



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRIA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

Análisis proteómico comparativo de glándulas salivales de dos cepas de garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistente y susceptible a la ivermectina

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

PRESENTA:

MVZ ROSA ERENDIRA PEÑA TRUJILLO

DIRIGIDO POR:

DRA. GABRIELA AGUILAR TIPACAMÚ

CO-DIRIGIDO POR:

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

Santiago de Querétaro, Qro. Noviembre 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRIA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

Análisis proteómico comparativo de glándulas salivales de dos cepas de garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistente y susceptible a la ivermectina

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

PRESENTA:

MVZ. ROSA ERENDIRA PEÑA TRUJILLO

DIRIGIDO POR:

DRA. GABRIELA AGUILAR TIPACAMÚ

CO- DIRIGIDO POR:

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

SINODALES

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Presidente

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Secretaria

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Vocal

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Vocal

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Vocal

Campus Juriquilla,
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2019
México

DEDICATORIAS

A mis padres Rosa Trujillo y Salvador Peña quienes siempre han estado para mí, las personas que me dieron la vida y el impulso de seguir mis sueños a pesar de lo difícil del camino, sé que de sus manos me han compartido todo lo que ha estado en ellas, los amo.

A mi hermana Pilar Peña, por sus consejos y abrazos cuando más los necesite en esta bella pero difícil experiencia, gracias una vez más por haber sido mi mayor inspiración dentro de mi vida académica, sin haber seguido tu ejemplo jamás hubiera querido este camino. Te amo

A mis amigos, Dafne Amador quien fue mi apoyo y fortaleza, a Cristian Figueroa que con su amistad y compañerismo como profesionista estuvo a mi lado durante el desarrollo de este proyecto, jamás olvidare todo lo que pasamos juntos. Gracias

A mi compañero de vida Omar García, por haber sido un pilar importante en la etapa más complicada del proyecto, por jamás dejarme sola, acompañarme y tenerme paciencia en los días complicados gracias por coincidir conmigo en ese momento.

A mi directora de tesis la Dra. Gabriela Aguilar por toda su comprensión brindada, su tiempo, su apoyo incondicional, por su paciencia e impulso para que creciera tanto profesionalmente como personalmente, agradezco su amistad y que haya prestado sus ganas para dirigirme en dos etapas. Siempre gracias

A mi país los Estados Unidos Mexicanos por brindarme la oportunidad de estudiar un posgrado con un apoyo económico, espero el estudio retribuya a mi sociedad.

A los animales que participaron en este estudio, mi respeto a la vida siempre.
Gracias

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a mi máxima casa de estudios la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) que me ha brindado mi educación media superior, superior y ahora mi posgrado, gracias por ofrecerme el espacio, las aulas y a los docentes mejor preparados para enriquecer mi formación.

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por permitirme trabajar y aprender en sus instalaciones.

A la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable (MSPAS) por la guía, los apoyos y por formarme dentro de su posgrado.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por becarme durante estos dos años para poder desarrollar el proyecto de manera exitosa.

A mi comité tutorial, por ser parte de esencial del proyecto, por ejercer presión y alentarme a crecer, a la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por su paciencia y entrega al proyecto a pesar de las adversidades del mismo, a la Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú por depositar su confianza en mí para asignarme su proyecto, a la Dra. Angelina Rodríguez Torres por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme su apoyo y enseñarme una parte muy inspiradora de la investigación, a la Dra. Bertha Isabel Carvajal Gaméz por sus enseñanzas y disposición, por último y no por ello menos importante al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por el impulso que me proporciono para mejorar día con día, por ser parte de mi formación, un excelente docente, por haber sido y ser una fuente esencial de inspiración de mi pasión por la investigación.

A mi equipo de trabajo el MSPAS Rodrigo Morales, la MVZ. Areli Esparza, al M. en C. Ilwikatzin Guerrero, al P.MVZ Andrés Ismael Reynoso Ramírez y al P.MVZ Miguel Ángel González García, por el esfuerzo, apoyo y trabajo en equipo.

A la Dra. Minerva Camacho Nuéz por compartir sus conocimientos y su tiempo

A la Dra. María Concepción Méndez Gómez Humarán por ser parte de este camino y por sus consejos y amistad.

Al equipo de la UACM por sus enseñanzas y un verdadero apoyo profesional, M. En C. Ana Laura Vázquez, Biol. Vianey Jimeno Troncoso, Dra. Jaqueline Castañeda Ortiz, Victor Saúl Peña Beltrán, Biol. Victor Hugo Morales Bernardino, Mariana Sánchez Calistro, Biol. José Antonio Hernández Aparicio, Lic. Bryan N. Gracias.

CONACYT CB-2015-01-257257Ciencia Básica por el financiamiento del proyecto

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I.INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	7
2.1 Importancia de la garrapata <i>R. microplus</i>	7
2.2 Garrapata <i>R. microplus</i>	8
2.2.1 Taxonomía.....	8
2.2.2 Distribución de la garrapata <i>R. microplus</i> en México.....	9
2.2.3 Distribución de la garrapata <i>R. microplus</i> en el mundo.....	9
2.2.4 Ciclo Biológico.....	11
2.3 Situación actual de resistencia de <i>R. microplus</i> en México.....	13
2.3.1 Mecanismos de resistencia a ivermectina.....	14
2.4 Ivermectina.....	16
2.4.1 Estructura química.....	17
2.4.2 Mecanismo de acción.....	18
III HIPOTESIS	20
IV OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
V MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1 Cepas de <i>R. microplus</i>	21

5.2 Obtención de la muestra	22
5.3 Procesamiento de las muestras	23
5.3.1 Extracción de proteínas.....	23
5.3.2 Purificación de proteínas.....	23
5.3.3 Cuantificación de proteínas.....	24
5.3.4 Análisis de integridad	24
5.4 Electroforesis Bidimensional	24
5.4.1 Separación de proteínas primera dimensión.....	25
5.4.2 Separación de proteínas segunda dimensión	26
5.5 Análisis de Geles.....	26
5.6 Identificación de proteínas por LC/MS/MS	27
5.7 Análisis <i>in silico</i> de las proteínas.....	28
VI RESULTADOS	29
6.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	29
6.2 Integridad de proteínas	30
6.3 Electroforesis Bidimensional	31
6.4 Identificación de Proteínas por LC/MS/MS.....	39
6.5 Análisis <i>in silico</i> de procesos moleculares y funciones biológicas	39
VII DISCUSIÓN	50
VIII CONCLUSIONES.....	54
IX LITERATURA CITADA.....	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Concentración de proteínas purificadas de extractos de glándulas salivales de las cepas	29
Cuadro 2 Número de manchas promedio obtenidos por condición	32
Cuadro 3 Análisis semi cuantitativo densitométrico de los pixeles de cada mancha seleccionada ambas condiciones.....	35
Cuadro 4 Representación 3D de las manchas seleccionadas con expresión diferencial.....	36
Cuadro 5 Proteínas identificadas en glándulas salivales de garrapatas R. microplus resistentes y susceptibles a ivermectina	40
Cuadro 6 Propiedades de las proteínas identificadas en glándulas salivales de garrapatas R. microplus resistentes y susceptibles a ivermectina mediante ontología de genes y anotaciones funcionales.	42
Cuadro 7 Funciones de la calreticulina.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 Situación zoonositaria de México acuerdo nacional para el control de la garrapata <i>Boophilus</i> spp	10
Figura 2: Distribución geográfica mundial de <i>R. microplus</i> y otras garrapatas	9
Figura 3 Ciclo de vida de garrapata <i>Rhipicephalus</i> spp. modificado de Sonenshine et al. 2013.....	12
Figura 4 Mecanismos de resistencia a las avermectinas en 3 especies de artrópodos (Clark et al., 1994).....	15
Figura 5 Estructura Química de la ivermectina (González et al., 2009).....	17
Figura 6 Sitio de acción de la ivermectina en el canal de cloro dependiente de glutamato (Wolstenholme 2012).....	19
Figura 7 Análisis de integridad de proteínas totales de glándulas salivales de garrapatas <i>R.microplus</i> , en gel de poliacrilamida al 10%, teñido con azul de Coomassie R-250.....	30
Figura 8 Electroforesis SDS-PAGE doble dimensión en gel de poliacrilamida al 12 % con un rango de pH 4-7, teñidos con Azul de Coomassie G-250 (240 µg de proteínas).....	33
Figura 9 Gel maestro donde se muestran los spots diferencialmente expresados que fueron seleccionados para su identificación por MALDI-TOF.....	34
Figura 10 Localización subcelular de las proteínas identificadas, en la gráfica se muestra el número de proteínas ubicadas por componente celular así como el porcentaje.....	45

Figura 11 Funciones moleculares de las proteínas identificadas, en la gráfica se muestra el número de proteínas por actividad así como el porcentaje.	46
Figura 12 Procesos biológicos de las proteínas identificadas, en la gráfica se muestra el número de proteínas que participa en cada proceso así como el porcentaje.....	47
Figura 13 Modelo 3D de la proteína calreticulina	48
Figura 14 Resultados del modelaje 3D de calreticulina.....	49

Dirección General de Bibliotecas UAO

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) es el ectoparásito del ganado bovino de mayor importancia ya que es vector de patógenos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, además de ocasionar pérdidas económicas por los daños directos e indirectos. Uno de los métodos químicos para controlarlas son los ixodicidas, sin embargo, su uso continuo ha ocasionado la presencia de garrapatas multirresistentes. En la actualidad se ha reportado resistencia a IVM en Uruguay, Brasil y México. Las lactonas macrocíclicas (LM) como la ivermectina (IVM) forman parte de los medicamentos de última generación para el control de endoparásitos y por su ventaja de acumularse en grasa ha sido utilizada para el control de *R. microplus*, por esto último resulta importante identificar los mecanismos moleculares de resistencia a IVM. El presente trabajo tuvo como objetivo obtener las proteínas expresadas diferencialmente entre las glándulas salivales de las garrapatas susceptibles y resistentes a ivermectina. Dos cepas de garrapatas fueron utilizadas, una susceptible de referencia media joya y una resistente a las IVM (IR=5.2). Se extrajeron las glándulas salivales de 100 garrapatas hembras adultas semi repletas de ambas cepas para la extracción de proteínas totales. Los extractos se separaron mediante una electroforesis 2D con un rango de pH de 4-7 para su posterior análisis en geles de acrilamida al 12% y una post-separación con tinción de Azul de Coomassie 250. El análisis de los spots se llevó a cabo en el programa PDQuest y los spots con expresión diferencial se analizaron por espectrometría de masas. Se obtuvieron de los 10 puntos que fueron enviados para su identificación por espectrometría de masas 8 fueron identificados exitosamente de las cuales se identificaron 12 proteínas, de las cuales 10 presentaron sobre expresión en garrapatas resistentes contra 2 proteínas sobre expresadas en garrapatas susceptibles. Después de esto, las proteínas fueron analizadas mediante herramientas bioinformáticas, Expasy compute pi/Mw y predict protein open para determinar las características de cada una de las proteínas identificadas, se determinó la localización sub celular predicha de las

proteínas expresadas diferencialmente, así como el porcentaje de distribución en el citoplasma y en la membrana de la mitocondria. Los resultados mostraron que existen proteínas que son factores de crecimiento, precursores de transportadores mitocondriales, proteínas de estructura celular, así como proteínas de respuesta a estímulos de estrés. Actualmente no existen estudios de proteómica de expresión diferencial de proteínas entre cepas resistentes y susceptibles de garrapatas de *R. microplus* a Ivermectina por lo que este trabajo representa un acercamiento en el entendimiento del mecanismo molecular de resistencia a IVM en este ectoparásito.

Palabras clave: Resistencia, Ivermectina, Proteomica, Glándulas Salivales, *R. microplus*

ABSTRACT

The *Rhipicephalus microplus* tick (*R. microplus*) is the most important ectoparasite of cattle as it is the vector of pathogens such as *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*, in addition to causing economic losses due to direct and indirect damage. One of the chemical methods to control them is ixodicides application, however, their continued use has caused the presence of multidrug ticks. Actually, resistance to IVM has been reported in Uruguay, Brazil and Mexico. Macrocyclic lactones (LM) such as ivermectin (IVM) are part of the latest generation drugs for the control of endoparasites and because of their advantage of accumulating in fat has been affected by the control of *R. microplus*, for the last is important to know the molecular mechanisms of resistance to IVM. The present work aimed to obtain differentially expressed proteins between the salivary glands of susceptible ticks and resistant to ivermectin.

Two strains of ticks were used, one susceptible of medium jewel reference and one resistant to IVM (IR = 5.2). Salivary glands were extracted from 100 adult female ticks semi-engorged both strains for total protein extraction. The extracts were separated by a 2D electrophoresis with a pH range of 4-7 for subsequent analysis in 12% acrylamide gels and post-separation with Coomassie Blue 250 staining. The spot analysis was carried out in the PDQuest program and spots with differential expression were analyzed by mass spectrometry. They were obtained from the 10 points that were sent for identification by mass spectrometry 8 were successfully identified of which 12 proteins were identified, of which 10 presented on expression in resistant ticks against 2 proteins on expressed in susceptible ticks. After this, the proteins were analyzed using bioinformatics tools, ExPASy compute pI / Mw and predict protein open to determine the characteristics of each of the identified proteins, the predicted sub-cellular location of the differentially expressed proteins was determined, as well as the percentage of distribution in the cytoplasm and in the

membrane of the mitochondria. The results showed that there are proteins that are growth factors, precursors of mitochondrial transporters, cell structure proteins, as well as response proteins to stress stimuli. Currently there are no studies of proteomics of differential protein expression between resistant and susceptible strains of *R. microplus* ticks to Ivermectin, so this work represents an approach in the understanding of the molecular mechanism of resistance to IVM in this ectoparasite.

Key words: Resistance, Ivermectin, Proteomics, Salivary Glands, *R. microplus*

I. INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) es el ectoparásito del ganado bovino de mayor importancia ya que es vector de patógenos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, (Johnsons *et al.*, 2008 Pérez-Cogollo, *et al.*, 2010; Ojeda, *et al.*, 2011). Además de ocasionar pérdidas económicas por los daños directos e indirectos. Uno de los métodos químicos para controlarlas es la aplicación de los ixodicidas, sin embargo, su uso continuo ha ocasionado la presencia de garrapatas multirresistentes. Las lactonas macrocíclicas (LM) como la ivermectina (IVM) forman parte de los medicamentos de última generación para el control de endoparásitos y por su ventaja de acumularse en grasa ha sido utilizada para el control de *R. microplus*, actualmente se han reportado casos de poblaciones de garrapatas con resistencia a IVM en Uruguay, Brasil y México. (Martins y Furlong, 2001), (Pérez-Cogollo *et al.*, 2010), (Fernández-Salas *et al.*, 2012). En garrapatas se han realizado varios estudios con el objeto de identificar los mecanismos moleculares que atribuyen la característica de resistencia a los ixodicidas, dentro de la fase I del metabolismo de los fármacos se ha asociado a la actividad catalítica del citocromo P450, a las carboxylesterasas, en la fase II a las glutathion S-transferasas (Bellgard *et al.*, 2012). Y en la fase III se ha asociado a las proteínas transportadoras ABC conocidas así por sus siglas en inglés ATP binding cassette, que son moléculas muy conservadas, encontradas prácticamente en cualquier ser vivo y encargadas del transporte activo de moléculas ayudando a detoxificar diferentes metabolitos. Estos transportadores de membrana han sido caracterizados como mecanismo de resistencia a la quimioterapia en células cancerígenas y algunos patógenos (Lage, 2008, Pohl P. *et al.*, 2011). También se han identificado mutaciones puntuales en la secuencia que codifica al canal de cloro dependiente de glutamato que es el sitio de acción de las LM, pero aún no se han asociado a la resistencia (Aguilar *et al.*, 2015; Maldonado *et al.*, 2017)., hasta el momento no se ha reportado el mecanismo molecular específico de resistencia a ivermectina, mismo que ayudaría a mejorar las técnicas de control

integral de las garrapatas, dentro de las necesidades de dilucidar el mecanismo de resistencia se encuentra el área de monitoreo de las poblaciones de *R. microplus* que se establecen en la república mexicana para ello se realizan pruebas diagnósticas de resistencia; tales como la prueba de paquete larvario (Haydock y Stone 1962; FAO, 1971) haciendo uso de la dosis discriminante (DD), técnica vigente y a pesar de ser económica para llevarse a cabo exitosamente; es necesaria una gran cantidad de material biológico (aproximadamente 50 hembras ingurgitadas) y la entrega del resultado requiere de un periodo de tiempo.

Por ello el presente trabajo tuvo como objetivo obtener las proteínas expresadas diferencialmente entre las glándulas salivales de las garrapatas susceptibles y resistentes a ivermectina

II. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de la garrapata *R. microplus*

La garrapata (*R. microplus*) es un ectoparásito del ganado bovino de importancia mundial que se encuentra principalmente en zonas con condiciones climatológicas que favorecen su desarrollo y proliferación; representando grandes pérdidas económicas durante la infestación por daños directos en la producción e indirectos debido a que es vector de algunos patógenos como los hemoparásitos *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* (Pérez-Cogollo, *et al.*, 2010; Ojeda, *et al.*, 2011).

En la producción de ganado bovino se han reportado pérdidas de aproximadamente 90.24L de leche por vaca por lactación y disminución de ganancia de peso de 1.18g y 1.37g por garrapata por animal dependiendo de la línea genética del ganado *Bos Taurus* y *Bos indicus* (Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2017). En cuanto a la producción de ganado bovino para exportación en 2017 se exportaron 713 425 cabezas de ganado siendo Estados Unidos el principal país de destino (INEGI), este país es libre de la garrapata *R. microplus*, por ello si el ganado bovino llega a la frontera con este ectoparásito es motivo de rechazo de la transacción.

El manejo de las infestaciones por *R. microplus* tiene un alto costo en la unidad de producción siendo el uso de ixodicidas el principal método de control entre ellos se encuentran las amidinas (Am), organofosforados (OP), piretroides sintéticos (PS) y lactonas macrocíclicas (LM), sin embargo, el uso frecuente de estos productos ha incrementado la presión de selección de poblaciones resistentes y multiresistentes (Pérez-Cogollo *et al.*, 2010).

2.2 Garrapata *R. microplus*

2.2.1 Taxonomía

Nombre común: *Garrapata del ganado*

Super Reino: Eukaryota

Reino: Metazoa

Super phylum: Ecdysozoa

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Chelicerata

Clase: Arachnida

Sub clase: Acari

Super orden: Parasitiformes

Orden: Ixodida

Super familia: Ixodoidea

Familia: Ixodidae

Sub familia: Rhipicephalinae

Género: *Rhipicephalus*

Subgénero: *Boophilus*

Especie: *Rhipicephalus (B) microplus*

(Canestrini 1888).

2.2.2 Distribución de la garrapata *R. microplus* en el mundo

R. microplus es una especie de garrapata cosmopolita, su identificación en lugares donde antes no se había detectado es reflejo de la capacidad que tiene de adaptarse y establecerse en diferentes zonas. En 2007 fue identificada por primera vez en el continente africano en costa marfil (Boka *et al.*, 2017).

Actualmente se ha registrado la presencia de *R. microplus* en todo el continente en países como Benin Burkina Faso, Mali y más recientemente en Togo (Boka *et al.*, 2017). Se han realizado algunos estudios filogenéticos para relacionar el parentesco de líneas genéticas de distintas garrapatas, en el caso de *R. microplus* se muestra en la figura la distribución que tiene alrededor del mundo. (Figura 2)

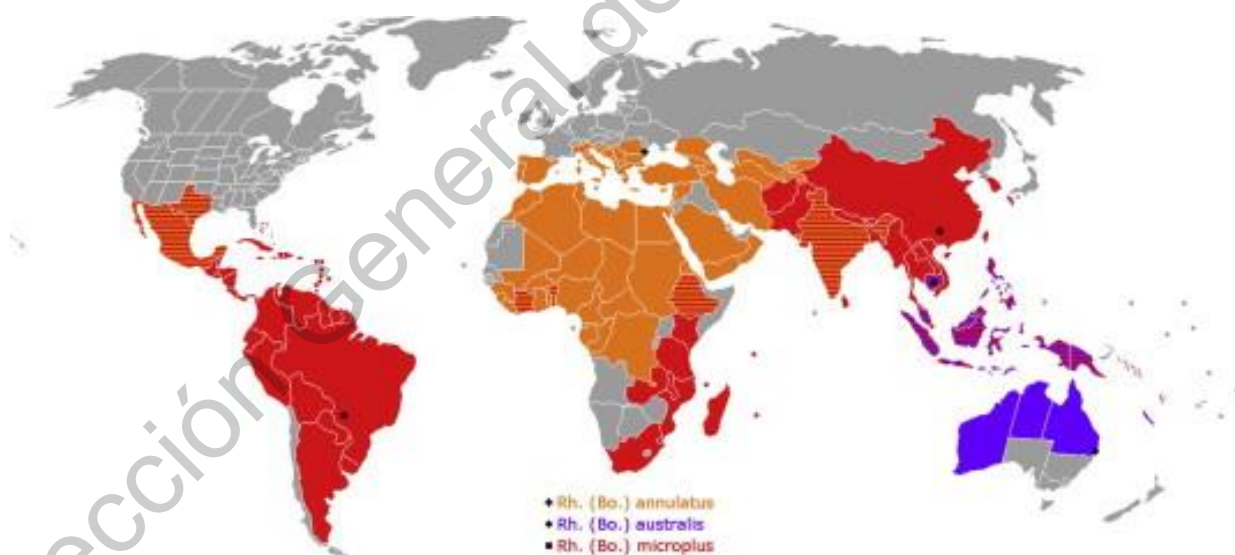


Figura 1: Distribución geográfica mundial de *R. microplus* y otras garrapatas

(Burger *et al.*, 2014).

2.2.3 Distribución de la garrapata *R. microplus* en México

En México *R. microplus* se encuentra distribuida en más del 60% del territorio nacional considerando las zonas dentro de las fases de control de acuerdo al acuerdo nacional contra la garrapata *Boophilus spp.* En 2015 el estado de Sonora fue reconocido como libre de garrapata *Boophilus spp.* por el Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal (APHIS) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), en la actualidad el 30.60% del país es considerado libre, el 3.44% del país se encuentra en erradicación y el área en control comprende un 65.96% del territorio nacional. (SENASICA, 2019) (figura 1).



Figura 2 Situación zoonosanitaria de México acuerdo nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp*

2.2.4Ciclo Biológico

R. microplus como antes se menciona es una garrapata perteneciente a la familia de los ixodidos, estas garrapatas se caracterizan por tener uno o dos huéspedes, sin embargo, *R. microplus* solo tiene un huésped preferentemente un bovino **Figura. 3** teniendo dos fases una parasítica y la otra no parasítica o de vida libre, en la primera se encuentran los huevos depositados en el ambiente y la larva en vida libre, y en la fase parasítica se encuentran la larva, ninfa y adulta (Quiroz *et al.*, 2011).

La fase de vida libre tiene como inicio una hembra ingurgitada que se desprende de un bovino y busca un lugar para ovopositar, pudiendo depositar miles de huevos que dependerán de su grado de ingurgitamiento generalmente ovopositarán del 40 al 60% de su peso, los huevos eclosionaran en un periodo de aproximadamente 15 días si las condiciones climatológicas lo permiten, las larvas se encontrarán en forma libre hasta localizar un huésped, una vez encontrado buscan un lugar para fijarse y comienzan la alimentación para que puedan mudar a ninfas, las ninfas se alimentaran hasta convertirse en adultas, llegando a la adultez se diferencian en macho y hembra encontrándose listos para la copula de inmediato. Al macho puede encontrarse móvil en todo el huésped y la hembra una vez fijada no se moverá esperando al macho hasta ingurgitarse y dejarse caer, la fase parasítica dura aproximadamente 21 días (Sonenshine, *et al.*, 2013).

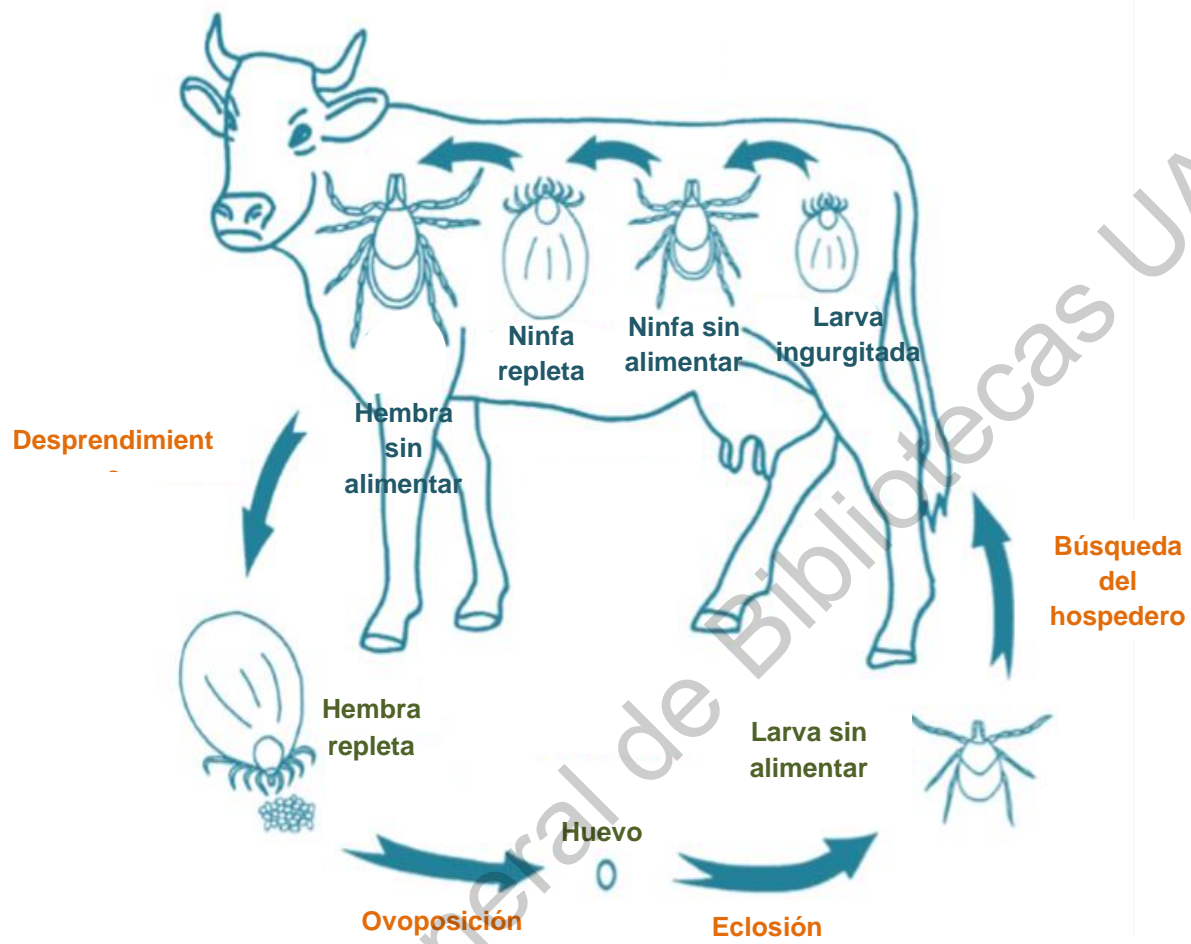


Figura 3 Ciclo de vida de garrapata *Rhipicephalus* spp. modificado de Sonenshine et al. 2013

2.3 Situación actual de resistencia de *R. microplus* en México

En México poblaciones de *R. microplus* con problemas de resistencia a OP fueron identificadas desde 1981, esto permitió que pudieran comercializarse otros productos y en 1986 se introdujeron al mercado Am y PS, sin embargo, en poco tiempo se localizaron poblaciones que presentaban no solo resistencia a uno si no a varios de los ixodicidas disponibles representando así un problema para el control de las infestaciones por *R. microplus* (NOM-019-ZOO-1994).

En 1995 se estableció dentro de esta norma la campaña nacional en contra de la garrapata *Boophilus spp.* que actualmente es un acuerdo, tiempo después se localizaron poblaciones de garrapatas que tenían un comportamiento fenotípico de resistencia a diferentes ixodicidas antes mencionados (multirresistencia), por ello las lactonas macrocíclicas representaron una novedosa opción para su control en especial la moxidectina (MOX) y la ivermectina (IVM) (Arieta *et al.*, 2010), las lactonas macrocíclicas tienen su sitio de acción en el canal de cloro dependiente de glutamato.

Si bien estas moléculas han sido una novedosa opción del manejo de infestaciones en diferentes partes de Latinoamérica se detectaron casos de resistencia a ivermectina (Martins y Furlong, 2001, Klafke *et al.*, 2006, Villar *et al.*, 2016).

En México el primer caso reportado fue en el estado de Yucatán (Pérez-Cogollo *et al.*, 2010) y posteriormente en Veracruz (Fernández-Salas., 2012) disminuyendo así las opciones disponibles en el mercado para el control de este parásito.

2.3.1 Mecanismos de resistencia a ivermectina

La característica de resistencia a las avermectinas en artrópodos, es multifactorial, autosomal, recesiva y poligénica por ello para que esta pueda hacerse presente existen diferentes mecanismos, que pueden ser clasificados como de excreción, de metabolismo oxidativo y dificultad de penetración. Además de ello pueden existir otros factores como alteraciones en el sitio de acción, hidrólisis, secuestro y conjugación **Figura 4** (Clark *et al.*, 1994).

Se han reportado en artrópodos como *Leptinotarsa decemlineata* mecanismos de resistencia de detoxificación enzimática como el incremento del Citocromo P-450 monooxigenasa, presencia de carboxilesterasas con actividad secuestradora y de hidrólisis de la lactona. En la *Musca domestica* se atribuyó la resistencia avermectinas por cambios en el sitio de acción, en *Tetraichus. urticae*, y a mecanismos de excreción (Clark *et al.*, 1994).

En garrapatas se han reportado las proteínas ABC transportadoras conocidas así por sus siglas en inglés ATP binding cassette, son moléculas muy conservadas, encontradas en prácticamente cualquier ser vivo, encargadas de transporte activo transmembranal de moléculas, participan en la detoxificación de diferentes metabolitos. Estas proteínas se han asociado a los fenómenos de resistencias hacia algunos medicamentos (Pohl *et al.*, 2012).

Se han estudiado sustituciones de nucleótidos en la secuencia de RNA codificante del canal de cloro dependiente de glutamato en cepas mexicanas con resistencia fenotípica y con susceptibilidad no encontrando diferencia alguna entre ellas pero si con respecto a la secuencia reportada en GenBank (GU562859.1) perteneciente a la cepa susceptible Mozo de Brasil (Aguilar-Tipacamú *et al.*, 2015), reportando una secuencia de 852pb, la mutación se localizó en el nucleótido 546 donde se sustituye una timina por una citosina.

En otro estudio se encontraron 25 mutaciones de la cepa de referencia susceptible mexicana media joya en comparación con la secuencia reportada GenBank: KF881800, siendo la mayoría de ellas mutaciones silenciosas, sin embargo, existen 7 mutaciones que codifican para aminoácidos diferentes, a los cuales no se les atribuye un cambio estructural importante (Maldonado, *et al.*, 2017).

Resistance mechanisms	Pest insect		
	CPB ^b	HF	TSSM ^c
Penetration	-	++	+ (CI-r)
Excretion	+	-	++
Oxidative metabolism	++	+ (LPR and dairy)	+ (HO-def and CI-r)
Esteratic metabolism/ sequestration	+	-	+ (HO-def)
Altered target site	NA	++ ^d	NA
GST-dependent conjugation	-	-	+

^a Abbreviations: CPB, Colorado potato beetle; HF, house fly; TSSM, two-spotted spider mite.

^b Minus (-) indicates absence of mechanism, plus (+) indicates possible presence of mechanism, plus plus (+ +) indicates presence of mechanism, and NA indicates that the mechanism has not been assessed.

^c Parentheses indicate specific strain of pest insect.

^d Reduced target site density.

Figura 4 Mecanismos de resistencia a las avermectinas en 3 especies de artrópodos (Clark et al., 1994).

2.4 Ivermectina

Este compuesto pertenece al grupo de fármacos llamados lactonas macrocíclicas que incrementan la liberación del ácido gamma aminobutírico (GABA) del sistema nervioso de los insectos. Se utilizan para el control de endo y ectoparásitos (endectocidas). Existen 2 grupos: Las Avermectinas y las milbemicinas. Dentro del grupo de las avermectinas se encuentra: la **ivermectina**, doramectina, eprinomectina y dentro de las milbemicinas se incluye a la moxidectina. (Rojas-Ramírez *et al.*, 2011).

La ivermectina es un compuesto perteneciente a las lactonas macrocíclicas, este grupo de medicamentos fue sintetizado por Chavala y colaboradores en 1980 a partir de un fermentado de *Streptomyces avermitilis*, y fue introducida la medicina veterinaria en 1981. Debido a algunas ventajas como su margen de seguridad en el huésped, su novedoso mecanismo de acción y su acción endectocida se convirtió en un compuesto de primera elección, La ivermectina es una avermectina semisintética sus productos se usan en el tratamiento contra nematodos y artrópodos (ácaros y garrapatas), es decir contra parásitos internos y externos (Mendoza, 2008), este es el compuesto más utilizado de este grupo dentro de medicina veterinaria. El uso que se le ha dado en medicina humana es para el tratamiento de la oncocercosis (Carrasco, 1998). En humanos solo se encuentra permitida la vía de administración oral.

2.4.1 Estructura química

La ivermectina es una mezcla de dos avermectinas modificadas conteniendo al menos el 80% de 22,23-dihydroavermectina B1a y el 20% de 22,23 dihydroavermectina B1b **Figura 5** (González *et al.*, 2009).

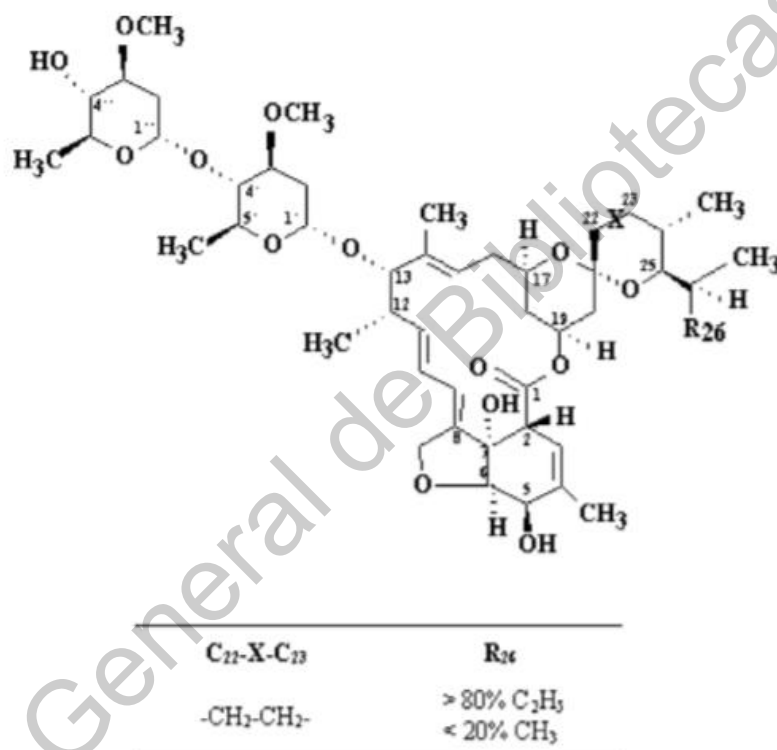


Figura 5 Estructura Química de la ivermectina (González *et al.*, 2009)

2.4.2 Mecanismo de acción

El sitio de acción de las LM son los canales de cloro dependientes de glutamato (GluCL) este canal es específico de organismos protostomados y resulta de gran importancia de estudio por sus diferentes funciones, se ha asociado a los procesos de alimentación, reproducción y funciones motoras, se encuentra ampliamente distribuido tanto en neuronas motoras como interneuronas. (Wolstenholme 2012).

La activación de este canal es lenta pero una vez que se abre el canal este se mantiene así por largo tiempo, siendo esencialmente irreversible, el flujo de iones de cloro, teniendo como resultado una hiperpolarización de la membrana celular, neuronal o muscular cambiando el potencial de acción. El canal de cloro dependiente de glutamato esta conformado por 5 dominios, cada uno conformado por 4 sub unidades M1, M2 M3 y M4. La ivermectina tiene su sitio de unión entre las subunidades M1 y M3 de cada dominio expandiendo así cada uno de ellos abriendo el canal **Figura 6**, el glutamato se une al receptor GLC-1 cuando la ivermectina se ha unido al canal (Wolstenholme 2012).

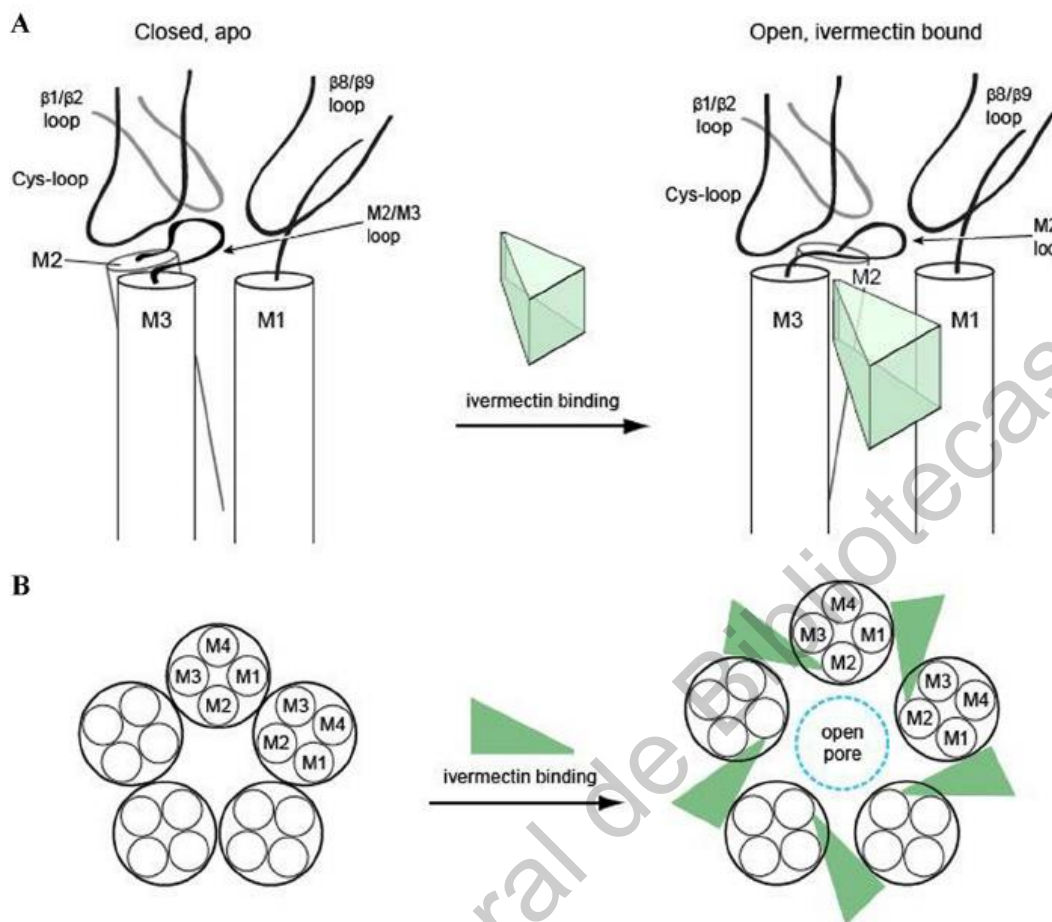


Figura 6 Sitio de acción de la ivermectina en el canal de cloro dependiente de glutamato (Wolstenholme 2012)

III HIPOTESIS

Las glándulas salivales de garrapatas *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) resistentes a ivermectina sub o sobre expresan proteínas involucradas en el mecanismo de resistencia al fármaco

IV OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener las proteínas expresadas diferencialmente entre las glándulas salivales de las garrapatas susceptibles y resistentes a ivermectina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener las glándulas salivales de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a ivermectina mediante disección
2. Obtener el perfil proteómico de glándulas salivales de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM
3. Caracterizar *in silico* a las proteínas identificadas que se expresaron diferencialmente en las glándulas salivales de garrapatas resistentes a IV y susceptibles.
4. Analizar mediante análisis *in silico* las vías y procesos celulares en las que participan las proteínas identificadas, así como su participación en el mecanismo de resistencia a ivermectina

V MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepas de *R. microplus*

Dos cepas de garrapata *R. microplus* fueron utilizadas para este estudio; la cepa considerada control, que es una cepa de referencia susceptible mexicana denominada Media Joya, la cual tiene como característica ser susceptible a todos los ixodíctidos que se encuentran disponibles en el mercado nacional y la misma cepa susceptible que fue presionada para hacerla resistente a las IVM y a esta cepa se le asignó el título de “resistente a las IVM”; esta cepa fue presionada en la Universidad Autónoma de Querétaro, por medio de una presión *in vivo* con sub dosificaciones de 200µl de IVM por Kg de peso vivo en bovinos, realizando infestaciones continuas y también con una presión *in vitro*, haciendo paquetes larvarios con las larvas provenientes de la eclosión de 0.5g de la ovoposición de las garrapatas adultas sobrevivientes a la presión *in vivo*, a estas larvas se les reto con una dosis menor a la Dosis DD (20 ppm) y con la DD (40 ppm), las larvas que sobrevivían se utilizaban para infestar a nuevos animales y de esa forma aumentar más rápido el IR; al mismo tiempo, se les realizó un análisis PROBIT utilizando la técnica de inmersión de larvas modificada por Klafke *et al.*, 2006. Esta presión fue realizada consecutivamente a través de cada generación de garrapatas hasta la obtención de un índice de resistencia (IR) de (5.2) según la escala de Castro y Janer, en donde se menciona que a partir de un IR de 2 una población es considerada resistente, el índice de resistencia se obtiene de la relación (CL50 muestra/CL50 de una cepa de referencia susceptible) (Castro-Janer *et al.*, 2011).

Las cepas se mantuvieron en bovinos de aproximadamente 300kg con acceso *ad libitum* a agua y alimento. Durante el proceso de presión, las cepas se monitorearon en cada generación con la técnica de inmersión de larvas modificada y descrita por klafke *et.*, al 2006.

5.2 Obtención de la muestra

Para realizar los estudios proteómicos de las glándulas salivales de ambas cepas de garrapatas, 100 garrapatas adultas semi repletas hembras con un tamaño de 0.5 a 0.7mm fueron disectadas en cajas petrí, siendo fijadas con cinta adhesiva doble vista. Se accedió a los órganos internos realizando un corte transversal en la parte posterior del idiosoma, sobre el extremo caudal del opithosoma, una vez realizado el corte, con unas tijeras vannas se rodeó por los costados hasta llegar al capitulum por encima de los cuatro pares de patas, se tomó la cutícula dorsal y se separó con ayuda del bisturí, una vez expuestos los órganos se ubicaron las glándulas salivales, desplazando el intestino medio hacia la parte central. Se ubicaron los ácinos de ambos lados y fueron extraídos con pinzas de microcirugía y se realizó la escisión de los ductos salivales.

Para este procedimiento se utilizó un microscopio estereoscópico Leica Zoom 2000. Durante la obtención de los órganos se utilizó solución salina tamponada de fosfatos (PBS) por sus siglas en inglés, con un pH 7 a 4°C, para evitar la deshidratación de los órganos, una vez extraídas las glándulas salivales se colocaron en tubos de micro centrífuga, en grupos de 20 órganos cada uno, con inhibidor de proteasas al 1x (complete protease inhibitor cocktail. Cat. No. 11 697 498 001, ROCHE®) y se almacenaron a -80°C hasta que fueron utilizadas para su análisis.

5.3 Procesamiento de las muestras

Las muestras de glándulas salivales se procesaron en la unidad de proteo genómica de la Universidad Autónoma de la ciudad de México UACM.

5.3.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas totales, un juego de 20 glándulas salivales de cada cepa fueron descongelados paulatinamente a 4°C, se realizaron tres lavados con 1ml de PBS pH 7, en cada lavado se mezclaba por medio del vortex, y se centrifugaron a 14000 rpm, para realizar la lisis química de las células se agregaron 490µl de TNTE y 10µl de Inhibidor de proteasas complete 50x, se mezcló por medio de vortex, incubando durante 15min, por último, una lisis física con un protocolo de sonicación de 30 segundos de pulsaciones por 30 segundos de descanso durante 3 min con una amplitud de 80% en baño de hielo, se centrifugo a 14000 rpm durante 5 min. y se realizó una cuantificación por el método de Bradford para su posterior purificación.

5.3.2 Purificación de proteínas

Las proteínas totales fueron purificadas mediante el kit de purificación ReadyPrep 2-D cleanup kit No. Cat. 1632130, siguiendo las instrucciones del proveedor, introduciendo al sistema 500µg por cada 100µl, terminado el protocolo la pastilla fue reconstituida en 108µl de buffer 2D (Urea 7M, DTT 50mM, Chaps 4% w/v, Thiourea 2M) y 8µl de inhibidor de proteasas complete 50x.

5.3.3 Cuantificación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas antes y después de su purificación mediante el método de Bradford directo en micro placa de 96 pozos, utilizando una curva estándar con 6 diluciones seriadas de albúmina sérica bovina Sigma Aldrich No. Cat. 9048-46-8, (0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.0025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), el ensayo se realizó por triplicado adicionando 80 μl de dilución estándar o de muestra a cuantificar en una dilución 1:100 y 20 μl del reactivo Bradford en cada pozo. Se realizó la lectura a 595nm en un lector de placa BIO TEK® ELX-800.

5.3.4 Análisis de integridad

Una electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida con SDS, fue realizada para descartar una degradación en las proteínas en pasos previos a la doble dimensión. Haciendo uso de un gel concentrador al 4% y un gel separador al 10%, se utilizó un marcador de peso molecular Dual Color® BioRad, No. Cat. 1610374 de 250KDa - 10KDa, se cargaron 15 μl de muestra con 5 μl de amortiguador de carga SDS, la muestra fue preparada con este amortiguador desnaturalizando las proteínas durante 5 min en baño de agua caliente, posteriormente fueron centrifugadas 14000rpm durante un minuto. Se le aplicó 108V a la electroforesis usando como amortiguador de corrida TGS 1x. Una vez resueltos los geles, fueron lavados con agua bi destilada y teñidos con azul de coomassie R-250 durante al menos 2 horas, posteriormente para su visualización se destiñeron con una solución decolorante (ácido acético 5% y metanol 16.5%) durante una hora, los geles se lavaron con agua bi destilada.

Al finalizar estos se visualizaron en un fotodocumentador Bio Rad con ayuda del programa Image Lab®

5.4 Electroforesis Bidimensional

Para la electroforesis bidimensional se preparó la placa de hidratación, retirando el exceso de grasa con SDS y etanol al 90%.

5.4.1 Separación de proteínas primera dimensión

En el isoelectroenfoque (IEF) se utilizaron tiras de gradiente de pH inmovilizado de 4-7 (Ready Strip IPG Strips de Bio Rad) de 7cm. Las tiras se hidrataron pasivamente durante 18h con 240µg de proteína, 5µl de anfolinas (BioLyte® 100x 3-10, Bio Rad), 5µl de azul de bromofenol al 1% y aforado a 130µl con buffer de rehidratación 2D. las tiras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se cubrieron con aceite mineral las 18h.

Al terminar la hidratación pasiva se retiró el exceso de aceite mineral con ayuda de papel absorbente sin manipular el gel de la tira y se transfirieron a una charola de isoelectroenfoque previamente preparada con paper-bridge electrode wicks humedecidos con 20µl de agua miliQ, en cada electrodo de los carriles donde se ubicarían las tiras a resolver y se cubrieron con aceite mineral.

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en el equipo PROTEAN® IEF Cell de BioRad con un programa de 3 pasos: 250V/1h L, 4000V/1h L, 4000V -10000V R.

Posteriormente las tiras con las proteínas enfocadas fueron equilibradas, se retiraron del equipo y se quitó el exceso de aceite mineral con ayuda de papel absorbente y enjuagando las tiras con amortiguador de corrida TGS1x (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM y SDS 0.1%), se redujeron las tiras con 2.5ml cada una de una solución de dithiothreitol (DTT) al 1% con amortiguador de equilibrio en un tubo falcón de 15ml, se mantuvieron en agitación durante 15min. Terminando este paso las proteínas reducidas se alquilaron con 2.5ml de una solución de iodoacetamida (IAA) al 2.5% con amortiguador de equilibrio en un tubo falcón de 15ml, se mantuvieron en agitación durante 15min. Cada muestra se realizó por triplicado para verificar la reproducibilidad del experimento.

5.4.2 Separación de proteínas segunda dimensión

La separación de la segunda dimensión se realizó con una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12%, para la separación de las proteínas con respecto a su peso molecular, para ello un gel de acrilamida al 12% fue preparado, la tira se colocó en el borde superior del gel, con el lado positivo hacia la derecha y el gel hacia el frente del vidrio, en el otro extremo un trozo de papel filtro whatman del #1 fue colocado con 3µl de marcador de peso molecular Dual Color® BioRad, No. Cat. 1610374 de 250KDa - 10KDa, el sistema fue sellado con agarosa con azul de bromofenol al 0.5% en punto de fusión . Se aplicaron 108V hasta que el frente de corrida llegara al borde de los soportes de vidrio.

Los geles fueron desmontados y lavados 3 veces durante 15min con agua miliQ, se fijaron con una solución de (40% etanol y 10% ácido acético) durante 30 min, y se tiñeron con 50ml de azul de coomassie G-250-HCl durante 12h.

Se retiró el colorante y los geles fueron lavados con agua miliQ estéril, las imágenes fueron visualizadas en un fotodocumentador Bio Rad con ayuda del programa Image Lab®

5.5 Análisis de Geles

Las imágenes digitalizadas de los geles fueron analizadas con el programa PDQuest 2D Analysis No. Cat.1709630 (Bio Rad). Dicho programa es una herramienta capaz de identificar las diferencias entre imágenes provenientes de geles de doble dimensión, detectando las proteínas (puntos).

De esta forma se cuantificó la presencia, ausencia, disminución o aumento de intensidad de los puntos en forma de pixeles en los geles de interés. Para reducir la variación entre cada una de las imágenes se utilizó un modelo de regresión lineal y se ajustaron de forma manual los puntos que coincidían entre cada una de las repeticiones.

Se realizó un análisis densitométrico semi cuantitativo para determinar los valores relativos de concentración de las proteínas (puntos) de interés, utilizando como criterios de inclusión la reproducibilidad del resultado, aumento o disminución en la cantidad de píxeles identificados en el gel y que se encontraran aislados o claramente visibles en los geles de donde se iba a recortar el punto para su identificación por espectrometría de masas.

5.6 Identificación de proteínas por LC/MS/MS

Los puntos seleccionados en el análisis semi cuantitativo, fueron recortados con puntas estériles de micropipeta de 1ml, con ayuda de un transluminador para la visualización de los puntos. Cada uno fue debidamente identificado y puesto en tubos para microcentrifuga de 1.5ml con agua miliQ estéril.

Las muestras fueron enviadas al laboratorio PlanTECC, del Cinvestav Irapuato para su identificación por medio del método de bottom proteomics, en donde la proteína es digerida por una proteasa y los péptidos resultantes son analizados por un sistema de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de Masas NanoAcquity (Waters Corporation Milford, Massachusetts, Estados Unidos) acoplado a una trampa de iones LTQ velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Con los espectros se realizó un análisis con ayuda del programa SEQUEST con una base de datos de UNIPROT de *Rhipicephalus* que contiene 38,110 secuencias.

5.7 Análisis *in silico* de las proteínas

Las proteínas identificadas fueron analizadas *in silico* utilizando diferentes bases de datos y programas; el peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas fueron calculadas en ExPasy Swiss-Prot/TrEMBL pI/Mw, los datos propios de cada secuencia se obtuvieron de las bases de datos disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), en el análisis se incluyó la clasificación por localización subcelular, función biológica y proceso molecular utilizando la base de datos de Gene Ontology and GO Annotations de EMBL-EBI.

VI RESULTADOS

6.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Una vez extraídas las proteínas totales de las glándulas salivales de ambas cepas, se cuantificaron antes de su purificación para determinar la cantidad de proteína que se introdujo al sistema Cleanup Bio Rad®. Una alícuota de 20µl fue tomada y el resto del extracto se almacenó a -80°C.

En el método de Bradford directo en microplaca con la curva descrita en la sección 5.3.3, se obtuvieron resultados de las regresiones lineales con una r^2 de 0.99 en todas las cuantificaciones, dato que nos permitió sugerir la bondad del ensayo. Se purificaron 500µg de proteína de cada condición, ajustando los volúmenes del sistema Cleanup Bio Rad®.

Una vez purificados se realizó la segunda cuantificación con la curva descrita en la sección 5.3.3 para determinar la concentración de µg por µl.

Cuadro 1 Concentración de proteínas purificadas de extractos de glándulas salivales de las cepas

Proteínas de cepa	Concentración post. purificación µg/ µl
Media Joya	15.05µg/ µl
Índice de resistencia 5.2	18.4 µg/ µl

Determinando así que se contaba con la suficiente cantidad de proteína para realizar la separación bidimensional.

6.2 Integridad de proteínas

Posterior a la cuantificación de proteína purificada se realizó el análisis de integridad con una electroforesis unidimensional SDS-PAGE (**Figura 5**) utilizando 15µl de la alícuota de extracto de proteínas de cada cepa para cargar en cada pozo. De acuerdo a lo observado se determinó que la integridad de las proteínas fue apropiada sin degradación, encontrando bandas nítidas correspondientes a proteínas de alto y bajo peso molecular.

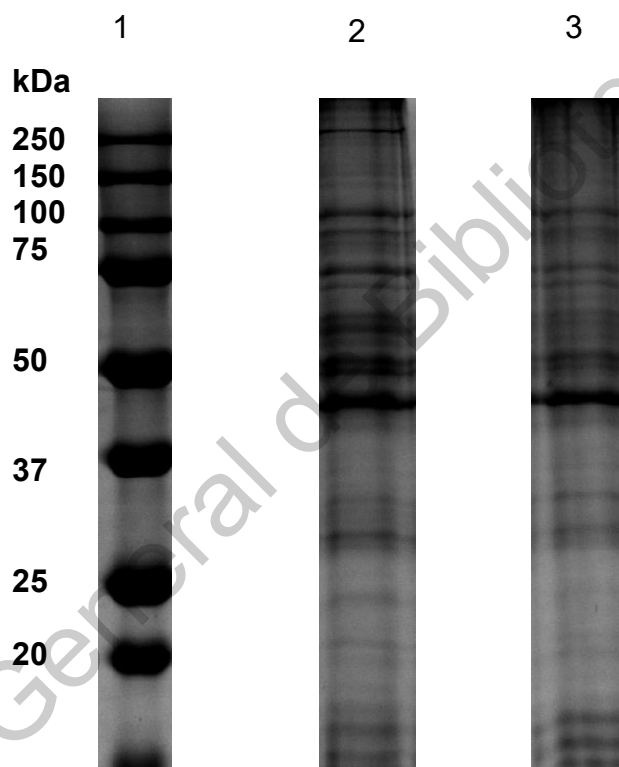


Figura 7 Análisis de integridad de proteínas totales de glándulas salivales de garrapatas *R. microplus*, en gel de poliacrilamida al 10%, teñido con azul de Coomassie R-250. Carril 1: Marcador de peso molecular 250kDa, Carril 2: Extracto de proteínas de glándulas salivales de *R. microplus* resistente a ivermectina con un IR 5.2, Carril 3: Extracto de proteínas de glándulas salivales de *R. microplus* susceptible a ivermectina

6.3 Electroforesis Bidimensional

El análisis 2D de las glándulas salivales de garrapatas resistentes y susceptibles a ivermectina se realizó en rangos de gradiente de pH inmovilizado de 4-7, para la separación de las proteínas en una primera dimensión de acuerdo a su punto isoeléctrico (PI), para la segunda dimensión las proteínas enfocadas fueron separadas de acuerdo a su peso molecular en geles de poliacrilamida al 12% post- equilibrio, una vez resuelta la electroforesis los geles fueron teñidos con azul de Coomassie G-250 para su posterior digitalización en el foto documentador de Bio Rad® **Figura 6**

Digitalizadas las imágenes de los geles por triplicado, se realizó un análisis en el software PDQuest, para determinar las diferencias entre los perfiles proteómicos de las dos condiciones estudiadas. El análisis diferencial mostró un promedio de 74 manchas o proteínas para la condición susceptible (Media Joya) y un promedio de 94 manchas para la condición resistente a ivermectina (IR 5.2), en el **cuadro 2** se presenta el número promedio de manchas por condición identificados. En promedio 75 machas encontradas dentro de ambas condiciones se parearon, es decir coincidieron o hicieron “match” y de estas se encontraron 51 con expresión diferencial en términos de aumento o disminución, 10 manchas ($\uparrow 7$ y $\downarrow 3$) que se observaron de forma consistente fueron seleccionadas **Figura 7**.

En el análisis por PDQuest se analizaron los datos obtenidos de los pixeles provenientes de cada mancha seleccionada contenidos en las imágenes pudiendo sugerir el grado de expresión aparente de las proteínas en cada condición observando proteínas con hasta 21 veces más densidad en pixeles.

Cuadro 3 pudiendo observar las diferencias de la mancha en cada condición en una visualización 3D en el **Cuadro 4**.

Cuadro 2 Número de manchas promedio obtenidos por condición

Manchas	Media Joya	Resistentes IR 5.2
Totales	75	94
Pareados (Match)		75
Diferenciales		51

Dirección General de Bibliotecas UAQ

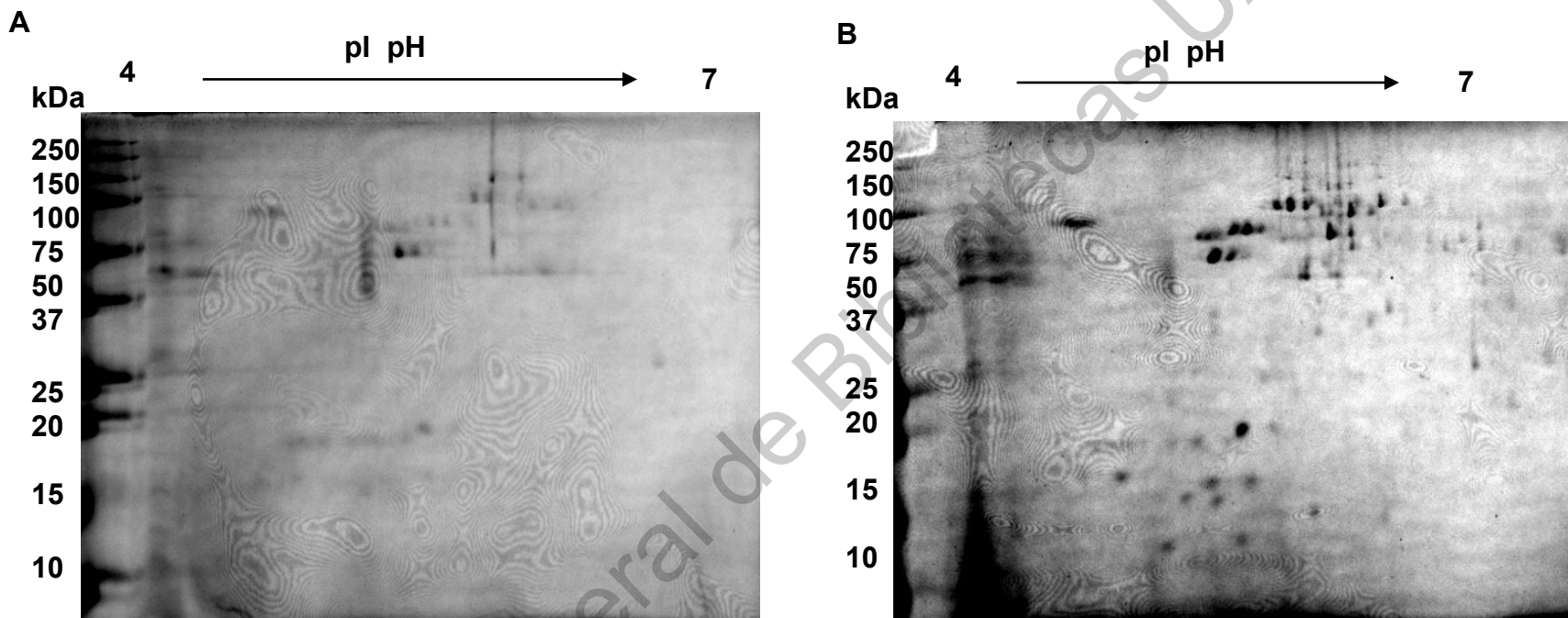


Figura 8 Electroforesis SDS-PAGE doble dimensión en gel de poliacrilamida al 12 % con un rango de pH 4-7, teñidos con Azul de Coomassie G-250 (240 µg de proteínas).

A: Proteínas de glándulas salivales de garrapatas semirepletas susceptibles a ivermectina. **B:** Proteínas de glándulas salivales de garrapatas semirepletas resistentes a ivermectina con un índice de resistencia de 5.2

Dirección General de Biotecnología UAQ

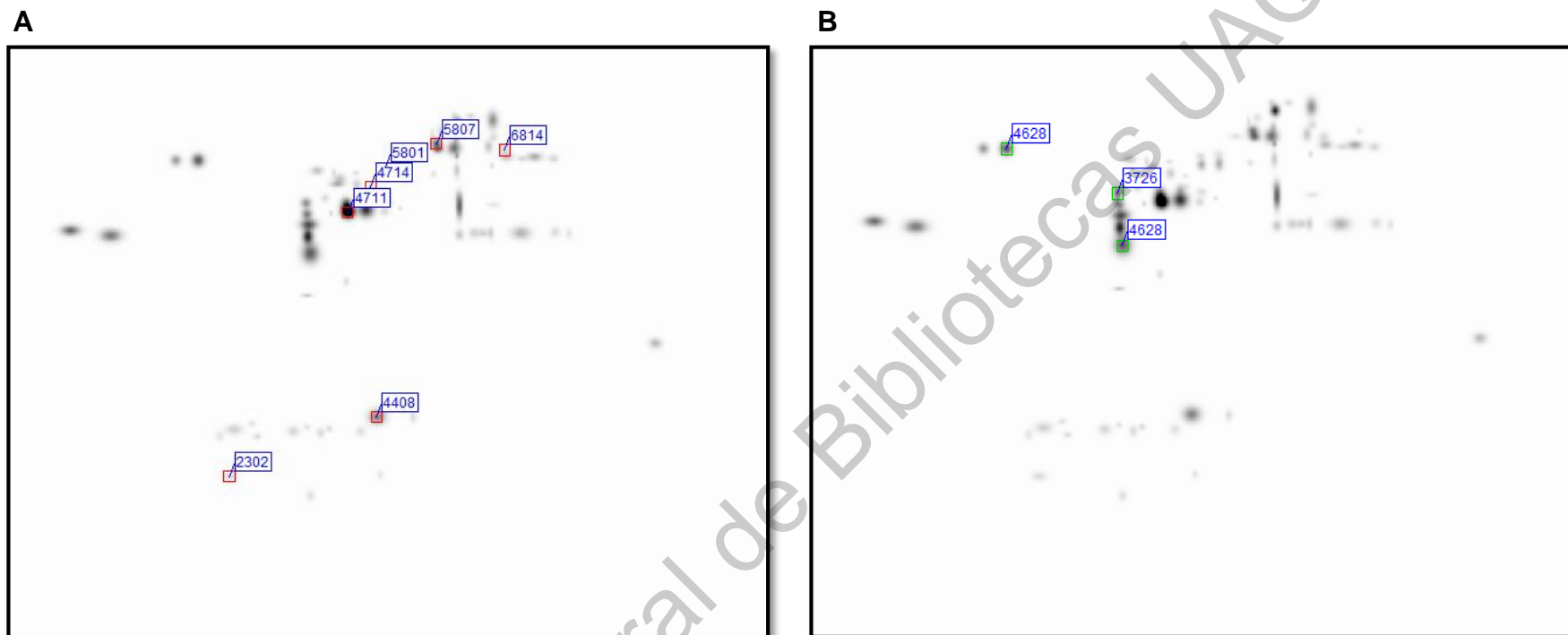


Figura 9 Gel maestro donde se muestran los spots diferencialmente expresados que fueron seleccionados para su identificación por MALDI-TOF.




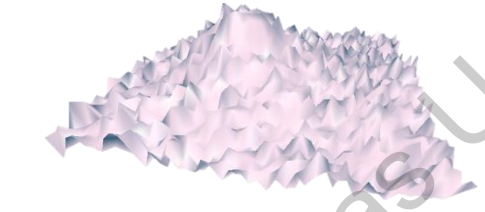



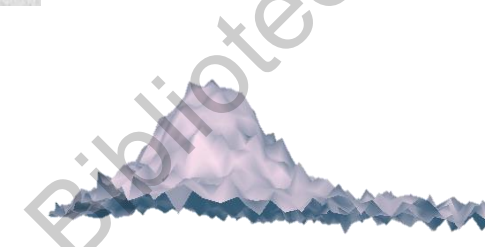



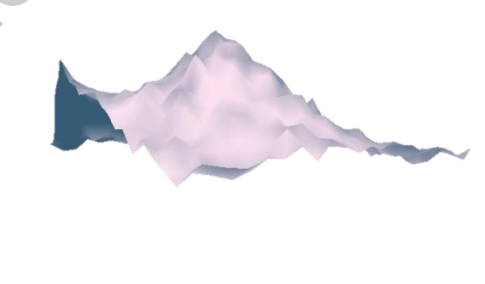



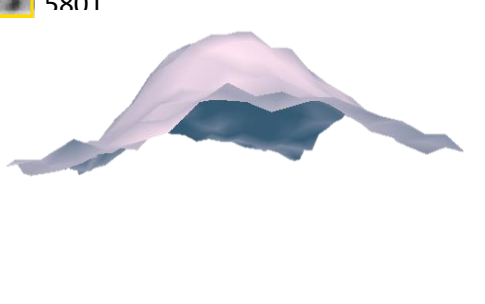
A En cuadros rojos se marcan las proteínas sobre expresadas en glándulas salivales de garrapatas resistentes a ivermectina con un índice de resistencia de 5.2. **B** En cuadros verdes se marcan las proteínas sub expresadas en glándulas salivales de garrapatas resistentes a ivermectina con un índice de resistencia de 5.2,












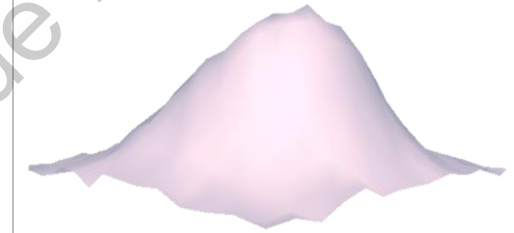




Cuadro 3 Análisis semi cuantitativo densitométrico de los pixeles de cada mancha seleccionada ambas condiciones.



Mancha	Pixeles media joya	Pixeles IR 5.2	Expresión aparente	Diferencia del contenido en pixeles comparativo con media joya
2302	83762	534014.8	↑	6.375382632
4408	663644	1499584.1	↑	2.259621273
4714	16828.8	354551.2	↑	21.06812132
5801	34252.8	713877.4	↑	20.84143194
5807	206941.5	491744.4	↑	2.37624836
6814	84196.6	746520.3	↑	8.866394843
4711	790506.3	2134265	↑	2.69987096
3726	183473.8	84035.5	↓	0.458024524
2822	520453.4	258421.1	↓	0.496530717
4628	635741.6	231310.7	↓	0.363843895

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Cuadro 4 Representación 3D de las manchas seleccionadas con expresión diferencial

Mancha	MEDIA JOYA	IR 5.2
2302	 2302 	 2302 
4408	 4408 	 4408 
4714	 4714 	 4714 
5801	 5801 	 5801 

<p>5807</p>  <p>5807</p> 	 <p>5807</p> 
<p>6814</p>  <p>6814</p> 	 <p>6814</p> 
<p>4711</p>  <p>4711</p> 	 <p>4711</p> 
<p>3726</p>  <p>3726</p> 	 <p>3726</p> 

2822	 2822 	 2822 
4628	 4628 	 4628 

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6.4 Identificación de Proteínas por LC/MS/MS

De las 10 proteínas que fueron enviadas para su identificación por espectrometría de masas 8 fueron identificados exitosamente de las cuales se identificaron 12 proteínas, en donde se obtuvieron porcentajes de cobertura desde 16.67% a 76.40% (**Cuadro 5**), las proteínas que fueron identificadas se encuentran principalmente involucradas en los procesos de plegamiento de proteínas, respuesta a estrés, transporte de protones, estructura celular y síntesis de ATP.

6.5 Análisis *in silico* de procesos moleculares y funciones biológicas

Las proteínas que se identificaron se compararon con la base de datos Gene Ontology and GO Annotations de EMBL-EBI, haciendo uso de la ontología de genes y anotaciones funcionales. (**Cuadro 6**), se realizó la clasificación de las proteínas de acuerdo a su localización subcelular, función molecular en la cual tiene actividad y participación dentro de un proceso biológico.

En la primera clasificación por su localización subcelular **Figura 8** se encontró que con una (n=13) el 40% de las proteínas se encuentran en el citoplasma, 15% en retículo endoplásmico, 15% en membrana celular y 15% en citoesqueleto.

En la segunda clasificación por su función molecular **Figura 9** con una (n=13) se observó un 37% de las proteínas con unión a ATP, 18% transferencia de electrones, 18% constituyentes estructurales, 9% transportador de protones, 9% Catalizador de plegamiento de proteínas, 9% Unión a nucleótido, y 9% unión a proteínas.

Por último, una tercera clasificación del proceso biológico en el cual se encuentran involucrados donde con una (n=13) el 34% tienen actividad en el proceso de plegamiento proteínas, el 25% tiene actividad de síntesis de ATP, 25% pertenecen a la respuesta de estrés, 8% a procesos asociados a microtúbulos y un 8% a la regulación de la contracción muscular.

Cuadro 5 Proteínas identificadas en glándulas salivales de garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina

Mancha	Proteína	No. de acceso	Masa KDa	Punto isoeléctrico teórico	Cobertura %	Longitud a.a	Gen Locus
2302	X	x	x	x	x	x	X
4408	ATP synthase subunit d, mitochondria	A0A131YF10	20.02	4.99	16.67	174	GEDV01011060
4714	Putative 60 kDa heat shock protein	L7M6W4	60.98	5.46	76.40	572	GACK01000000
4714	Protein disulfide-isomerase	A0A224Z4Y6	85.29	4.84	49.70	499	GFPF01000000
5801	Chaperonin GroEL	A0A131YRI2	61.07	5.44	69.93	572	GEDV01007369
5807	Heat shock 70kDa protein 5	A0A131Z3P5	72.44	5.32	57.36	659	GEDV01002543
5807	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 1	A0A131YWE7	79.90	5.77	36.73	735	GEDV01000000

6814	Heat shock 70kDa protein 1/8	A0A131YWH5	71.07	5.43	56.02	648	GEDV01005004
	Heat shock protein 70 cognate	A0A034WXY9	51.51	5.29	54.58	469	GBBO01000028
4711	ATP synthase subunit beta	A0A131YY57	56.30	5.45	70.29	525	GEDV01004224
	Tubulin beta chain	A0A224YT70	49.83	4.78	54.04	446	GFPF01006317
3726	X	X	X	X	X	X	X
2822	Calreticulin	J9QSA7	47.63	4.51	28.71	411	JX502831
4628	Tropomyosin	A0A0Y0AHW7	33.00	4.68	73.94	284	KU297182

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Cuadro 6 Propiedades de las proteínas identificadas en glándulas salivales de garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina mediante ontología de genes y anotaciones funcionales.

Mancha	Proteína	Localización subcelular	Función molecular	Proceso Biológico	Organismo
2302	X	X	X	X	X
4408	ATP synthase subunit d, mitochondria	Membrana interna de la mitocondria	Actividad transportadora de protones de manera transmembranal	Transporte de protones acoplado a síntesis de ATP	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
4714	Putative 60 kDa heat shock protein	Citoplasma	Unión a ATP	Replegamiento de proteínas	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>
	Protein disulfide-isomerase	Retículo endoplásmico	Actividad catalizadora de los enlaces disulfuro intra e inter catenarios en proteínas	Homeostasis reductora celular (Catalizador del reordenamiento de enlaces di sulfuro en proteínas)	<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>
5801	Chaperonin GroEL	Citoplasma	Unión ATP	Replegamiento de proteínas	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>

5807	Heat shock 70kDa protein 5	Citoplasma	Unión a ATP	Respuesta a estrés	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 1	Membrana celular	Actividad de transferencia de electrones, interacción con iones Fe-/S	Síntesis de ATP	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
6814	Heat shock 70kDa protein 1/8	Citoplasma	Interacción selectiva y no covalente a ATP	Respuesta a estrés	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
	Heat shock protein 70 cognate	Citoplasma	Unión nucleótido a	Respuesta a estrés	<i>Rhipicephalus microplus</i>
4711	ATP synthase subunit beta	Membrana celular Membrana mitocondrial	Habilita la transferencia de electrones de manera transmembranal por medio de un mecanismo rotacional	Transporte de protones acoplado a síntesis de ATP	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
	Tubulin beta chain	Citoesqueleto	Constitúyete estructural del citoesqueleto, actividad GTPasa	Procesos asociados a microtubulos	<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>
3726	X	X	X	X	X

2822	Calreticulin	Retículo endoplásmico	Unión a proteínas no plegadas, unión a calcio	Plegamiento de Proteínas	<i>Rhipicephalus microplus</i>
4628	Tropomyosi	Citoesqueleto	Constitúyete de estructural del citoesqueleto	Regulador de contracción muscular	<i>Rhipicephalus microplus</i>

Dirección General de Bibliotecas UNQ

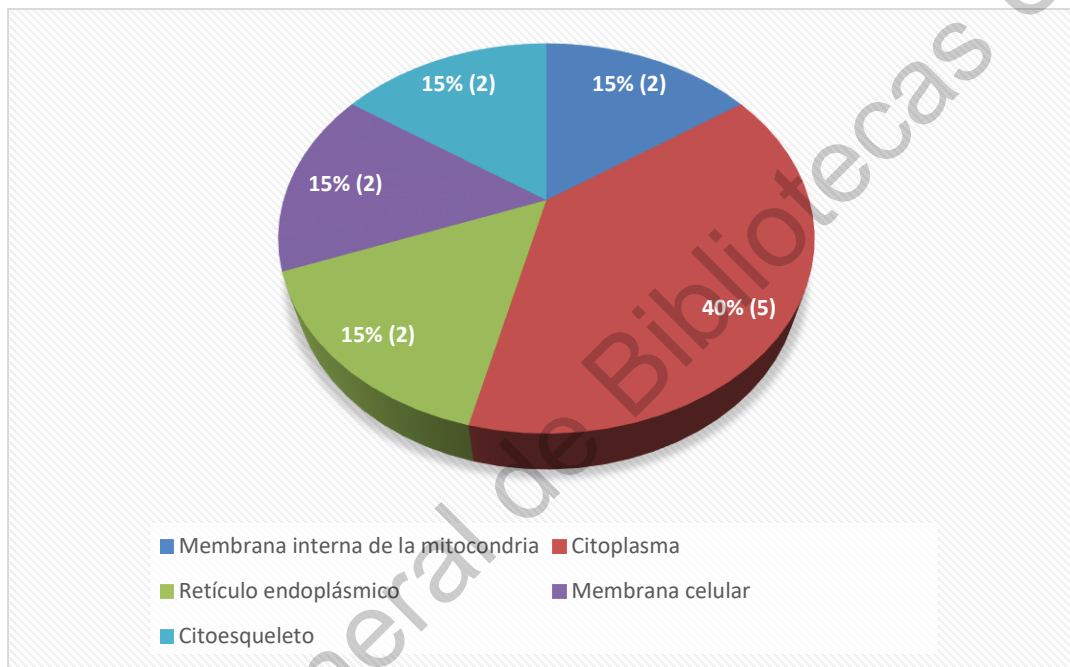


Figura 10 Localización subcelular de las proteínas identificadas, en la gráfica se muestra el número de proteínas ubicadas por componente celular así como el porcentaje.

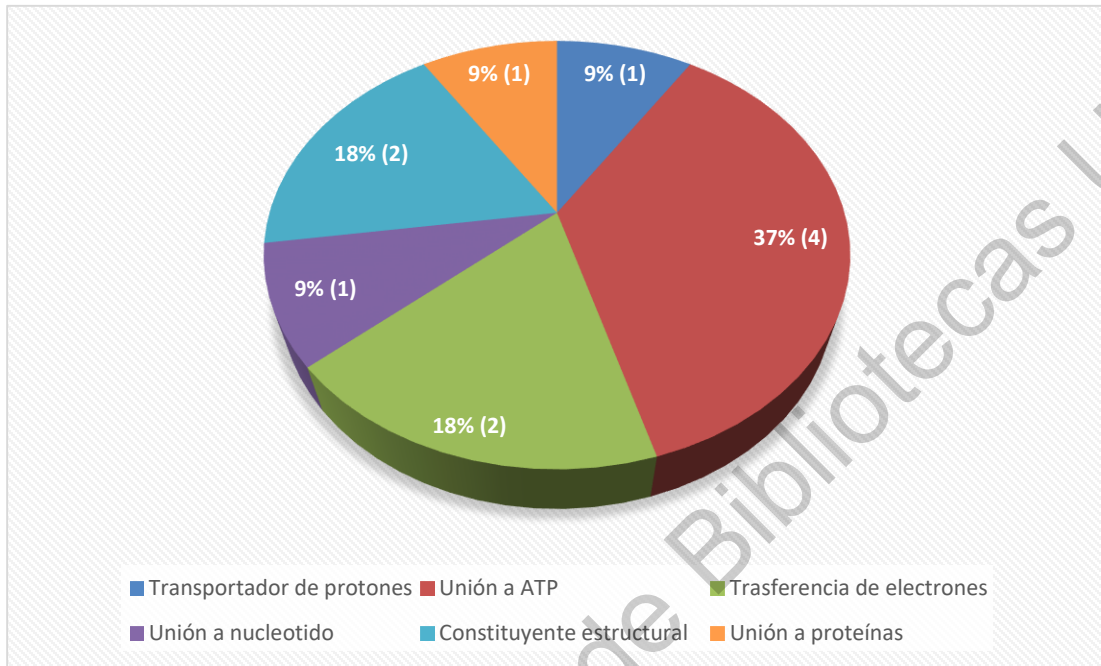


Figura 11 Funciones moleculares de las proteínas identificadas, en la gráfica se muestra el número de proteínas por actividad así como el porcentaje.

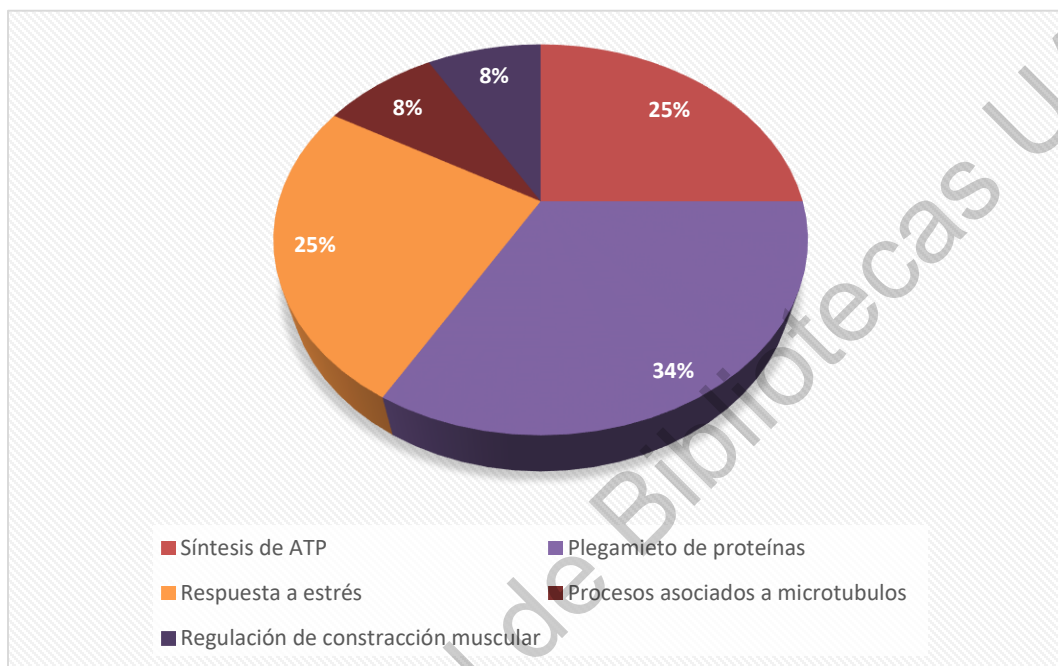


Figura 12 Procesos biológicos de las proteínas identificadas, en la gráfica se muestra el número de proteínas que participa en cada proceso así como el porcentaje.

6.6 Calreticulina

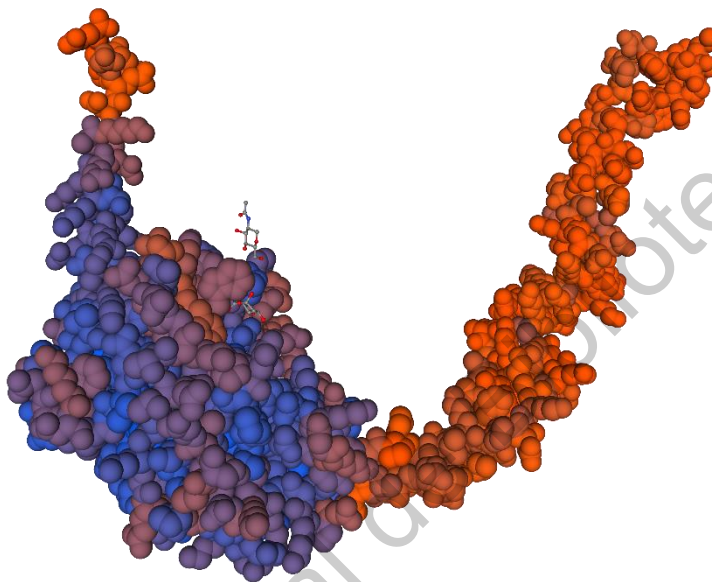


Figura 13 Modelo 3D de la proteína calreticulina

Una vez realizado el análisis de las funciones moleculares, procesos biológicos y revisión de bibliografía de las proteínas identificadas con expresión diferencial de las glándulas salivales de garrapatas *R. microplus* se propone a la calreticulina para continuar con los estudios para dilucidar su participación en el mecanismo molecular de resistencia a la ivermectina. Se realiza el modelaje en 3D de la proteína con código de acceso UNIPROT J9QSA7 (**Figura 13**), seleccionando el modelo predicho con una QMEAN de -1.58 . (**Figura 14**).

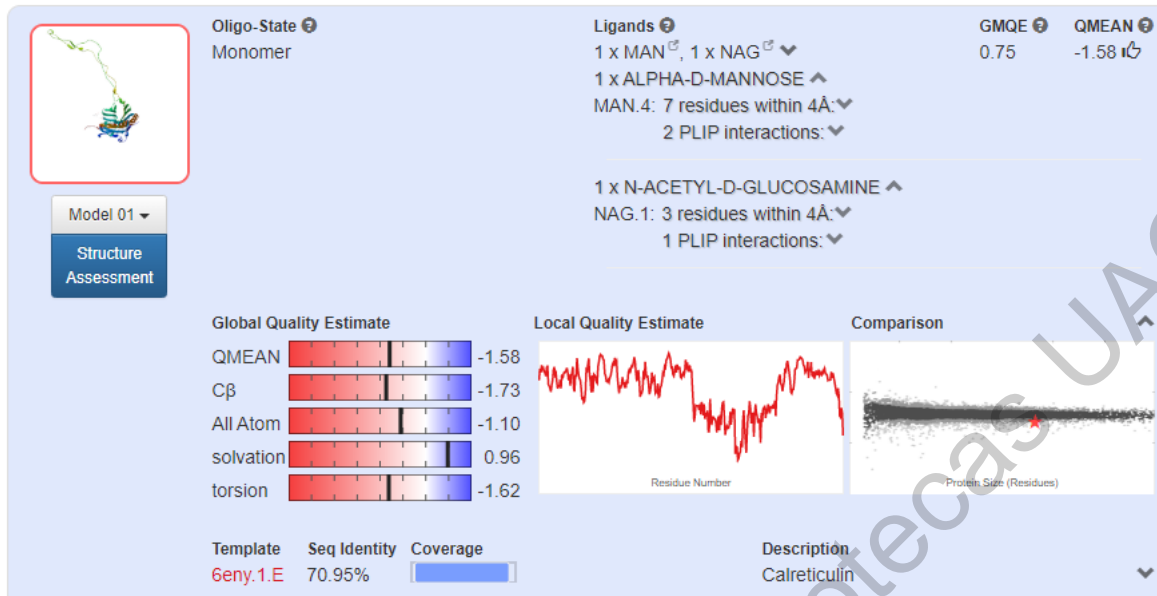


Figura 14 Resultados del modelaje 3D de calreticulina

Cuadro 7 Funciones de la calreticulina

Calreticulina
Funciones
<p>Homeostasis de Ca²⁺ intracelular Chaperona en el plegamiento de otras proteínas Marcador de superficie celular para apoptosis</p>

VII DISCUSIÓN

La presencia de poblaciones de garrapatas multirresistentes dificulta su control limitando las opciones de ixodicidas disponibles en el mercado (Rodríguez *et al.*, 2012). Las glándulas salivales juegan un papel fundamental en la alimentación de la garrapata, homeostasis de la garrapata y en la fijación al hospedero, estos órganos producen una gran cantidad de moléculas bioactivas de interés (Sonenshine *et al.*, 2013) y son responsables de generar diferentes tipos de respuesta humoral dependiendo de la línea genética del bovino (Rocha *et al.*, 2017).

Debido a que este es el primer estudio de proteómica de glándulas salivales en garrapatas resistentes a IVM los resultados determinan una aproximación para la comprensión de los mecanismos moleculares de resistencia a la IVM además de presentar una herramienta para identificar moléculas que pudieran proponerse como antígenos vacunales o biomarcadores. En este estudio se encontraron 12 proteínas de las cuales únicamente 3 han sido descritas en *R. microplus* ya que el genoma de la garrapata no se encuentra secuenciado en su totalidad, estas proteínas son la tropomiosina, la calreticulina y la Heat shock protein 70 cognate.

La tropomiosina con número de identificación 4628, sub expresada en garrapata resistente es una proteína altamente conservada e inmunogénica (Rocha *et al.*, 2017) propuesta con anterioridad como un antígeno vacunal para ácaros como *Dermanyssus gallinae*, (Harry *et al.*, 2016)., en garrapatas como *Hyalomma anatolicum* (Manjunathachar *et al.*, 2018) y en *Rhipicephalus microplus* (Mohamamd *et al.*, 2015). al encontrar subexpresada a la tropomiosina se sugiere que este tipo de antígenos vacunales podrían no ser funcionales para poblaciones de garrapatas resistentes. Además, es uno de los alérgenos más importantes en ácaros (Wright *et al.*, 2016) con la reducción de la expresión podemos especular que este podría ser un mecanismo de inhibición de la respuesta inmunitaria por parte del hospedero.

La calreticulina con número de identificación 2822 también sub expresada en garrapata resistente se ha mencionado en algunos parásitos como en *Heamonchus contortus*, como anticoagulante al unirse al Ca^{2+} y a los factores de coagulación, lo que permite que el parásito se alimente de la sangre del huésped, también se ha observado que es capaz de regular la respuesta inmune del hospedero al unirse al complemento C1q, teniendo como resultado una supervivencia. (Suchitra *et al.*, 2005). En garrapatas la calreticulina se ha identificado como una proteína, con las mismas funciones antes mencionadas además de su función como chaperona en el plegamiento de proteínas. (Hajdušek *et al.*, 2013). La calreticulina puede encontrarse tanto dentro del retículo endoplásmico rugoso (RER) como fuera de él, cuando se encuentra translocada en la superficie celular actúa como un marcador de apoptosis (Wang *et al.*, 2012) debido a que en este estudio encontramos sub expresada en las células de glándulas salivales de la cepa resistente estudiada podemos sugerir que dentro de la respuesta a la resistencia se encuentra el atrasar o disminuir la muerte celular programada.

La proteína Heat shock protein 70 cognate, esta proteína sobre expresada en garrapatas resistentes con número de identificación 6814 se ha reportado como una proteína de respuesta a estrés causada principalmente por el consumo de sangre caliente, en el vector *Rhodinus prolixus* un heteróptero triatomino que transmite *Tripanosoma cruzi* (causante de la enfermedad de chagas) además de esta característica se le han atribuido funciones reguladoras de la digestión de sangre, respuestas inmunitarias del intestino medio, por otro lado, las otras 9 proteínas fueron identificadas en diferentes especies de *Rhipicephalus*, también se observó que el proteoma de las glándulas salivales de garrapatas susceptibles tiene un mayor número de proteínas expresadas, en comparación con las de la cepa resistente, esto debido a que los ambientes adversos provocan la adaptación de un organismo regulando la expresión de proteínas en presencia del agente estresor. (Paim *et al.*, 2016).

Dentro de las proteínas sobre expresadas se observaron dos de ellas que se encuentran relacionadas, la ATP synthase subunit d con el número de identificación 4408 y la ATP synthase subunit β con el número de identificación 4711, ambas subunidades del complejo sintasa una enzima mitocondrial transmembranal altamente conservada encargada de sintetizar ATP (Wenchang y Faraldo., 2018). En mamíferos esta sintasa se encarga de producir más del 90% del ATP (Pecina *et al.*, 2018) siendo una de las vías metabólicas más importantes para la producción de ATP dentro del proceso de fosforilación oxidativa.

En este estudio ambas subunidades se encuentran sobre expresadas lo que nos sugiere un aumento en la expresión del complejo enzimático sintasa, es importante recordar que la resistencia a los ixodícos nunca se puede atribuir a una razón en específico pudiendo ser multifactorial (Metcalf R., 1989). La presencia de esta enzima aumentada en mitocondrias de células de las glándulas salivales nos hace suponer que el metabolismo de la cepa resistente exige una mayor demanda energética para la producción de las moléculas activas presentes en saliva, tales como inmunomoduladores, inhibidores de agregación plaquetaria, inhibidores del dolor y su respuesta, anticoagulantes y vasodilatadores. Esto inclusive para una mayor fijación al hospedero. En este estudio también se identificó otra proteína asociada a la cadena respiratoria y se encontró de igual manera sobre expresada la NADH deshidrogenasa ubiquinona, número de identificación 5807 dicha proteína ha sido identificada en glándulas salivales de *H. longicornis* como una proteína esencial para la alimentación de las garrapatas se ha mostrado que conforme pasan los días de alimentación y fijación los niveles de expresión de esta proteína disminuyen (Wang *et al.*, 2019), también se ha atribuido a la disminución de expresión al proceso natural de degradación de las glándulas salivales, proceso que progresa conforme pasan los días de fijación y alimentación de la garrapata, esta proteína tuvo una marcada expresión diferencial conforme a la cepa de referencia susceptible, nos habla también de un aumento en el metabolismo de las células de las glándulas salivales de garrapatas resistentes.

Otra de las proteínas sobre expresadas fue la Heat shock 60 KDa (Hsp60) también conocida como Chaperonin GroEL, con número de identificación 5801 esta es una proteína mitocondrial encargada de unir proteínas parcialmente plegadas y mediar sus cambios conformacionales, además, Hsp60 actúa directamente en células presentadoras de antígeno (APC) para vincular la respuesta inmune innata y adaptativa (Zhang *et al.*, 2015). Esta proteína ha sido estudiada en algunas especies de garrapatas como *H. longicornis* y *D. silvarum* como antígeno vacunal (Zhang *et al.*, 2015).

Dentro de las proteínas sobre expresadas se encontró la Protein Disulfide Isomerase (PDI) con un número de identificación 4714 esta proteína con múltiples funciones como el plegamiento de proteínas, ensamble y modificación pos-traducciona dentro del RER siendo un catalizador en la formación de enlaces de sulfuro entre dos cisteínas (Liao *et al.*, 2008). Además, se han identificado algunas isoformas en *H. longicornis* como la isoforma HIPDI-1 en glándulas salivales que son asociadas con la alimentación (Liao *et al.*, 2007).

Por último, mencionaremos a la β tubulin una proteína estructural, que conforma parte del cito esqueleto de las células de las glándulas salivales de garrapatas, se encontró sobre expresada en la cepa resistente, esta proteína que conforma el cito esqueleto participa en el transporte de moléculas dentro de la célula, se ha observado que las expresiones de estas proteínas pueden ser modificadas incluso por la invasión de un patógeno, para contrarrestar o modular la invasión y continuar con el metabolismo celular (Cabezas *et al.*, 2017).

VIII CONCLUSIONES

- El perfil proteómico de las glándulas salivales provenientes de la cepa de referencia susceptible Media Joya presenta una expresión diferencial con respecto a las glándulas salivales de la cepa resistente IR 5.2.
- Se encontró un perfil proteómico con proteínas sugerentes a un aumento en la tasa metabólica para la producción de moléculas activas entre ellas proteínas estructurales encargadas del transporte de las mismas.
- Las proteínas sobre expresadas identificadas se relacionan con la resistencia a ivermectina
- Las proteínas sub expresadas identificadas se relacionan con la resistencia a ivermectina

Por lo que se resalta la importancia de continuar con este tipo de estudios para identificar más blancos terapéuticos, antígenos vacunales o biomarcadores.

IX LITERATURA CITADA

- Aguilar, T.G., Mosqueda, G.J., Cantó, A.G., Klafke, G.M, Arellano, C.F., Alonso, D.M., Rodríguez, V.R. (2016) Identification of mutations in the glutamate-dependent chlorine channel in *Rhipicephalus microplus* resistant and susceptible to ivermectin, *Quehacer cient.*, 11, 20-26.
- Arieta, R. R., Rodríguez, V. R., Rosado, A.J., Ramírez, C.G., Basto, E.G. (2010) Persistent efficacy of two macrocyclic lactones against natural *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations in cattle in the Mexican tropics, *Rev Mex Cienc Pecu*, 1, 59-67.
- Bellgard, M.I., Moolhuijzen, P.M., Guerrero, F.D., Schibeci, D., Rodríguez-Valle, M., & Peterson, D.G. (2012). Cattle TickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J Parasitol.* 42(2), 161-169.
- Boku, O.M., Achi, L., Adakal, H., Azokou, A., Yao, P., Yapi, Y.G., Kone, M., Dagnogo, K., Kaboret, Y.Y., (2017) Review of cattle ticks (Acari, Ixodida) in Ivory Coast and geographic distribution of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, an emerging tick in West Africa, *Exp Appl Acarol*, 71, 355–36
- Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp.* Norma Oficial NOM-019-ZOO-1994; consultada de www.sagarpa.gob.mx en Enero 2017

- Cabezas A., Alberdi P., Valdes J., Villar M., de la fuente J., (2017). Remodeling of tick cytoskeleton in response to infection with *Anaplasma phagocytophilum* Front. Biosci 22:11, 1830–1844.
- Castro-Janer, E., Rifrain, I., González, P., Niell, C., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T.T. (2011). Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin and fipronil by the larval immersion test (LIT) in Uruguay. Veterinary Parasitology. 178:148-155.
- Clark J., Scott J., Campos F., Bloomquist J., (1994). Resistance To Avermectins: Extent, Mechanisms, and Management Implications, Ann. Rev. Entomol, 40:1-30.
- Villar D., Puerta J., Est MV; López A., MV; Chaparro J., (2016). Ivermectin resistance of three *Rhipicephalus microplus* populations using the larval immersion test, Rev Colomb Cienc Pecú; 29:51-57.
- Dominguez G., Rosario, G.R., Almazán, G.C., Saltijeral, O.J., Albertro, F.J. (2010), Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal en agro ecosistemas tropicales y subtropicales, Trop. Subtrop. Agroecosyst. 12:181-192.
- González A., Sahagún A., Díez M., Fernández., Sierra M., García J., (2009) The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species, Vet. J., 179: 25-37
- Hajdušek, Radek Š., Nieves A., Marie J., Jan P., de la Fuente J., Kopáček P. (2013) Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens, Front cell infect microbiol. 3:26

- Harry W.W, Kathryn B, Huntley J., Nisbet A. (2016) Characterisation of tropomyosin and paramyosin as vaccine candidate molecules for the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, *Parasites & Vectors* 9:544
- Fernandez, S.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso, D.M.A (2012) First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* 186: 338-342.
- Jonsson N.N., Bock R.E., Jorgensen W.K., (2008) Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet Parasitol* 155:1–9
- Liao, M., Hatta, T., Umemiya, R., Huang, P., Jia, H., Gong, H., ... Fujisaki, K. (2007). Identification of three protein disulfide isomerase members from *Haemaphysalis longicornis* tick. *Insect Biochem Mol Biol*, 37:7, 641–654.
- Liao, M., Boldbaatar, D., Gong, H., Huang, P., Umemiya, R., Harnnoi, T., Xuan, X. (2008). Functional analysis of protein disulfide isomerases in blood feeding, viability and oocyte development in *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Insect Biochem Mol Biol*, 38:3, 285–295.
- Maldonado, J.M., Castro S.E., Lagunes, Q.R., Granjeno, C.G., Hernández, O.R. (2017), Amplification of the gene coding glutamate-gated chloride channel from TICK *Rhipicephalus (B.) microplus*. *Rev. Nal. Pec.* 31-33.
- Manjunathachar HV, Kumar, Saravanan BC, Choudhary S, Mohanty AK, Nagar G, Chigure G, Ravi Kumar GV, de la Fuente J, Ghosh S., (2018) Identification and characterization of vaccine candidates against

Hyalomma anatolicum-Vector of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *Transbound Emerg Dis.*,66422-434.

- Martins J, Furlong J. (2001) Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet Rec*, 149: 64.
- Mermans, C., Dermauw, W., Geibel, S., Van Leeuwen, T., (2017), A G326E substitution in the glutamate-gated chloride channel 3 (GluCl3) of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* abolishes the agonistic activity of macrocyclic lactones *Pest Manag Sci* , 73: 2413–2418.
- Metcalf, R. L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Pesticide Sci*, 26: 333–358.
- Mohamamd M R., Shishir K. Ghorban G., Sedigheh N., Alireza S., Mohammad T., Sahar E., Maryam T. (2015) Designing and Modeling of Complex DNA Vaccine Based on Tropomyosin Protein of *Boophilus* Genus Tick, *Appl Biochem Biotechnol* 175:323–33
- Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. & Cruz-Velázquez, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2 (2).
- Paitoon K., Roger W. Stich G. R. Needham S., (2008) Molecular Analysis of Calreticulin Expressed in Salivary Glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Indigenous to Thailand
- Paim R., Araujo R., Leis M., Sant'anna M., Gontijo N., Lazzari C., Pereira M., (2016) Functional evaluation of Heat Shock Proteins 70

(HSP70/HSC70) on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) physiological responses associated with feeding and starvation Insect Biochem Mol Biol, 77:10-20.

- Pecina P., Nůsková H., Karbanová V., Kaplanová V., Mráček T., Houštěk J. (2018) Role of the mitochondrial ATP synthase central stalk subunits γ and δ in the activity and assembly of the mammalian enzyme, BBA 1083, 142-20
- Pérez, C.L., Rodríguez, V.R., Ramírez, C.J., Rosado, A.J., (2010) Survey of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatan México, Veterinary parasitology, 172, 109-113.
- Pohl, CP., Klafke, MG., Carvalho, DD., Martins, JR., Daffre, S., Da Silva, IV., & Masuda, A. (2011). ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. International Journal of Parasitology. 41, 1323-1333.
- Quiroz, H., Figueroa, J. A., Ibarra, C. F., López, M. E. (2011). Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. 1^a ed. 477-495.
-
- Rocha G.G., Maruyama, S.R., Nelson, K.T., Chaves R.J., Gardinassi G.L., Mendes M.A., Rossetti F.B., Kooyman N.J., de Miranda I.I., (2017) Immune recognition of salivary proteins from the cattle tick *Rhipicephalus microplus* differs according to the genotype of the bovine host Parasites & Vectors 201710:144
- Rodríguez-Vivas, R.I., Hodgkinson, J. E., J. Trees, A. (2012). Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Current status and mechanisms of resistance. Rev mex de cien pecu. 3: 9-24
- Rodríguez, V. R., Laerte, G., Pérez de León, A., Silva H., Torres, J.F., Frago, S.H., Romero, S.D., Rosario, C.R., Saldierna, F., García, C.D.

(2017) Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Rev Mex Cienc Pecu*, 8, 61-74.

- Suchitra S., y Joshi P. (2005) Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochim Biophys Acta*.15;1722::293-303.
- U.S. Department of agriculture, www.usda.gov consultada en Enero 2017
- Klafke, G.M., Sabatini, G.A., Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miler, R., Schumaker, T.T., (2006) Larval inmersión test with ivermectin in populations of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari ixodidae) from state of Sao Paulo, Brazil, *Veterinary Parasitology*, 14, 386-390.
- Wang, W., Groenendyk, J., Michalak, M. (2012). Calreticulin signaling in health and disease. *INT J BIOCHEM CELL B*, 44(6), 842–846
- Wang, H., Zhang, X., Wang, X., Zhang, B., Wang, M., Yang, X., Liu, J. (2019). Comprehensive Analysis of the Global Protein Changes That Occur During Salivary Gland Degeneration in Female Ixodid Ticks *Haemaphysalis longicornis*. *Front Physio*, 9.
- Wenchang Z., Faraldo J, (2018) Membrane plasticity facilitates recognition of the inhibitor oligomycin by the mitochondrial ATP synthase rotor, *BBA bioenergetics*
- Wolstenholme, A.J., (2012) Glutamate-gated chloride channel, *JBC*, 287, 40232-40238

- Wright W., Bartley K., Huntley J., Nisbet A., (2016) Characterisation of tropomyosin and paramyosin as vaccine candidate molecules for the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, *Parasites & Vectors* 9:544
- Zhang T., Cui X., Zhang J., Wang J., Wu M., Zeng H., Cao Y., Liu J., Hu Y., (2015) Screening and Identification of Antigenic Proteins from the Hard Tick *Dermacentor silvarum* (Acari: Ixodidae), *Korean J Parasitol* 53- 6: 789-793

Dirección General de Bibliotecas UAQ