP Imaging System.

Para analizar las fracciones por western blot, se corrieron dos geles de poliacrilamida SDS/PAGE al 10%, uno de los geles se tiñó con azul de coomasie y otro fue transferido a una membrana de nitrocelulosa con las mismas condiciones descritas anteriormente. Las condiciones de bloqueo de la membrana fueron las mismas ya descritas. Al día siguiente se recortó la membrana a la altura de 50 KDa, se utilizó el suero bovino anti-BmVDAC a una dilución 1:400 diluido en TBS-T con leche al 1 % para la membrana que recortada por debajo de 50 KDa, a la membrana recortada por arriba de los 50 KDa se le agregó el suero anti Bm86 a una dilución 1:500 diluido en TBS-T con leche al 1 %, ambos sueros se incubaron durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, los pasos subsiguientes del western blot se realizaron según las condiciones seleccionadas durante la estandarización. Por último, las membranas se colocaron sobre un acetato y se les agregó luminol (ECL western blottingRef: W1001) y se reveló en ChemiDoc MP Imaging System con un tiempo final de exposición de 150 segundos.

Resultados

Estandarización de la técnica de fraccionamiento celular y western blot a partir de muestras de intestino de *R. microplus* colectadas en campo

En la estandarización de la técnica de fraccionamiento celular, se utilizaron intestinos de garrapatas de campo, las cuales fueron recolectadas de establos ubicados en la cierra gorda de Querétaro. En la figura 1 se observa un intestino disectado sumergido en una gota de PBS para retirar el exceso de hemoglobina presente en la muestra, posteriormente se transfirió un aproximado de 5 intestinos a un tubo de 1.5 ml y se almacenaron a -80°C hasta su uso.



Figura 1: Intestino de *R. microplus*. Bajo la luz de un estereoscopio con aumento de 10x, se observa un intestino de garrapata repleta disectado.

Extracción de proteínas totales de intestino de garrapata de campo y estandarización de Western blot.

Para la estandarización del western blot, se extrajeron proteínas totales de intestinos de garrapatas colectadas en campo. Las extracciones de fueron analizadas mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 %, en cada carril se cargaron 19 $\mu\text{g/ml}$ del extracto proteico los cuales fueron teñidos con azul de coomassie para observar la integridad de las proteínas figura 5, panel A. a la par de este experimento se preparó una membrana de nitrocelulosa con el mismo extracto

proteico extraído, la membrana se cortó en tiras verticales y se tomaron dos de ellas, las cuales fueron incubadas con sueros bovinos anti-Bm86 y anti-BmVDAC, para este experimento se utilizaron diluciones de 1:1000 de ambos sueros, los cuales se observan con un peso de 86 y 31 KDa correspondientemente (figura 5 panel B y C), debido a que las bandas para BmVDAC y Bm86 dieron una señal débil se procedió a titular las diluciones de trabajo de ambos sueros junto con un anticuerpo comercial anti-cadherina.

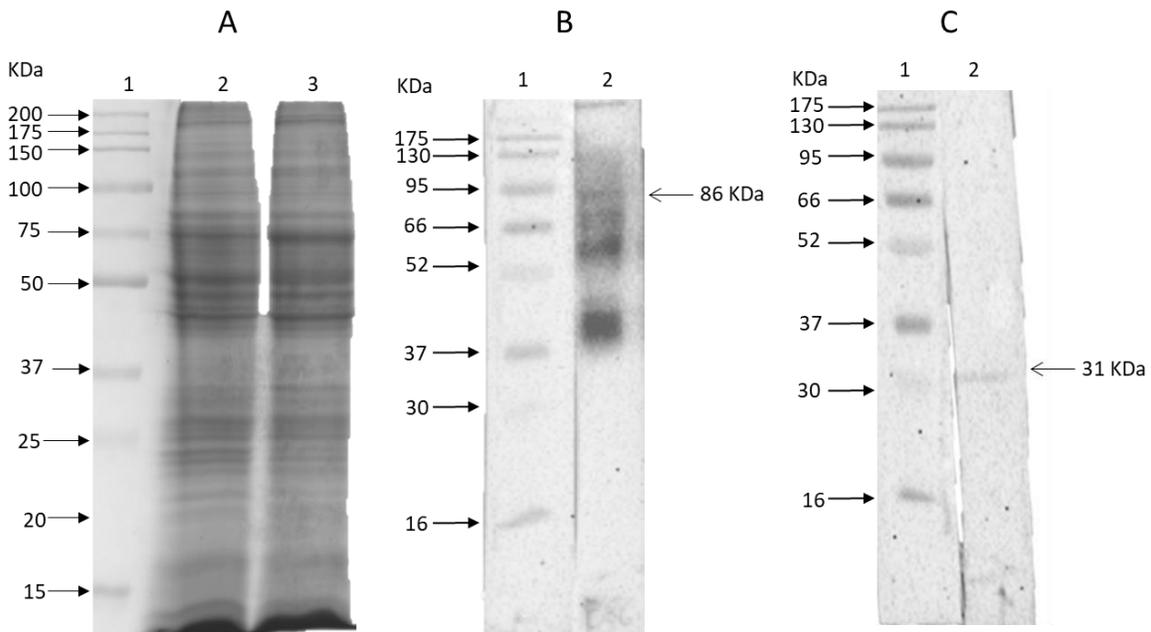


Figura 5: Análisis se proteínas totales de garrapatas de campo *R. microplus* por SDS-PAGE y western blot. (A) SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 10 %, carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 y 3 extractos de proteínas totales de intestinos de garrapata. Membranas de nitrocelulosa con extracto proteico incubadas con anticuerpos anti-Bm86 (B) y anti-BmVDAC (C), los carriles 1 del panel B y C, corresponden a los marcadores de peso molecular, el carril 2 del panel B, banda correspondiente a Bm86, panel C carril 2 banda correspondiente a BmVDAC.

Titulación de anticuerpos anti-Bm86, anti-BmVDAC y anti-cadherina

Para la titulación de anticuerpos se transfirieron proteínas totales de intestinos de garrapatas de campo a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue cortada en tiras verticales de 0.5 cm, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos bovinos anti-BM86 y anti-BmVDAC a distintas diluciones, también se tituló el anticuerpo anti-cadherina, el cual reconoce algún componente de nuestros proteicos, debido a que

este anticuerpo es comercial, se desconoce la secuencia del epítopo que reconoce, en experimentos anteriores (datos no mostrados), se ha visto reactividad con componentes proteicos de intestinos de garrapatas, adicionalmente tiene reacción cruzada con la cadherina de humano, ratón y pez cebra, por ello fue que se utilizó. En la titulación de Bm86 se observan bandas de 86 KDa (Figura 6 panel Bm86) con distintas intensidades, al igual que la titulación de BmVDAC (bandas de 31 KDa) (Figura 6 panel BmVDAC), mientras que la titulación con cadherina (Figura 6 panel cadherina) solo se observaron bandas de 100 KDa cuando se sobre expuso la membrana (Figura 6 panel cadherina*), por consiguiente, se decidió utilizar una dilución menor para los próximos ensayos. Por último, la dilución utilizada en los próximos experimentos fue la siguiente, para los sueros bovinos Bm86 1:500, BmVDAC 1:400 y para el anticuerpo anti-cadherina 1:100.

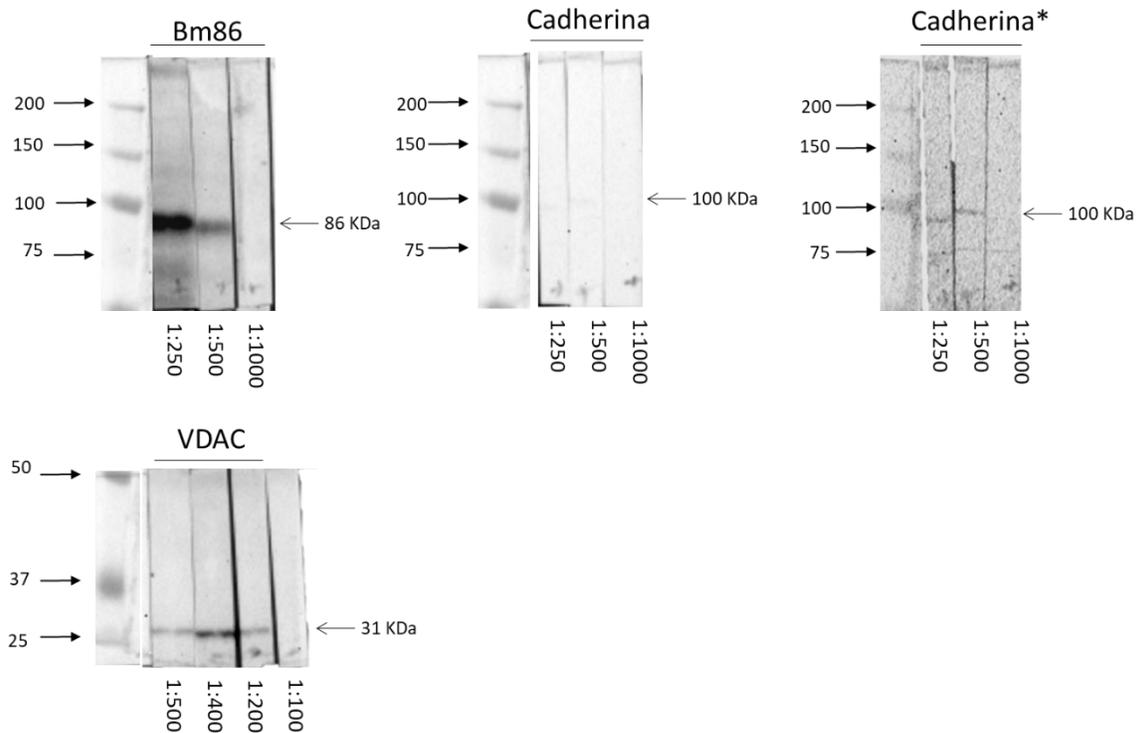


Figura 6: Titulación de los anticuerpos Anti-Bm86, Anti-BmVDAC y Anti-Cadherina. En membranas de nitrocelulosa con extracto de proteínas de intestino de garrapatas de campo, se incubaron distintas diluciones de anticuerpos bovinos anti-BmVDAC (1:100, 1:200, 1:400, 1:500) y anti-Bm86 (1:250, 1:500, 1:1000) y el anticuerpo comercial anti-cadherina (1:250, 1:500, 1:1000).

Adicionalmente en membranas con proteínas totales de intestinos de garrapatas, se incubaron distintas diluciones de anticuerpos bovinos 8148 (1:100, 1:200, 1:400, 1:500), 7513 (1:100, 1:200, 1:400, 1:500), 7479 (1:100, 1:200, 1:500) y 7483 (1:100, 1:200, 1:500), en esta titulación se usó como control positivo el suero bovino anti-BmVDAC del anterior experimento (**Figura 7**). No se observaron bandas correspondientes a *BmVDAC* en aquellas membranas incubadas con los sueros bovinos en cuestión, únicamente se observó una banda de 31 KDa en el control positivo, cabe mencionar que dichos sueros tenían mayor tiempo de almacenamiento.

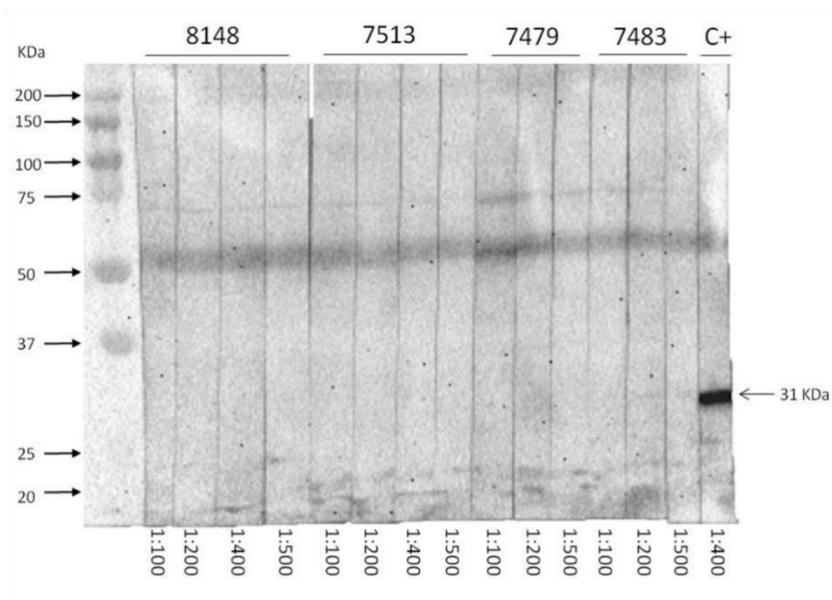


Figura 7: Titulación de sueros bovinos anti-BmVDAC. Se transfirieron proteínas totales de intestinos de garrapatas a una membrana de nitrocelulosa fueron incubadas con cuatro sueros bovinos Anti-BmVDAC (8148, 7513, 7479, 7483) con distintas diluciones (Señaladas en la imagen) y un control positivo.

Los sueros probados en la figura 7, no se utilizaron para ningún experimento debido a que no mostraron bandas correspondientes a *BmVDAC* en ninguna dilución.

Estandarización del fraccionamiento celular con intestinos de *R. microplus* de campo

En la estandarización del fraccionamiento celular, se adicionaron lavados con PBS 1 x inhibidor de proteasas entre los cambios de buffer para la extracción de fracciones del kit, esto para disminuir el riesgo de contaminación entre fracciones y también se compararon distintas formas de ruptura celular para la extracción de fracciones.

Cuando se realizó la extracción de fracciones celulares a partir de intestinos de *R. microplus* de campo con politrón velocidad 2 por 20 segundos (como indica el inserto del kit) y se analizó mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10 % (Figura 8, panel A) y western blot, hubo presencia de BmVDAC en la fracción citoplasmática y al igual que de Bm86, nuestro marcador de membrana. En el western blot (Figura 8, panel B) se comparan las fracciones citoplasmática carril 2 y membranal carril 3 contra un control de proteínas totales de intestino de garrapata carril 1. Tanto las fracciones como el control fueron incubados con anticuerpos bovinos anti-Bm86 (86 KDa) y anti-BmVDAC (31 KDa). En el western blot se observó contaminación en la fracción citoplasmática con la fracción membranal tal como se muestra en la figura 8, donde las bandas de BmVDAC están en todos los carriles (1, 2, 3) al igual que las de Bm86.

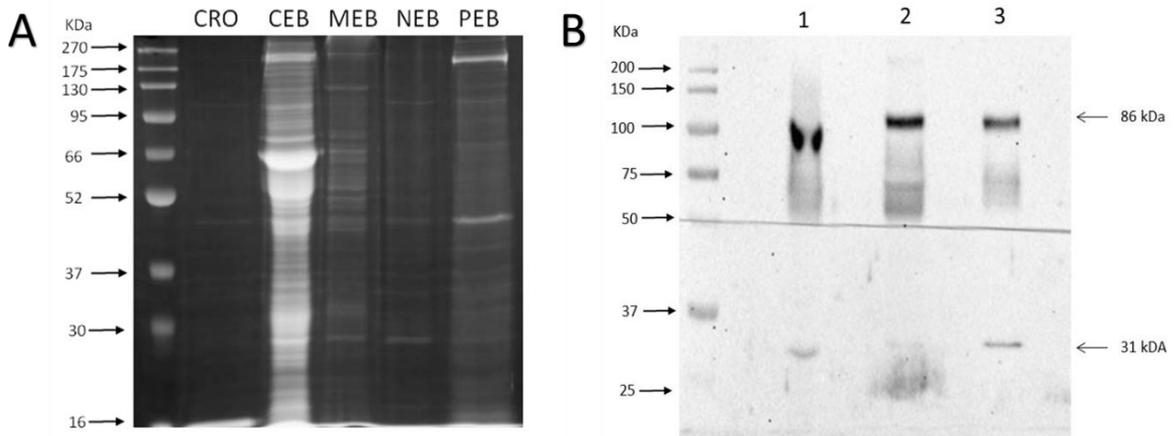


Figura 8: Análisis del fraccionamiento celular con politrón velocidad 2 por 20 segundos. Gel SDS-PAGE al 10 % (A) análisis de la integridad de las fracciones citoplasmática (CEB), Membranal (MEB), Nuclear (NEB), Cromatina (CRO) y Citoesqueleto (PEB). Western blot (B) de fracciones citoplasmática (carril 2) y membranal (carril 3), se compararon contra un control positivo de extracto de proteínas totales de intestino de garrapata.

Para evitar la contaminación entre las fracciones citoplasmática y membranal (figura 8, panel B), se realizaron lavados con PBS entre la extracción de las fracciones celulares y se probaron 3 métodos de ruptura del tejido, que fueron los siguientes: pistilo, sonicador 3 minutos (80% amplitud, 30 segundos de pulso, 30 segundos de pausa) y politrón (Velocidad 2 por 10 segundos), en la figura 9 panel B se observa un western blot de las fracciones citoplasmática y membranal de las extracciones con pistilo, politrón (Velocidad 2, 10 segundos) y sonicador 3 minutos (80% amplitud, 30 segundos de pulso, segundos de pausa). Se compararon las fracciones citoplasmática (CEB) y membranal (MEB) de los tres métodos de homogenización en cuestión (Figura 9 panel B, Pistilo 1, Sonicador 2 y politrón 3), la membrana de nitrocelulosa con las fracciones fue incubada con anticuerpos bovinos anti-Bm86 y anti-BmVDAC. Se puede apreciar que la ruptura por politrón solo muestra una banda de 31 KDa correspondiente a BmVDAC en la fracción membranal, mientras que en la ruptura por pistilo BmVDAC aparece tanto en la fracción citoplasmática y membranal, lo que nos indica contaminación entre fracciones, por lo tanto, este método se descartó. Por otro lado, la ruptura con sonicador mostro resultados similares a los del politrón, pero al observar el gel de poliácridamida al 10 % (figura 9 panel A) las proteínas de la extracción con sonicador de la fracción membranal se degradaron.

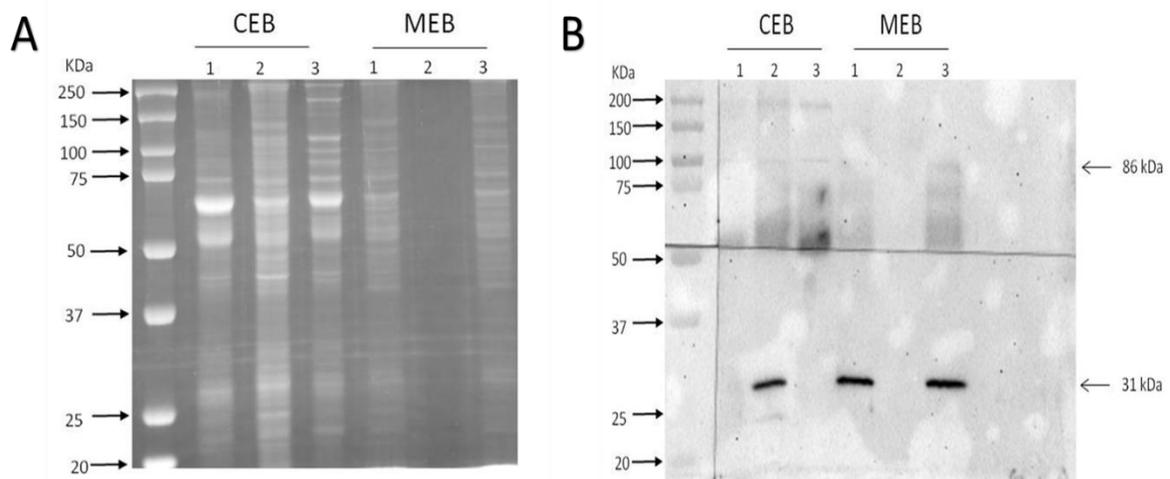


Figura 9: SDS-PAGE del análisis de las fracciones citoplasmática y membranal de los 3 métodos de homogenización. SDS-PAGE gel de poliácridamida al 10 % de las fracciones Citoplasmática (CEB) y Membranal (MEB) de la comparación de los tres métodos de homogenización Pistilo (1), Sonicador (2) y Politrón (3). Western blot de

la comparación de los tres métodos de homogenización del fraccionamiento celular. Fracción citoplasmática (CEB), fracción membranal (MEB), de la extracción de fracciones celulares con Pistilo (1), Sonicador (2) y Politrón (3).

Para corroborar que la extracción con politrón velocidad 2 por 10 segundos realmente fuera el método de ruptura indicado, se probaron los anticuerpos bovinos anti-Bm86, anti-BmVDAC y el anticuerpo anti-cadherina por separado con las fracciones citoplasmática y membranal, tal como se muestra en la figura 10, donde se hizo un triplicado de estas fracciones y cada par (CEB y MEB), se incubo con anti-BmVDAC (1:400), anti-Bm86 (1:500) y anti-cadherina (1:100).

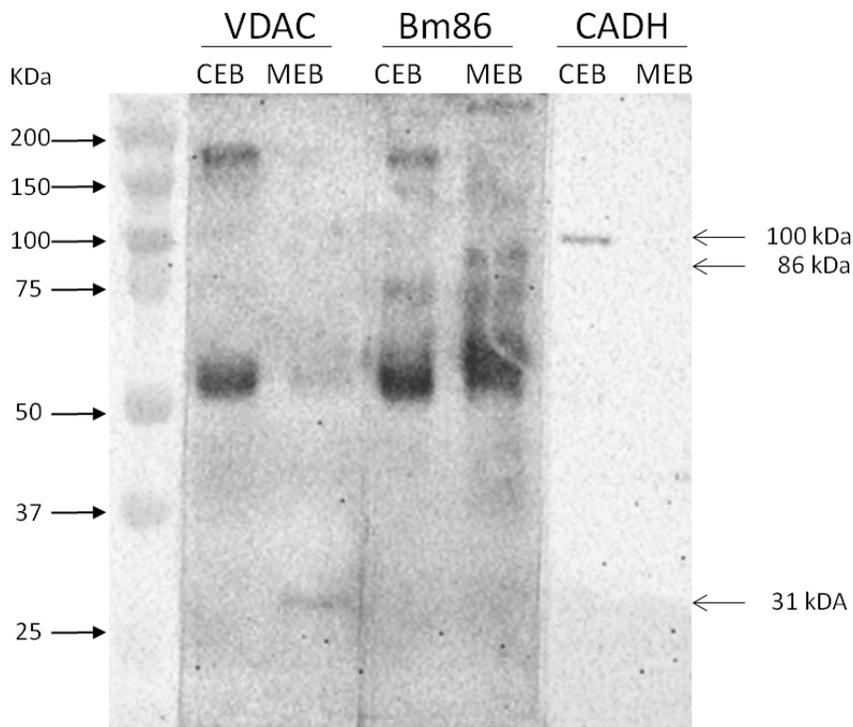


Figura 10: Western blot de las fracciones citoplasmática y membranal extraídas con politrón velocidad 2 por 10 segundos. Comparación de las fracciones Citoplasmática (CEB) y Membranal (MEB) incubadas con anticuerpos anti-Bm86, anti-BmVDAC y anti-Cadherina.

En la figura 10, BmVDAC (31 KDa) sólo aparece en la fracción membranal, al igual que Bm86 (86 KDa), en tanto a la Cadherina (100 KDa), solo se muestra una banda en la fracción citoplasmática, por esta razón, para las muestras de tiempos específicos post-repleción infectadas y no infectadas con *B. bigemina*, no se utilizó la cadherina como marcador.

Fraccionamiento celular a partir de intestinos de garrapatas *R. microplus* a las 0, 24 y 72 horas post-repleción infectadas y no infectadas con *B. bigemina*

Una vez estandarizado el fraccionamiento celular, se procedió a el análisis de los intestinos de *R. microplus* de los grupos 0, 24 y 72 horas post-repleción infectados y no infectados con *B. bigemina*. Las muestras para este análisis fueron proporcionadas por el Laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM. Después de la extracción de las fracciones celulares de todos los grupos de estudio, las fracciones se cuantificaron y analizaron en un gel SDS-PAGE al 10 % (Figura 11) en cada carril se cargaron 19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de las fracciones.

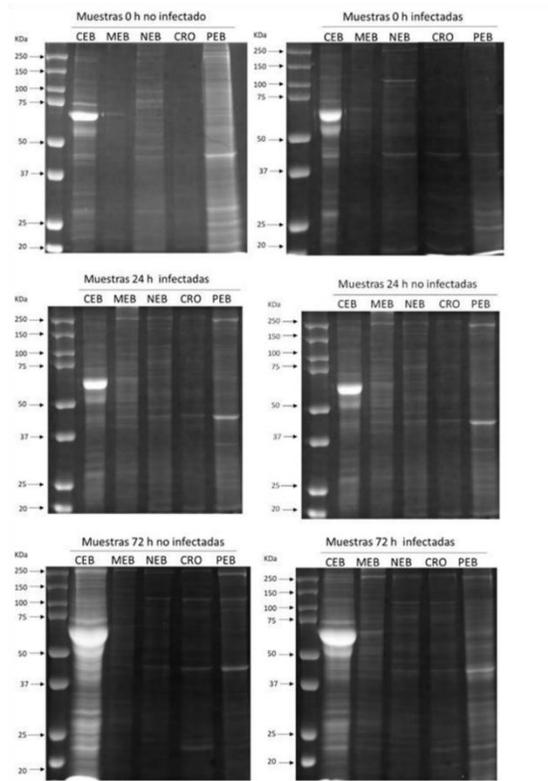


Figura 11: SDS-PAGE de fracciones celulares de intestinos de *R. microplus* a distintos tiempos post-repleción. SDS-PAGE gel de poliacrilamida al 10 % de fracciones celulares de los grupos 0, 24 y 72 horas post repleción de los grupos infectados y no infectados con *B. bigemina*. En cada gel se analizan por las

fracciones citoplasmática (CEB), membranal (MEB), nuclear (NEB), nuclear asociado a cromatina (CRO) y citoesqueleto (PEB).

Después del SDS-PAGE, se procedió a el análisis de las fracciones por western blot de todos los grupos, con las condiciones anteriormente estandarizadas utilizando los anticuerpos anti-BmVDAC y anti-Bm86 (marcador de membrana) para comprobar si la proteína BmVDAC se relocaliza a consecuencia de la infección por *B. bigemina* a distintos tiempos post repleción. Dentro de las fracciones extraídas se encuentran la citoplasmática, membranal, nuclear soluble, cromatina y citoesqueleto. Bm86 es una glicoproteína presente en la membrana plasmática de células del intestino de garrapatas, fue un control para el estudio de la relocalización de BmVDAC, ya que esta glicoproteína se encuentra en la fracción membranal de todos los grupos. Los resultados del fraccionamiento celular de los grupos 0 (Figura 12), 24 (Figura 13) y 72 (Figura 14) horas post repleción infectados y no infectados con *B. bigemina*, no se encontró diferencia alguna en cuanto a la localización de BmVDAC, ya que en los westerns blot de todos los grupos post repleción, se observaron bandas de 31 kDa, correspondientes a esta proteína únicamente en la fracción membranal.

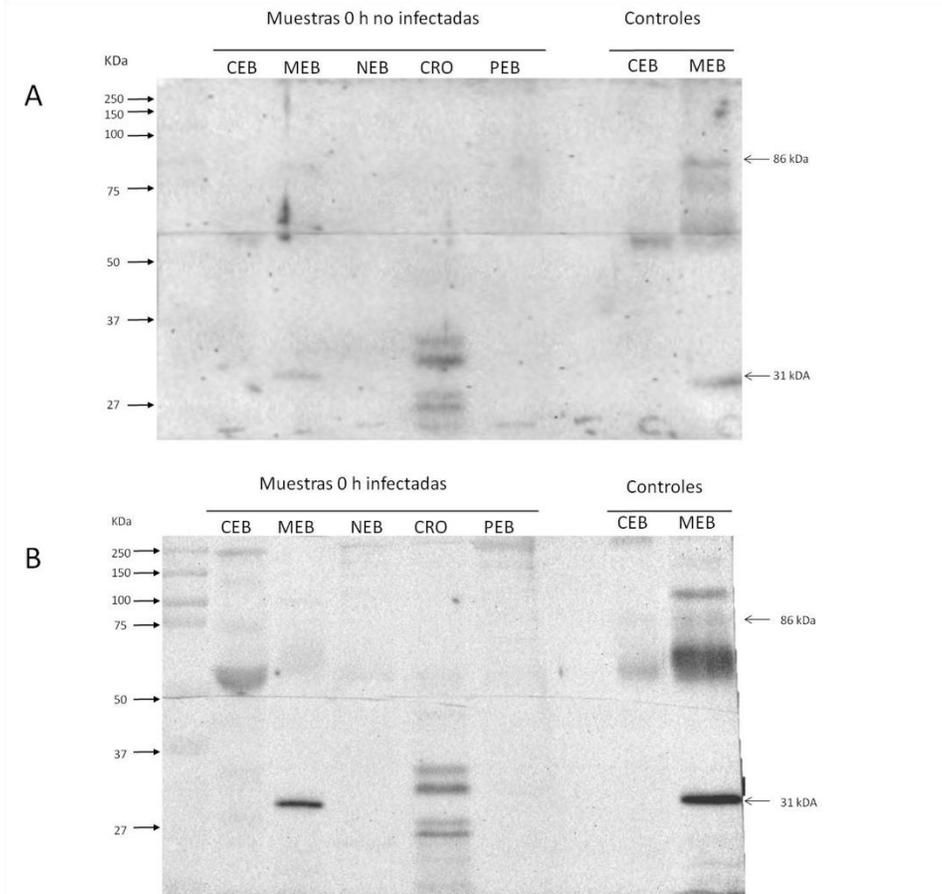


Figura 12. Western blot 0 horas post replicación de los grupos no infectados (panel A) e infectados con *B. Bigemina* (B). Análisis de las fracciones citoplasmática (CEB), membranal (MEB), nuclear (NEB), cromatina (CRO) y citoesqueleto (PEB), de intestinos de garrapatas *R. microplus* infectados y no infectados con *B. bigemina*. Controles positivos CEB y MEB de la extracción con politrón de la estandarización.

En la figura 13 se observa el análisis de western blot de las fracciones celulares de los grupos de 24 horas post replicación, el panel 13 A corresponde a las fracciones control no infectado con *B. bigemina*, el panel B corresponde al grupo infectado con *B. bigemina*.

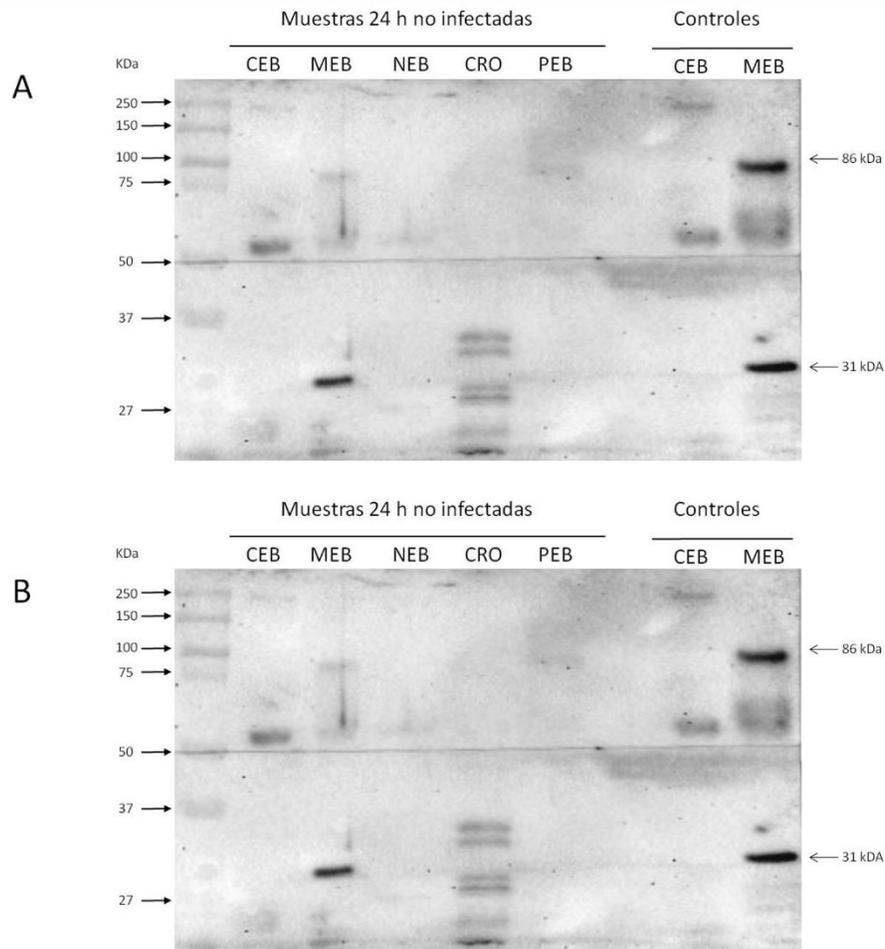


Figura 13. Western blot 24 horas post replicación de los grupos infectados y libres de *B. bigemina*. Análisis de las fracciones citoplasmática (CEB), membranal (MEB), nuclear (NEB), cromatina (CRO) y citoesqueleto (PEB), de intestinos de garrapatas *R. microplus* infectados y no infectados con *B. bigemina*. Controles positivos CEB y MEB de la extracción con politrón de la estandarización.

Por último, en la figura 14, western blot de las fracciones de intestinos disectados a las 72 horas post replicación, en el panel A se observa el análisis de las fracciones del grupo 72 horas post replicación no infectado con *B. bigemina*, en el panel B se muestra el western blot del grupo infectado con *B. bigemina*.

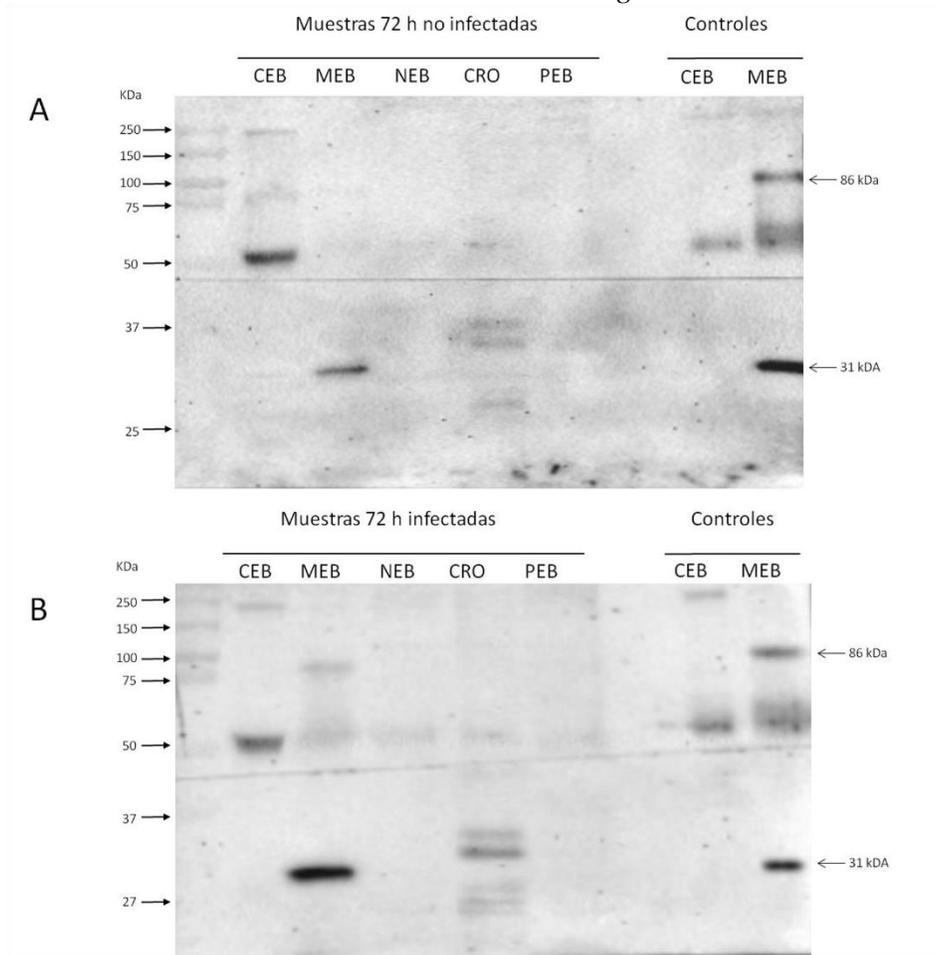


Figura 14. Western blot 72 horas post repleción de los grupos infectados y libres de *B. bigemina*. Análisis de las fracciones citoplasmática (CEB), membranal (MEB), nuclear (NEB), cromatina (CRO) y citoesqueleto (PEB), de intestinos de garrapatas *R. microplus* infectados y no infectados con *B. bigemina*. Controles positivos CEB y MEB de la extracción con politrón de la estandarización.

En estudios anteriores se ha reportado el papel de BmVDAC durante la infección con de *B. bigemina*, Rodríguez y colaboradores (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015) reportaron la expresión diferencial y un cambio en la distribución de BmVDAC en células de intestino de *R. microplus* infectadas por *B. bigemina* a las 24 y 72 horas post repleción, esto según los datos de la microscopía confocal donde se observó mayor cantidad de puntos correspondientes a BmVDAC a estos tiempos post repleción.

La proteína VDAC se ha identificado como una proteína participe de los procesos de infección de algunos parásitos intracelulares como *P. falciparum*, este al igual que *B. bigemina* es un parásito de la familia *Apicomplexa* que depende de dos hospederos para completar su ciclo de vida, se ha visto que la infección por Plasmodium regula positivamente los canales aniónicos endógenos del huésped como VDAC manteniendo una vía de permeabilidad que beneficia al parásito, aumentando la disponibilidad VDAC en la membrana de eritrocitos infectados, por lo tanto, probablemente *B. bigemina* regule la relocalización de BmVDAC hacia otras estructuras como la membrana citoplasmática de células de intestino de garrapata, para así mantener un flujo constante de nutrientes y productos de deshechos.

En los resultados de los experimentos anteriormente mostrados, no se observa alguna relocalización de *BmVDAC* entre las 5 fracciones celulares estudiadas. La fracción membranal incluye tanto membrana plasmática como mitocondrial, probablemente *BmVDAC* está presente en la membrana citoplasmática de los grupos infectados con *B. bigemina*, por ello, se complementará este estudio con un análisis de microscopía confocal de los grupos 0, 24 y 72 h post repleción de células de intestino de *R. microplus* infectadas y no infectadas con *B. bigemina*.

Establecimiento de cultivo celular primario de células de intestino de *R. microplus*.

Las garrapatas para este estudio se obtuvieron mediante la infestación con larvas de *R. microplus* e infección de bovinos con *B. bigemina*. Los bovinos fueron infestados con larvas, posteriormente a los 21 días que es cuando estas larvas maduran a ninfas y después a adultas, se colectaron únicamente las garrapatas repletas para la disección de los intestinos a las 0 y 72 horas post repleción. Después de la disección se procedió a realizar el protocolo de disociación del tejido para el establecimiento del cultivo primario. En la figura 15, se observan células de intestino de *R. microplus* resultado del establecimiento del cultivo primario, en cada

una de las celdas observamos células de distinto tamaño, esto se debe a que la composición de las estructuras histológicas del intestino, los componentes celulares son células basófilas, células digestivas tempranas y células digestivas maduras las cuales son de mayor tamaño. En todos los grupos se aprecian células esféricas de gran tamaño que se encuentran suspendidas en el medio de cultivo.

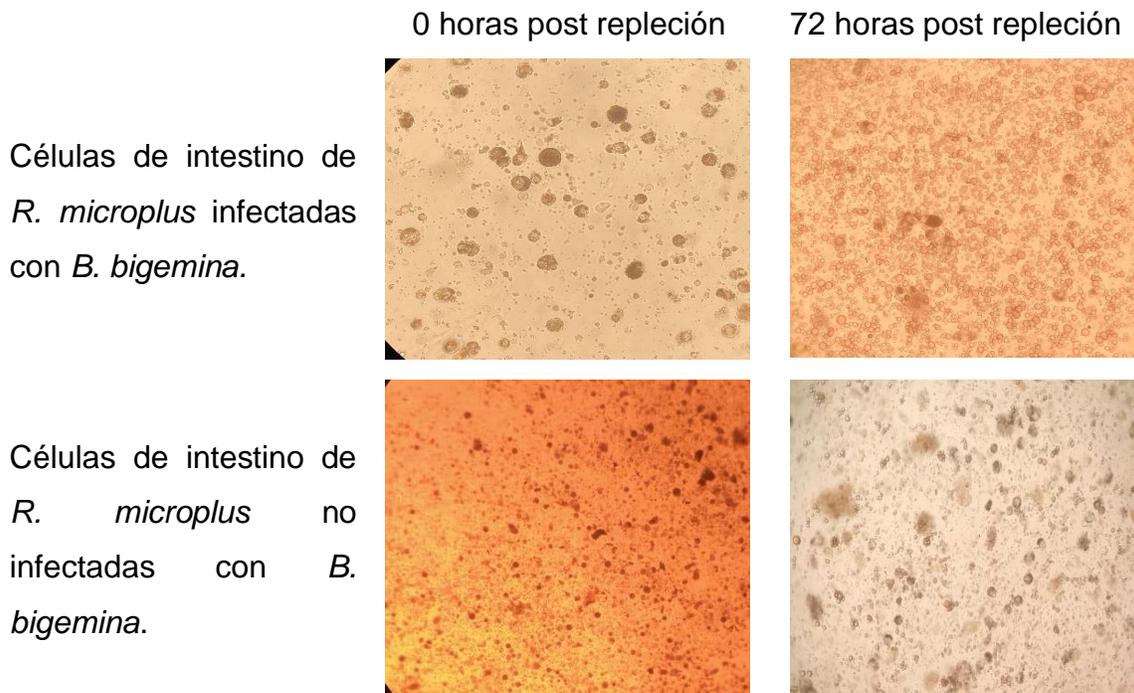


Figura 15: Células de intestino de *R. microplus* infectadas con *B. bigemina* y no infectadas observadas en microscopio invertido a 20x. En las imágenes observamos células de intestino de *R. microplus* disociado con tripsina al 0.25% del grupo control e infectado con *B. bigemina* a las 0 y 72 horas post repleción

Después del establecimiento del cultivo celular primario, las células fueron fijadas en suspensión con paraformaldehído al 3.7 % y se almacenaron a 4° C hasta su uso, antes de llevar a cabo la preparación y el análisis de microscopía, se realizó la extracción de ADN a partir de viales de células fijadas, para corroborar la infección de *B. bigemina* en los grupos infectados de 0 y 72 h post repleción, se realizó la detección molecular mediante PCR. En la figura 16 se observan los productos de PCR de los grupos infectados y no infectados con *B. bigemina*, como era de

esperarse únicamente se observan bandas de 250 pb en los grupos infectados con *B. bigemina*.

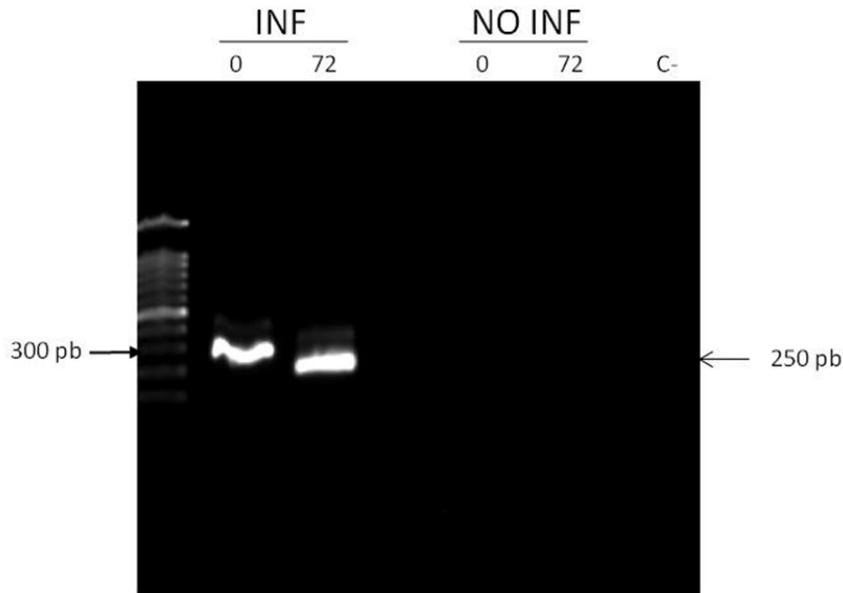


Figura 16. Amplificación del gen *ama-1* para la corroboración de la infección por *B. bigemina* en cultivo primario de intestino de *R. microplus*. Gel de agarosa al 1 % con productos de PCR la amplificación de 250 pb de *B. bigemina*. En los carriles 1 y 2 se muestran los productos de los grupos infectados a las 0 y 72 horas infectados, mientras que en los grupos de 0 y 72 horas no infectados y el control negativo no se observan bandas.

Como control de la extracción de ADN, se llevó a cabo un protocolo de PCR para la amplificación del gen *bmvdac* a partir de ADN extraído de células de intestino de garrapata a las 0 y 72 horas post repleción de los grupos infectados y no infectados con *B. bigemina*, adicionalmente se corrió un control positivo que consistió en ADN genómico de una garrapata *R. microplus*. En la figura 17 se observan los productos de la amplificación de *bmvdac* como un amplicón de 819 pb presente en todos los grupos y el control positivo.

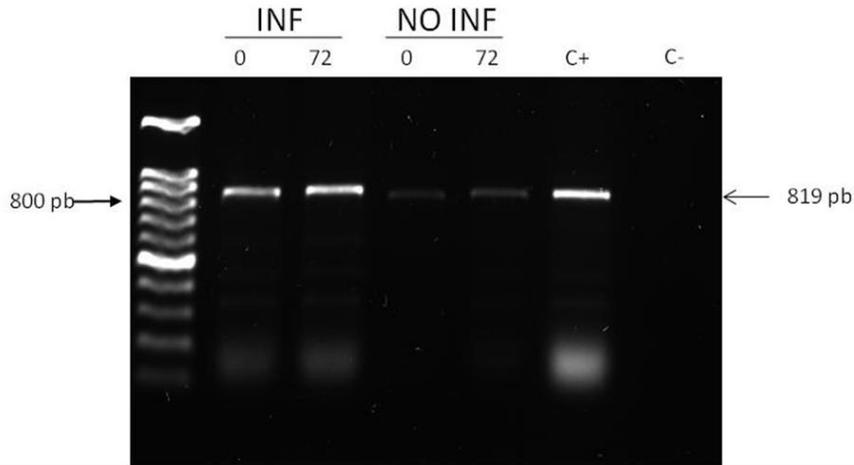


Figura 17: Amplificación del gen *bmvdac* a partir de cultivo primario de intestino de *R. microplus*. Gel de agarosa al 1 %, amplificación del gen *bmvdac* de los grupos 0 y 72 horas infectados y libres de *B. bigemina*, adicionalmente se corrió un control positivo a partir de ADN total de *R. microplus* (C+) y un control negativo (C-) sin ADN.

Inmunolocalización de la proteína BmVDAC en células de intestino de *R. microplus*

En células de intestino de *R. microplus* a las 0 y 72 horas post repleción de los grupos infectados y no infectados con *B. bigemina* se realizó la inmunolocalización de BmVDAC utilizando sueros bovinos con anticuerpos anti-BmVDAC, suero bovino pre inmune, y anticuerpos anti-cadherina. Las laminillas fueron preparadas y observadas en microscopio confocal. En la figura 18 únicamente se observan células de 72 horas post repleción no infectadas con *B. bigemina*, a causa de que este proyecto se llevó a cabo durante la pandemia de COVID-19, el tiempo de uso del microscopio confocal era limitado, además que cuando el acceso a dicho equipo fue libre, este se averió, complicando el análisis, las imágenes correspondientes a los otros grupos de estudio no se pudieron recuperar con éxito del equipo.

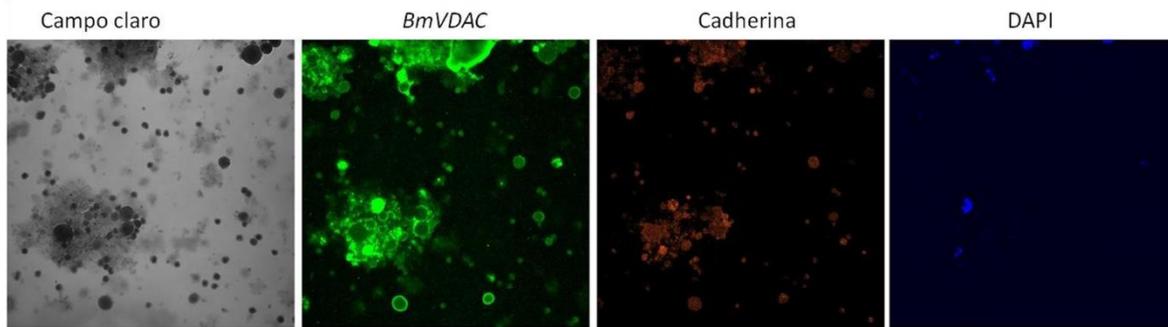


Figura 18: Microscopía confocal de células de células de intestino de *R. microplus*, a las 72 horas post replicación no infectadas con *B. bigemina*. Células de intestino de garrapata incubadas con anticuerpos bovinos anti-BmVDAC, a las 72 horas post replicación no infectadas con *B. bigemina*.

Se intentó sustituir el uso del microscopio confocal por uno de fluorescencia, pero para entonces las células tenían un tiempo de almacenaje considerable por lo que, al repetir la preparación de las laminillas, en el análisis sólo se observaron agregados y no células por lo que creemos que las muestras se degradaron, por esta razón no se pudo obtener imágenes de células. En la (Figura 19) se muestra el resultado del análisis de una de las laminillas por microscopio de fluorescencia, como se mencionó anteriormente, no se observan estructuras celulares, adicionalmente uno de los filtros de este microscopio mostraba emisión en el mismo campo visual tanto para BmVDAC (verde) como cadherina (Rojo).

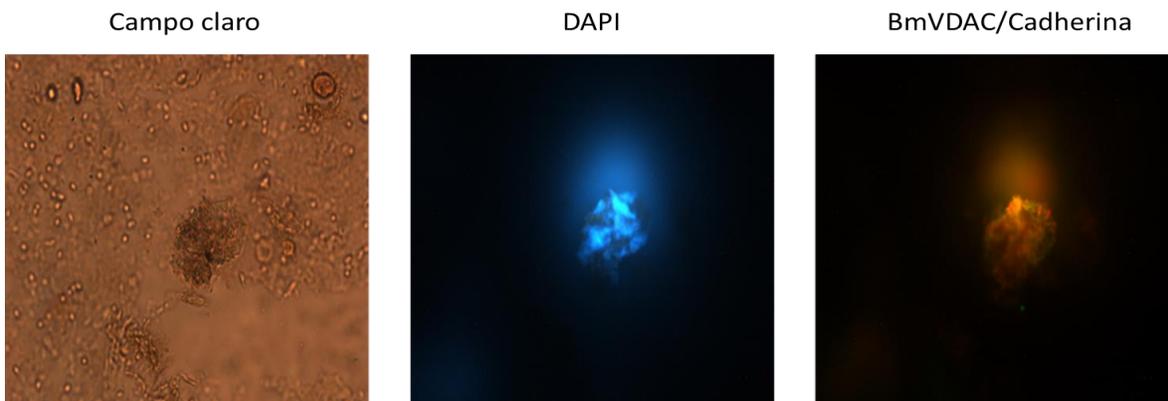


Figura 19. Microscopía de fluorescencia de células de intestino de *R. microplus* a las 0 horas post replicación no infectadas con *B. bigemina*.

Como perspectiva a futuro el análisis de las fracciones celulares de los intestinos de *R. microplus* a distintos tiempos post repleción infectados y no infectados con *B. bigemina*, se complementará con el análisis de inmunodetección por microscopía de fluorescencia, siguiendo el protocolo anteriormente descrito para el establecimiento de cultivo celular y la preparación de las laminillas.

Discusión

En el presente trabajo se llevó a cabo la estandarización de la técnica de extracción de fracciones celulares a partir de intestinos de garrapatas de la especie *R. microplus*, a distintos tiempos post repleción infectados y no infectados con *B. bigemina*. Esta técnica se estandarizó para realizar el estudio de BmVDAC una proteína recientemente caracterizada en la membrana mitocondrial de células de intestino de *R. microplus*. En cada grupo de estudio se analizaron 5 fracciones celulares: fracción citoplasmática (CEB), fracción membranal (MEB), fracción nuclear (NEB), fracción nuclear ligada a cromatina (CRO) y fracción de citoesqueleto (PEB). El análisis de las fracciones de los grupos 0, 24 y 72 horas post repleción de intestinos infectados y no infectados con *B. bigemina* se llevó a cabo mediante inmunodetección con western blot con anticuerpos anti-BmVDAC. En los resultados de western blot únicamente se detectó a la proteína BmVDAD en la fracción membranal en todos los grupos, por lo tanto, según nuestros resultados, la proteína BmVDAC no se relocaliza entre las fracciones analizadas.

En estudios anteriores de fraccionamiento celular, Taha M. S y colaboradores, realizaron la estandarización de una técnica de fraccionamiento celular con el fin de estudiar la distribución sub celular de la proteína de retraso mental X frágil, donde después de la extracción de fracciones, estas se analizaron por western blot con marcadores de proteínas específicas de cada una de las fracciones analizadas, cabe mencionar que realizaron la extracción y separación de fracciones membranales para analizar por separado la fracción membranal mitocondrial de la citoplasmática, para observar que su proteína de estudio se encontraba en ambos compartimentos (Taha M. S *et al.*, 2014).

En parásitos del grupo apicomplexa como *T. gondii*, VDAC se ha identificado como una proteína implicada con la regulación de Ca^{2+} y también un sitio de contacto entre la mitocondria y el retículo endoplásmico formando un puente de unión para la transferencia directa de calcio, la ausencia de VDAC no tiene efecto en el

transporte de calcio, pero sí en la morfología del retículo endoplásmico y en la replicación del parásito (Mallo *et al.*, 2021). Adicionalmente *T. gondii* regula la importación de proteínas del huésped como VDAC a la membrana citoplasmática (Blank *et al.*, 2021).

En *P. falciparum* al igual que *B. bigemina*, es un parásito intracelular, se ha reportado la regulación de proteínas endógenas de eritrocitos a causa de la infección por merozoítos de Plasmodium (Merckx, A. *et al.*, 2019). Una vez dentro del eritrocito este parásito es más activo metabólicamente, utiliza la hemoglobina presente en el eritrocito para la síntesis de amino ácidos, excepto la isoleucina, el cual es el único amino ácido que no puede sintetizar el cual obtiene del medio, por esta razón los desechos generados por Plasmodium pueden acumularse en la célula del huésped, por lo tanto el aumento en la permeabilidad están regulados por proteínas como VDAC, la cual aumenta su conductancia y su disponibilidad en la membrana plasmática en células infectadas con *P. falciparum* (Counihan, N. A. *et al.*, 2021).

Con *B. bigemina*, puede ocurrir un caso similar, pero con las fases sexuales, se han identificado cambios diferenciales en la expresión de BmVDAC a causa de la infección por *B. bigemina* a las 24 post repleción lo que evidencia su regulación. En este estudio los resultados por western blot de las fracciones celulares no identificaron a BmVDAC en algún compartimento distinto al membranal, creemos que probablemente *B. bigemina* sí regula la localización de BmVDAC a la membrana citoplasmática como lo hacen otros parásitos apicomplexa pero nuestro estudio analiza en conjunto la membrana citoplasmática y membranal, sería interesante separar estos dos compartimentos tal como lo realizaron Taha y colaboradores (Taha M. S *et al.*, 2014; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015).

De manera interesante como se menciona anteriormente, se ha reportado que VDAC de humanos puede relocalizarse en la membrana plasmática, en un trabajo anteriormente realizado por nuestro grupo de investigación, se reportó la unión del

plasminógeno bovino con la proteína BmVDAC mediante ensayos de binding blot. La subunidad del plasminógeno que interactúa con el extremo N-terminal de VDAC según reportes en humanos es Kringle 5, en BmVDAC el extremo N-terminal se encuentra conservado al igual que la subunidad kringle 5 de bovino en comparación con el humano, como se mencionó anteriormente la interacción de estas proteínas ayuda a la invasión celular de parásitos del phylum Apicomplexa como *Plasmodium*. por ello probablemente *B. bigemina* utiliza la activación de estas moléculas durante su proceso de invasión al epitelio intestinal de las garrapatas *R. microplus* (Hernández Aparicio, 2020)

La enolasa es una enzima implicada en el proceso de infección de algunos patógenos intracelulares la cual tiene sitios de unión a plasminógeno, cuando se unen estas dos moléculas se cataliza la conversión de plasminógeno (zimógeno) a plasmina lo que conduce a la degradación de fibrina y de la matriz extracelular, facilitando la invasión celular de los patógenos. En *P. falciparum* la enolasa se ha encontrado en la membrana citoplasmática de los merozoítos, y oocinetos como un receptor a plasminógeno, y como un ligando para las células epiteliales de intestino del mosquito (vector) (Ghosh A *et al.*, 2011). En *B. bigemina* la enolasa se encuentra expresada en merozoítos (etapa asexual) y en el citoplasma de eritrocitos infectados (Luna Rodríguez., 2019).

Como se mencionó anteriormente VDAC interactiva con un activador de plasminógeno en la membrana citoplasmática, el cual es utilizado en el proceso de infección de parásitos apicomplexa, tomando en cuenta que la activación del plasminógeno es un paso para la invasión de los parásitos como *Plasmodium*, probablemente BmVDAC se relocaliza a la membrana plasmática como consecuencia de la infección por *B. bigemina* y la activación del plasminógeno (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015).

Conclusión

En este trabajo se logró la estandarización del cultivo primario de células de intestino de *R. microplus* y la extracción de fracciones celulares a partir de intestino. Los resultados obtenidos no son suficientes para afirmar la translocación de la proteína BmVDAC tras la infección por *B. bigemina*, por ello es necesario realizar estudios adicionales que demuestren la presencia de esta proteína en algún otro sitio distinto a la membrana mitocondrial.

El objetivo de estandarizar la obtención de cultivo celular primario era aportar a los resultados obtenidos con la observación de células con inmunofluorescencia en un microscopio confocal, lamentablemente el tiempo de almacenado de las células fue muy prolongado y la disponibilidad de un microscopio confocal escasa, a causa de la pandemia del 2019 al 2022, por ello este experimento se realizará en un futuro.

Perspectivas

Observar la localización de la proteína BmVDAC mediante el uso de anticuerpos primarios anti-BmVDAC, marcadores mitocondriales y de membrana citoplasmática, para analizar si esta proteína se relocaliza como consecuencia de la infección por *B. bigemina* en células de intestinos de *R. microplus*.

Determinar la unión específica de BmVDAC con el plasminógeno y su función durante la infección por *B. bigemina*.

Referencias:

1. Mosqueda, J., Cossío-Bayugar, R., Rodríguez, E., Falcón, A., Ramos, A., Figueroa, J. V., & Alvarez, A. (2008). Primary midgut, salivary gland, and ovary cultures from *Boophilus microplus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 49-52.
2. Jacob, S. S., Sengupta, P. P., Paramanandham, K., Suresh, K. P., Chamuah, J. K., Rudramurthy, G. R., & Roy, P. (2020). Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. *Veterinary Parasitology*, 109136.
3. Terkawi, M. A., Huyen, N. X., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., ... & Xuan, X. (2011). Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Veterinary Parasitology*, 178(3-4), 201-207.
4. Narciso, R., Monzon, O., Mejia, J., & Mancia, C. (2014). Encuesta Nacional Agropecuaria 2013.
5. Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., de León, A. A. P., Villela, H. S., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sánchez, H. F., ... & Carrasco, D. G. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61-74.
6. Brites-Neto, J., Duarte, K. M. R., & Martins, T. F. (2015). Tick-borne infections in human and animal population worldwide. *Veterinary world*, 8(3), 301.
7. Leal, B., Thomas, D. B., & Dearth, R. K. (2018). Population dynamics of Off-Host *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) larvae in response to habitat and seasonality in South Texas. *Veterinary sciences*, 5(2), 33.

8. Jain, P., Satapathy, T., & Pandey, R. K. (2020). Rhipicephalus microplus: A parasite threatening cattle health and consequences of herbal acaricides for upliftment of livelihood of cattle rearing communities in Chhattisgarh. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101611.
9. Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., & J Canto, G. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Current medicinal chemistry*, 19(10), 1504-1518.
10. Brayton, K. A., Lau, A. O. T., Herndon, D. R., Hannick, L., & Kappmeyer, L. S. (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan.
11. Bastos, R. G., Ueti, M. W., Knowles, D. P., & Scoles, G. A. (2010). The Rhipicephalus (Boophilus) microplus Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites & vectors*, 3(1), 111.
12. Merino-Charrez, J. O., Gómez-Romero, N., Barrera-Molina, I., & Lagunes-Quintanilla, R. (2019). In silico analysis of the subolesin gene as a possible vaccine against Rhipicephalus microplus ticks. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), 129-136.
13. Antunes, S., Rosa, C., Couto, J., Ferrolho, J., & Domingos, A. (2017). Deciphering Babesia-vector interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 429.
14. Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., ... & Zeth, K. (2008). Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15370-15375.

15. Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., Alvarez-Sánchez, M. E., Neri, A. F., Mendoza-Hernández, G., & Camacho-Nuez, M. (2012). The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of *Babesia bigemina* sexual stages with *Rhipicephalus microplus* midgut cells. *Veterinary parasitology*, 187(3-4), 538-541.
16. Gincel, D., Silberberg, S. D., & Shoshan-Barmatz, V. (2000). Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by Glutamate¹. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 32(6), 571-583.
17. Shoshan-Barmatz, V., & Gincel, D. (2003). The voltage-dependent anion channel. *Cell biochemistry and biophysics*, 39(3), 279-292.
18. Tabor, A. E., Ali, A., Rehman, G., Rocha Garcia, G., Zangirolamo, A. F., Malardo, T., & Jonsson, N. N. (2017). Cattle tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: a review of resistant and susceptible host responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 506.
19. Berry, C. M. (2017). Resolution of the taxonomic status of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Doctoral dissertation, University of Glasgow).
20. Walker, A. R. (2003). Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species (pp. 3-210). Edinburgh: Bioscience Reports.
21. Lynen, G., Zeman, P., Bakuname, C., Di Giulio, G., Mtui, P., Sanka, P., & Jongejan, F. (2008). Shifts in the distributional ranges of *Boophilus* ticks in Tanzania: evidence that a parapatric boundary between *Boophilus microplus* and *B. decoloratus* follows climate gradients. *Experimental and Applied Acarology*, 44(2), 147-164.

22. Chevillon, C., de Meeûs, T., & McCoy, K. D. (2012). Population genetics and molecular epidemiology of infectious diseases. In *New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases* (pp. 45-76). Springer, Dordrecht.
23. Population Genetics and Molecular Epidemiology of Infectious Diseases - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Theoretical-life-cycle-of-the-southern-cattle-tick-Rhipicephalus-Boophilus-microplus_fig6_226243463
24. Pérez de la Rosa, J. J., Vargas Ureostegui, P., Álvarez Martínez, J. A., Rojas Martínez, C., González Zuñiga, V. M., & Figueroa Millán, J. V. (2012). Identificación inicial de genes en *Babesia bigemina* mediante análisis de Etiquetas de Secuencia Expresadas en el estadio intraeritrocítico del parásito. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3, 61-87.
25. Brown, W. C., Norimine, J., Knowles, D. P., & Goff, W. L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 75-87.
26. Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A., & Cooke, B. M. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit. *International journal for parasitology*, 49(2), 183-197.
27. Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary research*, 40(2), 1-18.
28. Owen, J. A., Punt, J., & Stranford, S. A. (2014). *Inmunología*. McGraw Hill.
29. Lu, P., Zhou, Y., Yu, Y., Cao, J., Zhang, H., Gong, H., ... & Zhou, J. (2016). RNA interference and the vaccine effect of a subolesin homolog from the tick

Rhipicephalus haemaphysaloides. *Experimental and Applied Acarology*, 68(1), 113-126.

30. Fisher, T. G., McElwain, T. F., & Palmer, G. H. (2001). Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American isolates of *Babesia bigemina*. *Infection and immunity*, 69(6), 3782-3790.
31. Bohaliga, G. A., Johnson, W. C., Taus, N. S., Hussein, H. E., Bastos, R. G., Suarez, C. E., ... & Ueti, M. W. (2019). Identification of proteins expressed by *Babesia bigemina* kinetes. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-9
32. AbouLaila, M., Terkawi, M., Menshawy, S., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2019). Identification, characterization, and protective effect of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) Homolog from the Argentina Strain of *Babesia bigemina*. *Ann Clin Investig.* 2019; 1 (1), 1001.
33. Hussein, H. E., Johnson, W. C., Taus, N. S., Suarez, C. E., Scoles, G. A., & Ueti, M. W. (2019). Silencing expression of the *Rhipicephalus microplus* vitellogenin receptor gene blocks *Babesia bovis* transmission and interferes with oocyte maturation. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-7.
34. Schein, S. J., Colombini, M., & Finkelstein, A. (1976). Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *The Journal of membrane biology*, 30(1), 99-120.
35. Young, M. J., Bay, D. C., & Hausner, G. (2007). The evolutionary history of mitochondrial porins. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 1-21.
36. Bock, F. J., & Tait, S. W. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), 85-100

37. Yan, G., Elbadawi, M., & Efferth, T. (2020). Multiple cell death modalities and their key features. *World Academy of Sciences Journal*, 2(2), 39-48.
38. Li, L., Yao, Y. C., Gu, X. Q., Che, D., Ma, C. Q., Dai, Z. Y., ... & Gao, G. Q. (2014). Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47), 32628-32638.
39. Shoshan-Barmatz, V., Shteinfer-Kuzmine, A., & Verma, A. (2020). VDAC1 at the intersection of cell metabolism, apoptosis, and diseases. *Biomolecules*, 10(11), 1485.
40. Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., & Cruz-Vázquez, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae): Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 2(2), 177-192.
41. Rodríguez-Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Pérez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 295-308.
42. Piper, E. K., Jonsson, N. N., Gondro, C., Lew-Tabor, A. E., Moolhuijzen, P., Vance, M. E., & Jackson, L. A. (2009). Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(7), 1074-1086.
43. Solorio-Rivera, J. L., & Rodríguez-Vivas, R. I. (1997). Epidemiología de la Babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *J. Biomed*, 8, 95-105.

44. Trentelman, J. J., Teunissen, H., Kleuskens, J. A., Van de Crommert, J., De la Fuente, J., Hovius, J. W., & Schetters, T. P. (2019). A combination of antibodies against Bm86 and Subolesin inhibits engorgement of *Rhipicephalus australis* (formerly *Rhipicephalus microplus*) larvae in vitro. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-10.
45. Parizi, L. F., Reck Jr, J., Oldiges, D. P., Guizzo, M. G., Seixas, A., Logullo, C., ... & da Silva Vaz Jr, I. (2012). Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. *Vaccine*, 30(48), 6912-6917.
46. SANCHEZ, R. I. O. (2019). Efecto de los anticuerpos contra la proteína canal-aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en el proceso de infección de *Babesia bigemina* en *Rhipicephalus microplus*.
47. Bouyer, G., Cueff, A., Egée, S., Kmiecik, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., ... & Thomas, S. L. (2011). Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(8), 2305-2312.
48. Mallo, N., Duarte, E. S. D. S. M., Baehr, S. C., Biddau, M., Ovcariikova, J., Wilde, M. L., ... & Sheiner, L. (2020). Depletion of voltage-dependent anion channel (VDAC) of *Toxoplasma gondii* affects multiple mitochondrial functions, but not calcium signalling. *bioRxiv*.
49. Danelishvili, L., Chinison, J. J., Pham, T., Gupta, R., & Bermudez, L. E. (2017). The Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) of *Mycobacterium avium* phagosome are associated with bacterial survival and lipid export in macrophages. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.

50. Jitobaom, K., Tongluan, N., & Smith, D. R. (2016). Involvement of voltage-dependent anion channel (VDAC) in dengue infection. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
51. Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., & Cruz-Vázquez, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae): Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 2(2), 177-192.
52. Rodríguez-Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Pérez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 295-308.
53. Piper, E. K., Jonsson, N. N., Gondro, C., Lew-Tabor, A. E., Moolhuijzen, P., Vance, M. E., & Jackson, L. A. (2009). Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(7), 1074-1086.
54. Solorio-Rivera, J. L., & Rodríguez-Vivas, R. I. (1997). Epidemiología de la Babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *J. Biomed*, 8, 95-105.
55. Trentelman, J. J., Teunissen, H., Kleuskens, J. A., Van de Crommert, J., De la Fuente, J., Hovius, J. W., & Schetters, T. P. (2019). A combination of antibodies against Bm86 and Subolesin inhibits engorgement of *Rhipicephalus australis* (formerly *Rhipicephalus microplus*) larvae in vitro. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-10.

56. Parizi, L. F., Reck Jr, J., Oldiges, D. P., Guizzo, M. G., Seixas, A., Logullo, C., ... & da Silva Vaz Jr, I. (2012). Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. *Vaccine*, 30(48), 6912-6917.
57. SANCHEZ, R. I. O. (2019). Efecto de los anticuerpos contra la proteína canal-aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en el proceso de infección de *Babesia bigemina* en *Rhipicephalus microplus*.
58. Bouyer, G., Cueff, A., Egée, S., Kniecik, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., ... & Thomas, S. L. (2011). Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(8), 2305-2312.
59. Mallo, N., Duarte, E. S. D. S. M., Baehr, S. C., Biddau, M., Ovcariikova, J., Wilde, M. L., ... & Sheiner, L. (2020). Depletion of voltage-dependent anion channel (VDAC) of *Toxoplasma gondii* affects multiple mitochondrial functions, but not calcium signalling. *bioRxiv*.
60. Danelishvili, L., Chinison, J. J., Pham, T., Gupta, R., & Bermudez, L. E. (2017). The Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) of *Mycobacterium avium* phagosome are associated with bacterial survival and lipid export in macrophages. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
61. Jitobaom, K., Tongluan, N., & Smith, D. R. (2016). Involvement of voltage-dependent anion channel (VDAC) in dengue infection. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
62. Yusuf, J. J. (2017). Review on Bovine Babesiosis and its Economical Importance. *Jemal. Journal of Veterinary Medicine and Research*.

63. Ganzinelli, S., Benitez, D., Gantuya, S., Guswanto, A., Florin-Christensen, M., Schnittger, L., & Igarashi, I. (2020). Highly sensitive nested PCR and rapid immunochromatographic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in a cattle herd with acute clinical and fatal cases in Argentina. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, 159-164.
64. Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. in persistently infected cattle. *Pathogens*, 8(3), 143.
65. Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. in persistently infected cattle. *Pathogens*, 8(3), 143
66. Torina, A., Cordaro, A., Blanda, V., D'Agostino, R., Scimeca, S., Scariano, M. E., ... & Lelli, R. (2016). A promising new ELISA diagnostic test for cattle babesiosis based on *Babesia bigemina* Apical Membrane Antigen-1. *Vet. Ital*, 52, 63-69.
67. Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., & J Canto, G. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Current medicinal chemistry*, 19(10), 1504-1518.
68. Yokoyama, N., Okamura, M., & Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2), 22-32.

69. Paravani, E. V., Simoniello, M. F., Poletta, G. L., & Casco, V. H. (2019). Cypermethrin induction of DNA damage and oxidative stress in zebrafish gill cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 1-7.
70. Rojas Ramírez, E. E., Mosqueda Gualito, J. J., Álvarez Martínez, J. A., Hernández Ortíz, R., Ramos Aragón, J. A., Rojas Martínez, C., ... & Figueroa Millán, J. V. (2011). Transmissibility of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* attenuated strains by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 2(3), 267-281.
71. Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R. I., & Alonso-Díaz, M. Á. (2012). Resistance of *Rhipicephalus microplus* to amitraz and cypermethrin in tropical cattle farms in Veracruz, Mexico. *Journal of Parasitology*, 98(5), 1010-1014.
72. Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology research*, 117(1), 3-29.
73. Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., León-Ávila, G., Castañeda-Ortiz, E. J., Álvarez-Sánchez, M. E., Camacho, A. D., ... & Camacho-Nuez, M. (2015). BmVDAC upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology*, 212(3-4), 368-374.
74. Bhat, S. A., Singh, N. K., Singh, H., & Rath, S. S. (2017). Molecular prevalence of *Babesia bigemina* in *Rhipicephalus microplus* ticks infesting cross-bred cattle of Punjab, India. *Parasite epidemiology and control*, 2(3), 85-90.

75. Chaudhry, Z. I., Suleman, M., Younus, M., & Aslim, A. (2010). Molecular detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in crossbred carrier cattle through PCR. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(2).
76. Checa, R., Montoya, A., Ortega, N., González-Fraga, J. L., Bartolomé, A., Gálvez, R., ... & Miró, G. (2017). Efficacy, safety and tolerance of imidocarb dipropionate versus atovaquone or buparvaquone plus azithromycin used to treat sick dogs naturally infected with the *Babesia microti*-like piroplasm. *Parasites & vectors*, 10(1), 1-12.
77. Havlíková, S., Roller, L., Koči, J., Trimnell, A. R., Kazimírová, M., Klempa, B., & Nuttall, P. A. (2009). Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine antigen from the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *International journal for parasitology*, 39(13), 1485-1494.
78. Rego, R. O., Trentelman, J. J., Anguita, J., Nijhof, A. M., Sprong, H., Klempa, B., ... & Hovius, J. W. (2019). Counterattacking the tick bite: towards a rational design of anti-tick vaccines targeting pathogen transmission. *Parasites & vectors*, 12(1), 1-20.
79. Panorama nacional de garrapata *boophilus* spp, SENASICA, 2021, https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/abril/PANGarrapataBoophilus24-03-21_d14af967-d0cc-4935-a6ba-dce18add7836.pdf
80. González Sáenz Pardo, J. R., & Hernández Ortiz, R. (2012). *Boophilus microplus*: current status of acaricide resistance on the Mexican American border and its impact on commerce. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3, 1-8.
81. De Pinto, V., Messina, A., Lane, D. J., & Lawen, A. (2010). Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS letters*, 584(9), 1793-1799.

82. Ghosh, A. K., & Jacobs-Lorena, M. (2011). Surface-expressed enolases of Plasmodium and other pathogens. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 85-90.
83. Zhang, J., Wang, K., Xue, P., Chen, X., & Bian, L. (2022). Molecular recognition and interaction between human plasminogen Kringle 5 and voltage-dependent anion channel-1 by biological specificity technologies and molecular dynamic simulation. *Biophysical Chemistry*, 280, 106710.
84. Luna Rodríguez, A. L. (2019). Identificación y caracterización molecular del gen de la enolasa de Babesia bigemina (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de la Ciudad de México: Colegio de Ciencia y Tecnología: Licenciatura en Ciencias Genómicas).
85. Taha, M. S., Nouri, K., Milroy, L. G., Moll, J. M., Herrmann, C., Brunsveld, L. & Ahmadian, M. R. (2014). Subcellular fractionation and localization studies reveal a direct interaction of the fragile X mental retardation protein (FMRP) with nucleolin. *PloS one*, 9(3), e91465.
86. Blank, M. L., Xia, J., Morcos, M. M., Sun, M., Cantrell, P. S., Liu, Y., ... & Boyle, J. P. (2021). Toxoplasma gondii association with host mitochondria requires key mitochondrial protein import machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(12), e2013336118.
87. Mallo, N., Ovciarikova, J., Martins-Duarte, E. S., Baehr, S. C., Biddau, M., Wilde, M. L., ... & Sheiner, L. (2021). Depletion of a Toxoplasma porin leads to defects in mitochondrial morphology and contacts with the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 134(20), jcs255299.

88. Counihan, N. A., Modak, J. K., & de Koning-Ward, T. F. (2021). How malaria parasites acquire nutrients from their host. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 649184.
89. Merckx, A., Bouyer, G., Thomas, S. L., Langsley, G., & Egée, S. (2009). Anion channels in *Plasmodium-falciparum*-infected erythrocytes and protein kinase A. *Trends in parasitology*, 25(3), 139-144.
90. Hernández Aparicio, J. A. (2020), Identificación de las proteínas que interaccionan con la proteína BmVDAC durante la infección de *Rhipicephalus microplus* con *Babesia bigemina*. Universidad Autónoma de la Ciudad de México: Colegio de Ciencia y Tecnología: Licenciatura en Ciencias Genómicas).
91. Yuan, Z., Dewson, G., Czabotar, P. E., & Birkinshaw, R. W. (2021). VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. *Biochemical Society Transactions*, 49(6), 2787-2795.