

“Identificación de las proteínas que interaccionan con la
proteína BmVDAC durante la infección de *Rhipicephalus*
microplus con *Babesia bigemina*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

José Antonio Hernández Aparicio

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

Integración del jurado

Presidente: Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

Secretario: Dra. Minerva Camacho Nuez

Vocal: Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM

Directora de Tesis

Dra. Minerva Camacho Nuez

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesora- Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASERORES

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez

Profesora- Investigadora

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Gloria de la Luz León Ávila

Profesora-Investigadora

Departamento de Zoología. ENCB

Instituto Politécnico Nacional

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Profesor- Investigador

Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Autónoma de Querétaro

AGRADECIMIENTOS

Debo de agradecer de manera especial y sincera a la **Dra. Minerva Camacho Nuez** por aceptarme para este proyecto. Su apoyo y sus conocimientos han sido invaluable.

Le agradezco también a la **Dra. Gloria de la Luz León Ávila**, al **Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito** y a la **Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez**, por sus recomendaciones durante el desarrollo esta tesis.

Además quiero agradecerle a la **Dra. Jacqueline Castañeda Ortiz** por haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de mi trabajo en el laboratorio y por brindarme su sincera amistad.

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

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de beca otorgada: 859928.

Este proyecto de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número: 283344 CB-2016-1. Y que lleva por título: “Caracterización molecular de RmVDAC una proteína de intestinos *Rhipicephalus microplus* y su papel en la transmisión de la babesiosis bovina.

DEDICATORIA

Esta tesis es el resultado del trabajo de varias personas que de una o de otra manera ayudaron a concluir la. Entre ellos quiero destacar en primer lugar a mi mamá **María Luisa**, que es el mejor ser humano que he tenido en mi vida.

A mis hermanos: **Marisol** y **Esteban**, que siempre han estado para mí cuando más los necesite, “Gracias por alentarme siempre”.

A mi amigo **Fabricio** que conozco desde que comencé mis estudios de Biología, es un amigo que pretendo conservar por siempre.

A mis compañeros que se convirtieron en mis amigos de generación **Vianey, Allan, Marco, Andrea y Karla** gracias por su compañía, espero que siempre estemos en contacto.

A mi novia **Ari** por tenerme paciencia “Gracias”.

Y a todas las personas que tuve la oportunidad de conocer durante mi estancia en el posgrado: **Kike, Jose, Mar, Lau, Vic, Sharon, Vic fashion, Iván, Manzanita, Eucli, Jesi, Brisa, Paquito, Gabo y Cris**. A los chicos de licenciatura que tuve la oportunidad de conocer: **Marlene, Astrid y Edgar**. A **Miguel, Susana y Rodrigo** de Querétaro.

Al **Dr. Mauricio** por todo el material donado, gracias.

“Gracias a todas aquellas personas que han sido pilares a lo largo de toda mi formación”.

“Educar no es solo impartir conocimiento. Educar es también forjar caracteres nobles, rectos y con fuertes principios, en los que no cabe la vulgaridad, la superficialidad y la arrogancia. Modificar lo que debemos hacer, por temor a que sea contraproducente o a una respuesta exagerada, significa renunciar a nuestro cometido”.

Natsume Soseki

Índice de tablas.....	9
Índice de figuras.....	9
Abreviaturas.....	13
Resumen.....	15
Abstrac.....	16

I. INTRODUCCIÓN

I. Introducción	17
A. Babesiosis bovina	17
B. Características de <i>B. bigemina</i>	18
C. Taxonomía de <i>B. bigemina</i>	19
D. Genoma de <i>Babesia</i>	20
E. Distribución geográfica de la babesiosis en México	21
F. Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	22
G. Genoma de <i>R. microplus</i>	24
H. Ciclo de vida de <i>B. bigemina</i>	24
I. Patogénesis de la enfermedad	26
J. Control de la enfermedad	26
K. Vacunas contra el parásito.	26
L. Control del vector transmisor.....	28
1. Quimioprofilaxis	28
2. Resistencia de <i>R. microplus</i> a acaricidas.....	29
3. Vacunas contra el vector transmisor	29
II. Antecedentes particulares	32
A. Moléculas asociadas a <i>Babesia</i> en el intestino del vector.....	32
B. Moléculas asociadas a <i>Babesia</i> en ovarios de garrapata.....	36
C. Moléculas asociadas a <i>Babesia</i> en glándulas salivales	36
D. Características generales de la proteína canal selectivo de aniones dependiente de voltaje (VDAC)	37
E. Interacciones importantes de VDAC.....	39
1. VDAC y tubulina.....	40
2. VDAC y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT).....	41
3. VDAC y Hexocinasa (HK)	41
4. VDAC y Bax	42

F.	Localización de VDAC en la membrana plasmática.	43
G.	VDAC como receptor de plasminógeno.....	45
H.	Plasminógeno en Apicomplexas	46
I.	Interacción de VDAC con proteínas de diversos patógenos	47
1.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	47
2.	Dengue	48
3.	<i>Plasmodium falciparum</i>	49
J.	Características de BmVDAC	50
III.	Hipótesis	52
IV.	Justificación	52
V.	Objetivo general	53
VI.	Objetivos particulares	53
VII.	Estrategia experimental	54
VIII.	Materiales y Métodos	55
A.	Obtención de intestinos de <i>R. microplus</i> no infectados e infectados con <i>B. bigemina</i> a diferentes tiempos post repleción	55
B.	Determinación de la parasitemia del bovino infectado con <i>B. bigemina</i>	55
C.	Determinación del hematocrito y temperatura en el bovino infectado.	56
D.	Prueba de hemolinfa en <i>R. microplus</i> infectada con <i>B. bigemina</i>	56
E.	Extracción y preparación de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i>	56
F.	Cuantificación de las proteínas de los intestinos de <i>R. microplus</i>	57
G.	Inmunotransferencia	57
H.	Tinción de geles de poliacrilamida SDS/PAGE con azul de Coomassie R-250.....	58
I.	Inducción de la proteína recombinante BmVDAC	58
J.	Purificación de BmVDAC recombinante	59
K.	Diálisis de BmVDAC recombinante	59
L.	Ensayos de Pull-Down	60
M.	Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunoprecipitación y de inmunotransferencia. 60	60
N.	Preclarado del anticuerpo policlonal BmVDAC	60
O.	Inmunoprecipitación	61
P.	Tinción de geles de poliacrilamida SDS/PAGE con azul de Coomassie G-250	61
Q.	Espectrometría de masas	62
R.	Ensayo de unión de BmVDACr al plasminógeno humano	62
S.	Análisis densitométrico de las bandas diferenciales de los ensayos de IP de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados con <i>B. bigemina</i> y no infectados a diferentes horas post repleción	63
IX.	Resultados	64

A.	Determinar la expresión diferencial de las proteínas que interaccionan con BmVDAC en el intestino de <i>R. microplus</i> durante la infección con <i>B. bigemina</i> a diferentes tiempos post repleción	64
B.	Identificar las proteínas expresadas diferencialmente que interaccionan con BmVDAC mediante espectrometría de masas.....	85
C.	Demostrar la interacción de BmVDAC con una de las proteínas identificadas.	87
X.	Discusión	92
XI.	Conclusiones	99
XII.	Bibliografía	100

Índice de tablas

Tabla 1. Proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i> que interaccionan con fases sexuales de <i>B. bigemina</i>	33
--	----

Tabla 2. Proteínas que interaccionan con BmVDAC.....	85
--	----

Índice de figuras

Figura 1. Frotis sanguíneo teñido con Giemsa de eritrocitos bovinos infectados con <i>B. bigemina</i> ..	18
--	----

Figura 2. Estructura de un merozoíto de <i>B. Bigemina</i>	19
--	----

Figura 3. Distribución geográfica del control de <i>R. microplus</i> en el territorio nacional.....	22
---	----

Figura 4. Ciclo de Vida de <i>R. microplus</i>	23
--	----

Figura 5. Ciclo de Vida de <i>B. bigemina</i>	25
--	----

Figura 6. Desventajas del uso de vacunas vivas atenuadas.	28
--	----

Figura 7. Expresión de BmVDAC en intestinos de <i>R. microplus</i> infectados (I) y no infectados (N.I) con <i>B. bigemina</i> a diferentes tiempos post repleción.	34
--	----

Figura 8. Expresión de la proteína BmVDAC de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados(I) y no infectados (NI) con <i>B. bigemina</i> a diferentes tiempos post repleción.....	34
---	----

Figura 9. Inmunolocalización de BmVDAC a diferentes horas post repleción.....	35
---	----

Figura 10. Esquema de la proteína VDAC en la membrana externa mitocondrial.	38
--	----

Figura 11. Interacción de la mitocondria con otros compartimientos celulares.	39
--	----

Figura 12. Modelo que muestra el bloqueo de VDAC por tubulina.	40
---	----

Figura 13. VDAC1 interaccionando con ANT1 y mCK.	41
---	----

Figura 14. Interacción de creatinina cinasa, el translocador de nucleótidos de adenina, VDAC y hexocinasa (CK/ANT/VDAC/HK).	42
Figura 15. Interacción de VDAC/Bax promoviendo la liberación de citocromo c.....	43
Figura 16. Proceso de purificación de VDAC1 de la membrana plasmática.	44
Figura 17. Esquema de la interacción de hVDAC1/plasminógeno (K5) que induce apoptosis en células epiteliales.	46
Figura 18. Modelo hipotético del papel del plasminógeno durante la invasión del quintero de <i>Plasmodium spp</i> al intestino de su vector.	47
Figura 19. Imagen realizada <i>in silico</i> de BmVDAC.	50
Figura 20. Flujo de trabajo de la infestación de <i>B. taurus</i> de la raza Holstein con <i>R. microplus</i> e infección con <i>B. bigemina</i>	64
Figura 21. Frotis sanguíneo de bovino infectado con <i>B. bigemina</i>	65
Figura 22. Parasitemia del bovino infectado durante los días de colecta de <i>R. microplus</i>	65
Figura 23. Valores de hematocrito del bovino infectado con <i>B. bigemina</i> durante cuatro días...66	
Figura 24. Temperatura corporal del bovino infectado con <i>B. bigemina</i> durante los días de colecta de las garrapatas.	67
Figura 25. Tinción con Giemsa de la hemolinfa de <i>R. microplus</i> infectada con <i>B. bigemina</i>	68
Figura 26. Lisado de la cepa <i>E. coli</i> BL21 donde se muestran la sobreexpresión de BmVDAC.. ...	68
Figura 27. Cromatograma de BmVDAC purificada con el método replegamiento de la proteína sobre la columna.	69
Figura 28. Fracciones en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie R-250 de BmVDAC purificadas en el FPLC.....	69
Figura 29. Perfil de elución de BmVDAC recombinante empleando 290 mM de imidazol.	70
Figura 30. Pull-down de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados con <i>B. Bigemina</i> 48 h post repleción.	71

Figura 31. IP de lisados de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados (I) y no infectados (N.I) con <i>B. bigemina</i> sin crosslink a 0 y 24 h post repleción.....	72
Figura 32. Bandas de proteínas diferenciales que interaccionan con BmVDAC.....	73
Figura 33. IP de lisado de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados con <i>B. bigemina</i> 24 h post repleción.	74
Figura 34. Estudio del posible reconocimiento de BmVDAC por un anticuerpo monoclonal contra VDAC de humano.	75
Figura 35. Integridad de lisado de intestinos de <i>R. microplus</i> a 0, 24, 48 y 72 h post repleción infectados y no infectados con <i>B. bigemina</i> y tratados durante 2 h con 2 mM de DSP.	76
Figura 36. Preclarado de 100 µg de intestinos de <i>R. microplus</i> a 0, 24, 48 y 72 h post repleción, infectados (I) y no infectados (N.I) con <i>B. bigemina</i>	77
Figura 37. IP de suero preinmune, inmune y BSA.....	78
Figura 38. IP de lisado de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados (I) y no infectados (N.I) con <i>B. bigemina</i> a 0 h post repleción.....	79
Figura 39. IP de lisado de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados (I) y no infectados (N.I) con <i>B. bigemina</i> a 24 h post repleción.....	80
Figura 40. IP de lisado de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados (I) y no infectados (N.I) con <i>B. bigemina</i> a 48 h post repleción.....	81
Figura 41. IP de lisado de intestinos de <i>R. microplus</i> infectados con <i>B. bigemina</i> y no infectados a 72 h post repleción.....	82
Figura 42. Análisis de BmVDAC nativa en las muestras usadas en la IP.....	83
Figura 43. Análisis semicuantitativo de la cantidad de proteínas de la banda superior (entre 90 y 140 kDa), para todos los tiempos post repleción	84
Figura 44. Análisis de la inducción de las proteínas recombinantes enolasa y BmVDAC..	87
Figura 45. Cromatograma de la purificación de las proteínas recombinantes enolasa y BmVDAC.	88

Figura 46. Purificación de las proteínas recombinantes enolasa y BmVDAC para los ensayos de unión	88
Figura 47. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE teñido con azul de coomassie de la integridad de las proteínas utilizadas en el ensayo de unión a plasminógeno.....	89
Figura 48. Especificidad de los anticuerpos utilizados en los ensayos de unión.	90
Figura 49. Interacción específica de BmVDAC al plasminógeno humano..	91
Figura 50. Modelo hipotético de la interacción BmVDAC/plasminógeno de <i>B. taurus</i>.....	97

Índice de abreviaturas

°C: Grados Celsius

µg: Microgramo

µl: Microlitros

µm: Micrómetros

ADP: Difosfato de adenosina

ANT: Translocador de nucleótidos de adenina

A-T: Adenina-Timina

ATP: Trifosfato de adenosina

B. bigemina: *Babesia bigemina*

B. bovis: *Babesia bovis*

B. indicus: *Bos indicus*

B. taurus: *Bos taurus*

BmVDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje de *Rhipicephalus microplus*

Ca²⁺: Ion calcio

Cl⁻: Ion cloro

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSP: Ditiobis (succinimidilpropionato)

DTT: 1,4 Ditiotreitól

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FPLC: Cromatografía líquida rápida de proteínas

g: Gramo

Gbp: Gigapares de bases

G-C: Guanina-Citocina

GSK3β: Glucógeno sintasa cinasa 3β

h: Horas

H₂O: Agua

HK: Hexiquinasa

hVDAC1: Isoforma 1 de VDAC humano

I. scapularis: *Ixodes scapularis*

IP: Inmunoprecipitación

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

K⁺: Ion potasio

Kbp: kilopares de bases

kDa: Kilodalton

Kg: Kilogramo

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

M: Molar

Mbp: Megapares de bases

mCK: Creatinin cinasa

mg: Miligramos

min: Minutos

ml: Mililitros

mM: Milimolar

MSA-2: Antígeno de superficie variable de merozoito 2

mV: Milivolts

N. gonorrhoeae: *Neisseria gonorrhoeae*

Na⁺: Ion sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NADH: Nicotin adenin dinucleótido

nm: Nanómetros

NP-40: Nonil fenoxipolietoxietanol

OH⁻: Ion hidroxilo

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

PBS: Amortiguador de fosfatos salino

PBS-T: Amortiguador de fosfatos salinos-Tween

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: Potencial de hidrógeno

R. annulatus: *Rhipicephalus annulatus*

R. microplus: *Rhipicephalus microplus*

RAP-1: Proteína asociada a ropria-1

rev: Revoluciones

RNA: Ácido ribonucleico

RNAi: RNA interferente

RNA_m: RNA mensajero

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SDS: Dodecilsulfato de sodio

PBS-T: Amortiguador Tris-NaCl-Tween

t-PA: Activador tisular del plasminógeno

Tris-HCl: Clorhidrato de (hidroximetil) aminometano

TSPO2: Proteína translocadora 2

u-PA: Activador del plasminógeno tipo uroquinidasa

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

VgR: Receptor de vitelogenina

Resumen

La babesiosis bovina es una enfermedad de alto impacto económico. Esta enfermedad es causada por parásitos del género *Babesia* que son transmitidos por garrapatas principalmente *Rhiphicephalus microplus* en México. *Babesia bigemina* desarrolla un complejo ciclo de vida con una fase de reproducción asexual en el hospedero bovino y sexual en la garrapata vector. El intestino de la garrapata es la primera barrera que tiene que cruzar el parásito para establecer la infección, por lo que el estudio de las proteínas involucradas en la interacción parásito/vector en esta etapa de la infección, resulta de gran interés para comprender mejor los mecanismos de invasión del parásito al intestino y para la identificación de posibles candidatos vacunales. En nuestro grupo de trabajo se identificó una proteína mitocondrial, Canal de Aniones Dependiente de Voltage (VDAC), de los intestinos de *R. microplus* que interacciona con fases sexuales de *B. bigemina* y que se sobre expresa a las 24 h post repleción en garrapatas infectadas, sin embargo se desconoce la función que juega esta proteína. Una estrategia experimental que se utiliza actualmente para comprender la función de las proteínas, es el estudio de la interacción de la proteína sujeta de estudio con otras proteínas, por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar la interacción de la proteína BmVDAC con proteínas en el intestino del vector *R. microplus* durante el proceso de infección con *B. bigemina*. Para cumplir con lo anterior se infestó con larvas de *R. microplus* dos bovinos, uno infectado con *B. bigemina* y otro son infectar, a los 21 días se colectaron las garrapatas adultas repletas; los intestinos de las garrapatas fueron disectados a 0, 24, 48 y 72 h post repleción. Las proteínas de membrana de los intestinos fueron extraídas, cuantificadas y sometidas a tratamiento con el entrecruzador DSP, posteriormente se realizó la inmunoprecipitación. El extracto de intestinos de cada condición experimental se incubó con 4 µL de suero bovino preinmune o inmune anti-BmVDAC durante 16 h a 4°C en agitación, posteriormente los complejos se incubaron con 100 µL de proteína G agarosa durante 2 h a 4°C. Los complejos resultantes se corrieron en geles SDS/PAGE al 10%. Las bandas proteicas diferenciales de Peso Molecular aproximado de 50 kDa y las de la región de 90 a 140 kDa, se mandaron a analizar por espectrometría de masas. El análisis semicuantitativo evidenció una abundancia estadísticamente superior de estas bandas a las 72 h post repleción. Los péptidos identificados por espectrometría de masas correspondieron fundamentalmente a cuatro proteínas de *Bos taurus*: Inhibidor de la alfa-tripsina cadena pesada H4, Plasminógeno, Factor de complemento H y Fosfatidilinositol-glucano-fosfolipasa D, finalmente se verificó la interacción de BmVDAC con el plasminógeno por ensayos de binding blot. La interacción de BmVDAC con el plasminógeno bovino sugiere una de las funciones de BmVDAC, ya que esta interacción podría activar el plasminógeno a plasmina y esta degradar componentes de la matriz extracelular lo que facilitaría la invasión del parásito al intestino. Este es el primer reporte de proteínas que interaccionan con BmVDAC durante la infección de *R. microplus* con *B. bigemina*.

Abstract

Bovine babesiosis is a disease of high economic impact. This disease is caused by parasites of the genus *Babesia* that are transmitted by ticks mainly *Rhiphicephalus microplus* in Mexico. *Babesia bigemina* develops a complex life cycle with an asexual reproduction phase in the bovine and sexual in the vector tick. The midgut tick is the first barrier that the parasite has to cross to establish the infection, therefore the study of the proteins involved in the parasite / vector interaction at this stage of the infection, is of great interest to better understand the mechanisms of invasion of the parasite to the midgut and to identify of possible vaccine candidates. In our working group, a mitochondrial protein, Voltage Dependent Anion Channel (VDAC), was identified from the *R. microplus* midgut that interacts with *B. bigemina* sexual stages and it is over expressed at 24 h post repletion in infected ticks, however the role of this protein is unknown. An experimental strategy that is currently used to understand the function of proteins is the study of the interaction of the protein under study with other proteins, therefore the main goal of the present research was to determine the interaction of BmVDAC with other proteins in *R. microplus* midgut during the infection process with *B. bigemina*. Two bovines were infested with *R. microplus* larvae, one of them was infected with *B. bigemina* and the other one was uninfected. 21 days later adult ticks were collected. The tick midguts were dissected at 0, 24, 48 and 72 h post repletion. The midgut membrane proteins were extracted, quantified and subjected to treatment with the DSP crosslinker, subsequently immunoprecipitation was performed. 100 µg of protein extract of each experimental condition was incubated with 4 µL of pre-immune or immune bovine serum anti-BmVDAC for 16 h at 4 ° C, the complexes were then incubated with 100 µL of G agarose protein for 2 h at 4 ° C. The resulting complexes were run on 10% SDS / PAGE gels. Differential protein bands of Molecular Weight of approximately 50 kDa and those in the region of 90 to 140 kDa were sent to be analyzed by mass spectrometry. The semi-quantitative analysis showed a statistically superior abundance of these bands in samples from infected ticks at 72 h post repletion. The peptides identified by mass spectrometry corresponded mainly to four *Bos taurus* proteins: H4 heavy chain alpha-trypsin inhibitor, Plasminogen, Complement factor H and Phosphatidylinositol-glucan-phospholipase D; finally the interaction of BmVDAC with the plasminogen was verified by binding blot assays. The interaction of BmVDAC with bovine plasminogen suggests one of the functions of BmVDAC, since this interaction could activate plasminogen to plasmin that degrades components of the extracellular matrix, which could facilitate the invasion of the parasite into the midgut. This is the first report of proteins that interact with BmVDAC during the infection of *R. microplus* with *B. bigemina*.

I. INTRODUCCIÓN

A. Babesiosis bovina

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por artrópodos y causada por un protozooario Apicomplexa del género *Babesia*, los signos clínicos en el bovino son; fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, anorexia y en ocasiones la muerte (Rojas-Martínez *et al.*, 2018).

Víctor Babes en 1888 fue el primero en describir la enfermedad después de analizar eritrocitos de bovinos con signos de anemia en Rumania y lo asoció con hemoglobinuria bovina que también es conocida como fiebre de las aguas rojas, en honor a Babes esta enfermedad es conocida como babesiosis (Uilenberg 2006).

Posteriormente en 1893 Theobald Smith y Frederick Kilborne que estudiaban la fiebre de Texas en el ganado (la cual era producida por un parásito intraeritrocítico), demostraron que la garrapata del género *Rhipicephalus* (antes conocida como *Boophilus*) era el vector responsable de transmitir la babesiosis a los bovinos (Assadian y Stanek, 2002).

Estos parásitos descritos por Babes y Smith-Kilborne fueron posteriormente llamados *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* respectivamente y desde su descubrimiento se han descrito más de 100 especies del género *Babesia* (Schnittger *et al.*, 2002).

La babesiosis bovina es la enfermedad más importante transmitida del artrópodo al ganado y su importancia económica se relaciona con la mortalidad, abortos, disminución de producción de leche y carne, así como en ocasiones la muerte.

En E.U.A se estimaron pérdidas económicas en la industria ganadera de más de \$130 millones de dólares a principios del siglo XIX, lo que llevó a que se realizara un programa de erradicación de la garrapata con el objetivo de terminar con la enfermedad la cual finalizó en 1943 (Guerrero *et al.*, 2010).

En México la babesiosis bovina es causada principalmente por *B. bovis* y *B. bigemina* que pueden ser transmitidas por la garrapata; *R. microplus* y *R. annulatus* que se distribuyen en el 75% del territorio nacional, por lo tanto, se estima que el número de bovinos en riesgo de infestarse con la garrapata es de 24,973,983 y las pérdidas económicas en la ganadería bovina para el 2013 se calcularon en 573,608,076 dólares (Álvarez *et al.*, 2004; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

B. Características de *B. bigemina*

B. bigemina es un parásito que infecta al ganado bovino y se distribuye en regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial, que es donde se localiza su vector (*R. microplus* y *R. annulatus*) e incluyen: el Norte y Sur de América, al Sur de Europa, Asia, África y Australia (Homer *et al.*, 2000).

B. bigemina es un parásito intraeritrocítico que tiene forma de pera y forma parejas en ángulo agudo, mide 2.5 x 5 µm de diámetro y puede ocupar hasta el 75% del eritrocito (Fig. 1). El período de incubación en el hospedero es de 3 a 4 días y la enfermedad se manifiesta entre la segunda y la tercera semana después de la picadura del vector infectado, el primer síntoma es la fiebre, seguido de anemia, hemoglobinuria y hemoglobinemia como consecuencia de la lisis de eritrocitos sanguíneos (Muñoz 2016).

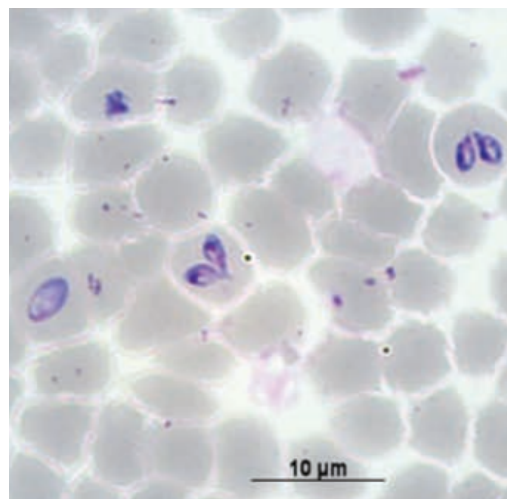


Figura 1. Frotis sanguíneo teñido con Giemsa de eritrocitos bovinos infectados con *B. bigemina*. Se observaron con objetivo de inmersión a 100x. Tomado de Mosqueda *et al.*, 2012.

C. Taxonomía de *B. bigemina*

B. bigemina pertenece al phylum Apicomplexa que incluye a más de 6,000 especies las cuales son protozoarios intracelulares obligados (Suarez *et al.*, 2017).

Los merozoítos miden de 2-5 μm y tienen organelos como; aparato de Golgi, núcleo, un apicomplasto, retículo endoplásmico y una mitocondria. Además, el merozoito posee una estructura llamada alveolar que es una película que consta de la membrana celular, alveoli o alveolos y microtúbulos, que ayudan al movimiento del parásito y también posee una estructura llamada complejo apical que incluyen: anillo polar, micronemas, roptrías y cuerpos esféricos, estos últimos son órganos especializados que le ayudan a la invasión (Fig. 2) (Adl *et al.*, 2007; Ganzinelli *et al.*, 2018).

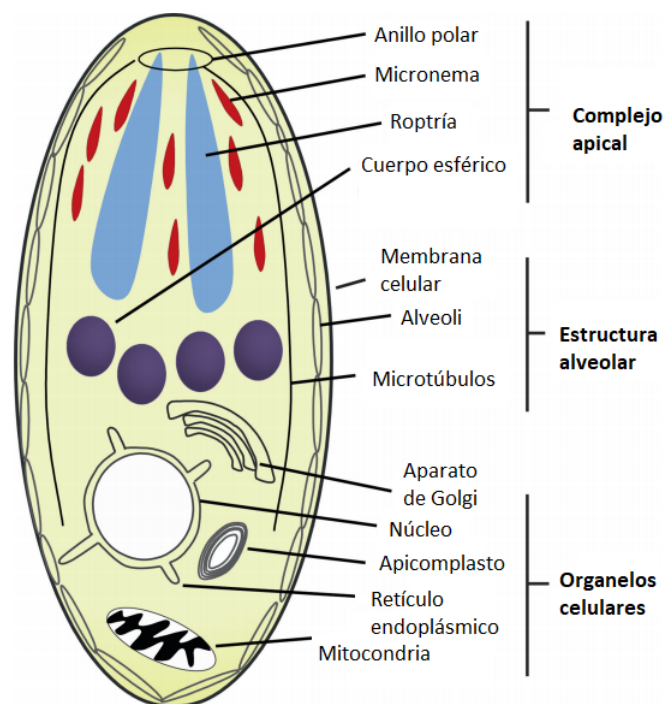


Figura 2. Estructura de un merozoíto de *B. Bigemina*. Se muestran sus organelos con membrana como en otros eucariotas como el núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y la mitocondria. También se muestran órganos especializados para la invasión conocido como complejo apical los cuales constan de un anillo polar, micronemas, roptrías y cuerpos esféricos. Tomado y modificado de Ganzinelli *et al.*, 2018.

La clasificación taxonómica propuesta para *B. bigemina* es:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoasida

Orden: Eucoccidiorida

Suborden: Piroplasmida

Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

Especie: *bigemina*

(Levine 1982; Vial *et al.*, 2006; Homer *et al.*, 2000)

D. Genoma de *Babesia*

La secuenciación del genoma de *B. bovis* de la cepa virulenta de Texas (T2Bo) se realizó por el método secuenciación masiva conocida como *shotgun*, el cual mostró que el parásito tiene 4 cromosomas que tienen un tamaño de 2.62, 2.59, 1.73 y ~1.25 Mbp respectivamente, con un tamaño total de 8.2 Mbp. Tres de los cuatro cromosomas son acrocéntricos y el cuarto cromosoma es submetacéntrico. Cada cromosoma de *B. bovis* contiene una región rica en A-T la cuál podría ser el centrómero (Brayton *et al.*, 2007).

Además, se calculó que hay 3,671 genes nucleares que codifican para proteínas y que el porcentaje de genes que contienen intrones es del 61.5%. El contenido de G-C del genoma es del 37% para las regiones intergénicas, 44% para los exones y 35.9% para los intrones (Brayton *et al.*, 2007).

Adicionalmente al genoma nuclear, *B. bovis* contiene dos genomas extracromosomales ricos en A-T: un genoma circular de 33 kbp que corresponde al apicomplasto y uno lineal de ~6 kbp que corresponde al genoma mitocondrial (Brayton *et al.*, 2007).

Para el genoma de *B. bigemina* solo se conoce que, en una cepa virulenta obtenida en Australia, el genoma nuclear tiene un tamaño aproximado de 10Mb distribuido en 4 cromosomas (Sanger 2019).

E. Distribución geográfica de la babesiosis en México

En nuestro país el clima se divide en cuatro áreas geográficas que son; zona árida, zona semiárida, zona húmeda y zona tropical lo que significa que se pueden encontrar varias especies de garrapatas incluyendo las que producen babesiosis (Peel *et al.*, 2010).

El género *Rhipicephalus* comprende alrededor de 70 especies y *R. microplus* es el principal vector causante de la babesiosis en nuestro país, se distribuye en el 75% del territorio nacional que abarca zonas áridas y templadas (Fig. 3) (Jongejan *et al.*, 1994; Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

En México los factores ambientales como; topografía, temperatura, lluvia y humedad relativa, así como tipo y cantidad de vegetación ayuda al desarrollo de *R. microplus* (Estrada-Peña *et al.*, 2006; Jonsson 1997).

Otros factores que intervienen en su distribución son la altitud, presencia y abundancia de hospederos como *Bos taurus* y *Bos indicus* (Cen-Aguilar *et al.*, 1998)

La situación actual respecto a la distribución de la garrapata en nuestro país comprende que los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur están reconocidos oficialmente como libres del ectoparásito.

En fase de erradicación se encuentran los Municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; así como los municipios de la zona Desierto del estado de Coahuila: Cuatrociénegas, Ocampo y Sierra Mojada.

El resto del país comparte regiones en control y zonas libres naturales de garrapata *Rhipicephalus* spp (SENASICA 2019).

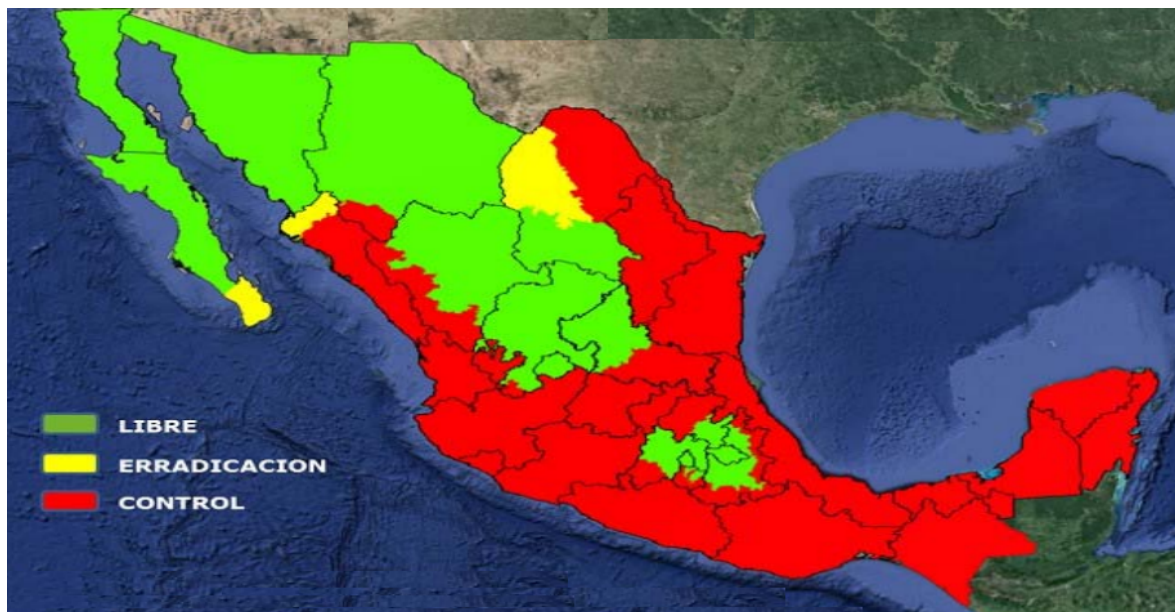


Figura 3. Distribución geográfica del control de *R. microplus* en el territorio nacional. Tomado de SAGARPA 2015.

F. Ciclo de vida de *R. microplus*

Esta garrapata pertenece a la familia Ixodidae (garrapatas duras) y se distribuye en regiones tropicales y subtropicales, causando pérdidas económicas debido a que puede transmitir gran variedad de enfermedades entre ellas la babesiosis que disminuye la producción de carne, leche y la picadura de la garrapata en su hospedero bovino afecta la producción de pieles (Li-Li *et al.*, 2019).

R. microplus presenta cuatro estadios para que se desarrolle y complete su ciclo de vida. Estos estadios son: huevo que se localiza en el suelo, larva, ninfa y adultos

que se desarrollan en el hospedero bovino, los adultos se diferencian en hembras y machos en el bovino sobre el cual se aparean y posteriormente se desprenden del bovino y caen al suelo donde ovipositan las garrapatas repletas (Riek 1964).

Para que la garrapata logre desarrollarse debe pasar a través de tres fases que son las siguientes:

1. Fase no parasítica: Es llamada también vida libre y comprende desde que la garrapata hembra repleta se desprende de su hospedero, hasta la aparición de las larvas en la vegetación.
2. Fase de encuentro: Se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación hasta llegar al hospedero y está influenciada por variables como tipo de vegetación y presencia de bovinos.
3. Fase parasítica: Es el periodo que completa el ciclo biológico de la garrapata desarrollándose una serie de eventos patológicos sobre el hospedero.

En general el ciclo biológico de *R. microplus* dura aproximadamente de 19 a 21 días en condiciones óptimas una hembra repleta de *R. microplus* pone de 2,500-3,500 huevos (Ortiz-Benavides *et al.*, 2016) (Fig. 4).

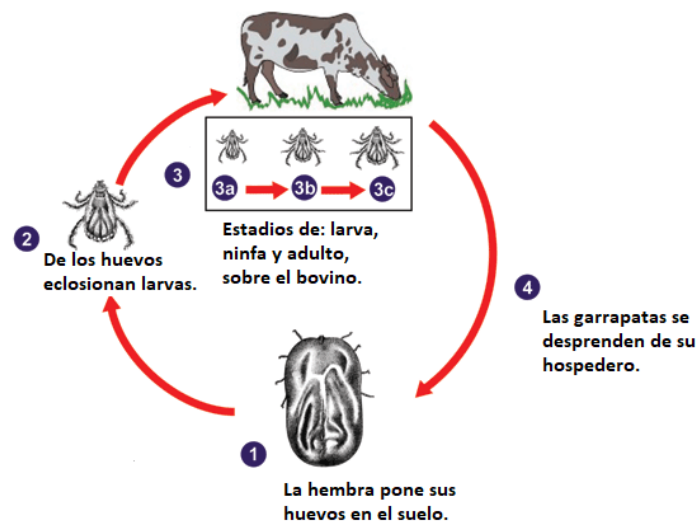


Figura 4. Ciclo de Vida de *R. microplus*. La hembra repleta cae al suelo y pone sus huevos en el suelo o vegetación (1). De los huevos eclosionan larvas que tienen tres pares de patas (2). Las larvas suben a su hospedero bovino y se desarrolla de larva a ninfa y posteriormente a adulto (3a, 3b y 3c). Finalmente, las garrapatas caen al suelo y las hembras colocan sus huevos y el ciclo inicia de nuevo (4). Tomado y modificado del Centers for Disease Control and Prevention, 2019.

G. Genoma de *R. microplus*

Actualmente el genoma de *R. microplus* no se encuentra secuenciado totalmente sin embargo se sabe que su genoma tiene un tamaño de 7.1 Gbp repartido en 22 cromosomas y tiene aproximadamente 70% de DNA repetitivo, además se reportan 38,872 genes que codifican para un total de 24,758 proteínas (Barrero *et al.*, 2017; Newton *et al.*, 1972).

El conocimiento de la secuencia del genoma de este vector es de suma importancia debido a que podría contribuir a identificar mecanismos que ayuden a controlar la infestación en el ganado bovino.

H. Ciclo de vida de *B. bigemina*

El género *Babesia* comprende alrededor de 100 especies de protozoarios patógenos que son capaces de infectar eritrocitos de una gran variedad de hospederos vertebrados (Lobo *et al.*, 2012).

B. bigemina tiene un ciclo de vida complejo, requiere de una reproducción asexual en los eritrocitos de su hospedero bovino y una reproducción sexual en su vector invertebrado siendo *R. microplus* su principal vector (Mosqueda *et al.*, 2004; Bohaliga *et al.*, 2019).

El ciclo de vida inicia con la picadura de una garrapata infectada con *B. bigemina*, esta le inyecta esporozoítos que migran hacia el torrente sanguíneo ahí penetran la membrana celular de los eritrocitos con ayuda del complejo apical el cual consta de roptrías, micronemas y cuerpos esféricos. Una vez dentro de los eritrocitos, los esporozoítos se dividen por fisión binaria en dos o cuatro merozoítos los que tienen forma de pera y también poseen un complejo apical. Algunos merozoítos detienen su división y se diferencian en pregametocitos; cuando la garrapata se alimenta de un bovino infectado con *Babesia* los pregametocitos se diferencian en el intestino del vector en gametos haploides, que son conocidos también como cuerpos rayados

y se fusionan para formar un cigoto diploide que infecta a células epiteliales del intestino de la garrapata, posteriormente sufren meiosis para dar lugar a un quineto que es móvil, este se multiplica y forma esporogonias que son capaces de migrar a la hemolinfa e invadir varios órganos de la garrapata incluyendo las glándulas salivales, donde finalmente se transforman en esporozoítos que pueden infectar al huésped vertebrado y así continuar su ciclo (Mehlhorn 1984; Uilenberg 2006; Schnittger *et al.*, 2012; Bock *et al.*, 2004) (Fig.5).

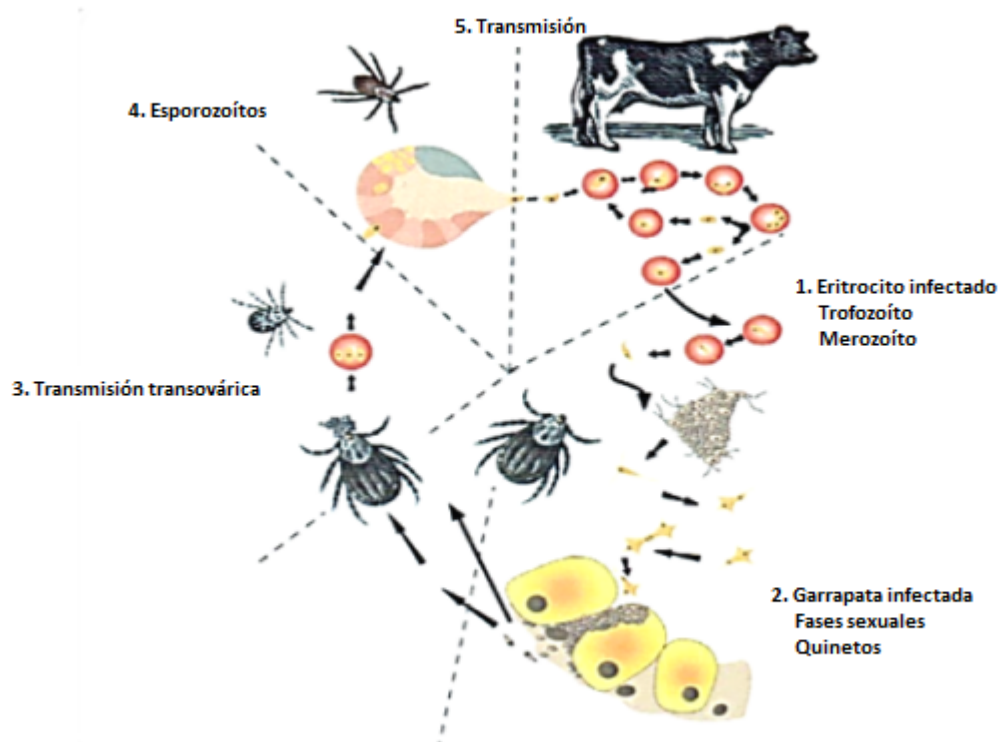


Figura 5. Ciclo de Vida de *B. bigemina*. 1) Los merozoítos penetran a eritrocitos bovinos, dentro se diferencian en trofozoítos y sufren división por fisión binaria, se diferencian a merozoítos y lisan eritrocitos, algunos invaden eritrocitos no infectados y otros se diferencian en pregametocitos. 2) En la garrapata se diferencian a gametocitos y se fusionan para formar cigotos, los que migran hacia el epitelio intestinal donde lo invaden y se transforman en quinetos. 3) Una vez en la hemolinfa los quinetos son capaces de invadir ovarios y glándulas salivales de la garrapata. Tomado y modificado de Bock *et al.*, 2004.

I. Patogénesis de la enfermedad

La patogénesis de la enfermedad varía dependiendo del tipo de *Babesia* que infecte además de la raza, la edad y la susceptibilidad del hospedero. Por ejemplo, la infección causada por *B. bigemina* generalmente produce fiebre, anemia e ictericia y en infecciones crónicas la división binaria del parásito trae como consecuencia la disminución del paquete celular en la sangre a más del 50% y se asocia con hemoglobinuria severa. El ganado con buena salud usualmente sobrevive a la infección, pero con una pérdida pronunciada de peso además produce la pérdida de leche y puede causar abortos espontáneos (Brown *et al.*, 1999).

Para el caso de *B. bovis* que es más virulenta el bovino presenta fiebre alta, anorexia, afección del sistema nervioso, anemia y hemoglobinuria. Estos síntomas tan severos no se relacionan con una alta parasitemia como lo es para el caso de *B. bigemina* ya que *B. bovis* tiene la capacidad de adherirse al endotelio resultando en babesiosis cerebral y dificultad respiratoria. También puede observarse una falta de coordinación, así como depresión, puede producir convulsiones y el animal puede morir en un periodo de 3 a 6 días (Wagner *et al.*, 2002).

J. Control de la enfermedad

En general, las medidas de control de la babesiosis están encaminadas a combatir tanto al parásito como a su vector transmisor *R. microplus*. Aunque se han desarrollado diferentes preparados vacunales dirigidos contra el parásito, no existe ninguno a nivel comercial.

Por otra parte, las medidas de control de la garrapata vector tampoco han resultado exitosas. En cuanto a los quimioprofilactos para combatir a las garrapatas han generado resistencia a estos, por lo tanto, es difícil tratar esta enfermedad.

K. Vacunas contra el parásito.

Para la obtención de vacunas vivas atenuadas se utilizan cepas virulentas, para obtener vacunas contra *B. bovis* se hace realizando pases sucesivos (de 20 a 30

pases) en bovinos esplenectomizados. Y para la producción de vacunas vivas atenuadas para *B. bigemina* no es necesario esplenectomizar al bovino (Zintl *et al.*, 2003).

Las vacunas vivas atenuadas se obtienen también a partir de pases sucesivos en cultivos *in vitro*, estas vacunas son utilizadas generalmente cuando los bovinos provenientes de zonas libres de garrapatas, son llevados a zonas con presencia del vector para generar una infección controlada en el bovino, lo que resulta en una respuesta inmune y consecuentemente en protección contra la babesiosis (Domingos *et al.*, 2013).

Estas vacunas vivas atenuadas tienen un tiempo de vida muy corto debido a que deben utilizarse de entre 4 y 7 días cuando se conservan de 2 a 8°C, cuando están congeladas en nitrógeno líquido pueden mantenerse por más tiempo, pero una vez reconstituidas deben utilizarse en un tiempo no mayor a 8 h (Florin-Christensen *et al.*, 2014).

Otra de las desventajas de este tipo de vacunas es el riesgo de contaminación con otros organismos patógenos y además de que necesitan un transporte de cadena fría.

Por otra parte, algunas vacunas utilizan como crio-conservante el dimetilsulfóxido (DMSO) el cual resulta tóxico a los animales en muchas ocasiones. En general estas vacunas no confieren protección total contra la enfermedad y producen una infección persistente en el bovino (Zintl *et al.*, 2003) (Fig. 6).

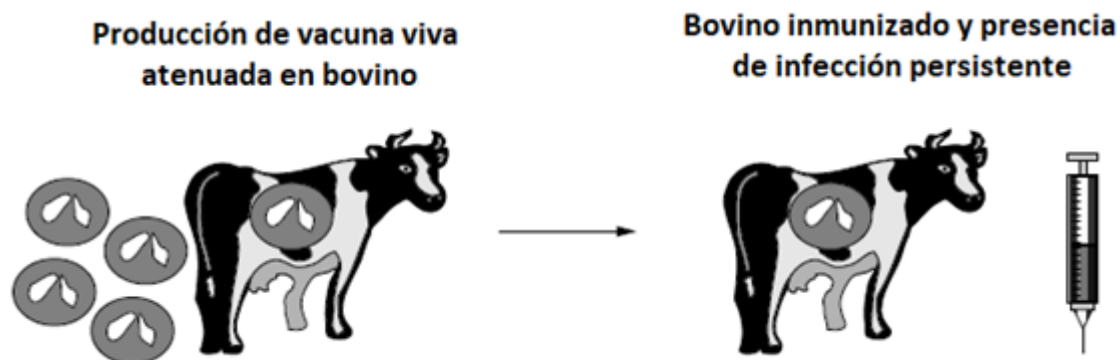


Figura 6. Desventajas del uso de vacunas vivas atenuadas. Infección persistente con *B. bigemina* en un bovino inmunizado con cepa viva atenuada de *B. bigemina* hecha en pases sucesivos en bovino. Tomado y modificado de Brown y Palmer 1999.

L. Control del vector transmisor.

El control de las garrapatas se realiza principalmente mediante el uso de baños garrapaticidas con compuestos químicos.

1. Quimioprofilaxis

En nuestro país se combate a *R. microplus* y *Babesia* con los siguientes quimioprofilácticos;

a) Piretroides: que causan una despolarización de la membrana en la garrapata debido a que causan una apertura de los canales de Na^{2+} en los nervios y músculos principalmente, un ejemplo de estos es la cipermetrina (MacDonald 1995).

b) Formamidinas: como el Amitraz, que actúa como agonista del receptor de octopamina del ectoparásito resultando en una hiperexcitabilidad neuronal y muerte (Evans y Gee 1980).

c) Diamidinas: que inhiben la síntesis de DNA de *Babesia*. En México se utiliza Imidicarb que también se relaciona con una disminución en la glucólisis del hospedero bovino trayendo como consecuencia la muerte del ectoparásito (Erlitzki *et al.*, 2017).

Estos tratamientos quimioprolácticos son utilizados en baños de inmersión, baños de aspersión y aplicación tópica (*Pour on*), para tratar de controlar al vector de *Babesia* (NORM 019).

Por otra parte, los métodos químicos reducen la infestación del ectoparásito, pero traen como consecuencia la selección de garrapatas resistentes. Estos métodos además de contaminar el medio ambiente, han provocado que se hayan encontrado residuos de estos productos químicos en la leche y en los productos cárnicos (De la Fuente y Contreras 2015).

2. Resistencia de *R. microplus* a acaricidas

En nuestro país y en el mundo *R. microplus* ha desarrollado resistencia a toda clase de acaricidas debido a que por décadas se ha hecho un uso indiscriminado de estos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

Para el caso de organofosforados y piretroides, las garrapatas han desarrollado resistencia debido a la rápida destoxificación de estos y por mutaciones que causan una selección de garrapatas resistentes (Miller *et al.*, 1999). A *R. microplus* se les atribuyen mutaciones en los genes que codifican para las enzimas como citocromo P450, esterasas y glutatión S transferasa (Aguilar *et al.*, 2018).

Además, dentro de estos mecanismos de resistencia se han encontrado mutaciones en los genes que codifican para los transportadores ABC los que funcionan transportando metabolitos hacia afuera y hacia dentro de la célula y sirven para reducir la concentración de componentes tóxicos (Pohl *et al.*, 2011).

3. Vacunas contra el vector transmisor

Otra de las formas de controlar la enfermedad en las que se ha incursionado, es la búsqueda de proteínas del vector transmisor que participen en la interfase vector-parásito y su estudio como candidatos vacunales, que sean eficientes no solo en controlar la transmisión del parásito sino además que sean capaces de interrumpir el ciclo de vida y desarrollo de las garrapatas y por lo tanto disminuyan la infestación y oviposición de las garrapatas.

En Australia en 1990 se descubrió un antígeno que protege contra la garrapata esta es una glicoproteína del intestino de *R. microplus* llamada Bm86, posteriormente se produjo una vacuna que produce una protección inmunológica en el bovino contra la infestación de la garrapata (Domingos *et al.*, 2013).

Entre 1993 y 1997 dos proteínas recombinantes de Bm86 fueron registrados en Latino América (GAVAC) y en Australia (TickGARD). Son las únicas vacunas comerciales para el control del ectoparásito (De la Fuente *et al.*, 2015).

Estas vacunas basadas en la glicoproteína Bm86 producen una reducción en el número, peso y capacidad reproductiva de garrapatas hembras. La vacuna reduce un 50% la infestación de las larvas sobre el bovino, sin embargo la vacuna no es capaz de erradicar a las garrapatas (De la Fuente y Contreras 2015).

La proteína Bm95 es una proteína homóloga de Bm86 aislada de una cepa Argentina de *R. microplus*. Sugumar y colaboradores en el 2011 probaron la eficacia de la proteína recombinante Bm95 contra la garrapata *R. haemaphysaloides* como potencial vacuna antigarrapata, una vez que fue vacunado *B. indicus* con Bm95 recombinante, se infestó al bovino con el ectoparásito y se obtuvo una disminución del 98.7% de larvas, un 84.6% de ninfas y un 78.9% de garrapatas adultas, respecto al control (Sugumar *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos demuestran el posible uso de Bm95 recombinante en el control de la infestación de *R. haemaphysaloides* aun que debe ser probado en otras garrapatas (Sugumar *et al.*, 2011).

Otra proteína recombinante probada como vacuna contra garrapatas fue Bm91 de *R. microplus*, para ello Lambertz y colaboradores en el 2012 inmunizaron con esta proteína recombinante a bovinos *B. indicus* y demostraron que es altamente inmunogénica ya que los bovinos expresaron títulos altos de anticuerpos anti-Bm91, además obtuvieron una eficiencia reproductiva del 6% y una viabilidad de los huevos del 8%, respecto al control. Sin embargo los autores concluyeron que el efecto en la reproducción de la garrapata no era suficiente para un control eficaz de la

garrapata y que probablemente se podría potenciar sus resultados al combinarse con otra proteína.

La Subolesina es otro antígeno de *R. microplus* probado como candidato vacunal, la proteína recombinante Subolesina fue inmunizada en bovinos *B. taurus* y *B. indicus*, posteriormente los bovinos fueron infestados con larvas de *R. microplus* y la inmunización dio como resultado una disminución del 16.3% de garrapatas hembras, un 8.0% en la disminución de peso, 9.4% en la disminución de ovoposición y un 26.1% en la disminución de la fertilización de huevos, comparado con los controles. La eficacia de la vacuna fue calculada en 44%. Estos resultados mostraron un posible uso de este antígeno recombinante en el control de la infestación de garrapatas en el ganado bovino (Shakya *et al.*, 2014).

Además se ha estudiado el papel de las acuaporinas como vacunas contra *R. microplus*, estas son una familia de proteínas transmembranales que forman poros y transportan agua y pequeños solutos a través de la membrana celular y su principal función es la osmorregulación (Borgnia *et al.*, 1999).

Específicamente la acuaporina 2 está implicada en la osmorregulación que ocurre durante la alimentación de la garrapata en su hospedero. Hussien y colaboradores en el 2015 encontraron que esta proteína solo se expresa en glándulas salivales y al silenciar la proteína con RNA de interferencia, dió como resultado la muerte de las larvas de *R. microplus*.

El esfuerzo por encontrar una vacuna que controle la infestación de los bovinos por garrapatas, se manifiesta en todas las proteínas recombinantes a partir de proteínas de garrapatas, discutidas anteriormente, desafortunadamente hasta el momento no se ha encontrado una proteína que sea capaz de inducir una respuesta inmune en el vector vertebrado que logre erradicar a la garrapata, por lo que muchos autores sugieren que el uso combinado de antígenos que causen una protección eficiente contra el ectoparásito, aunado a un programa de control integral.

II. ANTECEDENTES PARTICULARES

Estudios realizados en la *R. microplus* que es el vector de *Babesia* y qué tratan de entender la interacción Vector-Parásito-Hospedero, han reportado varias moléculas que dan una aproximación para el tratamiento de la babesiosis, así como el entendimiento de su ciclo de vida. Estas moléculas se basan principalmente en los siguientes tejidos del vector; intestino, ovarios y glándulas salivales de la garrapata (Antunes *et al.*, 2017).

A. Moléculas asociadas a *Babesia* en el intestino del vector

El intestino es la primera barrera que debe traspasar el parásito para poder establecer la infección en la garrapata y continuar su ciclo de vida en su vector. Por lo que es el principal objeto de estudio para diferentes grupos de investigación los cuales están enfocados en la interface vector-parásito de diferentes especies de garrapatas que transmiten virus, bacterias y protozoarios de importancia médica y veterinaria (Sonenshine y Hynes, 2008).

El receptor de la superficie de la proteína A (TROSPA) de garrapata fue encontrada en el intestino de *Ixodes scapularis* y funciona como receptor para *Borrelia burgdorferi*, en *R. annulatus* se descubrió un gen ortólogo de *trospa* sobre expresado durante la infección con *B. bigemina* y al ser apagado mediante RNAi se redujo significativamente los niveles de la infección de 70 y 83% para *R. microplus* y *R. annulatus* respectivamente (Urbanowicz *et al.*, 2016).

Otra molécula asociada a la interacción vector/parásito en la invasión al intestino de la garrapata, es una glicoproteína que se localiza en las células epiteliales del intestino de *R. microplus*, esta es conocida como Bm86, la que ya referimos anteriormente pues a partir de ella se desarrolló la primera vacuna comercial contra garrapatas. Estudios realizados con RNAi para Bm86 en *R. microplus* mostró una

reducción significativa en el número de garrapatas, pero no afectó la eficacia de la transmisión transovárica de *B. bovis* (Bastos *et al.*, 2010).

En el 2012 Rodríguez-Hernández y colaboradores, realizaron estudios proteómicos de interacción por medio de ensayos de overlay en los cuales se identificó por espectrometría de masas a la proteína mitocondrial llamada canal selectivo de aniones dependiente de voltaje (BmVDAC) de *R. microplus* la que interactúa con las fases sexuales de *B. bigemina* inducidas *in vitro* y marcadas con Biotina (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas de intestinos de *R. microplus* que interaccionan con fases sexuales de *B. bigemina*

Protein	Accession no.	Spot #	MASCOT score	Ion score	Peptide sequences	% coverage ^a
Electron transfer flavoprotein, beta subunit, putative	gi241680571	1	50	20	VIDYAVK	28%
				61	TGVVT DGVKHSNPF DEIAVEEAVR	
				26	TALAM GADKAIHVEV EGK	
				57	IEIVSVEDPP TR	
				49	VES VDELLAK	
Voltage-dependent anion-selective channel, putative	gi241061134	2	242	42	APPCYADLG K	33%
				24	DLFNKN	
				42	YHFGVVK	
				56	TTTKTGVEFNVSGLNDTGKVNASLETK	
				15	S GALK	
				72	VNNSG QVGLGFTHRLRPGISLTST MLDGKNFNQG GHK	

Se comparó contra el genoma de *I. scapularis*. Tomado de Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012.

Posteriormente Rodríguez-Hernández y colaboradores en el 2015 investigaron los niveles de expresión de BmVDAC a nivel de mRNA y de proteína en lisados de intestinos de garrapatas a tiempos a 0, 12, 24 y 72 h pos trepleción, así como la relocalización de esta proteína en células intestinales de *R. microplus*. En ensayos de RT-PCR de mRNA obtenido de intestinos infectados y no infectados con *B.*

bigemina a diferentes tiempos post repleción observaron una mayor sobreexpresión de BmVDAC a las 24 h post repleción (Fig. 7).

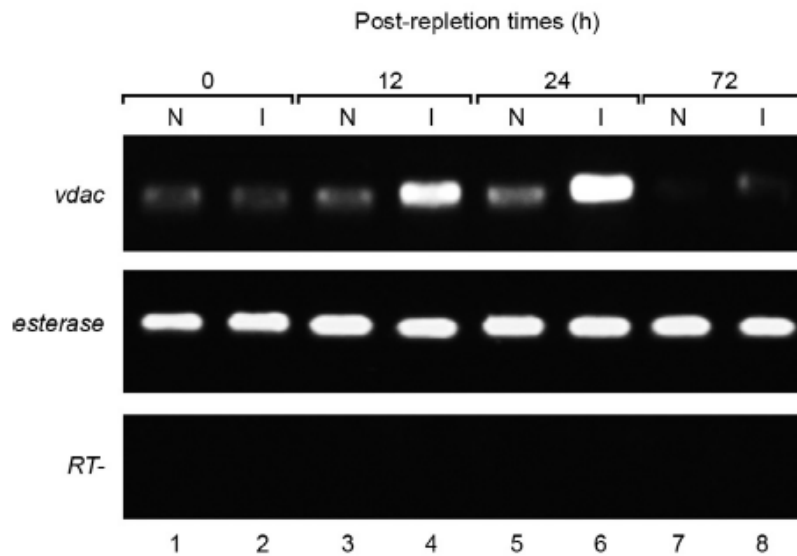


Figura 7. Expresión de BmVDAC en intestinos de *R. microplus* infectados (I) y no infectados (N.I) con *B. bigemina* a diferentes horas post repleción (0, 12, 24 y 72 h). Ensayos de RT-PCR en donde se utilizó el gen de la esterasa como control de carga y a RT- como control negativo. Tomado de Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015.

El nivel de expresión de la proteína BmVDAC también presentó un incremento a las 24 h post repleción en intestinos de garrapatas infectadas, lo anterior se estudió mediante western blot a los mismos tiempos post repleción de intestinos de *R. microplus* de intestinos infectados y no infectados con *B. bigemina* (Fig. 8).

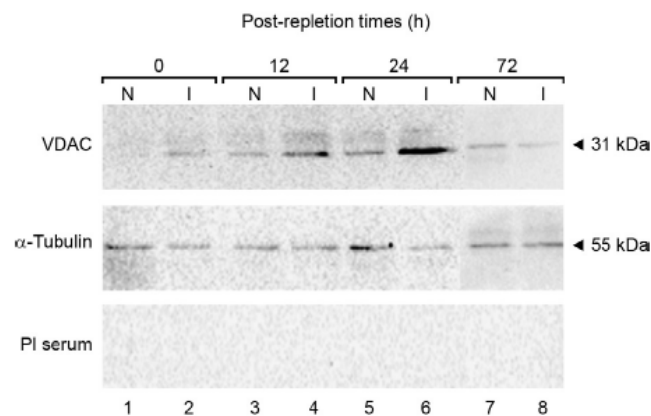


Figura 8. Expresión de la proteína BmVDAC de intestinos de *R. microplus* infectados(I) y no infectados (NI) con *B. bigemina* a diferentes horas post repleción (0, 12, 24 y 72 h). En el panel superior se observa VDAC, cuando se usó el suero inmune, panel intermedio muestra control de carga con un anticuerpo anti-tubulina y el inferior el control con suero preinmune. Tomado de Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015.

En este trabajo se observó además una redistribución significativa de BmVDAC en un cultivo primario de células epiteliales del intestino de *R. microplus* infectado con *B. bigemina* a las 24 y 72 h post repleción, respecto a su control no infectado (Fig. 9).

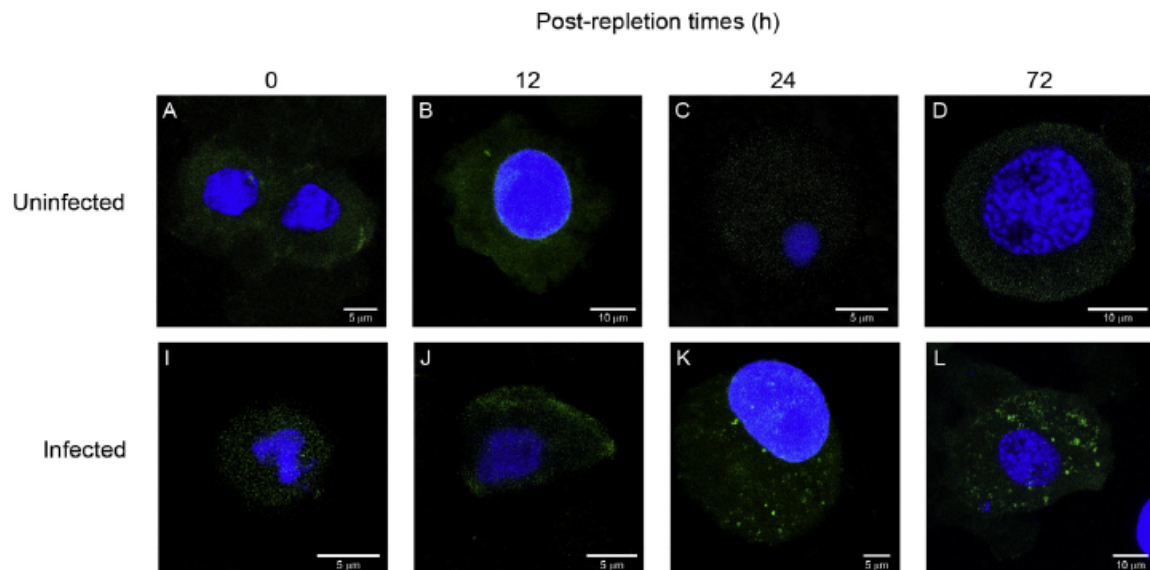


Figura 9. Inmunolocalización de BmVDAC a diferentes horas post repleción (0, 12, 24 y 72 h). Cultivo primario de células intestinales de *R. microplus* infectadas y no infectadas con *B. bigemina* a diferentes tiempos post repleción (0, 12, 24 y 72 h). En color azul se observa el núcleo teñido con DAPI y en color verde BmVDAC. Tomado y modificado de Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015.

Este hallazgo es importante porque se ha reportado que a las 24 h post repleción sucede la invasión de los cigotos de *B. bigemina* a las células intestinales de la garrapata. Los resultados obtenidos por Rodríguez-Hernández sugieren que BmVDAC podría participar en la invasión de *B. bigemina* a las células intestinales de *R. microplus*. Además de que en el mosquito vector de *Plasmodium spp*, VDAC juega un papel importante durante la invasión al intestino de este ya que se reportó que es capaz de unirse a un activador de tejido tipo plasminógeno (Gosh *et al.*, 2011).

B. Moléculas asociadas a *Babesia* en ovarios de garrapata

Una vez que *Babesia* atraviesa el epitelio intestinal de su vector los cigotos sufren meiosis y se diferencian en quinetos que es la fase móvil en la hemolinfa lo que es importante para que la transmisión transovárica suceda. Estudios proteómicos realizados por Rachinsky y colaboradores en el 2007, en tejido ovárico de *R. microplus* infectados con *B. bovis*, encontraron inmunofilinas sobre expresadas y al apagar su expresión mediante RNAi se observó un aumento de la infección en larvas, lo que sugiere que esta molécula podría mediar la invasión de *Babesia* en los ovarios y subsecuentemente a su progenie.

Otra molécula involucrada en la transmisión transovárica es el receptor de vitelogenina (VgR) encontrado en *Haemaphysalis longicornis* infectado con *B. gibsoni*, su silenciamiento resultó en la ausencia de *B. gibsoni* en los ovarios y en el desarrollo anormal de los huevos de esta garrapata (Wang y Heitman, 2005).

Estos resultados sugieren que *Babesia* podría tener un ligando para el receptor VgR lo que traería como consecuencia la invasión de los ovocitos (Boldbaatar *et al.*, 2008).

Las proteínas asociadas a la transmisión transovárica podrían ayudar a reducir la reproducción de la garrapata y disminuir la transmisión de la babesiosis, lo que posiblemente ayudaría a desarrollar candidatos vacunales.

C. Moléculas asociadas a *Babesia* en glándulas salivales

Finalmente, cuando *Babesia* atraviesa el epitelio intestinal y migra a la hemolinfa llega a las glándulas salivales de la garrapata. Ahí se multiplica nuevamente para producir esporozoítos que es el estado infectivo a su hospedero vertebrado. Por tanto, las glándulas salivales es la última barrera que el parásito cruza en su vector (Chauvin *et al.*, 2009).

En un estudio transcriptómico de las glándulas salivales de la garrapata *Ornithodoros parkeri*, se descubrió una proteína putativa homóloga a la proteína de

suero amiloide A, su función en vertebrados está relacionado con la fase aguda de la respuesta inflamatoria, en dicho estudio se encontró que la expresión del gen que codifica para la proteína de suero amiloide A está incrementado en respuesta a la infección de *B. bigemina* en *R. annulatus* y cuando este gen fue apagado resultó en una reducción del 66 y del 86% en los niveles de parasitemia en *R. microplus* y *R. annulatus*, respectivamente (Antunes *et al.*, 2012).

El trabajo en conjunto de varios investigadores, para entender la biología de la interacción *Babesia*-Vector-Hospedero, ha llevado a que diferentes blancos terapéuticos se hayan probado en experimentos en condiciones controladas.

El análisis de las interacciones de BmVDAC en el vector *R. microplus* durante la infección con *B. bigemina* en las fases sexuales, nos ayudará a elucidar la biología del parásito con su vector ya que solo se sabe que esta proteína aumenta su expresión durante la infección, pero no se sabe qué función está cumpliendo, ni con que otras proteínas del mismo vector, del parásito o del hospedero este interaccionando.

D. Características generales de la proteína canal selectivo de aniones dependiente de voltaje (VDAC)

La proteína protagonista del presente trabajo es BmVDAC identificada por nuestro grupo de investigación como se describió anteriormente, esta proteína es de localización mitocondrial.

La mitocondria se originó por un evento endosimbiótico hace dos billones de años, un ancestro eucariota incorporó a una célula procariota aerobia tipo *Rickettsia* (α -protoproteobacteria). En el curso de la evolución esta fue integrada a la célula eucariota y actualmente la mitocondria cumple una función esencial para la viabilidad celular, como lo es la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), además participa en diversas vías de biosíntesis (Becker y Wagner, 2018).

Varias vías bioquímicas convergen en la mitocondria tal como; la fosforilación oxidativa, oxidación de ácidos grasos, ciclo de Krebs, ciclo de la urea, biosíntesis

del grupo hemo así como biosíntesis de lípidos, aminoácidos y formación de centros de Hierro-Azufre (Scheffler 2008).

Para que la mitocondria cumpla su función los sustratos, productos e intermediarios deben ser transportados a través de las membranas mitocondriales, hasta ahora se conocen de 30 a 50 proteínas que median el intercambio de moléculas a través de la mitocondria (Palmieri y Pierri, 2010).

De todas las proteínas mencionadas, el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) es la proteína más abundante en la membrana externa mitocondrial. En levaduras existen dos isoformas, la más abundante es Por1 y la menos abundante es Por2 (Kmita *et al.*, 2003).

En mamíferos existen tres isoformas y son llamadas VDAC1, VDAC2 y VDAC3, siendo la más abundante VDAC1, 10 veces menor VDAC2 y 100 veces menor VDAC3. Los tamaños de esta proteína van desde los 29 kDa hasta los 37 kDa. VDAC1 y VDAC3 son codificadas por 9 exones y VDAC2 por 10 exones, todas las isoformas cuentan con un promotor de caja TATA que es característico de genes constitutivos (Young *et al.*, 2008; Sampson *et al.*, 1997; Jitobaom *et al.*, 2016; Sorgato *et al.*, 2018).

La proteína VDAC se caracteriza por tener de 12 a 19 láminas β antiparalelas conectadas por asas de diferentes tamaños, en el extremo N-terminal posee una α -hélice (que sirve como sensor de entrada), esta proteína tiene una estructura de barril que atraviesa la membrana externa mitocondrial (Fig. 10) (Tewari *et al.*, 2015).

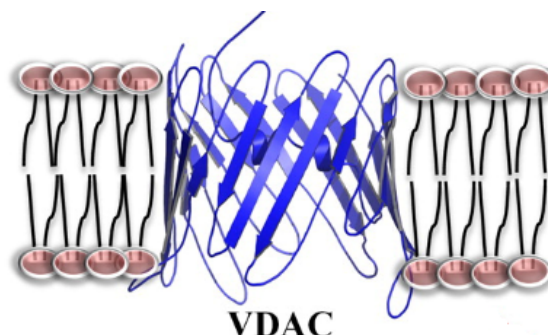


Figura 10. Esquema de la proteína VDAC en la membrana externa mitocondrial (en azul se muestra la proteína en forma de barril, con sus hojas β -plegadas y en el centro de barril la α -hélice). Tomado de Paschen *et al.*, 2005.

VDAC es la proteína más abundante en la membrana externa mitocondrial y la principal puerta de entrada entre la mitocondria y el citoplasma, que permite el intercambio de pequeños iones como Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , OH^- , H_2O y de algunos metabolitos con alto peso molecular como ATP, ADP, piruvato, succinato y fosfato inorgánico (Noskov *et al.*, 2015; Pastorino *et al.*, 2008).

El tamaño del poro de VDAC se ha estimado de 2.5 a 3 nm y este se mantiene en estado cerrado a voltajes mayores a 100mV y abierto a voltajes igual o menor a 60mV y se puede encontrar en forma monomérica, dimérica, trimérica y tetrámerica (Zalk *et al.*, 2005; Mazure 2017).

Así como la mitocondria está conectada a otros compartimentos celulares como lo es el retículo endoplásmico, ribosomas y citoplasma por tanto VDAC puede interactuar con distintos tipos de proteínas (Fig. 11) (Morgenstern *et al.*, 2017).

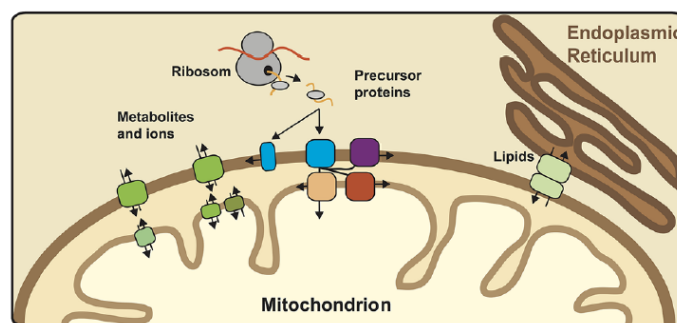


Figura 11. Interacción de la mitocondria con otros compartimentos celulares. La imagen representa el transporte masivo que sucede entre la membrana externa e interna mitocondrial, la cual es llevada a cabo proteínas que forman poros garantizando así el intercambio de iones y metabolitos. Además, también se translocan varias proteínas al interior mitocondrial y su interacción con el retículo endoplásmico es importante para el intercambio de lípidos. Tomado de Becker y Wagner, 2018.

E. Interacciones importantes de VDAC

La mitocondria es esencial para la sobrevivencia celular y exhibe una gran variedad de proteínas y lípidos dependiendo del tejido celular donde se encuentre. VDAC

regula varios procesos celulares como apoptosis, glucólisis, homeostasis e impacta en algunas enfermedades como el cáncer (Mazure 2017).

1. VDAC y tubulina.

La membrana externa mitocondrial funciona como un punto de chequeo entre el flujo de metabolitos y energía, además VDAC constituye la principal vía de intercambio entre ATP y ADP. Sheldon y colaboradores en el 2011 demostraron que la interacción de tubulina, que es un heterodímero compuesto de dos subunidades una α -tubulina y una β -tubulina, con VDAC disminuye dramáticamente la respiración celular, esta interacción se da gracias a las cargas negativas del extremo C-terminal de la tubulina y a las cargas positivas del barril de VDAC. Además, se observó que la translocación del ATP hacia el citoplasma disminuye enormemente, bloqueando la interacción de VDAC y el translocador de nucleótidos de adenina (Fig. 12) (Rostovtseva y Bezrukov, 2012).

La fosforilación de VDAC en residuos de serina/treonina realizado por cinasas citosólicas como GSK3 β , hace que haya una mejor interacción entre la tubulina y VDAC (Das *et al.*, 2008).

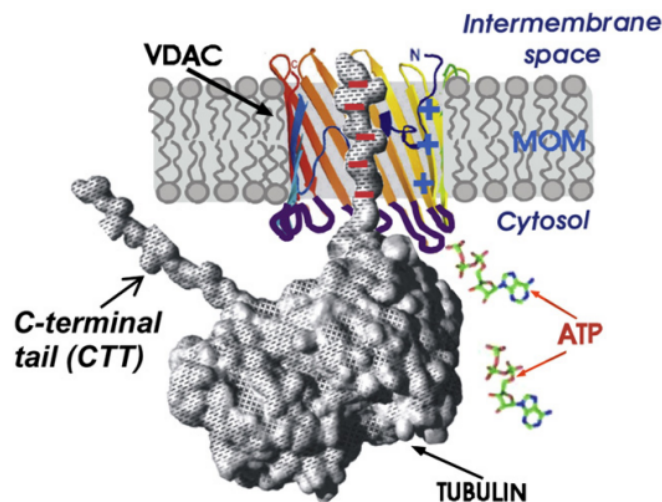


Figura 12. Modelo que muestra el bloqueo de VDAC por tubulina. Un tallo del extremo C-terminal de la tubulina tiene una carga parcial negativa y puede interactuar con la carga parcial positiva de la pared del canal VDAC, trayendo como consecuencia el bloqueo del paso de ATP. Tomado de Rostovtseva y Bezrukov, 2012.

2. VDAC y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT)

VDAC1 bajo condiciones normales interacciona con el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y con creatinina cinasa (mCK), formando un complejo VDAC1/ANT1/mCK para regular la translocación del ATP/ADP entre la mitocondria y el citosol (Camara *et al.*, 2017) (Fig. 13).

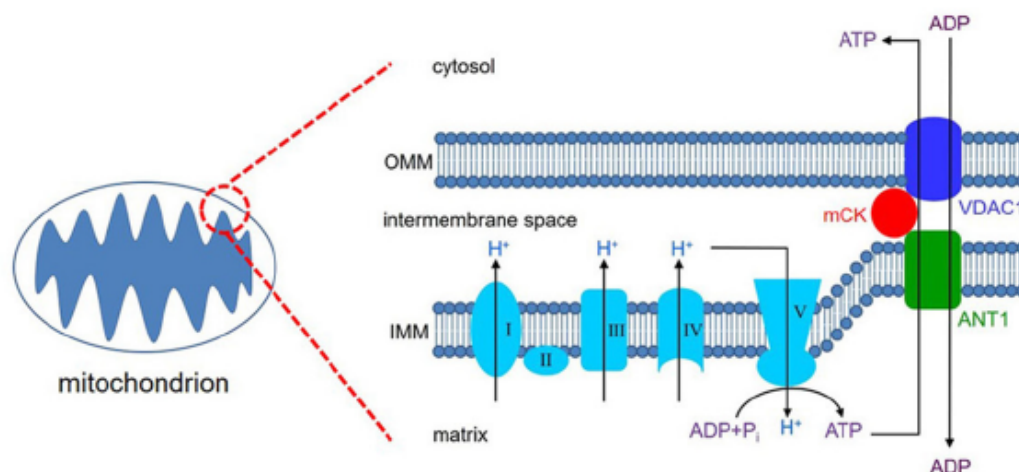


Figura 13. VDAC1 interaccionando con ANT1 y mCK. Esta interacción es importante para translocar eficientemente al ATP/ADP entre el citosol y la mitocondria. Tomado de Camara *et al.*, 2017.

3. VDAC y Hexocinasa (HK)

VDAC media la sobrevivencia y la muerte de la célula ya que es capaz de mediar el balance entre familias de proteínas proapoptóticas como Bcl y familias de proteínas antiapoptóticas como Hexocinasa (HK) I y II, por tanto, las interacciones entre estas proteínas promueven o previenen la apoptosis (Shimizu *et al.*, 2001).

La HK es una enzima que participa en la glucólisis y se encarga de catalizar la conversión de glucosa a glucosa-6-fosfato. Diferentes estudios han mostrado que la porción citosólica de VDAC1 puede servir como receptor de HK. Ensayos realizados de docking molecular demuestran que el extremo N-terminal de VDAC1 es esencial para la interacción con HK (Zaid *et al.*, 2015).

En algunos tipos de cáncer se ha reportado la sobreexpresión de la HKI y HKII unidos a VDAC1, esta interacción le confiere protección contra la apoptosis a las

células del cáncer ya que evita la unión de VDAC1 con Bax que es una proteína proapoptótica impidiendo así la posterior oligomerización de VDAC1 y liberación de citocromo c (Fig.14) (Da silva *et al.*, 2004; Shoshan-Barmatz *et al.*, 2009).

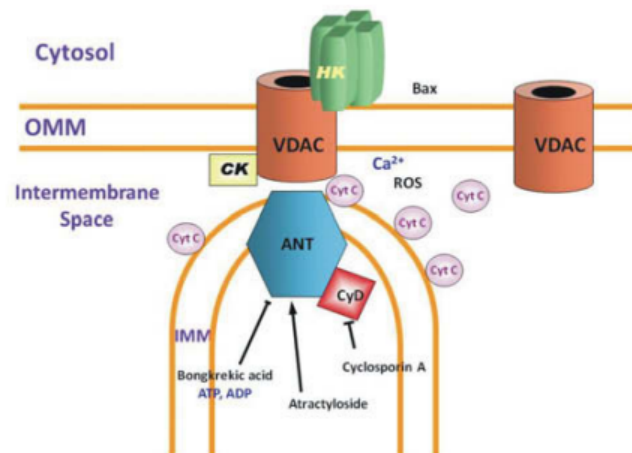


Figura 14. Interacción de creatinina quinasa, el translocador de nucleótidos de adenina, VDAC y hexocinasa (CK/ANT/VDAC/HK). En la imagen se observa que la interacción VDAC/HK inhibe la liberación de citocromo c evitando así la apoptosis. Tomado de Shoshan-Barmatz *et al.*, 2010.

4. VDAC y Bax

La familia de proteínas Bcl comprenden proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas que se encargan de regular la apoptosis alterando la permeabilidad mitocondrial. Las proteínas proapoptóticas como Bax alteran la permeabilidad mitocondrial causando la liberación de citocromo c que a su vez activa a las caspasas desencadenando finalmente la apoptosis (Fig. 15) (Tsujimoto *et al.*, 2010).

La interacción entre Bak/VDAC causa una apertura del poro cuatro veces mayor a su tamaño normal además Voehringer y colaboradores en el 2000 demostraron que al irradiar una línea celular de linfoma de células B murinas con luz ultravioleta (UV) hubo una sobreexpresión de la proteína VDAC y consecuentemente apoptosis en la célula (Shimizu *et al.*, 2010).

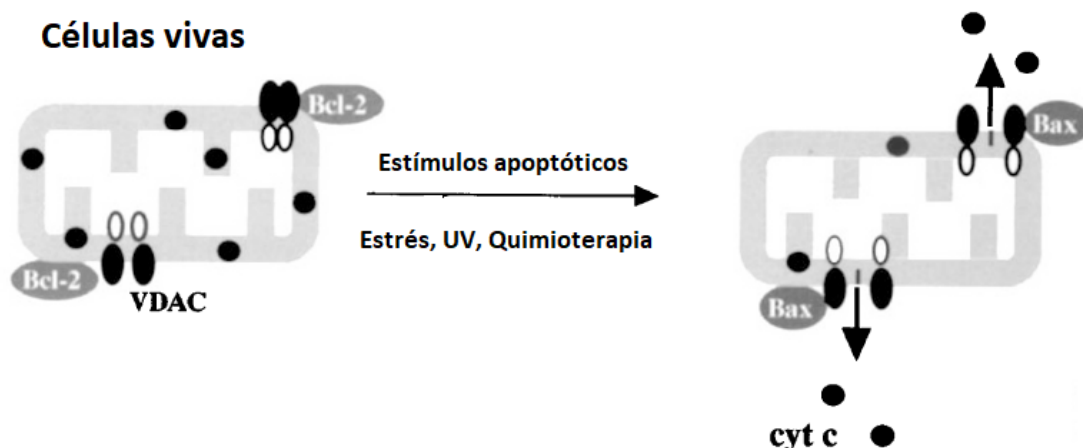


Figura 15. Interacción de VDAC/Bax promoviendo la liberación de citocromo c. La interacción entre Bax y VDAC se da gracias a estímulos apoptóticos como; estrés luz UV y quimioterapia. Tomado y modificado de Tsujimoto *et al.*, 2010.

VDAC es una proteína multifuncional ya que participa en diversos procesos celulares, además de la localización de VDAC en la membrana mitocondrial, se ha reportado que esta proteína puede localizarse también en la superficie celular (Ghost *et al.*, 2011; Gonzalez-Gronow *et al.*, 2013).

F. Localización de VDAC en la membrana plasmática.

La localización extra mitocondrial de VDAC fue descrita por primera vez por Thinnés y colaboradores en 1989 en la superficie de linfocitos B humanos. Esto fue corroborado posteriormente por varios investigadores ya que VDAC no presenta una señal de localización celular, los trabajos realizados incluyen; células epiteliales, astrocitos, fracciones celulares de cerebro y neuronas (Moon *et al.*, 1999; Lisanti *et al.*, 1994).

Inicialmente se pensó que la localización extra mitocondrial de VDAC se debía a una redistribución de los compartimientos celulares por el uso de detergentes, sin embargo, posteriormente se demostró que no era debido a la contaminación (Yu *et al.*, 1995).

Para demostrar que VDAC1 se puede localizar tanto en la mitocondria como en la membrana plasmática, primero se marcó con Biotina a VDAC1 de linfocitos B con la membrana celular intacta, la cual corresponde a VDAC1 de membrana plasmática. Después se solubilizó la membrana celular y posteriormente se realizaron dos métodos cromatográficos para separar a VDAC1 de ambos compartimientos; primero se separó en una columna de Hidroxiapatita/Celita a VDAC1 mitocondrial. Posteriormente para separar a VDAC1 de la membrana plasmática marcada con Biotina, se realizó una cromatografía de afinidad con agarosa estreptavidina. De esta manera se pudo demostrar que VDAC1 se localiza en la membrana plasmática (Fig. 16) (De pinto *et al.*, 2010).

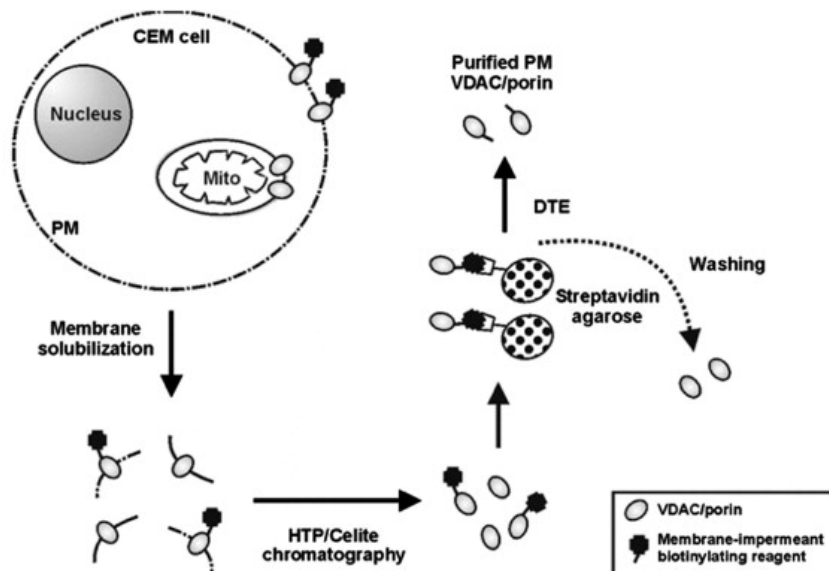


Figura 16. Proceso de purificación de VDAC1 de la membrana plasmática. Los linfocitos fueron incubados con biotina, después la membrana fue desnaturalizada y la caveola fue aislada. Después de la solubilización de la membrana celular con Tritón-100x y centrifugación, se purifico por cromatografía de HTP/Celite seguido de cromatografía por afinidad con estreptavidina agarosa. Tomado de De pinto *et al.*, 2010.

La función de VDAC en la membrana plasmática no se conoce sin embargo Baker y colaboradores en el 2004 descubrieron que VDAC1 puede funcionar como una enzima redox capaz de reducir el ferrocianuro extracelular en presencia de NADH, esto se soporta con base a lo siguiente:

1. VDAC es un polipéptido que asume diferentes conformaciones, dependiendo de su localización.
2. VDAC está controlado por efectores que puedan controlar la actividad de la proteína.

(Holden y Colombini, 1993)

Otra función importante de VDAC en la membrana plasmática es que puede funcionar como receptor de plasminógeno en su región kringle5, como parte de un complejo relacionado a la invasión Patógeno-Hospedero (Ghost *et al.*, 2011; Gonzalez-Gronow *et al.*, 2013).

G. VDAC como receptor de plasminógeno

El plasminógeno es un zimógeno que se encuentra en el plasma de los vertebrados se produce de manera constitutiva en el hígado y se encarga de degradar al fibrinógeno además participa en procesos celulares como; migración celular, formación de tejido, angiogénesis y embriogénesis (Celkan 2016).

El plasminógeno es convertido en plasmina, que es una serin proteasa, por activadores como; activador de plasminógeno tipo tejido (t-PA) y el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) que lo rompe entre la Arginina⁵⁶¹ y Valina⁵⁶² (Raum *et al.*, 1980).

Gonzales-Gronow y colaboradores en el 2003 demostraron que existe homología entre el activador de plasminógeno llamado estreptoquinasa y VDAC. La estreptoquinasa se une a la región kringle5 del plasminógeno entre los residuos Tirosina²⁵²-Lisina²⁸³, que es homóloga a los residuos de Tirosina²²⁴ y Lisina²⁵⁵ que se encuentran en la región N-terminal de la proteína VDAC.

Li y colaboradores en el 2014 estudiaron la interacción de VDAC1 y el plasminógeno en células epiteliales, encontrando que la región kringle5 del plasminógeno interacciona con VDAC1 y que este a su vez es fosforilado vía AKT-GSK3 β en residuos de serina y treonina lo que evita que VDAC1 sea degradado y se acumule en la célula, trayendo como consecuencia la translocación de VDAC1 a la

membrana plasmática, al mismo tiempo el exceso de VDAC1 desencadena la liberación de citocromo c causando apoptosis (Fig. 17).

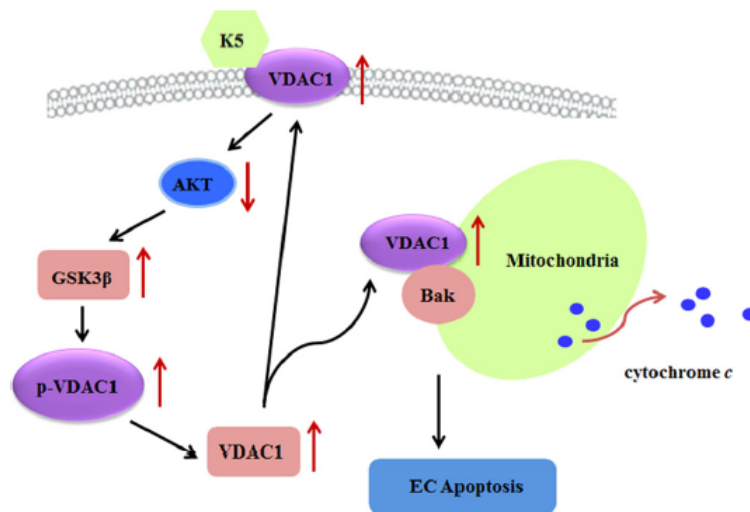


Figura 17. Esquema de la interacción de hVDAC1/plasminógeno (K5) que induce apoptosis en células epiteliales. Esta unión induce la sobreexpresión de hVDAC1 así como su fosforilación por GSK3 β y su posterior relocalización a la membrana plasmática así como la inducción de apoptosis de la célula epitelial. Tomado de Li *et al.*, 2014.

Con los antecedentes anteriores se sugiere que VDAC sirve como receptor para el plasminógeno en la membrana celular, esto es importante ya que patógenos como bacterias, hongos, protozoarios y helmintos, utilizan al sistema fibrinolítico especialmente al plasminógeno para la invasión y migración en su hospedero (Ayón-Núñez *et al.*, 2018).

H. Plasminógeno en Apicomplexas

Gosh y colaboradores en el 2011 estudiaron la invasión de los quinetos de *Plasmodium berghei* y *Plasmodium falciparum*, al epitelio intestinal del mosquito, encontraron que la enolasa que se localiza en la superficie de los quinetos puede actuar como receptor del plasminógeno, este último proviene de la sangre de su hospedero vertebrado y una vez activado a plasmina, los parásitos lo utilizan para invadir el epitelio intestinal de su vector (Fig. 18).

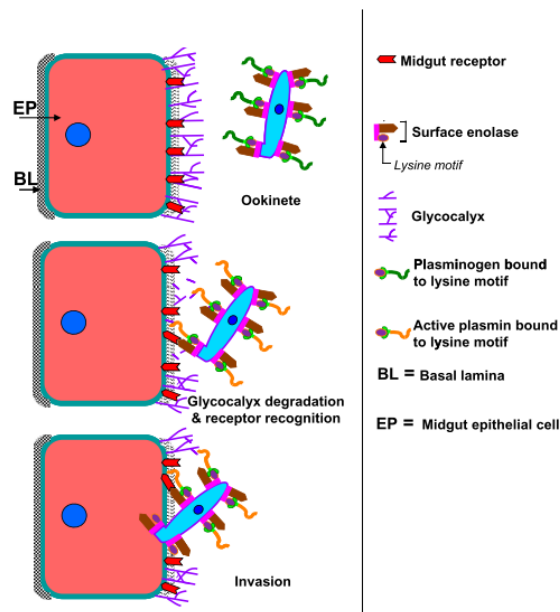


Figura 18. Modelo hipotético del papel del plasminógeno durante la invasión del queto de *Plasmodium spp* al intestino de su vector. Los quetos de *Plasmodium* expresan enolasa en su superficie esta es capaz de interactuar con el plasminógeno y una vez activado a plasmina ayuda al parásito a atravesar el epitelio intestinal de su vector. Tomado y modificado de Gosh *et al.*, 2011.

I. Interacción de VDAC con proteínas de diversos patógenos

Por millones de años agentes patógenos se han adaptado a la biología celular y molecular de su hospedero. Por tanto, algunos patógenos intracelulares invaden, proliferan y eventualmente salen de su hospedero induciendo apoptosis (Muller *et al.*, 2002).

Además, se puede considerar a la apoptosis como medio de propagación para patógenos, haciendo que proteínas como VDAC que se encarga de regular dicho proceso, sea un blanco para esta función (Boya *et al.*, 2001).

1. *Neisseria gonorrhoeae*

Durante la infección, algunos patógenos manipulan a su hospedero induciendo apoptosis, para esto utilizan factores de virulencia tal es el caso de *N. gonorrhoeae*

esta bacteria gram negativa libera una proteína llamada PorB que se inserta en la membrana externa mitocondrial formando un barril de láminas β que al interactuar con VDAC forman un poro que promueve la liberación de citocromo c y finalmente causa apoptosis (Muller *et al.*, 2002).

2. Dengue

Durante la infección con virus del Dengue algunas proteínas del virus interactúan con proteínas de la célula hospedera para facilitar la producción de virus. Este virus tiene tres proteínas que conforman la cápside las cuales son; cápside (C), envoltura (E) y membrana (M). Este virus es un virus envuelto en lípidos y su material genético es una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

El virus se internaliza por endocitosis mediado por clatrina seguido de la fusión y liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma. El genoma viral es traducido a proteínas estructurales y no estructurales del virus que median la replicación viral del genoma, así como el ensamble y liberación de la progenie (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Durante la replicación del virus los procesos celulares del hospedero son manipulados para crear un ambiente favorable para el ensamblaje viral. Esto se logra a través de la interacción directa de proteínas virales con proteínas de la célula hospedera, esto significa que las proteínas virales cumplen más de una función, tal es el caso de la proteína E que sirve como ligando para el receptor de las células que infecta y además interactúa con proteínas como la proteína GRP8, la cual es una chaperona localizada en el retículo endoplásmico y que también se ha localizado en la membrana plasmática, la interacción GRP8/Proteína E dentro de la célula hospedera está asociado directamente a la replicación del virus (Jitoboam *et al.*, 2016).

Otra proteína con la que GRP8 es capaz de interactuar es VDAC, que se encuentra en la membrana externa mitocondrial además también se ha encontrado en la membrana plasmática (Fongsaran *et al.*, 2014).

La interacción de la proteína E con GRP8 y VDAC no juega un papel importante en la internalización del virus, sin embargo se encontró que VDAC sufre una relocalización en células infectadas con el virus y se sugiere que la función de VDAC es aportar nucleótidos y metabolitos en sitios cercanos a la replicación del virus, además de estar asociada a la apoptosis inducida por el virus para poder salir de la célula hospedera (Jitoboam *et al.*, 2016).

3. *Plasmodium falciparum*

P. falciparum es un parásito intraeritrocítico que pertenece al phylum Apicomplexa, una vez que *Plasmodium* invade a los eritrocitos es capaz de causar modificaciones a su beneficio en la membrana plasmática de su hospedero, en esta vía está envuelta la proteína transportadora (TSPO), antes conocida como receptor de benzodiazepinas periférico que se encuentra en la membrana mitocondrial formando complejos con proteínas como VDAC y el ANT, además de participar en la estereoidogénesis (Cooke *et al.*, 2014).

En humanos existen dos isoformas de TSPO, la primera isoforma es la proteína TSPO1 que se localiza en la membrana externa mitocondrial y la segunda isoforma conocida como TSPO2 tiene localización nuclear, también puede encontrarse en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico de eritrocitos, la función específica de esta segunda isoforma es aún desconocida (Fan *et al.*, 2009).

Estudios previos demuestran que TSPO y VDAC están presentes en la membrana de eritrocitos tanto sanos como infectados con *Plasmodium* y lo que se sabe es que en los eritrocitos infectados con *P. falciparum* ocurre un incremento en la conductancia del eritrocito a través de canales tipo VDAC (Bouyer *et al.*, 2011).

Marginadas-Freixa y colaboradores en el 2016 demostraron que al utilizar un análogo del grupo hemo, este se translocó a través de la membrana plasmática por el complejo TSPO2/VDAC al interior de eritrocitos infectados con *P. falciparum* causando un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), que a su vez causó la muerte del parásito.

J. Características de BmVDAC

El acrónimo BmVDAC significa canal aniónico dependiente de voltaje y Bm significa que esta proteína pertenece a *Rhipichephalus* (antes conocida como *Boophilus*) *microplus* el cual es el principal vector de *B. bigemina* en México.

Esta proteína fue descrita por Rodríguez-Hernández y colaboradores en el 2012 se descubrió en intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina*, es una proteína que se encuentra en la membrana externa mitocondrial y tiene un porcentaje de identidad con VDAC1 humano del 70%, tiene 273 aminoácidos que forman un barril de 16 láminas β antiparalelas y en su extremo N-terminal tiene una α hélice que le sirve como sensor además tiene un peso molecular de 31 kDa y un punto isoeléctrico de 8.7 (Fig.19).

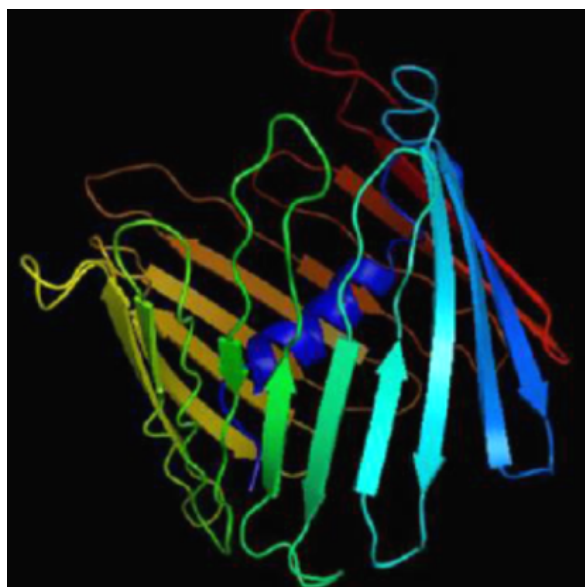


Figura 19. Imagen realizada *in silico* de BmVDAC. Está formado por 16 láminas beta antiparalelas y en el extremo N-terminal tiene una alfa hélice. Tomada de Rodríguez- Hernández *et al.*, 2012.

Debido a que en nuestro grupo de trabajo se describió por primera vez BmVDAC y como se sabe que VDAC es capaz de interactuar con una amplia gama de

proteínas celulares y de diferentes patógenos, es de nuestro interés investigar con cuáles proteínas interacciona BmVDAC durante la infección de *B. bigemina* en los intestinos de su vector *R. microplus*. Esto podría proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares de la infección, así como la función que juega BmVDAC en este proceso.

III. HIPÓTESIS

BmVDAC interacciona con proteínas de forma diferencial durante la infección de *R. microplus* con *B. bigemina*.

IV. JUSTIFICACIÓN

La babesiosis es una de las enfermedades más importante del ganado bovino y cuyo agente causal es transmitido por la garrapata *R. microplus*. Esta enfermedad provoca severas pérdidas económicas ya que causa mortalidad, abortos, disminución en la producción de carne y leche (Schinttger *et al.*, 2012).

Las pérdidas económicas en el ganado debido a babesiosis transmitida por garrapatas, se estima que puede llegar a los \$10 billones de dólares por año a nivel mundial (Lew-Tabor *et al.*, 2016).

En México se considera que el 75% de la población bovina se encuentra infestada con garrapatas, por lo que está expuesto a la enfermedad (Mosqueda *et al.*, 2012). En el año 2017 se calculó que, en nuestro país, las pérdidas económicas causadas por la infestación de *R. microplus* fueron de cerca de \$573.61 millones de dólares (Rodríguez-Vivaz *et al.*, 2017)

La manera más adecuada para combatir la babesiosis es haciéndolo de una manera integral como lo es controlando el vector en zonas endémicas y aplicando tratamientos quimioproláctico al hospedero (Waal y Combrink, 2006).

Por tanto, la comprensión de las interacciones de BmVDAC que hasta hoy en día son desconocidas, con otras proteínas durante la infección de *Babesia* en su vector, podría proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares durante la infección de *B. bigemina* a su vector *R. microplus* y la función que juega BmVDAC en este proceso.

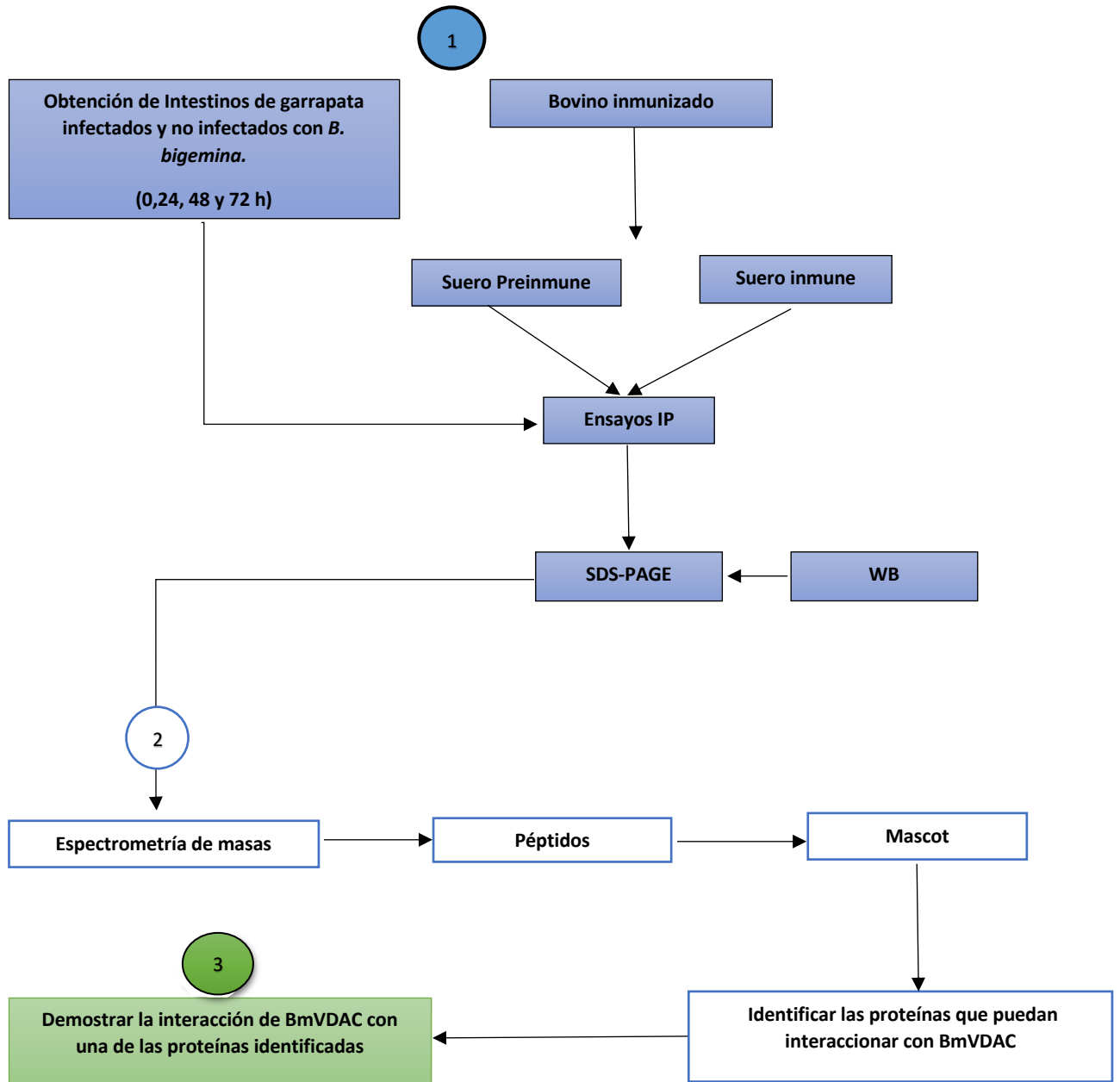
V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la interacción de la proteína BmVDAC con proteínas en el intestino del vector *R. microplus* durante el proceso de infección con *B. bigemina*.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la expresión diferencial de las proteínas que interaccionan con BmVDAC en el intestino de *R. microplus* durante la infección con *B. bigemina* a diferentes tiempos post repleción.
2. Identificar las proteínas expresadas diferencialmente que interaccionan con BmVDAC mediante espectrometría de masas.
3. Demostrar la interacción de BmVDAC con una de las proteínas identificadas.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Obtención de intestinos de *R. microplus* no infectados e infectados con *B. bigemina* a diferentes tiempos post repleción

Las muestras de garrapata se obtuvieron a partir de la infestación con 1 g de larvas de *R. microplus* a dos bovinos machos del género y especie *Bos taurus* de la raza Holstein de aproximadamente 250 Kg (se obtuvieron de un área libre de garrapatas), de la cepa Media Joya de la cepa Chiapas que fueron obtenidas del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID PAVET) en Jiutepec, Morelos, posteriormente uno de los bovinos fue esplenectomizado y se le inyectó 4 mL de eritrocitos infectados con *B. bigemina* (1×10^8 células) que fue donde se obtuvieron las garrapatas infectadas con *Babesia* y las garrapatas no infectadas se colectaron de otro bovino no infectado con el protozoario. Posteriormente las garrapatas se colectaron a los 23 días post infestación, que es cuando cumplen su ciclo de vida sobre el bovino. Las garrapatas colectadas se colocaron en una incubadora a 28°C con una humedad relativa superior al 70%, hasta cumplir con los diferentes tiempos post repleción (0, 24, 48 y 72 h), las únicas garrapatas que se disectaron el mismo día fueron las obtenidas a las 0 h post repleción.

B. Determinación de la parasitemia del bovino infectado con *B. bigemina*.

Para el seguimiento de la infección de *B. bigemina* en *B. taurus* se tomaron muestras de sangre de la vena coxígea del bovino con anticoagulante EDTA durante 4 días y se realizaron frotis sanguíneos. Estos fueron fijados con metanol y se dejaron secar, posteriormente se tiñeron con Giemsa durante 10 min después se lavó con agua destilada y se dejó secar para finalmente ser observadas en un microscopio óptico en un objetivo de inmersión (100x). Para conocer el estado de parasitemia del bovino se contaron 1000 eritrocitos y se calculó el porcentaje de eritrocitos infectados.

C. Determinación del hematocrito y temperatura en el bovino infectado.

Para medir el porcentaje de hematocrito de *B. taurus* infectado con *B. bigemina*, se utilizó sangre extraída de la vena coxígea del bovino con anticoagulante EDTA, después se colocó la muestra de sangre en tubos capilares con heparina que posteriormente fueron sellados se centrifugaron por 5 min a 12,000rev y se calculó el porcentaje de los elementos formes en la sangre.

La temperatura del bovino durante los días de colecta de *R. microplus* se midió con un termómetro digital cuidando de solo tocar las paredes del recto del bovino de *B. taurus*.

D. Prueba de hemolinfa en *R. microplus* infectada con *B. bigemina*

La infección de las garrapatas con *B. bigemina* fue determinada mediante una prueba de hemolinfa que se basa en la observación de quinetos en la hemolinfa de la garrapata infectada con *Babesia*. Se seleccionaron cinco garrapatas infectadas con *B. bigemina* a las cuales se les cortó una coxa de la pata, se realizó un frotis en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente las muestras fueron fijadas con metanol al 70%, después se tiñó con el colorante Giemsa durante 7 min. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100x).

E. Extracción y preparación de proteínas de intestinos de *R. microplus*.

Los intestinos de *R. microplus* se lavaron con PBS pH 8.0 más inhibidor de proteasas Complete 1x las veces suficientes para que quedaran limpios. Después se agregó 500 µL de solución de lisis (20 mM de Tris-HI, 137 mM de NaCl, 1% de

NP40 y 2 mM de EDTA) más inhibidor de proteasas Complete (Roche 12683400) 1x durante 15 min en hielo y se sonicaron por 3 min, 30 pulsos, 30 pausas y a 80% de amplitud. Posteriormente se realizó crosslink con 500 µL de DSP a una concentración final de 2 mM durante 2 h a 4°C en agitación suave, la reacción se detuvo con 20 mM de Tris-HCl durante 15 min a 4°C en agitación suave. Posteriormente se centrifugó 10 min a 10,000xg a 4°C para retirar las células que no se lisaron bien. Luego se centrifugó a 22,000xg por 1 h a 4°C para obtener proteínas de membrana. La integridad de las proteínas del lisado se verificó en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de coomassie.

F. Cuantificación de las proteínas de los intestinos de *R. microplus*.

Las fracciones de las proteínas obtenidas se cuantificaron con el método de Bradford. Para esto se realizaron seis diluciones por triplicado de albúmina de suero bovino que fue la proteína estándar a partir de concentraciones que van desde 80, 40, 20, 10, 5 y hasta 2.5 µg/mL. Después se agregó 80 µL de cada muestra por pocillo en una placa de 96 pozos y se agregó 20 µL de la solución de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD No. De Cat. 500-0006), se mezcló y se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm. El mismo procedimiento se realizó para las muestras de intestino.

G. Inmunotransferencia

Para verificar que BmVDAC estaba presente en el lisado de intestinos de *R. microplus* se tomó 19 µg del lisado de intestinos de *R. microplus* y se preparó con amortiguador de carga 6x para proteínas (Tris HCl pH 6.8 1 M 5 mL, SDS 10% 8 mL, Glicerol 4 mL, β-mercaptoetanol 2 mL, azul de bromofenol 0.05%, agua ultrapura 20 mL) y se colocó en ebullición por 5 min. Estas proteínas se corrieron con un gel espejo, que se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% y uno se tiñó

con colorante azul de coomassie el segundo gel se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm , la membrana se bloqueó toda la noche con solución de TBS-T y con leche al 5% a 4°C en agitación, posteriormente se lavaron con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario anti-bovino BmVDAC (a una dilución de 1:1000) en TBS-T con leche al 1% a 4°C en agitación toda la noche, después fue lavado con TBS-T y se colocó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (a una dilución 1:1000) (Goat anti-Rabbit HRP conjugate, Invitrogen) por una hora en agitación a temperatura ambiente, la membrana se lavó con TBS-T. Las membranas se revelaron con quimioluminiscencia en el equipo ChemiDocMP Imaging System (BIO-RAD).

H. Tinción de geles de poliacrilamida SDS/PAGE con azul de Coomassie R-250

Una vez finalizada la corrida electroforética del gel de poliacrilamida, se colocó en un recipiente hermético de plástico y se le añadió 50 mL de una solución de Coomassie R-250 (100 mL de metanol, 0.1 g de azul de Coomassie R-250, 20 mL de ácido acético y 80 mL de agua ultra pura (MiliQ)), se incubó durante 30-40 min en agitación suave a 37°C. Para desteñir el gel se incubó con 50 mL de una solución desteñidora (25 mL de ácido acético, 82.5 mL de metanol y 392.5 mL de agua), los cambios se hicieron cada media hora y se realizaron los suficientes para poder observar el patrón de bandeo.

I. Inducción de la proteína recombinante BmVDAC

La proteína BmVDAC recombinante, se indujo en la cepa *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pCold I que contenía el inserto correspondiente para la expresión de BmVDAC. Primero se realizó un preinóculo con 50 mL en medio de cultivo Luria Bertani (LB) y ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) el cual se dejó en crecimiento a

37°C en agitación a 200 rpm por 16 h. Posteriormente se inoculó en 500 mL de medio de cultivo LB/ampicilina que se dejó crecer a 37°C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de entre 0.4 a 0.6 nm. Después se dejó a 15°C en agitación a 200 rpm por 30 min y se indujo la proteína recombinante con 1mM de IPTG por 24 h a 15°C en agitación a 200 rpm. La expresión de la proteína BmVDAC recombinante se analizó en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie R-250. El mismo procedimiento se realizó para la enolasa recombinante de *B. bigemina* la cual se utilizó como control positivo.

J. Purificación de BmVDAC recombinante

Una vez inducida la proteína recombinante BmVDAC que tiene un tag de 6 histidinas, 250 mL del cultivo inducido se resuspendió en 20 mL de PBS pH 8.0 y se sónico en alícuotas de 1 mL por 3 min, 30 pulsos, 30 pausas y a 80% de amplitud en hielo. Se centrifugó a 7,500xg por 35 min, se decantó y el botón se dejó secar, se colocó a -20°C hasta su utilización. Después el botón se resuspendió en solución de unión que contenía; 6 M de hidrocloreuro de guanidina, 20 mM de Tris-HCl, 0.5 M de NaCl, 5 mM de imidazol y 1 mM de 2-mercaptoetanol a pH 8.0, se filtró con una membrana de 0.45 µm y se inyectó a la cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad (GE Healthcare ÄKTAprime plus), se programó con el método de replegamiento de la proteína sobre la columna (on column refolding) usando columnas de Níquel Hitrap™ de 1 mL. Una vez obtenidas las fracciones con la proteína recombinante purificada, se verificó su integridad en geles de poliacrilamida de SDS-PAGE al 10%.

K. Diálisis de BmVDAC recombinante

Una vez obtenidas las fracciones purificadas de la proteína recombinante se procedió a su diálisis. Se cortó 10 cm de membrana de diálisis Spectra/Por y se activó la membrana con una solución que contenía; 8 g de bicarbonato de sodio,

0.15 g de EDTA en 400 mL de agua ultra pura (MiliQ), durante 30 min en agitación, una vez hecho esto se lavó tres veces con agua ultra pura. Después se procedió a dializar en pool de tres fracciones con PBS pH 8.0 a 4°C en agitación suave, se realizaron cinco cambios en un intervalo de 24 h. Finalmente se cuantificó por el método de Bradford como se mencionó anteriormente.

L. Ensayos de Pull-Down

100 µL de resina de níquel (HisPur Níquel Resin), se lavó con 400 µL de solución de lavado (PBS pH 8.0 e imidazol 5 mM) a 1250xg por 1 min, este paso se repitió 3 veces. Después se incubó 20 µg de BmVDACr en la resina de níquel durante toda la noche a 4°C en agitación suave, después se lavó 3 veces con 400 µL de solución de lavado. Posteriormente BmVDACr unida a la resina de níquel se puso a interactuar con 1 mg del extracto total de lisados de intestinos infectados y no infectados con *B. bigemina* de los diferentes tiempos post repleción, durante 16 h a 4°C en agitación suave y se lavó tres veces. Finalmente, se eluyó con 250 µL del buffer de elución (290 mM imidazol) durante 10 min a 4°C en agitación suave y se centrifugó a 1250xg por 1 min. Se utilizó como control el preclarificado de los intestinos.

M. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunoprecipitación y de inmunotransferencia.

En los ensayos de inmunoprecipitación e inmunotransferencia, se usaron suero preimmune e immune de un bovino (bovino 7464) inmunizado con BmVDACr que se usó en ensayos de vacunación previamente publicados (Ortega-Sánchez *et al.*, 2020)

N. Preclarado del anticuerpo policlonal BmVDAC

Para preclarar los anticuerpos policlones BmVDAC producidos en bovino, primero se corrieron muestras de lisados de intestinos infectados con *B. bigemina* y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, el peso molecular en el

que se encuentra BmVDAC fue cortado de la membrana de nitrocelulosa dejando el resto de las proteínas para que posteriormente se pusieran a interactuar tanto el suero preinmune como el suero inmune a 4°C en agitación suave, esto se hizo con el fin de retirar las interacciones inespecíficas de ambos anticuerpos.

O. Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación primero se realizó un clarificado de los intestinos, para esto 100 µL de proteína G se lavó tres veces con solución de unión (NP-40 al 1%, 20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl y 2 mM de EDTA) a pH 8.0 más inhibidor de proteasas Complete 1x, posteriormente se incubó con 100 µg de lisado de intestinos de *R. microplus* durante 1 h a 4° C en agitación suave, después se centrifugó a 2600xg durante un minuto a 4°C, la proteína G se lavó tres veces con la solución de unión y se realizaron dos eluciones la primera fue a 50°C con 50 µL de solución de carga 2x por 10 min sin DTT y la segunda elución a 95°C con solución de carga 2x por 5 min con DTT a una concentración de 100 mM, este se utilizó como control. El clarificado de intestinos que se recuperó se incubó con 4 µL de suero preinmune o inmune durante 16 h a 4°C en agitación suave, una vez realizado la unión antígeno/anticuerpo se puso a interactuar con 100 µL de proteína G agarosa durante 2 h a 4°C en agitación suave y finalmente se lavó tres veces con solución de unión. Finalmente, se eluyó como se mencionó anteriormente dos veces y ambos eluidos se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10% y se tiñeron con azul de coomassie.

P. Tinción de geles de poliacrilamida SDS/PAGE con azul de Coomassie G-250

Para enviar las muestras a espectrometría de masas el gel de poliacrilamida se lavó tres veces con 100 mL agua estéril por 10 min en agitación, se tiñó durante toda la noche en agitación con 100 mL de azul de Coomassie G-250 que contenía; 80 mg de azul de Coomassie G-250, 35 mM de ácido clorhídrico en un litro de agua ultrapura (MiliQ). Después se lavó con una solución desteñidora (40% de metanol,

10% de ácido acético en agua ultra pura (MiliQ)), se realizaron dos cambios de 30 min cada uno. Posteriormente se lavó tres veces con agua estéril por 10 min en agitación. Las bandas fueron cortadas y almacenadas en agua de grado proteómico a -70°C hasta su envío a espectrometría de masas.

Q. Espectrometría de masas

Para el análisis de espectrometría de masas de la IP de intestinos infectados 72 h post repleción con *B. bigemina*, las muestras se prepararon en un gel de poliacrilamida al 10% después se fijaron en una solución que contenía 10% de HCl y 40% de metanol durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente y se tiñó con el colorante azul de coomassie G-250 que es compatible con espectrometría de masas. Las bandas a analizar se enviaron al Laboratorio Nacional Plan TECC del Cinvestav Irapuato, donde se trataron con tripsina, se alquilaron con iodoacetamida y se analizaron en un espectrómetro de masas de trampa de iones Lineal LTQ Velos de la compañía Thermo. El software utilizado para el análisis fue Xcalibur.

R. Ensayo de unión de BmVDACr al plasminógeno humano

50 µg de plasminógeno humano recombinante se corrió en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm, que después fue bloqueada con 5% de leche en una solución de PBS-T al 0.05% por 1 h a 37°C, después se hicieron cuatro lavados con PBS-T al 0.05%. Posteriormente se puso a interaccionar con 20 y 10 µg de BmVDAC recombinante durante toda la noche a 4°C en agitación suave, pasado el tiempo se realizaron cuatro lavados con PBS-T y se puso a incubar con anticuerpo policlonal BmVDAC de bovino en una dilución 1:1000 en PBS-T con leche al 1% a temperatura ambiente durante 1 h, después se realizaron cuatro lavados con PBS-T. Finalmente se puso a incubar por 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de bovino producido en ratón acoplado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:1000 en PBS-T con leche al 1% a temperatura ambiente, después la membrana se lavó cuatro veces con PBS-T. Las

membranas se revelaron con quimioluminiscencia en el equipo ChemiDocMP Imaging System (BIO-RAD). Se utilizó como control negativo 50 µg de albúmina de suero bovino y como control positivo 50 µg de enolasa recombinante de *B. bigemina*, todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

S. Análisis semicuantitativo de las bandas diferenciales de los ensayos de IP de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* y no infectados a diferentes horas post repleción

El análisis densitométrico de las bandas diferenciales respecto a su control no infectado, se realizó en el programa MYImageAnalysis de Thermo Scientific, después se realizó un test de distribución normal para verificar si los datos tenían una distribución normal, al no tener una distribución normal se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para todas las condiciones de los experimentos de IP, de intestinos infectados y no infectados a diferentes horas post repleción, así como t-student para cada condición post repleción. Los datos utilizados fueron triplicados de dos experimentos independientes.

IX. RESULTADOS

A. Determinar la expresión diferencial de las proteínas que interaccionan con BmVDAC en el intestino de *R. microplus* durante la infección con *B. bigemina* a diferentes tiempos post repleción

Para cumplir con el primer objetivo, se procedió a infestar a 2 bovinos con larvas de *R. microplus* de la cepa Media Joya y se realizó la colecta de garrapatas durante 4 días del bovino infectado con *B. bigemina* y del bovino control no infectado a diferentes tiempos post repleción (Fig. 20).

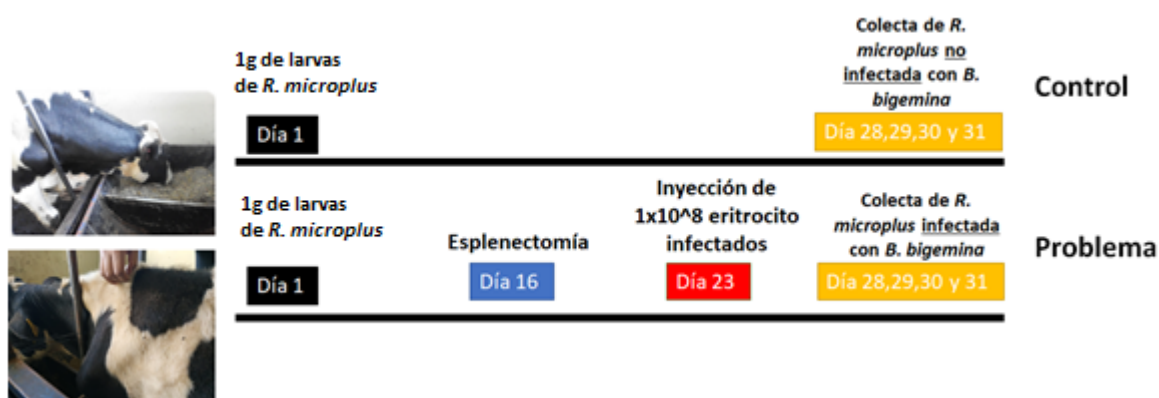


Figura 20. Flujo de trabajo de la infestación de *B. taurus* de la raza Holstein con *R. microplus* e infección con *B. bigemina*.

El seguimiento de la infección con *Babesia* en el bovino se realizó mediante frotis sanguíneos durante los 4 días de la recolecta de *R. microplus* (Fig. 21). En los cuales se analizó la presencia de las fases intraeritrocíticas del parásito y permitió calcular el porcentaje de parasitemia del bovino.

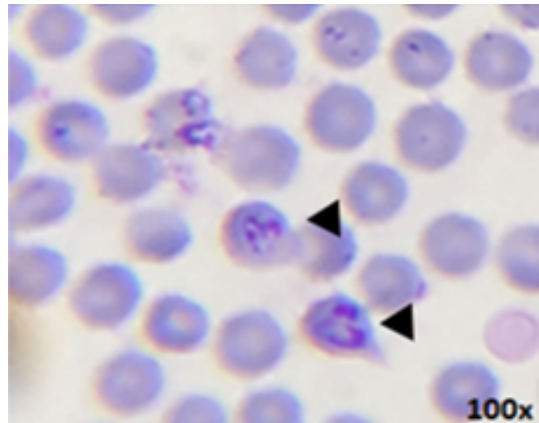


Figura 21. Frotis sanguíneo de bovino infectado con *B. bigemina*. En la imagen se observa un frotis sanguíneo de bovino en un microscopio óptico a 100x y teñido con Giemsa; las puntas de flecha indican eritrocitos infectados con el protozoo intraeritrocítico. Fotografía donada por Iván Corona.

En la Fig. 22 se observa que en el inicio de la infección, la parasitemia fue de 0.37%, para el segundo día de 0.62% y para el tercer día de 1.06% siendo el mayor porcentaje de parasitemia obtenida en el bovino ya que para el cuarto día la parasitemia disminuyó a 0.95%, esto es debido a que el ciclo de vida del parásito en su hospedero bovino, el parásito se divide por fisión binaria y lisa eritrocitos con base a esto la parasitemia se ve disminuida al cuarto día.

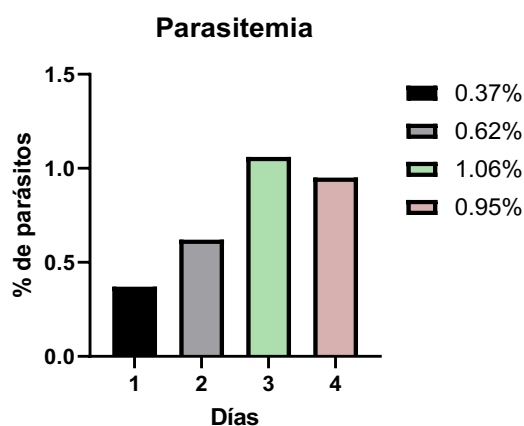


Figura 22. Parasitemia del bovino infectado durante los días de colecta de *R. microplus*. El mayor porcentaje de parasitemia se obtuvo al día tres.

Otro parámetro que fue utilizado para dar seguimiento a la infección del bovino con *B. bigemina* durante los 4 días de colecta de las garrapatas, fue la determinación del hematocrito. El hematocrito se define como el porcentaje de células en sangre completa y en bovino tiene valores de referencia que van de 24 a 46%. Para el bovino infectado el primer día se obtuvo un hematocrito de 34.5%, el segundo día fue de 31.5%, el tercer día de 23% y para el cuarto día el hematocrito fue de 16.5%. La disminución del hematocrito durante la babesiosis se debe a que el parásito lisa eritrocitos para continuar con su ciclo de vida (Fig. 23).

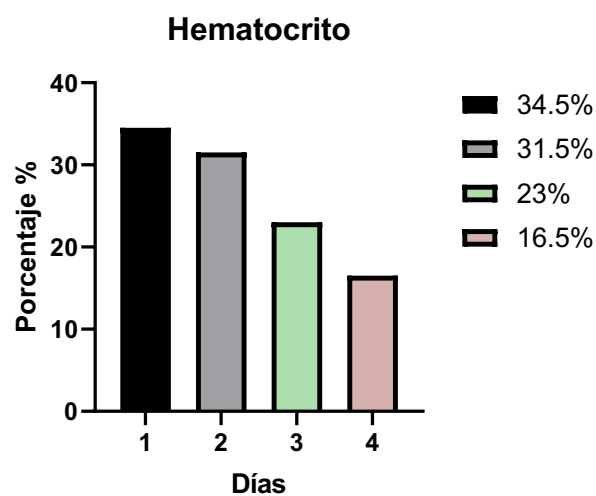


Figura 23. Valores de hematocrito del bovino infectado con *B. bigemina* durante cuatro días. Se tomo sangre del bovino infectado con *Babesia* en tubos capilares con heparina que posteriormente fueron centrifugados para después calcular el porcentaje de elementos formes en sangre.

Otro parámetro que se midió fue la temperatura del bovino durante los días de colecta de *R. microplus*. El valor de referencia para la temperatura corporal de un bovino normal es de 38.5°C, la lectura que obtuvimos para el primer día de muestreo fue de 38.7°C, para el segundo de 38.9°C y para el tercer día fue de 39.3°C que fue el valor más alto de temperatura que corresponde al día con el mayor porcentaje de parasitemia y para el cuarto día fue de 37.3°C (Fig. 24).

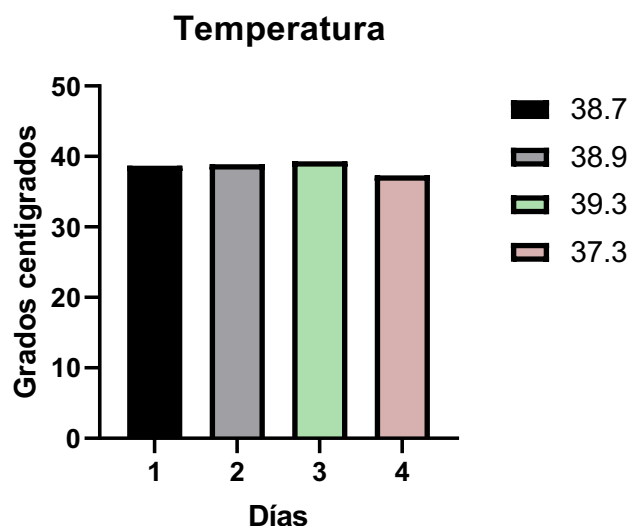


Figura 24. Temperatura corporal del bovino infectado con *B. bigemina* durante los días de colecta de las garrapatas. Se realizó con un termómetro digital en el recto del bovino infectado con *Babesia*. La mayor temperatura obtenida fue al día tres.

En conclusión, el bovino infectado con el parásito presentó además de los porcentajes altos de parasitemia, disminución de hematocrito y fiebre, también hubo presencia de diarrea aguda, debilidad, así como disminución del apetito debido a la babesiosis. Lo cual nos obligó a detener el experimento al cuarto día debido a que los porcentajes de hematocrito ponían en riesgo la vida del bovino. Finalmente se procedió a tratar al bovino con Imidocarb, el cual se aplicó de manera intramuscular, este medicamento actúa inhibiendo la síntesis de DNA del parásito.

Por otro lado, para verificar que las garrapatas de *R. microplus* estaban infectadas con *B. bigemina* se realizó la prueba de la hemolinfa en la cual se observó la presencia de los quinetos del protozoario intraeritrocítico (Fig. 25).

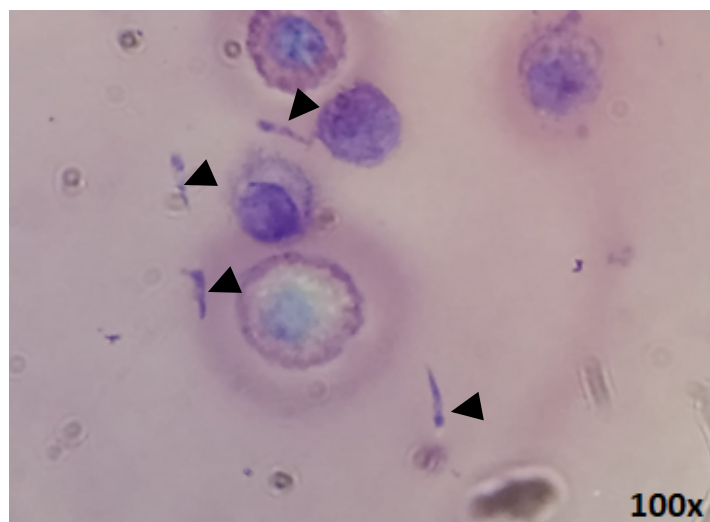


Figura 25. Tinción con Giemsa de la hemolinfa de *R. microplus* infectada con *B. bigemina*. Las puntas de flecha indican la presencia de quinetos en la hemolinfa de la garrapata, esto fue observado en un microscopio óptico en un objetivo de inmersión (100x). Fotografía donada por Iván Corona.

Una vez colectados los intestinos de las garrapatas infectadas y no infectadas con *B. bigemina*, se procedió en primera instancia a realizar ensayos de Pull-down para dar cumplimiento al primer objetivo del presente trabajo. Sin embargo para poder realizar los ensayos de Pull-down y los de inmunoprecipitación fue necesario inducir, purificar y dializar suficiente cantidad de rBmVDAC (Fig. 26, Fig. 27 y Fig. 28).

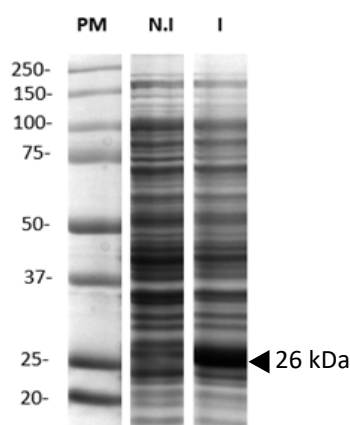


Figura 26. Lisado de la cepa *E. coli* BL21 donde se muestran la sobreexpresión de BmVDAC. El primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares (PM), el segundo carril corresponde a BmVDAC no inducido (N.I) y el tercer carril corresponde a BmVDAC recombinante inducida (I) con 1 mM de IPTG. La punta de flecha indica el PM de BmVDAC recombinante.

Las células de *E. coli* del cultivo inducido fueron lisadas y tratadas como se explicó en materiales y métodos y se procedió a purificar a BmVDACr por cromatografía de afinidad, el cromatograma de la purificación donde se puede observar el gradiente de concentraciones en color verde, la medición de UV a 290 nm y la elución de las fracciones de la proteína recombinante en color rojo, se muestra en la Fig. 27.

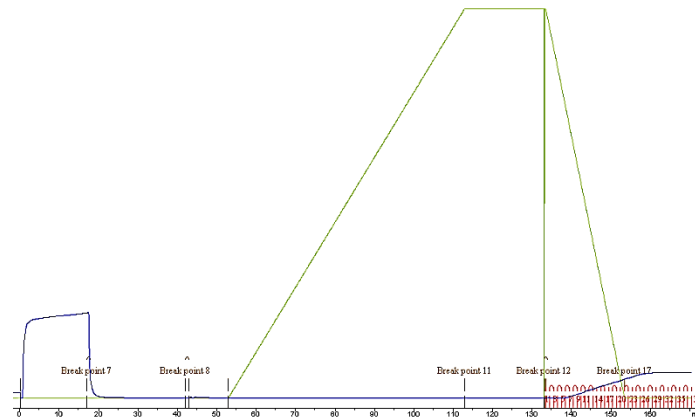


Figura 27. Cromatograma de BmVDAC purificada con el método replegamiento de la proteína sobre la columna. En color azul se muestra la medición de luz UV a 290 nm, en color rojo se observan las fracciones eluidas de la proteína recombinante BmVDAC y en color verde los cambios de concentraciones de las soluciones. El pico de luz UV indica la elución de la proteína recombinante de la columna de níquel.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas en electroforesis SDS/PAGE al 10%, para verificar en cuáles fracciones estaba presente BmVDACr, donde se observó que las fracciones 14, 15 y 16 eran las que contenían a la proteína recombinante con mayor pureza (Fig. 28).

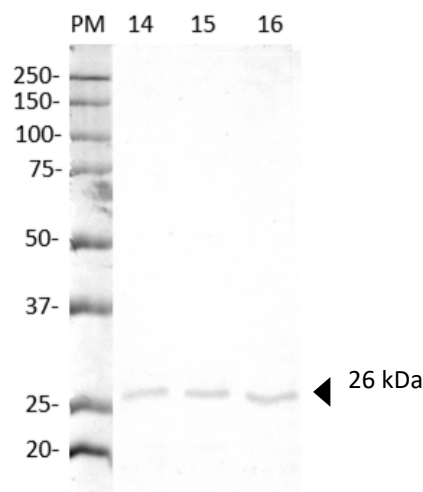


Figura 28. Fracciones en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie R-250 de BmVDAC purificadas en el FPLC. El carril uno se observa el marcador de pesos moleculares, en el carril 2, 3 y 4 a las fracciones 14, 15 y 16 de la proteína recombinante BmVDAC purificada. La punta de flecha indica el peso molecular de rBmVDAC.

Ensayos de Pull-down

La proteína recombinante BmVDAC se expresa como proteína de fusión con un tag de 6 histidinas mediante las cuales se unen a las resinas de cobalto y níquel. En un inicio se usó la resina de cobalto sin embargo no se obtuvieron resultados satisfactorios ya que la eficiencia de unión de BmVDAC a la resina fue menor que la que se une a la resina de níquel, por lo que se decidió continuar con la resina de níquel (Fig. 29).

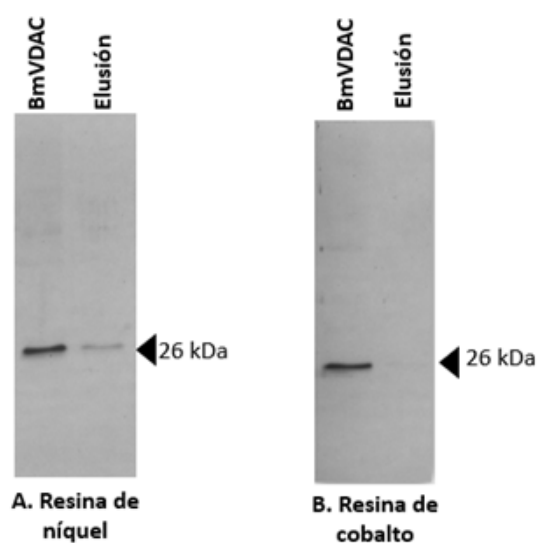


Figura 29. Perfil de elución de BmVDAC recombinante empleando 290 mM de imidazol. En el panel A se observa en el primer carril a BmVDAC recombinante introducida al sistema y en el segundo carril a BmVDAC eluido con 290 mM de la resina de níquel. En el panel B se observa en el primer carril a BmVDAC recombinante introducida al sistema y en el segundo carril a BmVDAC eluido con 290 mM de la resina de cobalto. Las puntas de flecha indican el peso molecular de BmVDAC recombinante.

Una vez elegida la matriz para unir a la proteína recombinante se procedió a poner a interaccionar 1 mg del lisados de extractos totales de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* 48 h post repleción durante toda la noche a 4°C. En este experimento se observaron dos bandas tenues que se encuentran entre los pesos moleculares de 50 y 100 kDa los cuales probablemente correspondan a proteínas que interaccionan con la proteína BmVDAC, además se observó una banda que

corresponde al peso molecular de la proteína recombinante que es de 26 kDa (Fig. 30).

Este experimento fue repetido tres veces sin embargo los resultados no fueron reproducidos por lo que se procedió a realizar ensayos de inmunoprecipitación para obtener la interacción de BmVDAC de *R. microplus* durante la infección con *B. bigemina* a diferentes tiempos post repleción.

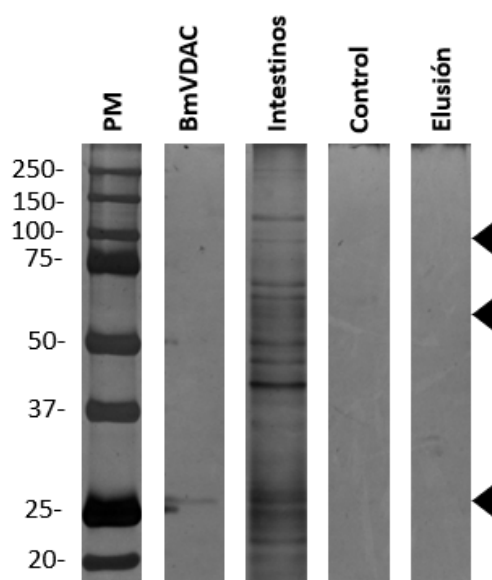


Figura 30. Pull-down de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. Bigemina* 48 h post repleción. En el primer carril se observa el marcador de pesos moleculares, en el segundo carril a BmVDAC recombinante, en el carril tres a los intestinos infectados con *B. bigemina* 48 h post repleción previamente clarificados, en el cuarto carril se observa el control de la resina donde se clarificaron previamente los intestinos y en el carril número cinco se observa la elución del Pull- down las puntas de flecha indican bandas corresponde a BmVDAC recombinante en un peso aproximado de 26 kDa y dos más las cuales se encuentran en pesos moleculares de entre 50 a 100 kDa.

Ensayos de Inmunoprecipitación

Inicialmente la IP se realizó con anticuerpos policlonales BmVDAC producidos en bovino e intestinos de *R. microplus* infectados y no infectados a 0 y 24 h post repleción con *B. bigemina* (sin crosslink con DSP de los intestinos).

En estos primeros ensayos se realizaron dos eluciones como se menciona en materiales y métodos, identificándose dos bandas diferenciales respecto al control (suero preinmune del mismo bovino) que se encuentran aproximadamente en los pesos moleculares de 30 y 100 kDa, que corresponden a la segunda elución de intestinos infectados con *B. bigemina* 24 h post repleción (Fig. 31).

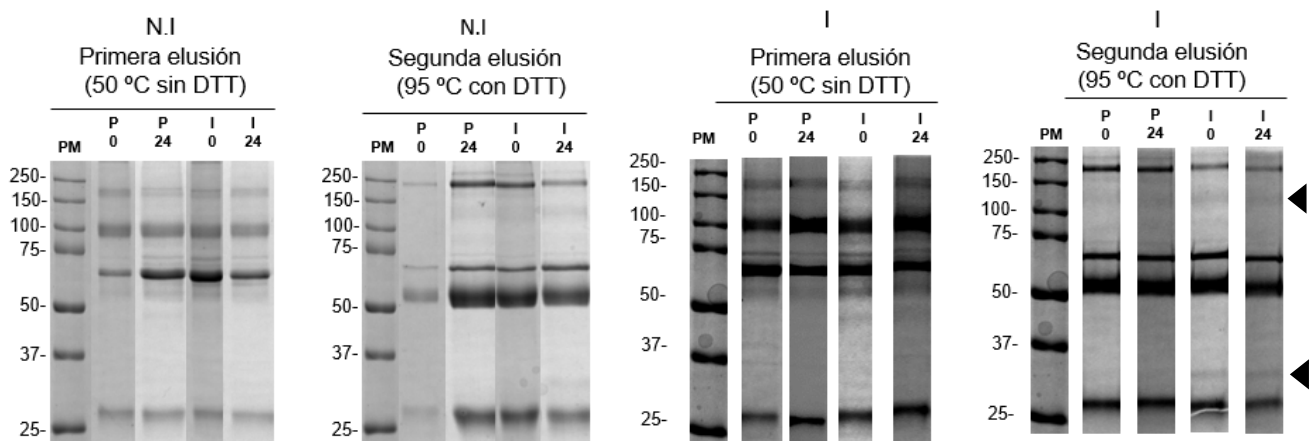


Figura 31. IP de lisados de intestinos de *R. microplus* infectados (I) y no infectados (N.I) con *B. bigemina* sin crosslink a 0 y 24 h post repleción. Las puntas de flecha indican dos bandas diferenciales en la segunda elución de intestinos infectados 24 h post repleción. I es suero inmune y P es suero preinmune.

En la Fig. 32, se observan dos bandas diferenciales donde cabe destacar que las bandas que se encuentran aproximadamente en un rango de peso molecular entre 90 y 130 kDa se mantuvieron constantes en todas las condiciones.

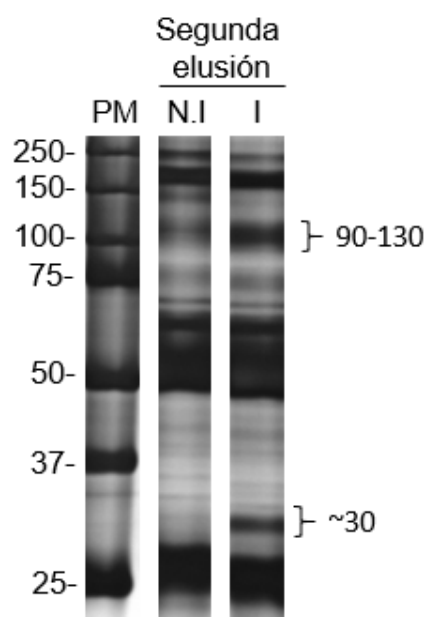


Figura 32. Bandas de proteínas diferenciales que interaccionan con BmVDAC. Electroforesis SDS/PAGE teñida con plata de la segunda elución a 95°C con DTT de la IP de intestinos de *R. microplus* no infectadas (N.I) e infectados (I) con *B. bigemina* 24 h post repleción. En el carril uno se observa el marcador de pesos moleculares (PM). En el carril dos la segunda elución de intestinos de *R. microplus* no infectados y en el tercer carril la segunda elución de intestinos de *R. microplus* infectados. Las llaves indican las bandas diferenciales de la IP de intestinos infectados respecto a su control no infectado, así como su peso molecular aproximado.

De los experimentos previos se seleccionaron dos bandas que fueron enviadas para ser identificadas por espectrometría de masas, estas bandas fueron de la segunda elución (95°C con DTT) de la IP de lisado de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* 24 h post repleción (Fig. 33). Sin embargo sólo se identificaron algunos péptidos pertenecientes a *B. taurus* y comunes a los controles.

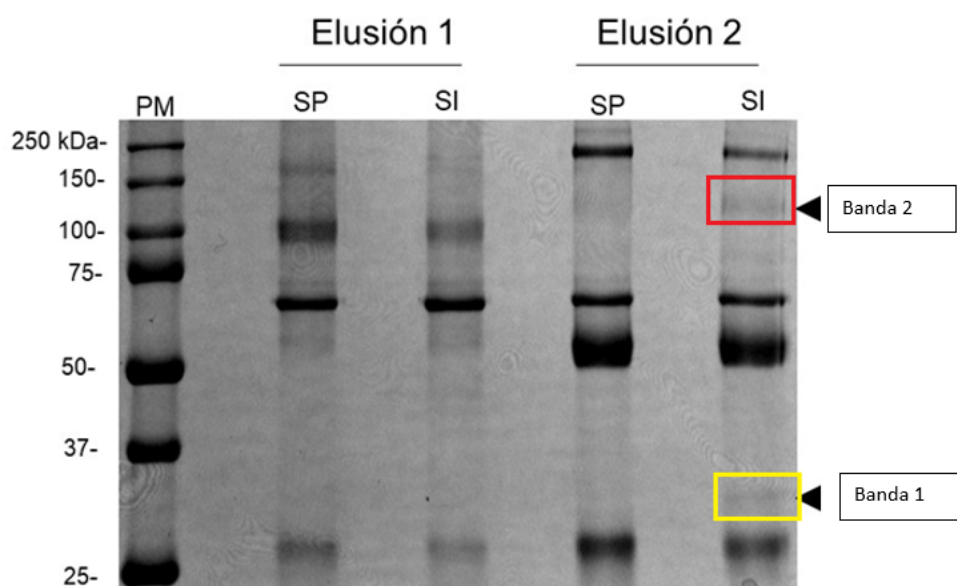


Figura 33. IP de lisado de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* 24 h post repleción. Elución 1 se realizó sin DTT y se calentó por 10 min a 50°C y Elución 2 realizó con DTT y se calentó 5 min a 95°C. SP= suero preinmune y SI= Suero inmune con BmVDAC ambos sueros pertenecen al mismo bovino. La banda 1 y 2 se enviaron a análisis por espectrometría de masas.

Uno de los problemas que se presentó en el desarrollo de la IP, fue el reconocimiento inespecífico del suero control (suero preinmune), con el fin de eliminar estas falsas interacciones se probó un anticuerpo monoclonal anti VDAC1 humano, sin embargo, este anticuerpo no reconoció a BmVDAC de los intestinos de *R. microplus*, para este ensayo se utilizó un lisado de la línea celular HeLa como control positivo (Fig. 34).

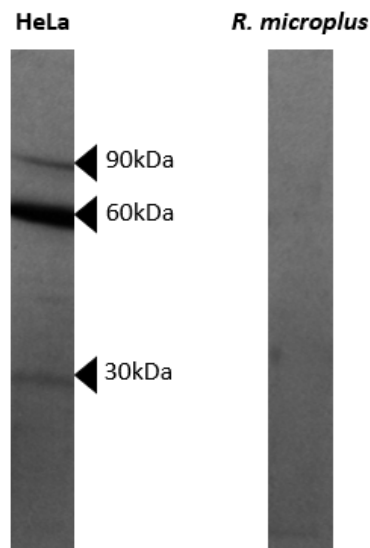


Figura 34. Estudio del posible reconocimiento de BmVDAC por un anticuerpo monoclonal contra VDAC de humano. Western blot del lisado de línea celular HeLa y *R. microplus* con anticuerpo monoclonal VDAC1 humano. Las puntas de flecha indican el reconocimiento de VDAC1 en su forma monomérica, dimérica y trimérica, en el lisado de la línea celular HeLa.

Otros cambios realizados para mejorar la IP fue modificar el tiempo de unión del antígeno/anticuerpo ya que anteriormente se hacía por 6 h a 4°C y posteriormente se cambió a 2 h a 4°C, esto con el fin de evitar uniones inespecíficas a la proteína G, además también se usó DSP.

Por otra parte, también se decidió trabajar con muestras de intestinos de *R. microplus* a 0, 24, 48 y 72 h post repleción infectadas y no infectadas con *B. bigemina*, para poder identificar bandas diferenciales en la inmunoprecipitación.

Para la parte de la técnica de IP donde se realizó la lisis de los intestinos de garrapata también se probó el uso de los detergentes NP-40 y Tritón X-100, obteniéndose mejor rendimiento con NP-40, ya que anteriormente era utilizado Tritón X-100.

Una vez estandarizada nuevamente la técnica de IP se procedió a verificar la integridad de los intestinos de *R. microplus* infectados y no infectados con *B. bigemina* a tiempos de 0, 24, 48 y 72 h post repleción tratados con DSP (Fig. 35).

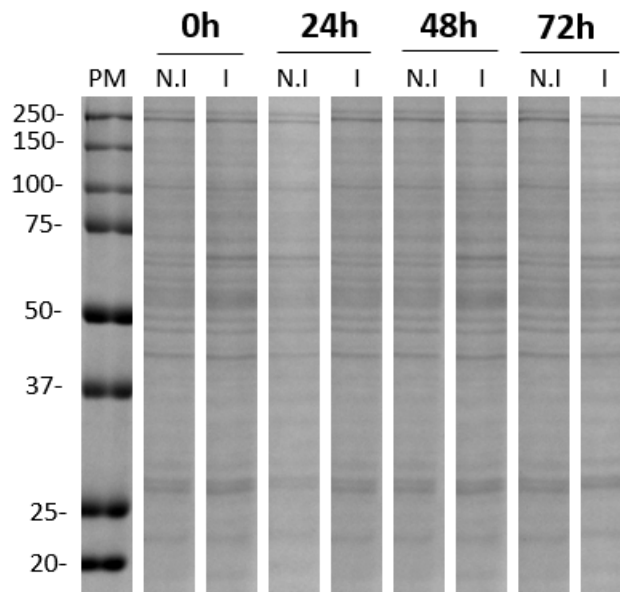


Figura 35. Integridad de lisado de intestinos de *R. microplus* a 0, 24, 48 y 72 h post repleción infectados y no infectados con *B. bigemina* y tratados durante 2 h con 2 mM de DSP. I= Lisado de intestinos infectados y N.I= Lisado de intestinos no infectados.

Después de haber verificado la integridad de las proteínas de los intestinos de *R. microplus* se procedió a realizar un clarificado de 100 µg de intestinos de los diferentes tiempos post repleción, que fue utilizado como control. Donde solamente se observó que tanto en intestinos infectados y no infectados con *B. bigemina* a 0 h post repleción una banda que se une de manera inespecífica a la agarosa de proteína G (Fig. 36).

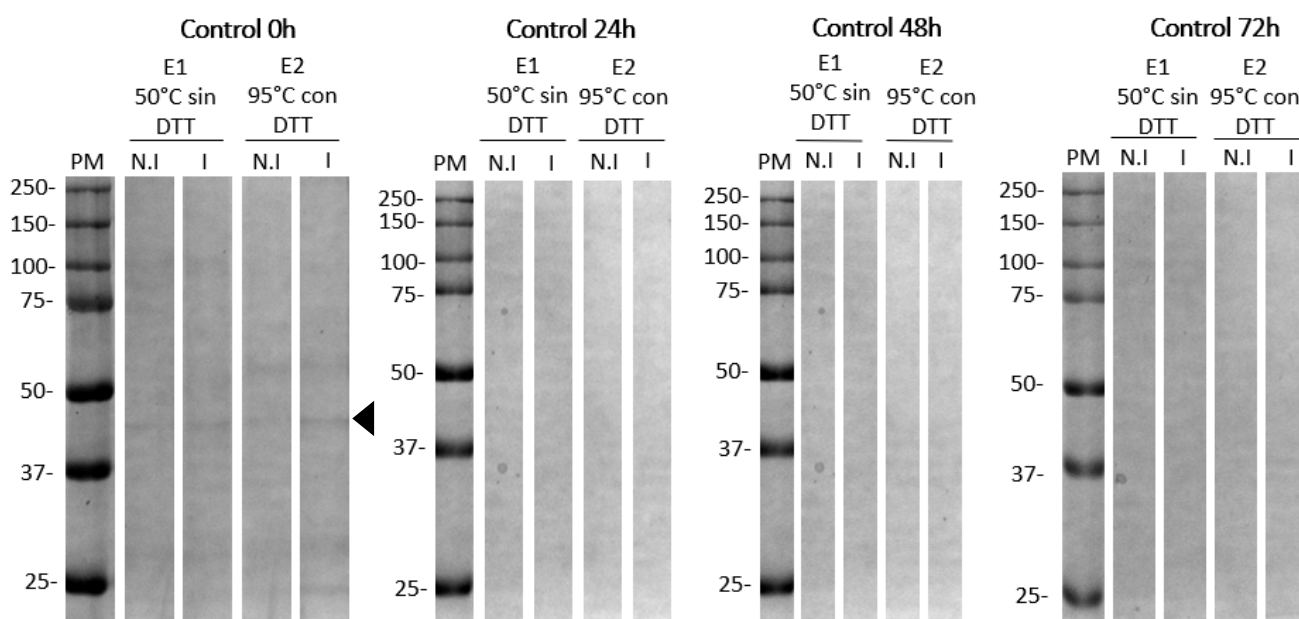


Figura 36. Preclarado de 100 µg de intestinos de *R. microplus* a 0, 24, 48 y 72 h post repleción, infectados (I) y no infectados (N.I) con *B. bigemina*. La punta de flecha indica la unión inespecífica de una proteína de intestinos de *R. microplus* a la proteína G a 0 h post repleción tanto en intestinos infectados y no infectados. En todos los ensayos se realizaron dos eluciones una por 10 min a 50°C sin DTT y la segunda por 5 min a 95°C con DTT.

Además se probó la unión de los sueros preinmune e inmune a la proteína G agarosa ya que estos proceden del suero completo del bovino, estos controles nos sirvieron para descartar falsos positivos durante nuestros ensayos de IP, el patrón de bandeo observados nos ayudó a omitir distintas bandas que se unen de manera inespecífica a la matriz las cuales se encuentran en los pesos moleculares aproximados de; 28, 50, 60, 100 y 200 kDa (Fig. 37).

Una vez realizado todos los controles necesarios que tuvieron como finalidad poder encontrar un patrón de bandeo que fuera verdaderamente diferencial respecto a nuestro control, se procedió a realizar la IP.

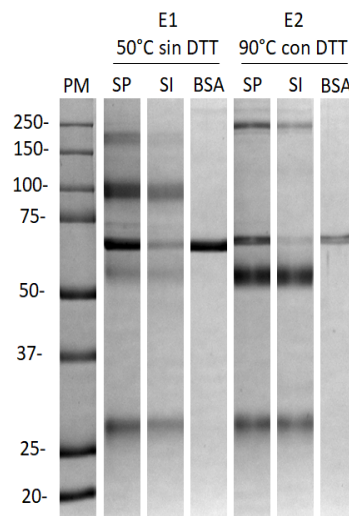


Figura 37. IP de suero preinmune, inmune y BSA. Control de unión de 4 μ L de suero preinmune (SP), suero inmune (SI) y albumina de suero bovino (BSA) al 0.1% a la proteína G, en el carril uno se observa el marcador de pesos moleculares (PM), en el carril dos, tres y cuatro se observa la primera elución del SP, SI y BSA. En el carril cinco, seis y siete se observa la segunda elución de SP, SI y BSA.

Además, en todas las IP se realizó un análisis densitométrico de las dos bandas diferenciales las cuales se enviaron a analizar por espectrometría de masas, la banda de abajo corresponde a un peso molecular aproximado de 50 kDa y la banda superior corresponde a una banda que se encuentra entre los 90 a 140 kDa (Fig. 38, Fig. 39, Fig. 40 y Fig. 41), de los ensayos de IP de 0h, 24h, 48 y 72 h post repleción de las garrapatas alimentadas en el bovino infectado y en el control no infectado.

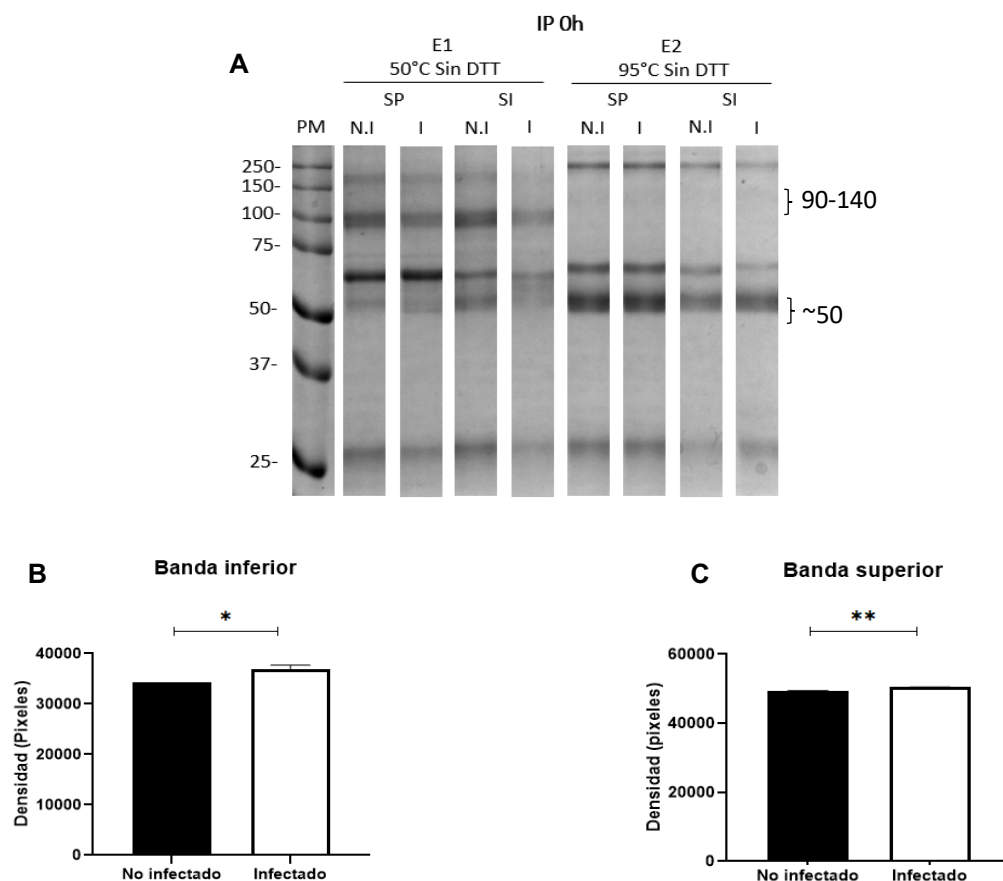


Figura 38. IP de lisado de intestinos de *R. microplus* infectados (I) y no infectados (N.I) con *B. bigemina* a 0 h post repleción. Las llaves señalan las bandas a las cuales se les realizó análisis densitométrico y corresponden a la segunda elución de intestinos infectados. Las estrellas indican que son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). A) SDS/PAGE al 10% de las fracciones de los ensayos de IP. B) Análisis densitométrico de la banda inferior y C) Análisis densitométrico de la banda superior.

El mismo tipo de análisis se realizó para las fracciones proteicas de la IP de las muestras 24 h post repleción de *R. microplus* infectadas y no infectadas (Fig. 39)

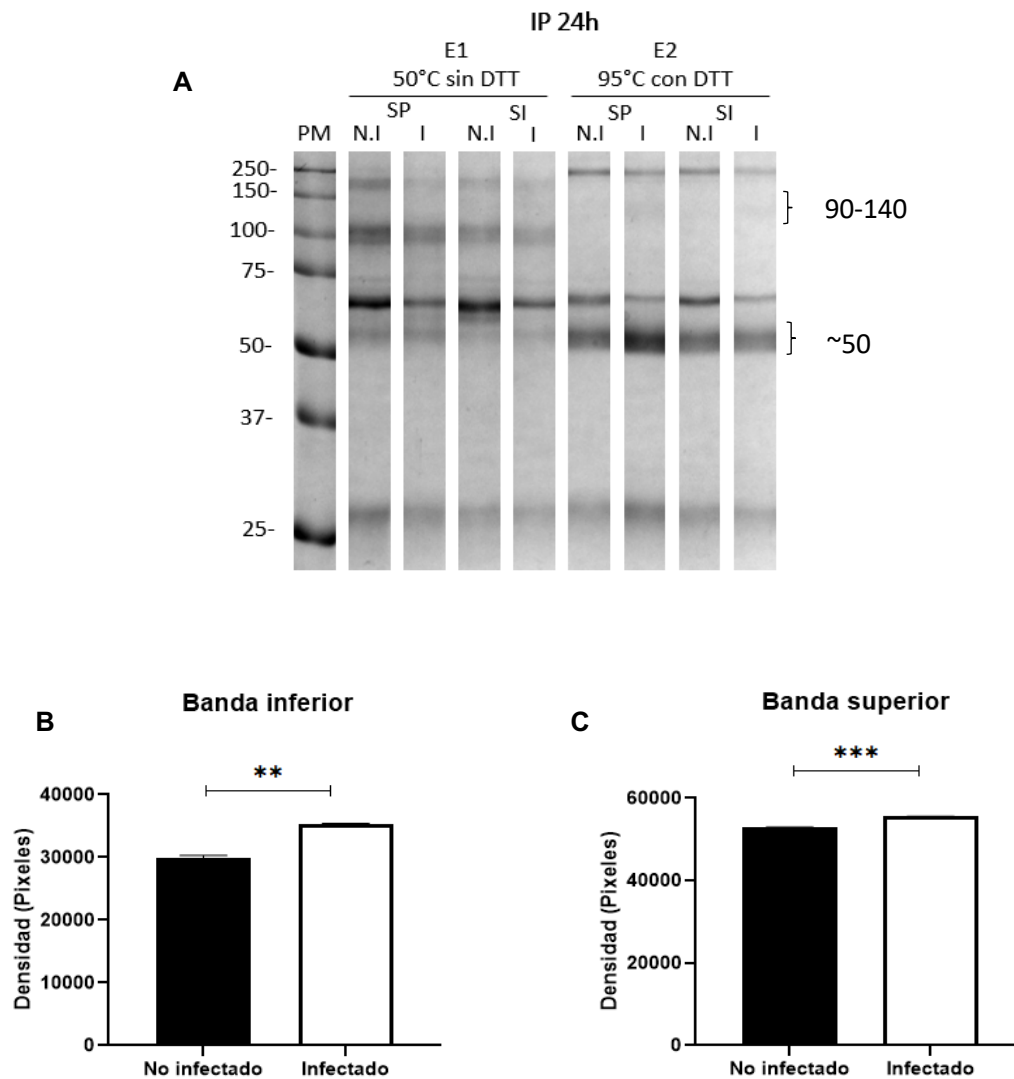


Figura 39. IP de lisado de intestinos de *R. microplus* infectados (I) y no infectados (N.I) con *B. bigemina* a 24 h post repleción. Las llaves señalan las bandas a las cuales se les realizó análisis densitométrico y corresponden a la segunda elución de intestinos infectados. Las estrellas indican que son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). A) SDS/PAGE al 10% de las fracciones de los ensayos de IP. B) Análisis densitométrico de la banda inferior y C) Análisis densitométrico de la banda superior.

La Fig 40, muestra los resultados del mismo análisis, pero para las muestras de intestinos infectados y no infectados a 48 h post repleción, inmunoprecipitadas con el suero inmune y el preinmune.

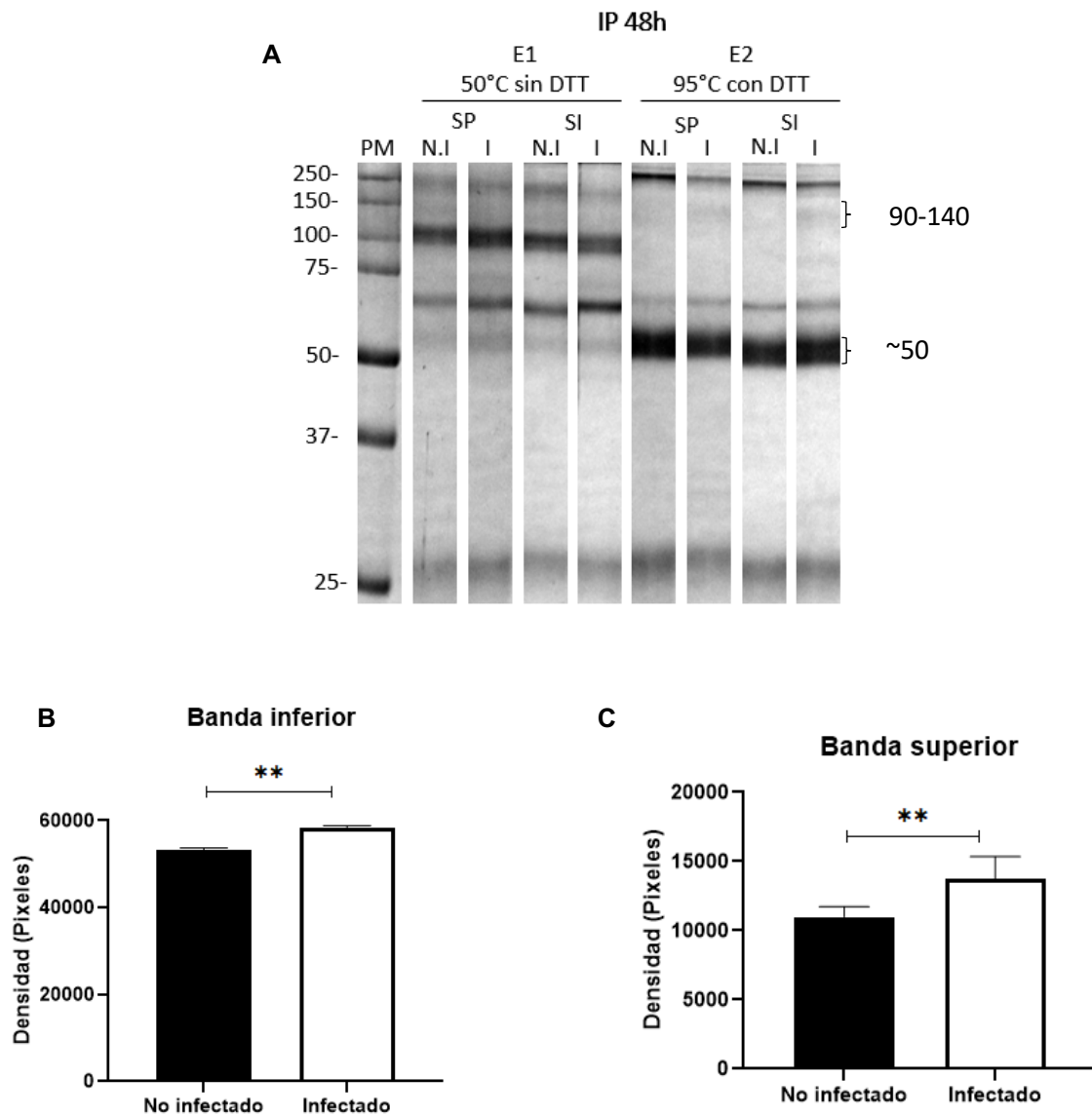


Figura 40. IP de lisado de intestinos de *R. microplus* infectados (I) y no infectados (N.I) con *B. bigemina* a 48 h post repleción. A) SDS/PAGE de las eluciones del ensayo IP de las muestras a las 48 h post repleción, las llaves señalan las bandas a las cuales se les realizó análisis densitométrico y corresponden a la segunda elución. Las estrellas indican que son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). B) Análisis densitométrico de la banda inferior y C) análisis densitométrico de la banda superior.

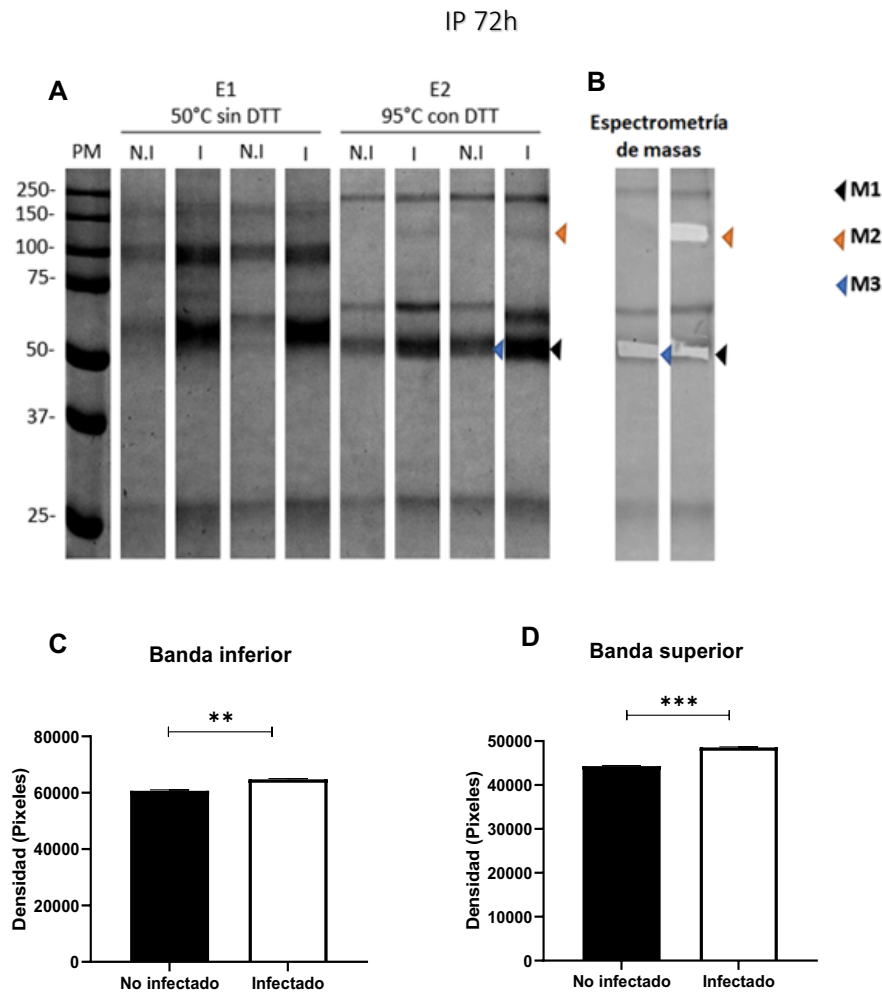


Figura 41. IP de lisado de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* y no infectados a 72 h post repleción. En el panel A se muestran las fracciones resultantes de la IP corridas en un gel SDS/PAGE al 10%. En el panel B, se muestran las bandas recortadas y enviadas a espectrometría de masas, el color negro fue llamada M1, el color naranja fue llamada M2 ambos corresponden a la segunda elución de intestinos infectados (I) y el color azul es el control no infectado (N.I). La banda M3 corresponde al control. En el panel C y D se muestran los resultados del análisis densitométrico de la banda inferior y superior. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$.

El análisis densitométrico de las bandas señaladas en las imágenes 38, 39, 40 y 41 demuestra que son estadísticamente significativas respecto a su control, sin embargo la diferencia en la intensidad de las bandas analizadas, fue mayor a las 72 h post repleción en la elución 2 de la IP de las muestras de intestinos infectados (Fig. 41), de este gel se picaron las bandas para mandar a analizar por espectrometría de masas.

Para demostrar la presencia de la proteína nativa BmVDAC en las muestras se realizó otro control donde se corrieron las fracciones de la inmunoprecipitación de la segunda elución (de las mismas muestras de donde se picaron las bandas para

analizar por espectrometría de masas) y se realizó un Western Blot usando el suero inmune (Fig. 42).

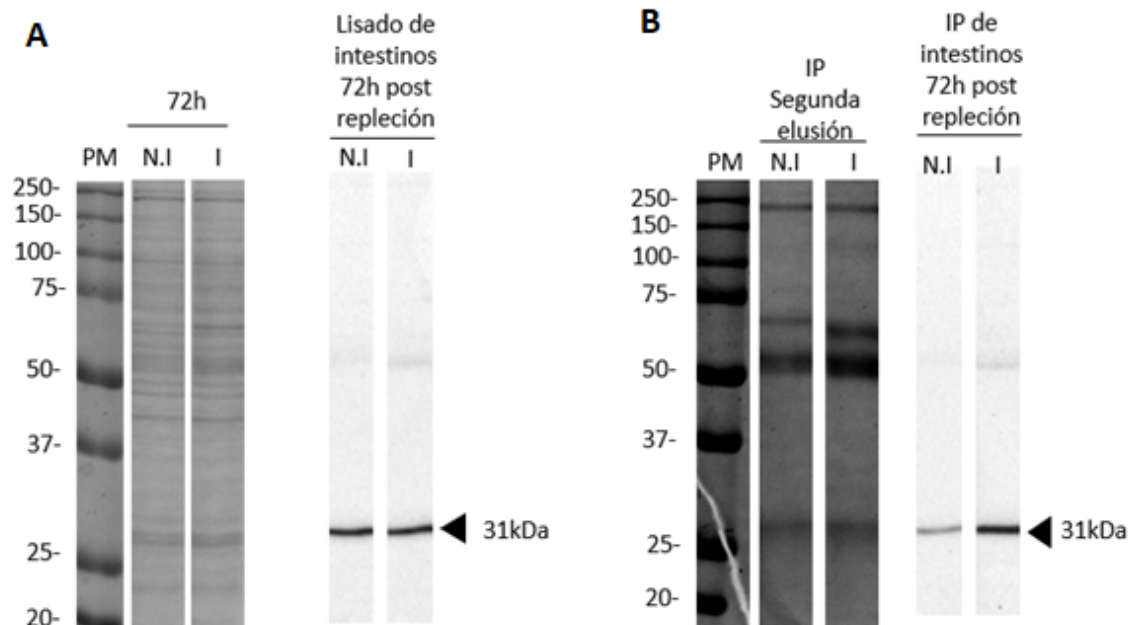


Figura 42. Análisis de BmVDAC nativa en las muestras usadas en la IP. Panel A: el panel de la izquierda muestra una SDS/PAGE del extracto de intestinos de garrapatas infectadas y no infectadas 72 h post repleción y en el panel de la derecha es un WB con el anticuerpo específico anti BmVDACr. El panel B muestra el WB de las proteínas inmunoprecipitadas a las 72 h post repleción con los sueros inmune y preinmune, donde se observa la banda correspondiente a BmVDAC nativa de 31 kDa.

Además de los análisis densitométrico anteriores, los cuales fueron realizados en cada condición problema respecto a su control se realizó una prueba de normalidad solo de la banda superior que se encuentra entre los pesos moleculares de entre 90 y 140 kDa de todos los tiempos post repleción para ver si los datos tenían una distribución normal, al no tener una distribución normal se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para más de tres grupos de datos que no tienen una distribución normal y ver si hay diferencias significativas entre ellos respecto a su control (Fig. 43).

Banda superior de entre 90 y 140 kDa

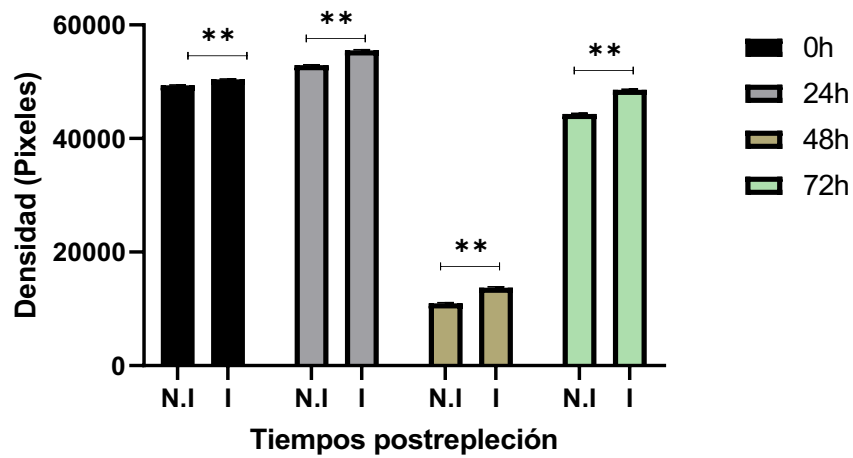


Figura 43. Análisis semicuantitativo de la cantidad de proteínas de la banda superior (entre 90 y 140 kDa), para todos los tiempos post repleción. El análisis densitométrico corresponde a la segunda elución de intestinos de *R. microplus* no infectados (N.I) e infectados (I) con *B. bigemina*. Las estrellas indican que hay diferencias estadísticamente significativas entre todas las condiciones respecto a su control con una confianza de $p < 0.0001$.

B. Identificar las proteínas expresadas diferencialmente que interaccionan con BmVDAC mediante espectrometría de masas.

Para el análisis de espectrometría de masas se enviaron tres bandas:

a) Banda M1 que corresponde a la IP de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* 72 h post repleción y se encuentra en un peso molecular de ~50 kDa.

b) Banda M2 que corresponde a la IP de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina* 72 h post repleción y se encuentra en un peso molecular de entre 90 y 140 kDa.

c) Banda M3 que corresponde a la IP de intestinos de *R. microplus* no infectados con *B. bigemina* 72 h post repleción y se encuentra en un peso molecular de ~50 kDa, el cual corresponde al control del ensayo.

En la Banda M1 se identificaron péptidos que no son diferenciales respecto a la Banda M3 el cual es el control y en la banda M2 se identificaron péptidos que corresponden a proteínas que, si son diferenciales, en ambos casos son proteínas de *B. taurus* (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas que interaccionan con BmVDAC

Proteína ID	Descripción	No. de péptidos	PM	Cobertura
Q3T052	Inhibidor de la alfa-tripsina cadena pesada H4	7	101.4	22.6
P06868	Plasminógeno	5	91.2	6.4
Q28085	Factor de complemento H	7	140.3	4.77
P80109	Fosfatidilinositol-glucano-fosfolipasa D específica	3	92.5	3.46

La identificación de los péptidos se realizó por espectrometría de masas y corresponden a *B. taurus*

Se identificaron cuatro proteínas diferenciales en la Banda M2 respecto al control no infectado:

1. La proteína inhibidora de la alfa-tripsina cadena pesada H4, es un inhibidor de endopeptidasas de tipos serina plasmáticas (Itoh *et al.*, 1994).

2. El plasminógeno, es un zimógeno que una vez activado a plasmina disuelve la fibrina de los coágulos sanguíneos y actúa como un factor proteolítico en una variedad de procesos que incluyen el desarrollo embrionario, la remodelación de los tejidos, la invasión tumoral e inflamación (Celkan 2016).

3. El factor de complemento H, es una glicoproteína que regula la activación del complemento, actúa como un inhibidor de la vía del complemento alternativa, degradando a la convertasa C3b y también puede actuar como cofactor del factor de serin proteasa I (Beek *et al.*, 2018).

4. La proteína fosfatidilinositol-glucano-fosfolipasa D específica, se encarga de hidrolizar el enlace de fosfato de inositol en proteínas ancladas por los glicanos de fosfatidilinositol (ancla GPI) liberando así estas proteínas de la membrana plasmática (Stadelmann *et al.*, 1997).

La interacción de patógenos con moléculas de su hospedero puede mediar la invasión y el establecimiento de la infección, por lo que estas moléculas son de suma importancia para entender la interfase vector/parásito.

C. Demostrar la interacción de BmVDAC con una de las proteínas identificadas.

Para demostrar esta interacción se realizó un ensayo de binding blot y se utilizó albúmina de suero bovino como control negativo el cual fue obtenido de manera comercial, así como el plasminógeno humano, para el caso de las proteínas recombinantes enolasa y BmVDAC debieron ser inducidas (Fig. 44).

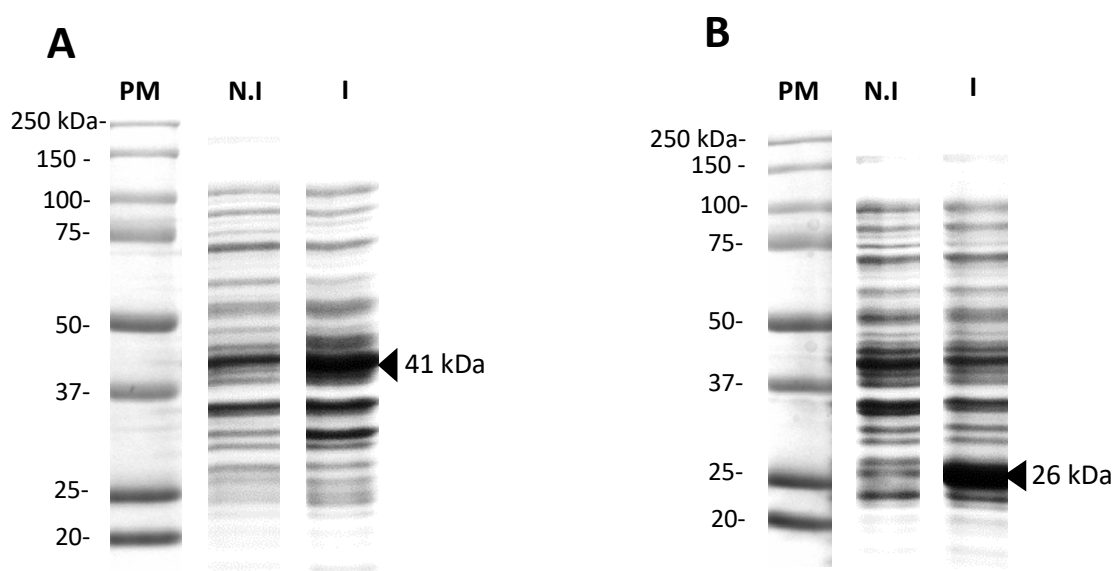


Figura 44. Análisis de la inducción de las proteínas recombinantes enolasa y BmVDAC. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% teñido con azul de coomassie, donde muestran los lisados de la inducción de las proteínas recombinantes enolasa y BmVDAC con 1 mM de IPTG. En el primer carril del panel A se observa el marcador de pesos moleculares (PM), en el segundo carril a enolasa no inducida (N.I) y en el tercer carril a enolasa inducida (I), la punta de flecha indica el peso molecular de la proteína recombinante. En el primer carril del panel B se observa a BmVDAC no inducido (N.I) y en el tercer carril a BmVDAC, la punta de flecha indica el peso molecular de la proteína recombinante.

Una vez verificado la inducción de la proteína recombinante el siguiente paso fue purificarlas en el FPLC con el método de replegamiento de la proteína sobre la columna (Fig. 45).

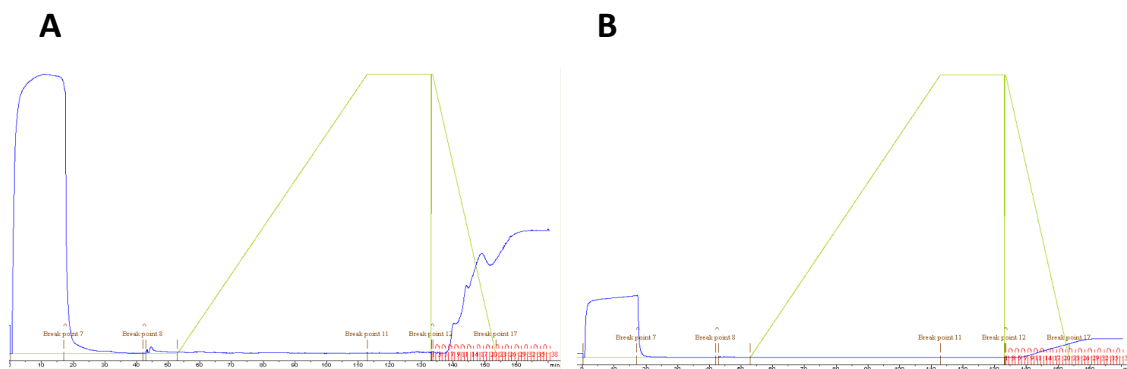


Figura 45. Cromatograma de la purificación de las proteínas recombinantes enolasa y BmVDAC. En panel A se observa el cromatograma arrojado por el FPLC de la purificación de enolasa recombinante. En el panel B se observa el cromatograma arrojado por el FPLC de la purificación de BmVDAC recombinante. Para ambos casos el color verde indica los cambios de concentraciones de las soluciones utilizadas, el color azul indica los cambios de absorbancia medidas a 290 nm y en color rojo se muestran las fracciones arrojadas por el FPLC.

Después de purificar las proteínas recombinantes se deben dializar, uniendo tres fracciones, se eligieron las que se veían más limpias, para enolasa fueron las fracciones 12,13 y 14, para BmVDAC fueron las fracciones 14, 15 y 16 (Fig. 46).

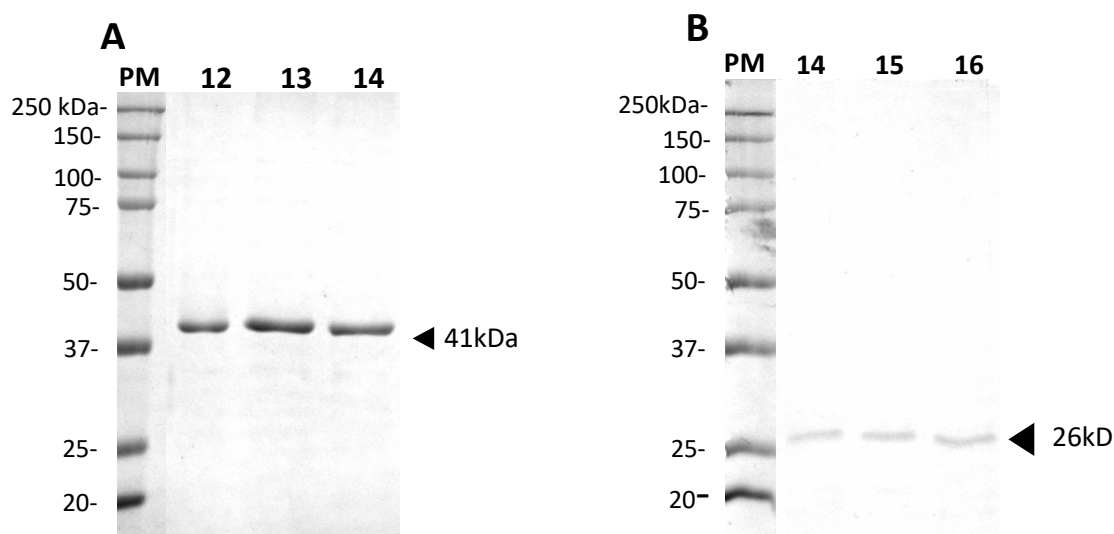


Figura 46. Purificación de las proteínas recombinantes enolasa y BmVDAC para los ensayos de unión. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% teñido con azul de coomassie donde se observan las fracciones dializadas de enolasa y BmVDAC recombinante. En el panel A se observa a enolasa purificada, en el primer carril el marcador de pesos moleculares en el segundo, tercer y cuarto carril a las fracciones 12, 13 y 14 respectivamente. La punta de flecha indica el peso molecular de enolasa recombinante. En el panel B se observa a BmVDAC purificada, en el primer carril el marcador de pesos moleculares, en el segundo, tercer y cuarto carril a las fracciones 14, 15 y 16 respectivamente. La punta de flecha indica el peso molecular de BmVDAC recombinante.

Antes de realizar el ensayo de unión a plasminógeno humano se procedió a verificar la integridad de todas las proteínas utilizadas (Fig. 47).

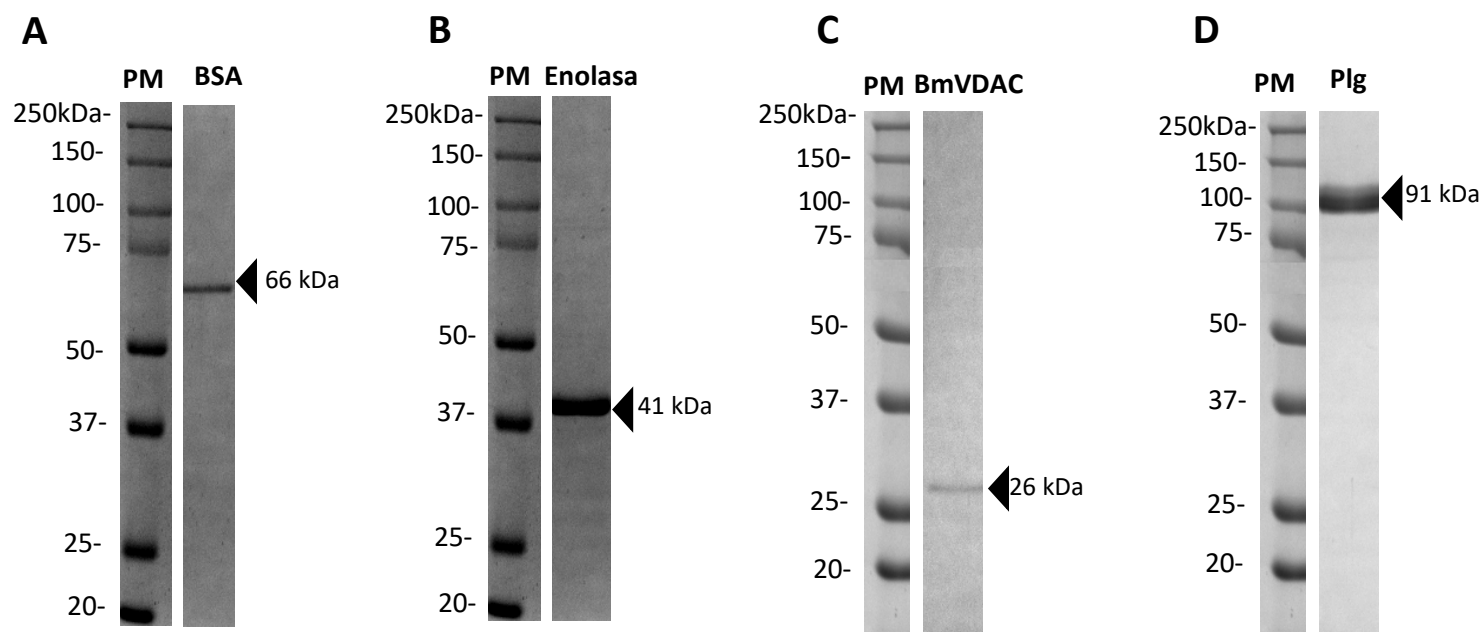


Figura 47. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE teñido con azul de coomassie de la integridad de las proteínas utilizadas en el ensayo de unión a plasminógeno. En el panel A se observa a albúmina de suero bovino (BSA), en el panel B a enolasa recombinante de *B. bigemina*, en el panel C a BmVDAC recombinante de *R. microplus* y en panel D al plasminógeno humano. En todos los paneles el primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares y la punta de flecha indica el peso molecular de la proteína.

Una vez verificada la integridad de las proteínas a utilizar se realizaron los controles, primero se verificó que la proteína BSA no fuera reconocida por el anticuerpo anti-BmVDAC, después se verificó que enolasa recombinante si fuera reconocido por el anticuerpo anti-enolasa, también se comprobó que la proteína BmVDAC si fuera reconocida por el anticuerpo anti-BmVDAC y finalmente se comprobó que el plasminógeno humano no fuera reconocido por los anticuerpos anti-enolasa ni anti-BmVDAC, se realizaron todos estos controles con la finalidad de evitar falsos positivos así como falsos negativos.

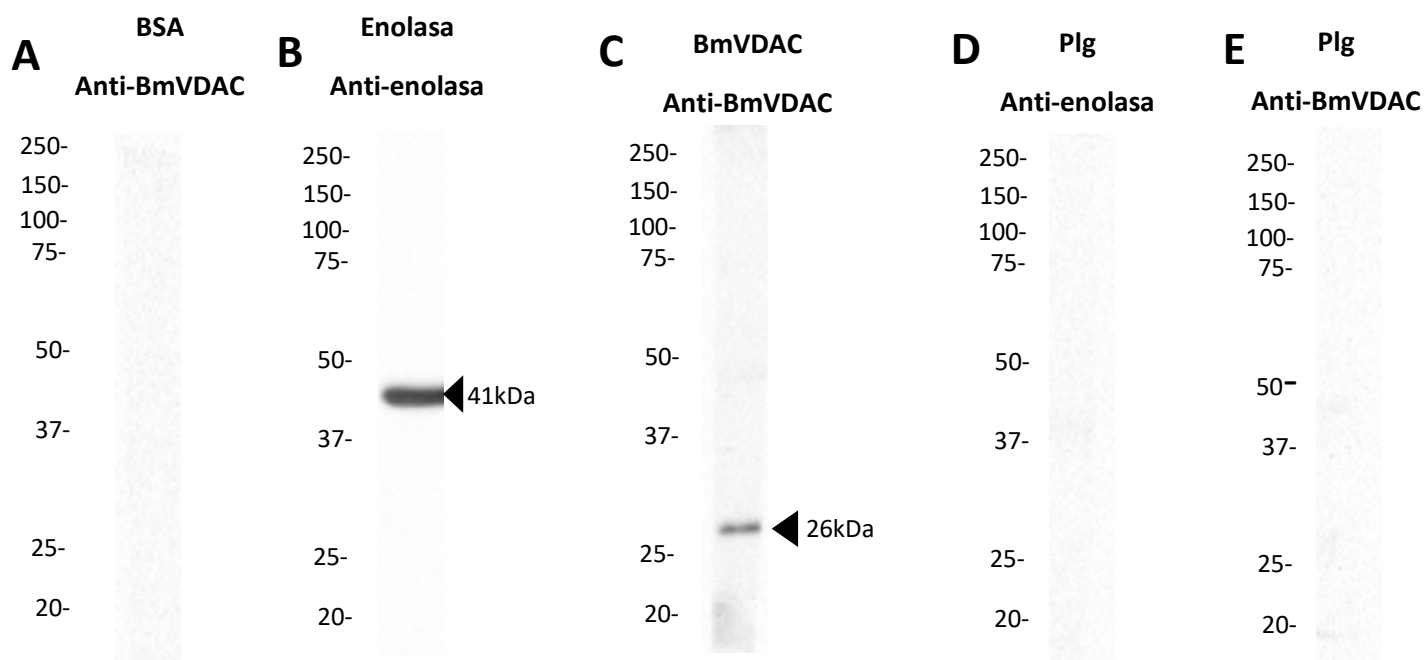


Figura 48. Especificidad de los anticuerpos utilizados en los ensayos de unión. En el panel A se observa a la proteína BSA revelado con anticuerpos anti-BmVDAC. En el panel B se observa a enolasa recombinante de *B. bigemina* revelado con anticuerpos anti-enolasa. En el panel C se observa a BmVDAC recombinante de *R. microplus* revelado con anticuerpos anti-BmVDAC. En el panel D se observa a plasminógeno humano (Plg) revelado con anticuerpos anti-enolasa y en el panel E se observa al plasminógeno humano revelado con anticuerpos anti-BmVDAC. Las puntas de flechas indican los pesos moleculares de las proteínas recombinantes.

Una vez verificado la integridad de las proteínas y realizado los controles necesarios se procedió a realizar el ensayo de unión a plasminógeno (Fig. 49).

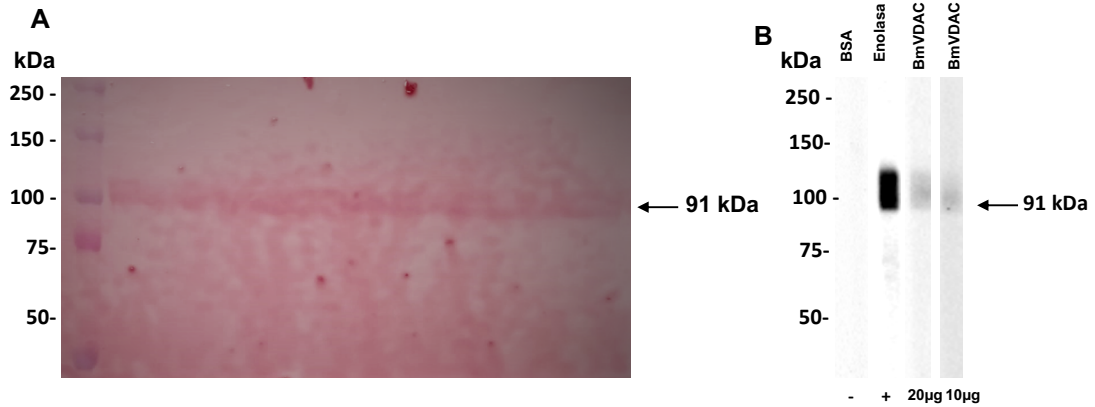


Figura 49. Interacción específica de BmVDAC al plasminógeno humano. En el panel A se observa la membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau, donde se transfirió el gel preparativo de plasminógeno. En el panel B en el primer carril se observa a plasminógeno y su interacción con BSA (control negativo -), en el segundo carril se observa al plasminógeno y su interacción con enolasa (control positivo +), y en el tercer y cuarto carril se observa al plasminógeno y su interacción con 20 y 10µg de BmVDAC. Los ensayos ser realizaron por duplicado. Las puntas de flecha indican el peso molecular del plasminógeno humano.

Con el ensayo de binding blot se demuestra la interacción entre BmVDAC y el plasminógeno.

X. DISCUSIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados que transmiten más de 100 patógenos que incluyen bacterias, virus, protozoarios y helmintos. Estas son el segundo vector transmisor de enfermedades humanas y el primero transmisor de patógenos en animales domésticos y salvajes (De la fuente *et al.*, 2008).

Actualmente se han desarrollado diferentes estrategias para el control de la infestación de garrapatas y de la transmisión de patógenos (Schorderet-Weber *et al.*, 2017). El uso de acaricidas que comúnmente son utilizados para combatir la infestación de este ectoparásito causa una selección de garrapatas resistentes a acaricidas además de contaminar el medio ambiente y productos alimenticios (Abbas *et al.*, 2014).

El uso de vacunas ha mostrado ser uno de los métodos más eficientes y económicos para el control de la infestación de garrapatas en bovinos, así como la manera más adecuada para la prevención de enfermedades transmitidas por este vector especialmente en regiones con alto riesgo de infección o en lugares donde los bovinos presentan síntomas severos, el uso de vacunas también tiene la característica de ser amigable con el medio ambiente (Sprong *et al.*, 2018).

Algunas vacunas basadas en proteínas recombinantes de *R. microplus* como Bm86 o Bm95 han sido comercializadas para el control de la infestación del vector que transmite *Babesia*, sin que funcionen de manera eficiente contra la babesiosis bovina (Gomes-Solecki, 2014).

En los últimos años el uso de tecnologías ómicas han demostrado ser una poderosa herramienta para la caracterización de interacciones moleculares garrapata-hospedero-patógeno, estudios de interactómica han proporcionado nuevos antígenos con capacidad de proteger al ganado de patógenos o del ectoparásito haciendo que sean usados como potenciales candidatos vacunales (De la fuente y Contreras, 2015).

Por lo tanto, el estudio de las interacciones proteína-proteína nos ayuda a entender las funciones de diferentes procesos biológicos y como es que son regulados. Actualmente una de las principales aplicaciones de la interactómica es el entendimiento de la biología de las enfermedades (Feng *et al.*, 2015).

En nuestro grupo de trabajo el análisis de la interacción entre células intestinales de *R. microplus* infectadas con *B. Bigemina* resultó en la identificación de BmVDAC, esta porina mitocondrial también se sobreexpresa y se relocaliza durante la infección (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015).

BmVDAC recombinante ya fue evaluada como vacuna anti-garrapata en bovinos, se encontró que es inmunogénica además ofrece un 82% de eficacia contra la infestación de *R. microplus* en comparación con el control. Para el caso de *R. microplus* infectado con *B. bigemina* mostró una eficacia del 34%, que es considera baja. También se observó una reducción del 34% en la fertilidad de los huevos en *R. microplus* infectados y no infectados con *B. bigemina*. Estos resultados sugieren que BmVDAC recombinante puede ser usado como vacuna para el control de la infestación con *R. microplus* (Ortega-Sánchez *et al.*, 2020).

Interesados en conocer con que proteínas del vector-hospedero-parásito pueden interaccionar con BmVDAC en intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina*. Se realizaron ensayos de Pull-down, donde 20 µg de BmVDAC recombinante inmovilizado en una resina de níquel se puso a interaccionar con 1 mg de extractos totales de intestinos de *R. microplus* infectados con *B. bigemina*, en estos experimentos se observaron tres bandas que se encontraron en un peso molecular aproximado de entre 26, 50 y 100 kDa.

Estos ensayos no pudieron reproducirse debido a que BmVDAC es una proteína de membrana y tiende a degradarse muy rápido además de que los intestinos de *R. microplus* contienen una gran variedad de proteasas (Ali *et al.*, 2015). La mayoría de las proteínas de membrana funcionan en complejos (Daley, 2008) y las interacciones dentro de estos complejos pueden ser directas (interacciones principales) o indirectas (interacciones secundarias). Las interacciones directas generalmente son de alta afinidad y forman complejos estables (Jura *et al.*, 2011).

Adicionalmente las interacciones secundarias o transitorias son de baja afinidad y son necesarias para regular la actividad de los complejos estables (Hunke y Muller, 2012).

La mayoría de los entrecruzadores o “crosslinkers” químicos permiten detectar las interacciones proteína-proteína transitorias o no covalentes (Traskselis *et al.*, 2005), por lo que en nuestro caso usamos DSP, combinado con ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos anti-BmVDAC. El DSP es un reactivo que sirve para establecer uniones estables entre proteínas que tienen interacciones débiles, ya que tiene dos extremos éster reactivos los cuales pueden interaccionar con los extremos N-terminales de las proteínas, también cuenta con un enlace disulfuro en medio de la molécula el cual puede ser roto en condiciones desnaturalizantes (Mertz *et al.*, 2012).

Los resultados usando la combinación de IP con DSP, mostraron que la segunda elución de intestinos infectados 72 h post repleción tenía mayor abundancia de proteínas. Por tanto, se decidió enviar a analizar dos bandas a espectrometría de masas que corresponden a la condición problema (M1 y M2) y una como control (M3).

Los resultados obtenidos en este análisis dieron como resultados péptidos que corresponden a cuatro proteínas de *B. taurus* que interaccionan de manera diferencial con BmVDAC, estas proteínas son:

1. Inhibidor de la alfa-tripsina cadena pesada H4
2. Plasminógeno
3. Factor de complemento H
4. Fosfatidilinositol-glucano-fosfolipasa D específica

Las proteínas identificadas de *B. taurus* demuestran el complejo microambiente del intestino de *R. microplus*, donde se presentan proteínas del hospedero bovino del cual se alimenta la garrapata, proteínas del parásito y del propio vector transmisor. El hecho de no haber identificado péptidos del parásito, o de *R. microplus* nos hace

sugerir que las cantidades de complejo fueron insuficientes para ser detectadas y en el caso de *R. microplus*, la ausencia del genoma secuenciado completo, nos impidió la posible identificación de péptidos que podrían estar interactuando con BmVDAC.

Un resultado interesante de este trabajo, es el haber encontrado y demostrado la interacción de BmVDAC con el plasminógeno, ya que VDAC1 de humano es capaz de interactuar con el plasminógeno humano (Gosh *et al.*, 2011).

Babesia debe cruzar el epitelio intestinal de su vector invertebrado para continuar con su ciclo de vida. Lahteenmaki y colaboradores en el 2011 mencionan que algunos patógenos como bacterias y protozoarios reclutan de su hospedero al plasminógeno que es un zimógeno y una vez activado a plasmina (proteasa) es capaz de ayudar a patógenos a cruzar barreras, además de ayudar a hidrolizar proteínas tales como proteínas del complemento e inmunoglobulinas y que una vez activado a plasmina el inhibidor de tripsina alfa no evita su actividad proteolítica. Cabe recalcar que el sistema fibrinolítico pertenece al hospedero vertebrado y que el parásito se aprovecha de este.

Además, BeeK y colaboradores en el 2018 mencionan que *P. falciparum* utiliza al factor del complemento H para evadir al sistema del complemento ya que este lo regula de manera negativa, esto es de suma importancia ya que *Babesia* al igual que *Plasmodium* son ambos Apicomplexas y nos habla de que probablemente utilicen mecanismos similares para evadir al sistema inmune del hospedero.

Otro aspecto interesante es que Chung y colaboradores en el 2011 refieren que el sistema fibrinolítico al que pertenece la plasmina ayuda a escapar a algunas bacterias de la inmovilización de la matriz extracelular. Para el caso de *B. bigemina* es bien sabido que parte de su ciclo de vida dentro de su vector (*R. microplus*) debe de atravesar barreras físicas como el epitelio de las células intestinales.

Algunos activadores para el plasminógeno son el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y uroquinasa (u-PA), Gonzalez-Gronow y colaboradores en el 2013 demostraron que VDAC funciona como receptor de t-PA (activador del

plasminógeno) en la región N-terminal de la proteína, y que a su vez convierte al plasminógeno a su forma activa (plasmina).

Ghosh y colaboradores en el 2011 demostraron que los oquistos del Apicomplexa *Plasmodium berguei* utilizan la actividad proteolítica de la plasmina que obtienen de su hospedero para su invasión al intestino del mosquito *Anopheles gambiae* el cual es su vector, produciendo la degradación de la glucocálix y así permitir al parásito el reconocimiento de los receptores de las células intestinas del vector y poder invadirlas.

Por otra parte, Hoener en 1990 describió que la Fosfolipasa D que es específica para glicanos de fosfatidil-inositol hidroliza proteínas que se encuentran ancladas mediante (GPI) a la membrana celular, probablemente la función de esta proteína sea aprovechada por *Babesia* ya que liberando receptores celulares que estén anclados a la superficie del epitelio intestinal quizá tenga acceso a otros receptores que le ayuden a atravesar el epitelio intestinal de *R. microplus*.

Hasta ahora se sabe que proteínas como AMA-1 que es de micronemas, RAP-1 que es de roptrías y SBP-1 de cuerpos esféricos participan en la internalización del parásito, sin que ninguna de ellas tenga una actividad de proteasa.

El uso de proteínas con actividad proteolítica es importante ya que para completar el ciclo de vida de *Babesia* en su vector debe atravesar el epitelio intestinal de *R. microplus* y debe suceder lo siguiente:

- a. Primero debe eliminar las microvellosidades que normalmente cubren el epitelio intestinal.
- b. Segundo debe realizarse una interacción vector-parásito.
- c. Tercero el epitelio intestinal debe ser atravesado.

Una vez descrita las funciones generales de las proteínas identificadas en la espectrometría de masas se eligió demostrar la interacción entre BmVDAC y el plasminógeno humano mediante un ensayo de binding blot. La razón por la cual el plasminógeno fue elegido se debió a que Gonzales-Gronow y colaboradores en el

2012, demostró que hVDAC1 tiene un motivo de lisina/glicina en la región N-terminal de la porina mitocondrial la cual es capaz interactuar con la región kringle 5 del plasminógeno humano, este mismo motivo se encuentra conservado en BmVDAC. Además, la región k5 entre plasminógeno bovino y humano también se encuentra conservado.

Al demostrar que esta interacción sucede nos hace hipotetizar que *B. bigemina* utiliza a la plasmina para a travesar el epitelio intestinal de *R. microplus* (Fig. 50).

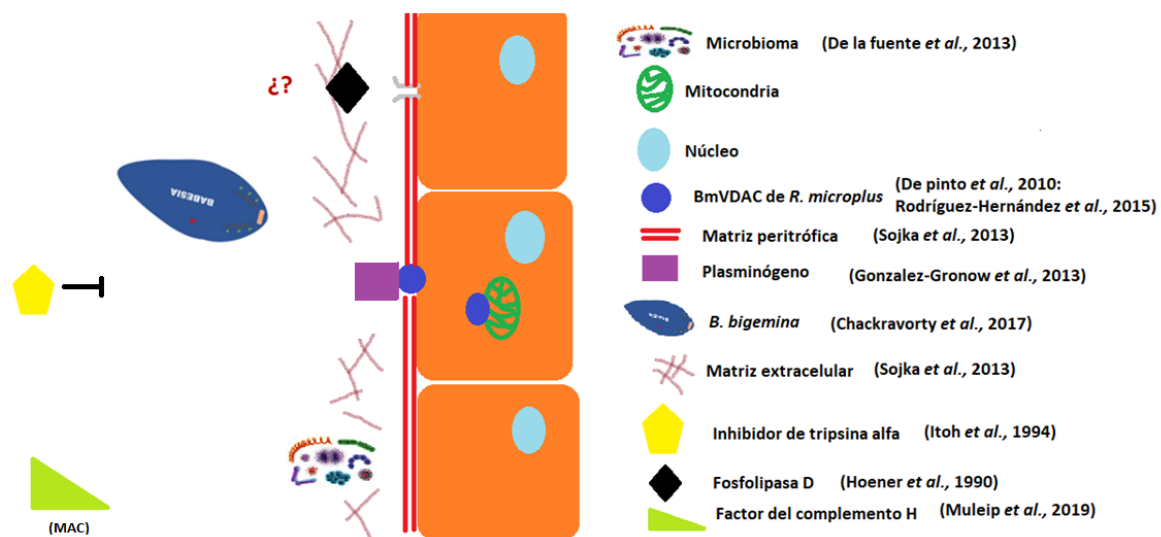


Figura 50. Modelo hipotético de la interacción BmVDAC/plasminógeno de *B. taurus*. La interacción de estas moléculas trae como consecuencia la remodelación de la matriz extracelular del epitelio intestinal de *R. microplus*. Al mismo tiempo que sucede esto el microbioma de la garrapata es muy sensible a cambio por tanto el inhibidor de tripsina alfa puede regular la activación de plasminógeno a plasmina. Por otra parte, el factor de complemento H podría regular moléculas del complemento del bovino que aún se encuentran en el intestino de la garrapata para evitar el complejo de ataque a membrana tanto de las bacterias y protozoarios que podrían ser flora normal de *R. microplus*. Y la fosfolipasa D probablemente ayude al parásito a invadir a las células del epitelio intestinal liberando receptores que se quedan anclados a la membrana celular.

Una función adicional relacionado con la sobreexpresión de BmVDAC es que también podría participar en la inducción de la apoptosis causada por la invasión de *Babesia* a las células epiteliales del intestino de su vector, ya que actualmente no se sabe cómo es que sucede. Esto debido a que Li y colaboradores en el 2014 describieron que al sobre expresarse hVDAC1 es fosforilado haciendo que esta

proteína no pueda ser degradada y este sobre expresada causando dos eventos importantes; primero que VDAC1 se relocalice en la membrana celular y segundo, que promueva la liberación de citocromo c promoviendo la apoptosis de la célula.

Finalmente, el conocimiento de las interacciones en la interfase del ciclo del parásito/vector son de suma importancia ya que podría ayudarnos a encontrar un antígeno del vector que al ser inmunizado en el hospedero bovino le otorgue protección contra la infección con *Babesia*. Ya que actualmente no se cuenta con una vacuna que sea efectiva contra este protozoario que causa grandes pérdidas económicas a nivel mundial.

XI. CONCLUSIONES

- BmVDAC de *R. microplus* interactúa con proteínas del hospedero bovino durante el proceso de infección.
- Las proteínas diferenciales inmunoprecipitadas con los anticuerpos anti-BmVDAC tienen un rango de PM de 90-140 kDa.
- A las 72 h post repleción se obtuvo una mayor cantidad de las proteínas inmunoprecipitadas respecto a las 0, 24 y 48 h post repleción.
- Las proteínas identificadas que interaccionan con BmVDAC son las proteínas del suero bovino: Inhibidor inter-alfa de tripsina cadena pesada, plasminógeno, factor del complemento H y fosfolipasa D específica.
- La interacción de BmVDAC con el plasminógeno se confirmó por ensayos de binding blot.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Abbas R, Zaman M, Colwell D, et al., (2014) Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Vet Parasitol.* 2003(2):6-20.

Adl S.M, Leander B, Alastair G, Simpson A, Archibald J.M, Anderson R.O, Bass D, Bowser S, Brugerolle G, Farmer M, Karpov S, Kolisko M, Lane C, Lodge D, Mann D.G, Meisterfeld R, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge S, Smirnov A, and Spiegel F (2007) Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. *Sysl. Biol* 56(4):684-689.

Aguilar G, Olvera A, Carvajal B and Mosqueda J (2018) SNPs and other polymorphisms associated with acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Frontiers In Bioscience.* 23:65-82.

Al-Khedery B and Allred D.R (2006) Antigenic variation in *Babesia bovis* occurs through segmental gene conversion of the *ves* multigene family, within a bidirectional locus of active transcription. *Molecular Microbiology* 59 (2):402–414.

Allred D.R, Carlton J, Satcher R.L, Long J.A, Brown W.C, Patterson P.E, O'Connor R.M, and Stroup S.E (2000) The *ves* Multigene Family of *B. bovis* Encodes Components of Rapid Antigenic Variation at the Infected Erythrocyte Surface. *Molecular Cell* 5:153–162.

Almazan C, Aguilar-Tipacamu G, Rodriguez S, Mosqueda J and Perez de Leon A (2018) Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers In Bioscience* 1535-1551.

Álvarez J.A, Ramos J.A, Rojas E, Mosqueda J.J, Vega C, Olvera A.M, Figueroa J, and Cantó G (2004) Field Challenge of Cattle Vaccinated with a Combined *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* Frozen Immunogen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1026: 277–283.

Antunes S, Galindo R. C, Almazan C, Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Shkap V, do Rosário, de la Fuente J and Domingos A (2012) Functional genomics studies of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks in response to

infection with the cattle protozoan parasite, *Babesia bigemina*. Int. J. Parasitol. 42:187–195.

Antunes S, Rosa C, Couto J, Ferrolho J and Domingos A (2017) Deciphering Babesia-Vector interactions. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 7(429):1-8.

Assadian T and Stanek G (2002) Theobald Smith – The discover of ticks as vector of disease. History of Medicine 114(13):479-481.

Ayon-Nuñez D, Fragoso G, Bobes R and Laclette J.P (2018) Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. Bioscience Reports. 38:1-16.

Baker M.A, Lane D.J, Ly J.D, De Pinto V and Lawen A (2004) VDAC1 is a transplasma membrane NADH-ferricyanide reductase. J. Biol. Chem. 279(6): 4811–4819.

Barrero R, Guerrero F, Black M, et al., (2017) Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. Australian Society for Parasitology. 15:1-15.

Bastos R. G, Ueti M. W, Knowles D. P and 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. Parasit. Vectors 3:111.

Becker T and Wagner R (2018) Mitochondrial Outer Membrane Channels: Emerging Diversity in Transport Processes. BioEssays. 1800013:1-8.

Beek A, Sarr I, Correa S, et al., (2018) Complement Factor H Levels Associate With *Plasmodium falciparum* Malaria Susceptibility and Severity. Open Forum Infectious Diseases. 1-6.

Benavides-Ortiz E, Romero-Prada y Villamil-Jiménez L.C (2016) Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). ISBN: 978-92-9248-655-6.

Bock R, Jackson L, De Vos A and Jorgensen W (2004) Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129:247-269.

Bohaliga G, Johnson W, Taus N, Hussein H, Bastos R, Suarez C, Scoles G and Ueti M (2019) Identification of proteins expressed by *Babesia bigemina* kinetes. *Parasites Vectors*. 12:271-279.

Boldbaatar D, Battsetseg B, Matsuo T, Hatta T, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X., et al., (2008) Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of *Babesia* parasite. *Biochem. Cell Biol.* 86, 331–344.

Borgnia M, Nielsen S, Engel A and Agre P (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem.* 68:425-58.

Bouyer G, Cueff A, Egée S, Kmiecik J, Maksimova Y, Glogowska E, Gallagher PG, and Thomas S.L (2011) Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood*. 118:2305-2312.

Boya P, Roques B and Kroemer G (2001) Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *The EMBO Journal*. 20(16): 4325-4331.

Brayton K, Audrey O. T, David R. Herndon, Hannick L, Lowell S. Kappmeyer, Shawn J. Berens, Shelby L. Bidwell, Wendy C. Brown, Crabtree J, Fadrosch D, Feldblum T, Heather A. Forberger, et al., (2007) Genome Sequence of *Babesia bovis* and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotozoa. *PLoS Pathog* 3(10):148.

Brown W.C and Palmer G.H (1999) Designing Blood-stage Vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology today*. 15(7):275-281.

Brown W.C, Norimine J, Knowles D and Goff W (2006) Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology* 138:75–87.

Camara A, Zhou Y, Wen P, Tajkhorshid E and Kwok W (2017) Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Frontiers in Physiology*. 8(460):1-18.

Celkan T (2016) Plasminogen deficiency. *J Thromb Thrombolysis*. 43(1):132-138.

Cen-Aguilar J.F, Rodríguez-Vivas R.I, Domínguez-Alpizara J.L and G.G. Wagner G.G (1998) Studies on the effect of infection by *Babesia spp.* On oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 78:253-257.

Centers for Disease Control and Prevention.
<https://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>. Último acceso 07/12/19.

Chakraborty S, Roy S, Mistry H, Murthy S, George N, Bhandari V and Sharma P (2017) Potential Sabotage of Host Cell Physiology by Apicomplexan Parasites for Their Survival Benefits. *Frontiers in immunology*. 8(1261):1-15.

Cooke B. M, Stuart J. and Nash G. B (2014) The cellular and molecular rheology of malaria. *Biorheology*. 51:99–119.

Da Silva W. S, Gomez-Puyou A, De Gomez-Puyou M. T, Moreno-Sanchez R, De Felice F. G, De Meis L, et al., (2004) Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J. Biol. Chem*. 279:39846–39855.

Daley D.O (2008) The assembly of membrane proteins into complex. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 18(4):420-424.

Das S, Wong R, Rajapakse N, Murphy E and Steenbergen C (2008) Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Slows Mitochondrial Adenine Nucleotide Transport and Regulates Voltage-Dependent Anion Channel Phosphorylation. *Circ Res*. 103:983-991.

De la Fuente J y Contreras M (2015) Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev. Vaccines* 1–10.

De la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal J, et al., (2008) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci*.13:6938-46.

De la Fuente J, Kocan K.M and Contreras M (2015) Prevention and control strategies for ticks and pathogen transmission. *Rev. Sci. Tech. Off.* 34(1): 249-264.

De la Fuente J, Moreno-Cid JA, Galindo RC, Almazan C, Kocan KM, Merino O, Perez de la Lastra JM, Estrada-Peña A and Blouin EF (2013) Subolesin/Akirin vaccines for the control of arthropod vectors and vector borne pathogens. *Transboundary and Emerging Diseases*. 60(2):172–178.

De Pinto V, Messina A, Lane D and Lawen A (2010) Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS Letters* 584:1793–1799.

Domingos A, Antunes S, Borges L and Estólio do Rosário V (2013) Approaches towards tick and tick-borne diseases control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46(3):265-269.

Erlitzki N, Huang K, Xhani S, Farahat A, Kumar A, Boykin D.W and Poon G.M (2017) Investigation of the electrostatic and hydration properties of DNA minor groove-binding by a heterocyclic diamidine by osmotic pressure. *Biophys Chem*. 231:95-104.

Estrada-Peña A, García Z and Fragoso-Sánchez H (2006) The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Experimental and Applied Acarology*. 38:307–316.

Evans PD and Gee JD (1980) Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature*. 287(5777): 60-62.

Fan J, Rone M.B and Papadopoulos V (2009) Translocator protein 2 is involved in cholesterol redistribution during erythropoiesis. *The Journal of biological chemistry* 284:30484-30497.

Feng S, Zhou L, Huang C, et al., (2015) Interactomics: toward protein function and regulation. *Expert Rev Proteomics*. 12(1):37-60.

Figueroa J.V, Chieves L.P, Johnson G.S, Go W.L and Buening, G.M (1994) Polymerase chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. *Rev. Latinoam. Microbiol*. 36:47–55.

Florin-Christensen M, Suarez C, Rodriguez A, Flores D and Schnittger L (2014) Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*. 141:1563–1592.

Fongsaran C, Phaonakrop N, Roytrakul S, Thepparit C, Kuadkitkan A and Smith D (2014) Voltage Dependent Anion Channel Is Redistributed during Japanese Encephalitis Virus Infection of Insect Cells. *Scientific World Journal*. 976015:1-10.

Ganzinelli S, Rodriguez A, Schnittger L and Florin-Christensen M (2018) *Babesia* in Domestic Ruminants. Chapter 9. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018. 215-239.

Ghosh A. K, Coppens I, Gardsvoll H, Ploug M and Jacobs-Lorena M (2011) *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:17153–17158.

Goff W.L, McElwain T.F, Suares C.E, Johnson W.C, Brown W, Norimine J and Knowles D.P (2003) Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:38–43.

Gomes-Solecki M (2014) Blocking pathogen transmission at the source: reservoir targeted OspA-based vaccines against *Borrelia Burgdorferi*. *Front Cell Infect Microbiol.* 4:136.

Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson C, Gawdi G and Pizzo S (2003) The Voltage-dependent Anion Channel Is a Receptor for Plasminogen Kringle 5 on Human Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:(29): 27312–27318.

Gonzalez-Gronow M, Ray R, Wang F and Pizzo S.V (2013) The voltage-dependent anion channel (VDAC) binds tissue-type plasminogen activator and promotes activation of plasminogen on the cell surface. *J. Biol. Chem* 288:498–509.

Gray, J. S and Murphy T.M (1985) Bovine babesiosis in Ireland. *Ir Vet News*. 9-14.

Guerrero F, Moolhuijzen P, Peterson D.G, Bidwell S, Caler E, Bellgard M, Nene V and Djikeng A (2010) Reassociation kinetics-based approach for partial genome sequencing of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. BMC Genomics. 11:374-382.

Guglielmone A.A, Gaido A.B and Mangold A.J (1996) Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. Vet. Parasitol.61:15–20.

Hoener M, Stieger S and Brodbeck U (1990) Isolation and characterization of a phosphatidylinositol-glycan-anchor-specific phospholipase D from bovine brain. Eur. J. Biochem. 190:593-601.

Holden M.J and Colombini M (1993) The outer mitochondrial membrane channel, VDAC, is modulated by a protein localized in the intermembrane space. Biochim. Biophys.1144(3):396–402.

Homer M.J, Aguilar-Delfin, Telford S.R, Krause P and Persing D (2000) Babesiosis. Clinical Microbiology Reviews 13(3):451–469.

Howell J.M, Ueti M.W, Palmer G.H, Scoles G.A and Knowles D.P (2007) Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. J. Clin. Microbiol. 45:3155–3159.

<https://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/babesia-bigemina.html>.

Último acceso 15/12/2019.

Hunke S and Müller V.S (2012) Approaches to Analyze Protein-Protein Interactions of Membrane Proteins. Molekulare Mikrobiologie. Cap 17. 327-348.

Hussein H, Scoles G, Ueti M, Suarez C, et al., (2015) Targeted silencing of the Aquaporin 2 gene of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* reduces tick fitness. Parasites & Vectors. 8:618-630.

Itoh H, Ide H, Kataoka H, Tomita M, Yoshihara H and Nawa Y (1994) cDNA Sequencing of Mouse α -Microglobulin/Inter- α -Trypsin Inhibitor Light Chain and Its Expression in Acute Inflammation. J. Biochem. 116:767-772.

Jackson A.P, Otto T.D, Darby A, Ramaprasad A, Xia D, Echaide I.E, Farber M, Gahlot S, Gamble J, Gupta D, Gupta Y, Jackson L, Malandrin L, Malas T, Moussa E, Nair M, Reid A.J, Sanders M, Sharma J, Tracey A, Quail M.A, Weir W, Wastling J.M, Hall N, Willadsen P, Lingelbach K, Shiels B, Tait A, Berriman M, Allred D.R and Pain A (2014) The evolutionary dynamics of variant antigen genes in *Babesia* reveal a history of genomic innovation underlying host–parasite interaction. *Nucleic Acids Research* 42(11):7113-7131.

Jaramillo O.J.M, Montenegro V.N, Fournière S.A.M, Sarmiento N.F, Farber M.D and Wilkowsky, S (2018) Development of an indirect ELISA based on a recombinant chimeric protein for the detection of antibodies against bovine babesiosis. *Vet. Sci.* 5:13.

Jitobaom K, Tongluan N and Smith D (2016) Involvement of voltage-dependent anion channel (VDAC) in dengue infection. *Scientific Reports.* 6:1-12.

Jongejan F and Uilenberg G (1994) Ticks and control methods. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 13 (4); 1201-1226.

Jonsson N.N. (1997) Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. *Australian Veterinary Journal.* 75(11): 882-886.

Jura N, Xuewe Z, Nicholas E, Markus A, et al., (2011) Catalytic control in the EGF receptor and its connection to general kinase regulatory mechanism. *Mol. Cell.* 42(1):9-12.

Kmita H, Budzinska M and Stobienia O (2003) Modulation of the voltage-dependent anion-selective channel by cytoplasmic proteins from wild type and the channel depleted cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochimica Polonica.* 50(2): 415-424.

Laha R, Das M and Sen A (2015) Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. *Trop. Parasitol.* 5:94–100.

Lambertz C, Chongkasikit N, Jittapalapong S and Gauly M (2012) Immune Response of *Bos indicus* Cattle against the Anti-Tick Antigen Bm91 Derived from

Local *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks and Its Effect on Tick Reproduction under Natural Infestation. Journal of Parasitology Research. 9:1-10.

Levine N.D. (1982) Apicomplexa: Synopsis and classification of living organisms. MacGraw-Hill Book Co. Vol II: 571-587.

Lew-Tabor A.E and Rodriguez-Valle M.A (2016) Review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick-borne diseases. Ticks Tick Borne Dis. 7:573–585.

Li-Li Feng, Lei Liu and Tian-Yin Cheng (2019) Proteomic analysis of saliva from partially and fully engorged adult female *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology. 78:443–460.

Lisanti M.P, Scherer P.E, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski-Vosatka A, Tu Y.H, Cook R.F and Sargiacomo, M (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source. Implications for human disease. J. Cell. Biol. 126 (1):111–126.

Lobo C, Rodriguez M and Cursino-Santos J. (2012) Babesia and red cell invasion. Curr Opin Hematol. 19(3):170-5.

MacDonald JM (1995) Flea control: an overview of treatment concepts for North America. Vet Dermatol 6(3): 121-130.

Marginedas-Freixa I, Hattab C, Bouyer G, Halle F, Chene A, Lefevre S.D, Cambot M, Cueff A, Schmitt M, Gamain B, Lacapere J, Egee S, Bihel F, LeVan Kim C and Ostuni M.A (2016) TSPO ligands stimulate ZnPPiX transport and ROS accumulation leading to the inhibition of *P. falciparum* growth in human blood. Scientific Reports. 6:1-15.

Mehlhorn H (1984) The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. ADVANCES IN PARASITOLOGY VOLUME 23 ISBN 0-12-031723-0:37-103.

Miller R.J, Davey R.B and George J.E (1999) Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 36:533–538.

Moon J. I, Jung Y. W, Ko B. H, De Pinto V, Jin I and Moon I. S (1999) Presence of a voltage-dependent anion channel 1 in the rat postsynaptic density fraction. *Neuroreport* 10:443–447.

Morgenstern M, Stiller S, Leubbert P, et al., (2017) Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Reports* 19:2836–2852.

Mosqueda J, Falcon A, Alvarez J.A, Ramos J.A, Oropeza-Hernandez L.F and Figueroa J.V (2004) *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *International Journal for Parasitology*. 34:1229–1236.

Mosqueda J, Nerib A, Ramos-Aragónb J, Canto-Alarcóna G, Camacho-Nuez M (2012) Genome and molecular strategies for *bovine babesiosis* control. *Rev Mex Cienc Pecu* 3:51-59.

Mosqueda J, Olvera-Ramírez A, Aguilar-Tipacamú G and Cantó G.J (2012) Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*. 19:1504-1518.

Mukhopadhyay S, Kuhn R. J and Rossmann M. G (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Micro* 3:13–22.

Muller A, Rassow J, Grimm J, Machuy N, Meyer T and Rudel T (2002) VDAC and the bacterial porin PorB of *Neisseria gonorrhoeae* share mitochondrial import pathways. *The EMBO Journal*. 21(8):1916-1929.

Muñoz Tito (2016) Bovine Babesiosis (*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*), a disease hematozoa of economic importance in the world. *Centro de Biotecnología* 5(1): 21-30.

Newton W. H. Price M. A and Trevino J.L (1972) Chromosome patterns in Mexican *Boophilus annulatus* and *B. microplus*. *Ann. ent. Soc. Am. Madison*. 65(2):508-512.

Norma Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994, Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp.*

Noskov S, Rostovtseva T, Chamberlin A, Teijido O, Jiang W, Bezrukov S (2016) Current state of theoretical and experimental studies of the voltage-dependent anion channel (VDAC). *Biochimica et Biophysica Acta* 1858:1778–1790.

O'Connor R.M, Lane T.J, Stroup S.E, Allred D.R (1997) Characterization of a variant erythrocyte surface antigen (VESA1) expressed by *Babesia bovis* during antigenic variation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89:259-270.

Oliveira-Sequeira T.C.G, Oliveira M.C.S, Araujo, J.P and Amarante A.F.T (2005) PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int. J. Parasitol.* 35:105–111.

Ortega-Sánchez R, Camacho-Nuez M, Castañeda-Ortíz J.E, Martínez-Benítez M.B, Hernández-Silva D.J, Aguilar-Tipacamú G and Mosqueda J (2020) Vaccine efficacy of recombinant BmVDAC on *Rhipicephalus microplus* fed on *Babesia bigemina*-infected and uninfected cattle. *Vaccine* 1-8.

Palmieri F and Pierri C.L (2010) Mitochondrial metabolite transport. *Essays Biochem.* 47:37–52.

Paschen S, Neupert W and Rapaport D (2005) Biogenesis of b-barrel membrane proteins of mitochondria. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 30(10): 575-582.

Pastorino John and Jan B. Hoek (2008) Regulation of Hexokinase Binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr.* 40(3): 171–182.

Peel D.S, Johnson R.J and Mathews K.H (2010) Cow-Calf Beef Production in Mexico. A Report from the Economic Research Service. USDA. www.ers.usda.gov.

Pohl P.C, Klafke G.M, Carvalho D.D, Martins J.R, Daffre S, Silva Vr, et al (2014) ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J Parasitol.* 41(13-14): 1323-1333.

Rachinskya A, Guerrero F and Scoles G (2007) Differential protein expression in ovaries of uninfected and *Babesia* infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:1291–1308.

Raum D, Marcus D, Alper CA et al., (1980) Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208:1036–1037.

Riek R.F (1964) The life cycle of *Babesia bigemina* (smith & kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* 15:802-21.

Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J and Smit J (2010) Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:2773–2786.

Rodríguez-Hernández E, Mosqueda J, Alvarez-Sánchez M, Falcón A, Mendoza-Hernández G, Camacho-Nueza 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* 187:538– 541.

Rodríguez-Hernández E, Mosqueda J, León-Ávila G, Castañeda-Ortiz E, Álvarez-Sánchez ME, Camacho A, Ramos A and Camacho-Nuez M (2015) BmVDAC upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology* 212:368–374.

Rodríguez-Vivas R.I, Grisi L, Pérez de León A, Silva-Villela H, Torres-Acosta J, Fragoso-Sánchez H, Romero-Salas D, Rosario-Cruz R, Saldierna F and García-Carrasco D (2017) Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu* 8(1):61-74.

Rodríguez-Vivas RI, Grisi L, Pérez de León AA, Silva-Villela H, Torres-Acosta JFJ, Fragoso-Sánchez H, Romero-Salas D, Rosario-Cruz R, Saldierna F, García-Carrasco D (2017) Potential economic impact assessment for cattle parasites in México review. *Rev Mex Cienc Pec* 8(1):61–74.

Rojas-Martínez C, Rodríguez-Vivas R.I, Figueroa-Millán J.V, Bautista-Garfias C.R, Castañeda-Arriola R.O, Lira-Amaya J.J, Vargas-Urióstegui P, Ojeda-Carrasco J.J and Álvarez Martínez J.A (2018) Bovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured in vitro with a serum free médium. *Parasitology International* 67:190–195.

Rosario-Cruz R, Guerrero F.D, Miller R.J, Rodriguez-Vivas R.I, Tijerina M, Dominguez-Garcia D.I, Hernandez-Ortiz R, Cornel A.J, McAbee R.D and

Alonso-Diaz M.A (2009) Molecular survey of pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitol Res. 105:1145–1153.

Rostovtseva T and Bezrukov S (2012) VDAC inhibition by tubulin and its physiological implications. Biochimica et Biophysica Acta. 1818:1526–1535.

Sampson M.J, Lovell R.S, and Craigen W.J (1997) The Murine Voltage-dependent Anion Channel Gene Family Conserved Structure and Function. The journal of biological chemistry 272(30):18966–18973.

Scheffler I. E (2008) Mitochondria. John Wiley & Sons, New Jersey.

Schnittger L, Rodriguez A.E, Florin-Christensen M and Morrison D.A (2012) Babesia: A world emerging. Infection, Genetics and Evolution 12:1788–1809.

Schorderet-Weber S, Noack S, Selzer P, et al., (2017) Blocking transmission of vectorborne diseases. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 7(1):90-109.

Shakya M, Kumar M, Nagar G, De la Fuente J and Ghosh S (2014) Subolesin: A candidate vaccine antigen for the control of cattle tick infestations in Indian situation. Vaccine. 15334:1-7.

Sheldon K, Maldonado E, Lemasters J, Rostovtseva T and Bezrukov S (2011) Phosphorylation of Voltage-Dependent Anion Channel by Serine/Threonine Kinases Governs Its Interaction with Tubulin. PLoS ONE 6(10): e25539.

Shimizu S, Ide T, Yanagida T and Tsujimoto Y (2000) Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and VDAC, which is permeable to cytochrome c. J. Biol. Chem. 275: 12321-12325.

Shimizu, S., Matsuoka Y, Shinohara Y, Yoneda Y and Tsujimoto Y (2001) Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. J. Cell Biol. 152:237–250.

Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N and Arbel N (2010) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. Molecular Aspects of Medicine 31:227–285.

- Shoshan-Barmatz V, Zakar M, Rosenthal K and Abu-Hamad S. (2009)** Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787:421–430.
- Silva M, Knowles D, Mazuz M, Cooke B & Suarez C (2018)** Stable transformation of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* using a single transfection plasmid. *Scientific Reports* 8:6096.
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Caffrey C, Mares C, and Kopa P (2013)** Trends in Parasitology. 29(6): 276-285.
- Sonenshine D and Hynes W (2008)** Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. Department of Biological Sciences, Old Dominion University, Norfolk, Virginia USA. 7046-7063.
- Sorgato M.C, Moran O and Pedersen P.L (2008)** Channels in Mitochondrial Membranes: Knowns, Unknowns, and Prospects for the Future. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 28(2):127-171.
- Sprong H, Azagi T, Hoornstra D, et al., (2018)** Control of Lyme borreliosis and other Ixodes ricinus-borne diseases. *Parasit Vectors.* 11(1):145.
- Suarez C.E, Bishop R.B, Alzan H.F, Poole W.A and Cooke B.M (2017)** Advances in the application of genetic manipulation methods to apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology* 47:701–710.
- Sugumar P, Chandran D, Rani G, Shahana P, et al., (2011)** Recombinant mid gut antigen (Bm95) as a vaccine against Indian *Rhiphicephalus haemaphysaloides* in *Bos indicus* cattle. *Research in Veterinary Science* 90:262–268.
- Tewari D, Ahmed T, Chirasani V, Singh P, Maji S, Senapati S and Bera A (2015)** Modulation of the mitochondrial voltage dependent anion channel (VDAC) by curcumin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1848:151–158.
- Thinnes F. P, Gotz H, Kayser H, Benz R, Schmidt W. E, Kratzin H. D, et al. (1989)** Identification of human porins. I. Purification of a porin from human B-lymphocytes

(Porin 31HL) and the topochemical proof of its expresión on the plasmalemma of the progenitor cell. Biol. Chem. 370: 1253–1264.

Trakkselis M.A, Alley S and Ishmael (2005) Identification and Mapping of Protein-Protein Interactions by a Combination of Cross-Linking, Cleavage, and Proteomics. Bioconjugate Chemistry. 16(4): 741-750.

Tsujimoto Y and Shimizu S (2010) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. Cell Death and Differentiation. 7:1174-1181.

Uilenberg G (2006) Babesia—A historical overview. Veterinary Parasitology 138:3-10.

Urbanowicz A, Lewandowski, Szpotkowski K and Figlerowicz M (2016) Tick receptor for outer surface protein A from *Ixodes ricinus*-the first intrinsically disordered protein involved in vector-microbe recognition. Sci. Rep. 6:25205.

Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, et al., (1996) In: Veterinary Protozoology, 2nd edition. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1996:239.

Vannier E, Diuk-Wasser M, Mamoun C and Krause P (2015) Babesiosis. Infect Dis Clin N Am. 29:357–370.

Vial H.J and Gorenflot A (2006) Chemotherapy against babesiosis. Veterinary Parasitology 138:147–160.

Voehringer D.W, Hirschberg D.L, Xiao J, Lu Q, Roederer M, Lock C.B, Herzenberg L.A and Steinman L (2000) Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 97(6):2680–2685.

Waal D and Combrink M (2006) Live vaccines against bovine babesiosis. Veterinary Parasitology 138:88–96.

Wagner G, Holman P and Waghela (2002) Babesiosis and heartwater: threats without boundaries. Vet Clin Food Anim 18:417–430.

Wake Hidenori (2019) Histidine-rich Glycoprotein Modulates the Blood-vascular System in Septic Condition. Acta Med. Okoyama 73(5):379-382.

Wang X, Xiao X.P, Bouchut A, Al-Khedery B, Wang H.B and Allreda D.R (2012) Characterization of the Unusual Bidirectional ves Promoters Driving VESA1 Expression and Associated with Antigenic Variation in *Babesia bovis*. Eukaryotic Cell 11(3):260-269.

Young M, Bay D, Hausner G and Court D (2008) The evolutionary history of mitochondrial porins. BMC Evolutionary Biology 7:31.

Yu W.H, Wolfgang W and Forte M (1995) Subcellular localization of human voltage-dependent anion channel isoforms. J. Biol. Chem. 270(23):13998–14006.

Zaid H, Abu-Hamad S, Israelson A, Nathan I and Shoshan-Barmatz V (2005) The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death. Cell Death Differ. 12:751–760.

Zalk R, Israelson A, Garty E.S, Azoulay-Zohar H and Shoshan-Barmatz V (2005) Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria, Biochem. J. 386:73–83.

Zintl A, Mulcahy G, Skerrett H, Taylor S and Gray J (2003) *Babesia divergens*, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. Clinical Microbiology Reviews. 16(4):622–636.