CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C.

ANÁLISIS FUNCIONAL PRELIMINAR DE UN CANAL DE CLORO MODULADO POR LIGANDO, EN LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO

ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y

TECNOLOGÍA

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA

PRESENTA

QFB. CARLA PATRICIA BARRAGÁN

ÁLVAREZ

GUADALAJARA, JAL. DICIEMBRE 2016





CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco a 01 de Diciembre del 2016

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO

INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado del estudiante **QFB. Carla Patricia Barragán Álvarez**, una vez leída y revisada la Tesis titulada "ANÁLISIS FUNCIONAL PRELIMINAR DE UN CANAL DE CLORO MODULADO POR LIGANDO, EN LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología Productiva durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día primero del mes de Diciembre del año 2016

Dr. Carlos Barajas López

M.C. Flor Yohana Flores Hernández

Presidente

Secretario

Dr. Moisés Martínez Velázquez

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al fondo institucional del CONACYT (FOINS), por al apoyo otorgado al proyecto PDCPN 2013-01-216321, de la convocatoria denominada "Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales, 2013".

Al Fondo Sectorial de Innovación (FINNOVA) en la convocatoria 2013-04, No. de proyecto 225275.

CONACYT- Programa de Estancias Sabáticas Nacionales, Estancias Sabáticas al Extranjero y Estancias cortas para la consolidación de grupos de Investigación 2014-246310.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado como parte de la Convocatoria de Becas Nacionales 2014 Segundo Periodo. No. de becario: 339880.

Al PYCYT por el apoyo otorgado durante el programa de Maestría en Ciencia y Tecnología (2014-2016).

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por que fue en esta institución que pude desarrollarme profesionalmente, por medio de mi proyecto de Maestría en Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, el Dr. Moisés Martínez Velázquez, que me permitió ser parte de su grupo de trabajo y me brindó la oportunidad de desarrollar mi proyecto de Maestría.

A mi amigo el Dr. José Miguel Flores Fernández por su todo su apoyo y consejo durante el desarrollo de mi Tesis.

Al Dr. Eduardo Padilla Camberos por brindarme no sólo su amistad, si no también apoyo para poder llevar a cabo este proyecto.

Agradezco a mis tutores y asesores, que me compartieron sus conocimientos y me guiaron en vías de un mejor desempeño en este trabajo, Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo, Dr. Abel Gutiérrez Ortega, M.C. Flor Yohana Flores Hernández, Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández, Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez y Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez.

En especial agradezco a las personas que me ofrecieron su apoyo académico y amistad durante mi estancia en IPICYT, Dr. Carlos Barajas López, Enf. Rosa Espinosa Luna, Karen, Mariela, Flor, Lili, Cris, Jess, Gaby y Sra. Rosi. Gracias por su invaluable ayuda.

Gracias a Karla Pacheco, que más que mi amiga la considero una hermana, ya que me ha acompañado en los mejores y peores momentos. A Lizeth Barrientos, gran amiga y ser humano, que me motiva y aconseja para que sea mejor día a día.

A mis amigos que me acompañaron en este periodo de mi vida durante mi estancia en CIATEJ, con quienes he compartido bellos momentos, gracias por su ayuda, ocurrencias y aventuras a todo el barrio del ala sur, Alma, Vero, Chris, Rito, Iván, Óscar, Diego, Lalo, Adri, Pao, Paty y Mario.

Gracias también por su amistad a Lupita, Jessy, Dani y Paula.

DEDICATORIAS

Me tomo la libertad de dedicar en primera instancia este trabajo a Dios, porque sé que él fue quien me guió para seguir este camino de la ciencia que tanto me apasiona. Agradezco a Dios por permitirme vivir y vivir este sueño, que me inspira a lograr todas aquellas metas que he tenido desde niña, aunado a aquellas que voy fomentando día a día.

Dedico mi trabajo y esfuerzo a mi familia, por la que me motivo a ser mejor persona, una mujer de la que puedan sentir orgullo el día de mañana.

A mi padre que siempre creyó en mí y me impulsó a ser una mujer fuerte que lucha por sus sueños y que nunca se conforma. A pesar de su ausencia física, sé que desde el cielo me envía sus bendiciones; su ejemplo y palabras de aliento siempre me acompañan y me impulsan a no desistir a pesar de los tiempos difíciles.

A mi madre por su amor, confianza y apoyo incondicional en mis decisiones. Gracias mamá por creer en mí, acompañarme en todo momento, mostrarme con tu ejemplo de fortaleza, trabajo duro y constancia, que todo es posible. Te dedico este y otros proyectos de vida que quiero compartir a futuro contigo.

A mi hermana Angélica, porque a pesar de los buenos y malos ratos que nos ha tocado vivir, siempre estás ahí, preocurándome. Nos tenemos la una a la otra y así será siempre. Gracias por traer bendiciones y alegría a la familia, al concebir a mis sobrinas Sofi y próximamente Monse.

A doña Silveria que a pesar de que ya no está con nosotros, cuando tuve la oportunidad de tenerla en mi vida me dio el mayor ejemplo de fortaleza, alegría y ganas de vivir. Excelente ser humano que siempre será un ejemplo para mí.

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus microplus*, es considerada como el ectoparásito de mayor importancia a nivel mundial; afecta a la industria ganadera en zonas tropicales y subtropicales, generando pérdidas económicas importantes. Además, es vector de los agentes causales de las enfermedades babesiosis y anaplasmosis. A pesar de los esfuerzos actuales para controlar la plaga, sigue implicando un problema que afecta gran parte del territorio nacional. El principal método de control de la garrapata es la aplicación de acaricidas químicos, como son los compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas, piretroides y lactonas macrocíclicas. Sin embargo, el uso indiscriminado de acaricidas ha generado poblaciones de garrapatas resistentes en diferentes regiones del mundo. Dentro del grupo de las lactonas macrocíclicas usadas en el control de la garrapata, se encuentra la Ivermectina (IVM). La IVM actúa modulando alostéricamente receptores específicos de neuronas motoras periféricas de parásitos, activa canales iónicos de cloro regulados por ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato y glicina, causando parálisis de la función motora, inhibición de la alimentación, reproducción y finalmente la muerte.

En la garrapata *R. microplus* sólo se han caracterizado molecular y funcionalmente dos receptores que forman canales iónicos de cloro, un receptor GABA y un canal de cloro activado por glutamato (GluCl). Hallazgos recientes muestran la expresión de un gen que codifica para un receptor tipo glicina (RmGlyR) en la garrapata *R. microplus*, el cual presenta características comunes a las subunidades de la familia de receptores Cys-loop que conforman los canales iónicos pentaméricos modulados por ligando (pLGICs). El polipéptido caracterizado, aparentemente no predice péptido señal y conserva un residuo de glicina en el tercer dominio transmembranal (Flores y cols. 2014), el cual es esencial para una alta sensibilidad a IVM.

En el presente trabajo se reporta la caracterización molecular de una variante del gen de este receptor tipo glicina (RmGlyRv), que guarda identidad del 92 % con el receptor previamente reportado; sin embargo, se encontraron variaciones específicas en el extremo 5[′], como lo es



la predicción de péptido señal y cambios de algunos aminoácidos. Los resultados mostraron que la secuencia cuenta con un marco de lectura abierto de 1401 pb que codifican para 467 aminoácidos, no contiene metionina como codón inicial y conserva características propias de una subunidad de la familia de receptores Cys-loop. Adicionalmente presenta un residuo de glicina en el tercer paso transmembranal necesario para la selectividad a IVM. Así mismo, se muestra su expresión en diferentes estadios de desarrollo de la garrapata *R. microplus*.

Se realizó la expresión heteróloga en ovocitos de rana *Xenopus leavis*, de las variantes del receptor putativo de glicina, y se hizo el registro de corrientes al aplicar los agonistas GABA, glicina y glutamato, mostrando bajas corrientes al aplicar el agonista glutamato y sin cambios en la corriente, al co-aplicar el agonista alostérico IVM. Por lo que se sugiere que el receptor no es capaz de formar un canal homomérico funcional.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ANTECEDENTES	1
Importancia de las garrapatas y la garrapata del ganado bovino <i>Rhipicep</i> <i>microplus</i>	ohalus (Boophilus) 1
Distribución geográfica y persistencia en México	
Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	5
Fase parasitaria	6
Fase no parasitaria	6
Neurobiología de la garrapata	
Región supra-esofágica	9
Región sub-esofágica	
Nervios pedales	
Zona cortical	
Nervios hemales y estructuras neurohemales	
Métodos de control de la garrapata	
Uso de productos químicos para el control de R. microplus	
Compuestos arsenicales	
Compuestos organoclorados	
Inhibidores de la acetilcolinesterasa	
Compuestos organofosforados	14
Carbamatos	
Piretroides	
Formamidinas	
Lactonas macrocíclicas	
Manejo de pastoreo y control biológico	
Desarrollo de vacunas	
Resistencia a agentes acaricidas	
Genoma de <i>R. microplus</i>	
Canales iónicos y Neurotransmisores inhibitorios	
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	
HIPÓTESIS	
OBJETIVOS	



Objetivo general	
Objetivos particulares	
MATERIALES Y MÉTODOS	
Recursos y análisis bioinformáticos	
Obtención de garrapatas y tejidos	
Tratamiento de huevos y extracción de ARN total	
Tratamiento de huevos	
Extracción de ARN total	
Síntesis de ADNc	
Caracterización del extremo 5' de la secuencia <i>RmGlyR</i> (KJ476181)	
Caracterización de la secuencia codificante completa, <i>RmGlyRv</i>	
Transformación de bacterias <i>E. coli</i>	
Extracción de ADN plasmídico y confirmación de transformantes	
Diseño de gen sintético de RmGlyR y clonación de la variante RmGlyRv	
Diseño de gen sintético de <i>RmGlyR</i>	
Amplificación y clonación de la variante <i>RmGlyRv</i>	
Ligación del fragmento	
PCR de colonia	
Extracción de ADN plasmídico utilizando midi prep	
Proliferación de la línea celular HEK 293	
Ensayos de transfección celular	
Estandarización de los ensayos de transfección	
Transfección celular, empleando las variantes del receptor tipo glicina <i>RmGlyR</i> y	RmGlyRv 47
Extracción de proteína de membrana de células HEK 293	
Extracción de proteína de membrana de ovocitos de rana Xenopus laevis	
Western blot	50
Western blot línea celular HEK 293	50
Western blot línea celular Ovocitos de rana Xenopus laevis	
Síntesis de ARNm In vitro	
Microinyección de ARNm y ensayos de voltage clamp	
Extracción y defoliculación de ovocitos	
Microinyección de ARNm	

iv

Registros electrofisiológicos	55
RESULTADOS	
Caracterización del extremo 5' de la secuencia <i>RmGlyR</i> (KJ476181)	
Identificación de la secuencia RmGlyRv, variante del receptor tipo de glicina	
Perfil de expresión de <i>RmGlyRv</i>	
Clonación de <i>RmGlyrRv</i>	66
Ensayos de transfección celular	67
Extracción de proteína de membrana, células HEK 293	71
Western blot línea celular HEK 293	71
Extracción de proteína de membrana, ovocitos de rana Xenopus laevis	
Western blot ovocitos de rana Xenopus laevis	73
Registros electrofisiológicos: Voltage Clamp	73
DISCUSIÓN	76
CONCLUSIONES	
PERSPECTIVAS	85
REFERENCIAS	76
ANEXOS	



ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>R. microplus</i> a nivel mundial
Figura 2. Esquema de la situación actual de la campaña en México para el control de la garrrapata <i>Boophilus sp.</i>
Figura 3. Ciclo de vida de la garrapata del ganado bovino <i>R. microplus</i>
Figura 4. Figura esquemática de una garrapata hembra repleta adulta (familia Ixodidae), alimentándose y en cópula con el macho
Figura 5. Diagrama esquemático del singanglion de R. microplus, vista lateral10
Figura 6. Diagrama que muestra una vista dorsal de la inervación por los nervios hemales y coxales, de las glándulas hipodermal y salival
Figura 7. Representación del sitio de unión de la Ivermectina
Figura 8. Representación de los residuos esenciales para la unión de IVM en su sitio de unión
Figura 9. Representación de la estructura de los receptores Cys-loop
Figura 10. Determinación del extremo 5´de la secuencia KJ47618157
Figura 11. Transformación de bacterias <i>E. coli</i> , con el producto del RACE 5´ y confirmación del inserto
Figura 12. Alineamiento de secuencia de aminoácidos del producto RACE 5´ clonado y secuenciado vs la secuencia previamente reportada KJ476181. *En la figura sólo se muestra el extremo 5´, la secuencia original reportada, cuenta con 257 AA más que no se muestran en la imagen
Figura 13. Gen sintético y confirmación de inserto
Figura 14. Alineamiento local de la secuencia KJ476181
Figura 15. Amplificación por PCR de la secuencia EST77721160
Figura 16. Amplificación y clonación de RmGlyRv
Figura 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducida de la variante del receptor tipo glicina de <i>R. microplus (RmGlyRv)</i>
Figura 18. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la secuencia deducida de la variante del receptor tipo glicina (<i>RmGlyRv</i>), los receptores de GlyR (KJ476181), GluCl (AHE41097) y GABA (AHE41094)
Figura 19. Predicción del péptido señal (A) y de las regiones transmembranales (B) de la variante del receptor tipo glicina (<i>RmGlyRv</i>)
Figura 20. Representación en 2D de la variante del receptor tipo glicina de la garrapata <i>R. microplus</i>
Figura 21. Expresión de la variante del gen <i>RmGlyRv</i> en diferentes etapas del desarrollo de <i>R</i> . <i>microplus</i>



Figura 22. Amplificación por PCR de la variante <i>RmGlyRv</i> , incluyendo los sitios de restricción HindIII y NotI	. 66
Figura 23. Amplificación y clonación de <i>RmGlyRv</i> en el vector de expresión pcDNA [™] 3.1/myc-His A	. 67
Figura 24. Estandarización de la transfección celular	. 69
Figura 25A . Representación de la transfección y selección las de células transfectadas con variantes del receptor tipo glicina (<i>RmglyR</i> y <i>RmglyRv</i>)	las . 70
Figura 25B. Representación de la transfección y selección de las células transfectadas con variantes del receptor tipo glicina (<i>RmglyR</i> y <i>RmglyRv</i>)	as . 70
Figura 26. Análisis de la expresión de proteínas en células HEK 293	. 71
Figura 27. Detección de la etiqueta de histidinas en la proteína del receptor tipo glicina (RmGlyR) en células HEK 293	. 72
Figura 28. Análisis de la expresión de proteínas en ovocitos de rana Xenopus laevis	. 72
Figura 29. Detección de la etiqueta de histidinas en la proteína del receptor tipo glicina en ovocitos de rana <i>Xenopus laevis</i>	. 73
Figura 30. Registro de corrientes en ovocitos de rana Xenopus laevis.	. 74
Figura 31 . Representación de las cinéticas de los receptores, después de la aplicación de glutamato 100 mM durante 5 y 10 segundos. Las barras sólidas indican la aplicación del glutamato	75
Figure 32 Sitios de unión del agonista glutamato	. 75
Figura 32. Sitios de union del agonista giutaniato. Figura 33. Mutaciones en el modelo GluCL, AVR-14B, que confirman un modo de unión común en Ecdisozoos GluCLs.	. 79
Figura 34. Alineamieno de aminoácidos, de las secuencias RmGlyR, RmGlyRv y H.Conto	rtus
Glucl (Modelo AVR-14B).	. 80
Figura 35. Residuo de arginina en el sitio de unión, principal o complementario, que recom al grupo α-carboxilo del glutamato en Ecdisozoos GluCLs	эсе . 81



ANTECEDENTES

Importancia de las garrapatas y la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

A nivel mundial, las enfermedades parasitarias implican un grave problema que afecta la salud humana y animal. Los síntomas causados por las parasitosis, además de repercutir en la salud animal, interfieren en la productividad de éstos, generando pérdidas económicas importantes. Los parásitos pueden vivir dentro o fuera del cuerpo; las garrapatas son ectoparásitos y son los artrópodos de mayor importancia, puesto que son responsables de la transmisión de una amplia gama de agentes patógenos en humanos y animales domésticos. Las enfermedades transmitidas por garrapatas ocupan el cuarto sitio entre las infecciones presentes en el ganado y afectan a un 80% de la población mundial de ganado. Aproximadamente el 10% de las 867 especies de garrapatas que se conocen, actúan como vectores de patógenos, además del daño directo que causan, por su forma de alimentación (Mahar y cols., 2014; Rajput y cols., 2006).

Las garrapatas se encuentran en la subclase Acari y pertenecen al Phylum Artrópoda. Se clasifican en dos grandes familias, Ixodidae (garrapatas de cuerpo duro) y Argasidae (garrapatas de cuerpo blando), existe una tercera familia en la que se clasifican sólo a unas cuantas especies, la familia Nuttalliellidae. En términos generales, son ectoparásitos obligados, especializados en la succión de la sangre de sus hospederos; infestan de forma transitoria a mamíferos, aves y reptiles, principalmente. Se caracterizan dentro de los ácaros, por el tamaño de su cuerpo, que es relativamente grande y son capaces de ingerir enormes cantidades de sangre. Sus mudas o cambios de estadios se regulan de acuerdo a la ingestión de sangre, temperatura y la duración del día (Anderson, 2002; Rajput y cols., 2006). Su cuerpo está compuesto de una cabeza y tórax, los cuales se encuentran fusionados; cuentan con cuatro pares de patas. Tienen un órgano de alimentación especializado llamado hipostoma y una estructura quimiorreceptora en el primer par de patas denominada órgano de Haller (Anderson, 2002). La percepción sensorial de las garrapatas incluye visión y sonido

rudimentaria, pero cuentan con una sofisticada detección olfativa que les permite detectar kariomones y feromonas; esta capacidad se debe en gran medida a los órganos de Haller, presentes en la porción distal de las dos patas delanteras (Lees y Bowman, 2007).

La superficie exterior, o cutícula, de las garrapatas de cuerpo duro, crece para almacenar un gran volumen de sangre, el cual en las garrapatas hembras adultas, puede ser de 200 a 600 veces su peso corporal (Rajput y cols., 2006). Las hembras adultas repletas se desprenden del hospedero, por un tiempo prolongado para continuar con su ciclo y llevar a cabo la ovoposición de una gran cantidad de huevos, que puede ascender hasta 26,000 huevos por hembra (Lees y Bowman, 2007). Cabe mencionar que las garrapatas pueden sobrevivir largos periodos aún bajo condiciones de inanición (Rajput y cols., 2006).

Las garrapatas tienen una forma única y especializada de obtener sus nutrientes; se adhieren a la piel del hospedero mediante el uso de su hipostoma, que se ancla en la piel generando una lesión a través de la cual se alimenta de sangre, linfa y tejidos lisados. Durante la fase de la alimentación, la garrapata causa un daño directo a la piel del hospedero y en este punto se produce la transmisión de agentes patógenos, ya sea que los ingiera la garrapata desde el hospedero o los expulse en él (Anderson y Magnarelli, 2008; Kazimírová y Štibrániová, 2013). La ruta común de un patógeno dentro del vector es a través de la ingesta de sangre de un hospedero infectado, migra a través del intestino a la cavidad oral y entra a las glándulas salivales, donde se desarrolla y multiplica (Kazimírová y Štibrániová, 2013).

Un hospedero puede reaccionar a los daños en la piel causados por la presencia de la garrapata, activando mecanismos como la cascada de coagulación, vasoconstricción, respuesta inflamatoria, entre otros, permitiendo así la cicatrización de la herida y la remodelación del tejido. Esto interrumpe la alimentación de la garrapata, sin embargo, la garrapata ha desarrollado mecanismos a través de su evolución para permanecer de forma exitosa en su anfitrión y poder alimentarse. La saliva de las garrapatas contiene moléculas biológicamente activas, con actividades antihemostática, anti inflamatoria, inmunosupresora y anticoagulante (Anderson y Magnarelli, 2008; Kazimírová y Štibrániová, 2013).

La garrapata *R. microplus* que pertenece a la familia Ixodidae, se considera como el ectoparásito de mayor importancia a nivel mundial, que afecta a la industria ganadera en zonas tropicales y subtropicales, generando pérdidas económicas importantes; se estima que las pérdidas anuales van de 2000 a 3000 millones de USD. Dentro de los daños que provoca este ectoparásito en los bovinos encontramos: pérdida de sangre, reducción en la ganancia de peso, disminución de la producción de leche, inmunosupresión y deterioro en las pieles. Además, es vector de agentes patógenos como lo son: *Babesia bovis, B. bigemina y Anaplasma marginale*, los cuales causan las enfermedades de babesiosis y anaplasmosis, respectivamente, conocidas también como "fiebre de las garrapatas"; estos padecimientos comprometen directamente la salud y productividad de los animales (Jonsson, 2006; Martinez-Velazquez y cols., 2011; Abbas y cols., 2014; SENASICA, 2016).

Distribución geográfica y persistencia en México

La distribución geográfica de muchas especies de garrapatas se concentra principalmente en zonas tropicales y subtropicales; sin embargo, en los últimos años se ha observado una variación en esta distribución, sobre todo hacia el norte y altitudes mayores, influenciado por factores como el cambio climatológico, modificaciones del hábitat y la globalización humana. Se sabe que cambios en la distribución de estos ectoparásitos en sitios donde no se encontraban anteriormente, conlleva consecuencias negativas, dentro de las que se destacan las modificaciones en las características ecológicas, tanto de las especies que llegan a la zona, como de las endémicas, así como la emergencia de enfermedades en humanos y animales, transmitidas por estos vectores (Léger y cols., 2013).

La distribución geográfica de *R. microplus* inicialmente se limitaba a países asiáticos, principalmente en India e Indonesia, sin embargo, ha tenido una gran expansión a nivel mundial en los últimos 150 años, y actualmente se extiende por el trópico y los cinturones subtropicales (Fig.1). Dentro de los factores que han favorecido el incremento de la incidencia de este ectoparásito, se encuentra la introducción de ganado europeo (*Bos taurus*)

a zonas tropicales, ya que es más susceptible a esta plaga, a diferencia del ganado de zonas tropicales, que es capaz de generar respuesta inmune contra *R. microplus*, haciéndolo menos susceptible a la infestación. Otro factor que beneficia el incremento en su distribución es su tipo de ciclo de vida. También se puede atribuir su persistencia a la facilidad de adaptación a nuevos hospederos y el incremento de poblaciones resistentes a una amplia gama de agentes acaricidas (Léger y cols., 2013).

Debido a la importancia económica y sanitaria que tiene la garrapata *R. microplus* existe una campaña en México que se avoca principalmente al control de esta especie, observándose que, a pesar de los esfuerzos para controlar la plaga, sigue implicando un problema que afecta gran parte del territorio nacional (SENASICA 2016).

"La fase libre ocupa una porción importante del norte del país, así como áreas del centro; comprende 94.4 millones de hectáreas, las cuales equivalen al 47.88% del territorio nacional. Las zonas en fase de erradicación cuentan con 1.1 millones de hectáreas que se ubican en las áreas en las cuales el parásito ha sido eliminado por efectos de la campaña y representan un 0.57%. Las áreas en fase de control en este momento alcanzan una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país" (Fig. 2) (SENASICA, 2016).



Figura 1. Distribución geográfica de *R. microplus* a nivel mundial. Se distribuye en zonas tropicales y subtropicales. Se resaltan en color negro los países afectados por este ectoparásito, con recientes reportes en África occidental, englobados en un círculo (Figuar tomada de Léger y cols., 2013).



Figura 2. Esquema de la situación actual de la campaña en México para el control de la garrapata *Boophilus sp*. En color amarillo se muestran las zonas donde se ha erradicado el parásito, en color verde las zonas libres del parásito y en color rojo las zonas en fase de control (Figura tomada de SENASICA 2016).

Ciclo de vida de R. microplus

El ciclo de vida de este ectoparásito consta de 4 etapas de desarrollo, el huevo y 3 estadios parasitarios activos: larva, ninfa y adulto (macho y hembra) (Sonenshine y Roe, 2014).

R. microplus es un ejemplo de las garrapatas que tienen un número reducido de posibles hospederos, ya que se alimenta casi exclusivamente de ganado bovino y otros rumiantes; esta garrapata se desarrolla en un solo hospedero, es decir, que todas las etapas de vida parasitaria permanecen en el mismo hospedero. A las garrapatas de cuerpo duro, como lo es *R. microplus*, les toma días completar su alimentación y sólo se alimentan una vez por un tiempo prolongado en cada una de sus etapas de desarrollo (Anderson y Magnarelli, 2008; Kazimírová y Štibrániová, 2013; Léger y cols., 2013).

El ciclo de vida de este ectoparásito se desarrolla en dos fases, una sobre el hospedero (fase parasitaria) y otra de forma libre (fase no parasitaria), puesto que la oviposición de la hembra es fuera del mismo (Fig. 3) (Urdaz-Rodriguez, 2007).

Fase parasitaria

Las larvas de *R. microplus*, que tienen 6 patas, se adhieren al bovino y sufren 2 mudas sobre éste, hasta que se convierten en un adulto sexualmente diferenciado de 8 patas. La fase parasitaria se completa en un periodo de 25 a 30 días, sin embargo, la duración de esta etapa se ve directamente afectada por las condiciones ambientales. Las larvas que se adhieren al animal comienzan a alimentarse por un periodo de 4 a 8 días para llegar a estar repletas. En el día 9 se da la primera muda de larva a ninfa y emerge contando ya con 8 patas. Las ninfas buscan un nuevo sitio para alimentarse durante 5 o 6 días más y una vez que se encuentran repletas, sufren la segunda muda que se produce entre el día 17 y 18, dando origen a una hembra o a un macho (Nuñez y cols., 1985; CFPH, 2007; Urdaz-Rodriguez, 2007; Léger y cols., 2013; SENASICA, 2016).

Las garrapatas adultas se aparean sobre el anfitrión; una vez que han sido fecundadas, continúan alimentándose cerca del sitio donde se alimentaban durante su estadio de ninfa, hasta estar completamente repletas, lo que ocurre del día 18 al 24. 12 horas antes de desprenderse, realizan una absorción rápida de sangre. La mayoría de la sangre que se consume en este tiempo de absorción rápida, es utilizada para la producción de vitelogenina y la maduración de los huevos. Después del desprendimiento inicia la fase no parasitaria. Los machos pueden sobrevivir durante 70 días, ya sea sobre el hospedero o fuera de él, en búsqueda de hembras no fecundadas o en la vegetación (Nuñez y cols.,1985; CFPH, 2007; Urdaz-Rodriguez, 2007; Léger y cols., 2013; SENASICA, 2016).

Fase no parasitaria

La fase no parasitaria comienza cuando la hembra adulta está completamente repleta y de forma espontánea se desprende del hospedero; busca sitios oscuros y protegidos para realizar la puesta de huevos. Esta fase consta de 4 etapas principales, pre-oviposición, oviposición, incubación/eclosión de los huevos y desarrollo de las larvas. Los procesos de esta fase

dependen directamente de las condiciones ambientales, incluyendo a la temperatura y la humedad. Las condiciones óptimas de humedad son mayores a 95 % y las de temperatura entre 24 y 27 °C. La fase no parasitaria se puede completar en aproximadamente 2 meses; sin embargo, si las condiciones no son las óptimas se puede extender hasta 6 meses (Nuñez y cols., 1985; Urdaz-Rodriguez, 2007).

El periodo de pre-oviposición puede durar de 2 a 40 días, mientras que el periodo de oviposición llega a tomar de 13 a 15 días; una garrapata repleta puede poner de 2,500 a 3,500 huevos y la hembra muere al finalizar la oviposición. Después de que los huevos han sido depositados en el ambiente, el tiempo de incubación varía de 14 a 114 días, considerándose que el tiempo regular de incubación oscila entre los 30 y 33 días (Nuñez y cols., 1985; Urdaz-Rodriguez, 2007).

Una vez que se lleva a cabo la eclosión, de los huevos emergen larvas de vida libre que tienen un tamaño aproximado de 500 μ m de largo, por 400 μ m de ancho, con forma ligeramente ovoide y 3 pares de patas; éstas se arrastran por el pasto para adherirse a su hospedero. Son muy activas e inmediatamente buscan al hospedero adecuado y una vez que lo encuentran, comienzan a escalarlo (Nuñez y cols., 1985; Urdaz-Rodriguez, 2007).

Gracias a este tipo de ciclo de vida, *R. microplus* tiene la capacidad de generar un incremento considerable de población de garrapatas en poco tiempo, cuando se encuentra en el hospedero adecuado (CFPH, 2007; Léger y cols., 2013; SENASICA, 2016).



Figura 3. Ciclo de vida de la garrapata del ganado bovino *R. microplus* (Nuñez y cols., 1985; Sonenshine y Roe, 2014).

Neurobiología de la garrapata

El sistema nervioso central de las garrapatas está compuesto por una masa de nervios fusionada, a la cual se le denomina singanglion. Y es a partir de este órgano que emergen los nervios periféricos, de los que surgen a su vez numerosos ganglios que inervan a los apéndices, los músculos, las estructuras sensoriales, el integumento, las glándulas salivales y los órganos internos. El tamaño de este órgano en garrapatas adultas oscila de 300 a 500 µm de largo y de 275 a 550 µm de ancho, sin existir variaciones de tamaño entre una garrapata sin alimentar y una alimentada. La disposición del singanglion prácticamente es igual en los tres taxones de garrapatas (Lees y Bowman, 2007; Roma y cols., 2012; Sonenshine y Roe, 2014).

El singanglion se encuentra dentro de una cavidad llamada seno perigangliónico, ubicada en la parte dorsal del conducto genital y ventral de la glándula salivaria, aproximadamente entre el primer y segundo par de patas. Se encuentra cubierto por una envoltura vascular, que es continua a la aorta y el corazón de las garrapatas, conocida como envoltura perigangliónica,

que rodea al seno periganglionar, y permite que el singanglion sea suplementado con hemolinfa recién filtrada desde el corazón. El esófago atraviesa el singanglion y lo divide en dos regiones, la región supra-esofágica y la región sub-esofágica (Fig. 4) (Lees y Bowman, 2007; Roma y cols., 2012; Sonenshine y Roe, 2014).

Región supra-esofágica

La porción supra-esofágica es la más pequeña de las dos, contiene un único protocerebro con cuatro pares de glomérulos, asociados con los lóbulos ópticos, un ganglio queliceral y un solo puente estomodeo (Fig. 5 y 6). En esta región se puede apreciar una larga masa dorsal de neuropilo poco organizado y con pequeñas áreas de glomérulos. Éstas están enlazadas por tractos de fibras dirigidos transversalmente, los cuales conectan de forma bilateral glomérulos opuestos conocidos como comisuras, y conectores que son dirigidos longitudinalmente en tractos de fibras que contienen glomérulos dispuestos en el eje anteroposterior. Dichas comisuras y conectores están unidas al glomérulo y los nódulos glomerulares en todo el singanglion (Lees y Bowman, 2007; Roma y cols., 2012).



Figura 4. Figura esquemática de una garrapata hembra repleta adulta (familia Ixodidae), alimentándose y en cópula con el macho. En la imagen se muestra la posición de los órganos internos de la garrapata hembra; se resalta en color rojo el singanglion que se encuentra unido al esófago (Figura tomada de Lees y Bowman, 2007).

Región sub-esofágica

Por otro lado, la región sub-esofágica, que constituye la parte más larga del singanglion, contiene una porción de una red céntrica de comisuras y conexiones, donde se sitúa un par de ganglios palpales, asociado con los lóbulos olfatorios y el primer ganglio pedal, cuatro pares de ganglios pedales y un solo ganglio opistosoma (Fig. 5) (Szlendak y Oliver, 1992; Lees y Bowman, 2007). Los cuatro pares de ganglios pedales, de forma individual, dan lugar a los nervios pedales que inervan a los cuatro pares de patas, y hacia el extremo caudal, un par de ganglios viscerales. En esta zona también se encuentra un par de lóbulos, conocidos como ganglios olfatorios, localizados en el ganglio medial del pedal I, el cual se cree que recibe a los axones de la estructura quimiorreceptora (órgano de Haller) (Lees y Bowman, 2007).



Figura 5. Diagrama esquemático del singanglion de *R. microplus*, vista lateral (Figura tomada de Binnington y Stone, 1977; Nuñez y cols., 1985).

El resto del sistema nervioso está compuesto de neuronas y los órganos que constituyen la corteza, mientras que el neuropilo se compone de sus correspondientes dendritas y axones (Roma y cols., 2012).

Un estudio realizado por Binnington (1981), describe la distribución proximal y distal de los nervios periféricos en *R. microplus* Canestrini, haciendo énfasis en los músculos coxales y en la glándula de inervación salivaria. Se describen las siguientes estructuras:

Nervios pedales

Los nervios de los troncos pedales contienen senos formados por extensiones de la cubierta que rodea al singanglion, y continúan con el seno anterior y el dorsal (o aorta), este último está conectado al corazón. Los troncos pedales contienen un gran número de fibras, que probablemente son los axones de los receptores sensoriales y el motor que suministra a los músculos intrínsecos de las piernas. Las ramas de los troncos pedales inervan a los músculos coxales, los músculos dorso-ventrales y la hipodermis (Fig. 6) (Binnington, 1981).

Zona cortical

El singanglion está apropiadamente cubierto por un neurilema acelular de 1.5 a 3.5 µm de espesor, que comprende capas repetitivas de láminas finas y el material granular, situada justo debajo de la vaina preganglionar. El interior del singanglion se subdivide en (a) una zona cortical externa (corteza), que contiene los cuerpos celulares de las neuronas y células gliales y (b) un neuropilo (Binnington, 1981).

Nervios hemales y estructuras neurohemales

Las ramas de los nervios hemales proximal y dorsal que provienen del nervio pedal, forman un plexo lateral que da lugar a los nervios que inervan a los músculos coxales, músculos dorso-ventrales, glándulas dérmicas y las glándulas salivales (Fig. 6) (Binnington, 1981).

Inervación hipodermal y cardiaca

Los nervios que se ramifican a partir de los troncos pedales principales y los nervios hemales, inervan a las glándulas dérmicas y reciben fibras de varios tipos de sensilia epidermal. Las terminaciones en las glándulas dérmicas son varicosas y similares a las de la glándula salival (Binnington, 1981).



Figura 6. Diagrama que muestra una vista dorsal de la inervación por los nervios hemales y coxales, de las glándulas hipodermal y salival (Figura tomada de Binnington, 1981).

Neuronas multipolares se asocian con el tabique peri cardíaco del complejo del corazón. Es muy probable que los movimientos provocados por los músculos de la vaina perigangliónica y la aorta, estén asistiendo en la circulación de la hemolinfa. La presencia de terminaciones nerviosas en el tabique del corazón y los músculos, sugiere que el control circulatorio de *R*. *microplus* está en parte bajo control neural. Las neuronas multipolares asociadas con el sistema circulatorio podrían ser células periféricas neurosecretoras, células marcapasos o receptores de estiramiento (Binnington, 1981).

Métodos de control de la garrapata

La eficiencia de un método de control en contra de *R. microplus* reside en la capacidad de prevenir que las formas parasitarias activas lleguen a su estadio de hembra adulta repleta, cuando se encuentran en el hospedero, evitando así su caída al suelo, oviposición y consecuente eclosión de larvas que infesten nuevamente al hospedero (Nuñez y cols., 1985).

Uso de productos químicos para el control de R. microplus

Actualmente el principal método de control de la garrapata es la aplicación de acaricidas químicos, como son los compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas, piretroides y lactonas macrocíclicas (Mapholi y cols., 2014; Rajput y cols., 2006).

Compuestos arsenicales

El uso del arsénico fue el primer método eficaz para controlar a las garrapatas. Sin embargo, su efectividad es limitada; los residuos del uso de este compuesto son altamente tóxicos y a nivel mundial la mayoría de las garrapatas *R. microplus* se han vuelto resistentes al arsénico. Fue hasta el descubrimiento del DDT y el desarrollo de pesticidas organoclorados, que el control de las garrapatas fue más efectivo (Graf y cols., 2004).

Compuestos organoclorados

Las cuatro principales clases de insecticidas orgánicos son neurotóxicos. Actúan sobre las membranas nerviosas o en la sinapsis (Casida y cols., 1983).

El DDT y el hexacloruro de benceno fueron los primeros productos químicos en ser utilizados como acaricidas. La dieldrina, compuestos del ciclodieno y toxafeno fueron otros compuestos ampliamente utilizados para el control de garrapatas. Pero debido a su persistencia y a su alto grado de toxicidad, fueron retirados del mercado o sustituidos por otros agentes químicos (George y cols., 2004).

El DDT (diclorodifeniltricloroetano) es un derivado de clorobenceno, que fue ampliamente utilizado como insecticida. Se empleó en varios países para el control de *R. Microplus*; sin embargo el mecanismo de acción del DDT, a través del cual actúa sobre las garrapatas, no está claro aún, parece deberse a la interferencia en la transmisión del impulso nervioso en el axón de las células del sistema nervioso central (Nuñez y cols., 1985).

El BHC (hexacloruro de benceno) es también conocido como lindano; su mecanismo de acción es debido a su liposolubilidad, penetra en el parásito y paraliza su sistema nervioso (Nuñez y cols., 1985).

La dieldrina,; tiene un efecto residual similar al DDT, pero su toxicicidad es menor a la de otros insecticidas clorados (Nuñez y cols., 1985).

Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Los organofosfatos y los carbamatos son ejemplos de inhibidores de la AChE.

Compuestos organofosforados

Todos los componentes de este grupo son preparaciones orgánicas derivadas del ácido fosfórico, por lo que se les asignó un nombre común de compuestos organofosforados y se caracterizan porque tienen un modo de acción similar (Casida y cols., 1983; Nuñez y cols., 1985).

Compuestos organofosforados tales como el paratión, malatión, diazinón y metilcarbamato, así como ésteres como carbaril, carbofurano, entre otros, actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa, al reaccionar con la serina del sitio activo de la AChE, formando un complejo covalentemente estable (fosforilo-enzima), lo que resulta en un incremento de la acetilcolina, que cuando alcanza niveles críticos, causa la aparición de los síntomas y posterior efecto letal (Casida y cols., 1983; Colovic y cols., 2013).

Carbamatos

Los carbamatos son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico; en el sector agrícola se emplean como pesticidas, fungicidas, herbicidas, antiparasitarios y en la profilaxis de envenenamiento por compuestos organofosforados. Compuestos como el aldicarb, carbofurano (furadán), fenoburcab y propoxur, forman parte del grupo de los carbamatos (Colovic y cols., 2013).

Su mecanismo de acción es similar al de los compuestos organofosforados, pertenecen al grupo de inhibidores reversibles de la AChE. Por esta razón no fueron muy eficaces para combatir cepas resistentes a organofosforados de *R. microplus* (Nuñez y cols., 1985).

Piretroides

El éxito de los piretroides sintéticos fue por su alta potencia y selectividad como venenos dirigidos al sistema nervioso (Casida y cols., 1983; Nuñez y cols., 1985; Sogorb y Vilanova, 2002).

Se considera que actúan sobre la membrana celular, causando cambios en la permeabilidad de los iones sodio y potasio; ya que muestran gran afinidad por canales de sodio, la unión de los piretroides a estas estructuras provoca la apertura prolongada de los canales. A altas concentraciones los piretroides provocan el bloqueo de la corriente, llevando a una despolarización completa de la membrana nerviosa e interfiriendo con la excitabilidad neuronal; esto provoca un incremento del potencial negativo, seguido de hiperexcitación y posterior bloqueo del nervio conductor, llevando a la parálisis del insecto (Nuñez y cols., 1985; Sogorb y Vilanova, 2002).

La permetrina, la aletrina y el fenvalerato fueron los primeros agentes químicos de este grupo, empleados en el control de garrapatas en el ganado. Posteriormente surgieron diversos compuestos, por mencionar algunos: ciflutrina, esfenvalerato, tetrametrina, tralometrina, entre otros (Nuñez y cols., 1985).

Formamidinas

El amitraz es un compuesto de la familia de las formamidinas empleado en el control de la garrapata *R. microplus*; es muy común su uso en diversos países, dentro de los que se destaca Australia, Sudáfrica y América Latina (Jonsson y Hope, 2007; Rivera, 2012).

Los compuestos de este grupo imitan el mecanismo de acción de la octopamina, neurotransmisor que está implicado en la excitación del SNC de invertebrados, puesto que es considerado como el equivalente a las catecolaminas, noradrenalina y adrenalina. La presencia de amitraz sobreestimula a los receptores acoplados a proteínas G y los que están relacionados con la adenilato ciclasa; esto genera toxicidad, impidiendo la actividad de la octopamina y sobreestimulando en las sinápsis octopaminérgicas, lo que conlleva a la muerte del artrópodo (Jonsson y Hope, 2007; Rivera, 2012; Kita y cols., 2016).

Lactonas macrocíclicas

Este grupo de compuestos se divide en dos subgrupos, las avermectinas, donde se encuentra la ivermectina (IVM), doramectina, abamectina y eprinomectina. El otro grupo, las milbemicinas, cuenta con componentes como moxidectina y milbemicina oxima. Las avermectinas son producidas por la bacteria *Streptomyces avermitilis*, mientras que las milbemicinas son producidas por *Streptomyces cyaneogriseus*; tienen una estructura similar a los antibióticos macrólidos, pero sin actividad antibacterial (Dourmishev y cols., 2005; Rivera, 2012).

La IVM es una lactona macrocícilica semi sintética que se utiliza en contra de una amplia gama de endoparásitos (nemátodos) y ectoparásitos (insectos y ácaros), presentes en animales v seres humanos; actúa modulando alostéricamente receptores específicos de neurotransmisores de las neuronas motoras periféricas. Se sabe que la IVM activa canales iónicos de cloro regulados por ácido gamma-aminobutírico (GABA), glutamato (GluCl) y glicina. La estrucutura básica de esta molécula consta de un grupo hexahidrobenzofurano, un grupo disacárido (en C-13) y un anillo espirocetal (C-17 a C-28). Su sitio de unión es en la interfaz de dos subunidades advacentes, en la periferia de los pases transmembranales, cerca de la bicapa de la membrana. Se ubica entre el alfa hélice del pase transmembranal 3, en la subunidad principal (+) y en el alfa hélice del pase transmembranal 1 de la subunidad complementaria (-). La IVM se inserta profundamente en la interfaz de estas subunidades y establece contacto también con el pase transmembranal 2, que es el encargado de formar el canal (Fig. 7). La unión se logra gracias a interacciones hidrofóbicas y por la formación de enlaces de hidrógeno con los 3 pases transmembranales en los que se ancla a los residuos, tirosina 285 del pase transmembranal 3, leucina 218 del pase transmembranal 1 y serina 260 del pase transmembranal 2. De igual manera, un residuo de glicina en la posición 281 del pase transmembranal 3 es esencial para la selectividad a IVM (Fig. 8) (Dourmishev y cols., 2005; Hibbs y Gouaux, 2011; Lynagh y Lynch, 2010, 2012a, 2012b; Rivera, 2012).



Figura 7. Representación del sitio de unión de la Ivermectina (Figura tomada de Hibbs y Gouaux, 2011).

Al activar los receptores GABA y glutamato en células nerviosas y musculares, en artrópodos y nemátodos, la IVM causa parálisis de la función motora, inhibición de la alimentación, reproducción y finalmente la muerte. (Dourmishev y cols., 2005; Gassel y cols. 2014; Rachinsky y cols. 2007).

Hallazgos recientes muestran la expresión de un receptor tipo glicina en la garrapata *R*. *microplus*. Esta secuencia tiene un marco de lectura abierto de 1392 pb que codifica para una proteína de 464 aminoácidos; este receptor contiene características comunes a las subunidades que conforman los pLGICs, como lo es un dominio amino-terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales y un bucle grande extracelular que se forma por la unión de dos cisteínas englobando 13 aminoácidos (característico de la familia de receptores Cysloop). El polipéptido caracterizado, aparentemente no contiene péptido señal. Conserva un residuo de glicina en el tercer dominio transmembranal, el cual, en otros estudios se ha visto que es esencial para la alta sensibilidad a la IVM (Flores y cols., 2014).



Figura 8. Representación de los residuos esenciales para la unión de IVM en su sitio de unión (Figuras tomadas de Hibbs y Gouaux, 2011; Lynagh y Lynch, 2012b).

El uso de agentes químicos implica desventajas, como lo es la presencia de residuos en productos animales de consumo humano y el desarrollo de garrapatas resistentes a estos productos químicos. Esto genera efectos nocivos sobre los humanos, los animales y el medio ambiente. El rendimiento de un agente acaricida no sólo depende de la actividad de un producto, sino de la calidad y cantidad de ingrediente activo utilizado (Graf y cols., 2004).

Resistencia a agentes acaricidas

El uso indiscriminado de acaricidas ha generado poblaciones de garrapatas resistentes en diferentes regiones del mundo (Abbas y cols., 2014b).

"La resistencia se puede definir como la capacidad del parásito para sobrevivir y multiplicarse a pesar de la administración y la absorción de un fármaco aplicado en dosis iguales o mayores a las generalmente recomendadas, y que se encuentran dentro de los límites de tolerancia del sujeto" (Abbas y cols., 2014).

Existen diferentes formas en las cuales se puede presentar la resistencia; encontramos a la resistencia adquirida, que resulta de la herencia, en donde se disminuye la sensibilidad a acaricidas a través del tiempo. Se destaca una relación directa entre la concentración del compuesto y el grado de resistencia. Es decir, una cepa que se controla a cierta dosis, puede mostrar resistencia a una dosis menor, lo que permite la selección de mutantes resistentes a bajas concentraciones del compuesto, y si se continúa con la exposición al compuesto, se removerán las cepas susceptibles, persistiendo sólo aquellas que son resistentes (Abbas y cols., 2014).

Otra forma de resistencia es la que se genera en la resistencia cruzada, en donde se comparte la resistencia entre diferentes acaricidas, porque estos tienen un mecanismo de acción similar. Un ejemplo de ello es la aparición de cepas resistentes a organofosforados, que dio origen a la resistencia también a carbamatos (Abbas y cols., 2014b; Nuñez y cols., 1985). Finalmente se encuentra la resistencia múltiple, que se da cuando una cepa es resistente a más de una clase de compuesto acaricida, con diferentes mecanismos de acción. En México existen reportes de poblaciones de garrapatas *R. microplus* con múltiple resistencia, incluyendo el DDT, piretroides, organofosforados y formamidinas (amitraz). Las mutaciones en los sitios de unión, pueden estar presentes en el desarrollo de este tipo de resistencia, sin embargo, se atribuye principalmente que la resistencia múltiple, se debe a cuestiones metabólicas (Abbas y cols., 2014).

En países como México, Brasil, y recientemente Uruguay, se han observado poblaciones resistentes de *R. microplus* a IVM (Dourmishev y cols. 2005; Castro y cols. 2011; Mendes et al. 2013). A nivel mundial se han reportado cepas resistentes a uno o diversos agentes acaricidas, que abarcan a las familias clásicas de agentes acaricidas empleados en el control de las garrapatas, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidinas, lactonas macrocíclicas, piretrinas y piretroides. Es por ello que se siguen desarrollando nuevas clases de agentes acaricidas, como alternativa a la presencia de resistencia (Abbas y cols., 2014b; Gassel y cols., 2014).

Manejo de pastoreo y control biológico

El manejo de pastoreo en conjunto con la aplicación de agentes acaricidas, es un método económico para el control de garrapatas en el ganado vacuno; estas medidas ayudan a reducir en gran medida la densidad de las poblaciones de garrapatas en el entorno, así como la quema de pastos; sin embargo, en algunos casos la eclosión de los huevos no sufre alteración alguna, por lo que estudios sugieren que la quema de los pastos, no es un método eficaz para el control (Mapholi y cols., 2014).

Por otro lado, el control biológico de las garrapatas se puede lograr mediante la introducción de un organismo en el medio ambiente de otros, para controlar un parásito diana. De esta forma, se reduce el crecimiento de la población del parásito, sin afectar el medio en cuestión. Se sabe que algunos organismos pueden asistir en el control biológico, por mencionar algunos, encontramos cierto tipo de aves, como *Buphagus africanus*, depredador natural de las garrapatas. Insectos himenópteros (*Ixodiphagus y Hunterellus spp.*) que se alimentan de larvas de garrapatas. Plantas, por ejemplo, del género *Stylosanthes spp.* (Leguminosas tropicales) que pueden llegar a inmovilizar a las larvas de las garrapatas durante su fase de vida libre. También hongos, que desempeñan un papel importante en el control de insectos, ya que son capaces de infectar a los parásitos que se encuentran en el suelo, con altas tasas de mortandad, tal es el caso de *Aspergillus terreus* (Mahar y cols., 2014).

A pesar de que el control biológico es una buena alternativa al control químico, aún no se han podido aplicar con éxito en campo, debido a su inestabilidad ambiental y la reducción de la selectividad en la especie que se desea controlar, lo que resulta afectando a otros insectos que también son parte del ecosistema (Mahar y cols., 2014).

Desarrollo de vacunas

La vacunación con antígenos de garrapatas es una alternativa segura para el control de las garrapatas en el ganado. Las vacunas son potencialmente importantes en el control de agentes

patógenos, ya que, a diferencia de los agentes químicos, éstas no persisten ni afectan el medio ambiente; además, el desarrollo de vacunas puede resultar más económico que la síntesis de productos químicos. Por otra parte, la aparición de resistencia en las garrapatas en contra de las vacunas, es un proceso más lento (Mapholi y cols., 2014).

A pesar de que no existe una vacuna que sea eficaz contra la mayoría de las garrapatas, se cuenta con diversas vacunas, diseñadas a partir de antígenos aislados de la garrapata, estos antígenos pueden ser de dos tipos, antígenos expuestos y antígenos ocultos. Los antígenos expuestos, están en contacto de forma natural al sistema inmune del hospedero, como lo son los antígenos presentes en la saliva, la cutícula y las secreciones del ectoparásito; animales inmunizados con este tipo de antígenos, son estimulados por la exposición continua con la garrapata. Por otra parte se encuentran los antígenos ocultos, o que no se encuentran expuestos al sistema inmune del hospedero, durante la infestación por garrapatas. La mayoría de este tipo de antígenos ocultos, se obtienen del epitelio intestinal de las garrapatas y por ingeniería recombinante. El uso de antígenos no expuestos resulta ser más conveniente, porque es poco probable que la garrapata evolucione y desarrolle un mecanismo que contrarreste la respuesta inmune del hospedero. En el proceso de vacunación, se reduce el número de garrapatas repletas, disminuye su peso y por lo tanto su capacidad reproductiva, lo que implica que el mayor efecto se observa en la reducción de la población de la siguiente generación de larvas. Es por ello que, en los casos de infestaciones con cargas importantes de garrapatas, es necesaria la aplicación conjunta con agentes químicos, ya que estos sí tienen la capacidad de actuar de forma inmediata en contra de las garrapatas (Mahar y cols., 2014; Mapholi y cols., 2014).

La vacuna comercial y que muestra mejor efecto en contra de la garrapata *R. microplus*, se basa en el antígeno de intestino Bm86; se ha observado que la inmunización con Bm86 muestra rechazo significativo de las garrapatas adultas, reducción de la ingesta de sangre y reducción en la masa de huevos. También mostró más del 80% de protección durante infestaciones, en el desafío del ganado con *B. microplus* (Mahar y cols., 2014; Mapholi y cols., 2014).

La principal desventaja de algunas vacunas que se usan actualmente, es que no ofrecen protección frente a múltiples especies de garrapatas, por lo que se ha buscado hacer mezclas de proteínas homólogas de Bm86 de otras especies de garrapatas, y se ha observado un buen efecto (Mahar y cols., 2014).

Genoma de R. microplus

Pese a la importancia e impacto de este ectoparásito, se tiene poco conocimiento sobre su genoma y su asociación fenotípica. Actualmente, se han secuenciado diferentes genomas de insectos o se encuentran en proceso, y a pesar de que los insectos y las garrapatas comparten un ancestro en común, es altamente probable que sus genomas hayan sufrido divergencias significativas a través del tiempo (Ullmann y cols., 2005).

Ullmann y cols., (2005) hicieron una estimación del tamaño del genoma y la organización del ADN repetitivo en *R. microplus*, y determinaron que el tamaño es de aproximadamente 7.1×10^9 pb, y está compuesto de un 0.82% de secuencias repetidas plegadas, un 38% de secuencias altamente repetidas y un 30% de secuencias moderadamente repetidas.

Se cuenta también con una biblioteca de cDNAs expresados en la garrapata *R. microplus*, elaborada por Guerrero y cols., (2005), donde reportan 20,417 ESTs (por sus siglas en inglés Expressed Sequence Tag), secuencias a las que se les ha asignado una función potencial. Estos datos aportan información que permite el desarrollo de métodos de alto rendimiento en la investigación basada en la hipótesis, en el estudio de la garrapata (Guerrero y cols., 2005).

Canales iónicos y Neurotransmisores inhibitorios

Los canales iónicos son poros macromoleculares presentes en las membranas celulares, y al igual que los iones, se les considera elementos excitables fundamentales, por su papel central en la excitabilidad en nervios y músculos (Hille, 2001).

La excitación y señalización eléctrica en el sistema nervioso conlleva al movimiento de iones a través de su respectivo canal. Los principales iones implicados en la excitabilidad son, Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻ (Hille, 2001).

El flujo de corriente está controlado por los canales iónicos; se distinguen dos tipos de canales, los de reposo y los regulados. Los canales en reposo se encuentran normalmente abiertos y no se ven afectados significativamente por factores extrínsecos; son esenciales para mantener el potencial de membrana en reposo, es decir, el potencial eléctrico en la membrana cuando no existe una señalización. Por su parte, los canales regulados se encuentran cerrados cuando la membrana está en reposo. Cada canal puede considerarse como una molécula excitable, ya que son específicamente sensibles a algún estímulo: los que obedecen a las variaciones de voltaje o cambio en el potencial de membrana (regulados por voltaje), los que responden a un neurotransmisor u otro estímulo químico (regulados por ligando) y los responden a la presión o una deformación mecánica (regulados mecánicamente) (Kandel y cols, 2000; Hille, 2001).

La respuesta del canal es aparentemente una simple apertura o cierre del poro. El poro abierto tiene permeabilidad selectiva a ciertos iones, que fluyen pasivamente en favor de su gradiente electroquímico a tasas muy elevadas (> 10^6 iones por segundo); el intercambio de iones a través de la membrana, permite la generación de un **potencial de acción**, que se define como el cambio en el potencial de membrana de forma brusca y transitoria (Hille, 2001).

La neurotransmisión inhibitoria rápida en el sistema nervioso es mediada por receptores ionotrópicos, que se activan por la unión de su ligando. Dicha respuesta inhibitoria rápida regula tanto la magnitud como la duración de la actividad neuronal; este proceso involucra la liberación de neurotransmisores inhibitorios en la sinapsis, activando los canales iónicos modulados por ligando pentaméricos (pLGICs). La respuesta inhibitoria rápida conduce a un aumento en la permeabilidad del ión cloruro en la membrana celular, anión biológico más abundante (Hibbs y cols., 2011, Gassel y cols., 2014).
Los receptores GABA y glicina se expresan en el Sistema Nervioso Central (SNC) de vertebrados. Insectos e invertebrados poseen receptores GABA y de glutamato en su SNC; sin embargo, estudios recientes están mostrando la presencia de receptores de glicina, donde generan potenciales inhibitorios, para la correcta integración de señales neuronales (Gassel y cols., 2014; Lynagh y cols., 2012).

Los pLGICs median la comunicación química entre las células, en el SNC y sistema nervioso periférico (Baenziger y cols., 2011).

Se clasifican en dos categorías:

- Catión-selectivos, que engloba a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), receptores de serotonina 5-HT₃ y receptores de Zinc.
- Anión-selectivos, que incluye a los receptores GABA_{A/C}, receptores de glicina, y en invertebrados, receptores de glutamato (Hibbs y cols., 2011).

La función principal de la mayoría de los pLGICs es abrir el canal al unirse un neurotransmisor, permitiendo el paso de iones, lo que conduce a la excitación o a la inhibición intracelular, dependiendo de la selectividad del canal (Baenziger y cols., 2011).

Estructura de los receptores Cys-loop

Es debido a su gran similitud estructural que los pLGICs se clasifican dentro de una superfamilia distinta. Esta similitud se deriva desde la secuencia primaria de aminoácidos, la estructura secundaria y terciaria de cada subunidad individual. Todas las subunidades son aproximadamente del mismo tamaño y cuentan con un perfil de hidropatía similar, lo que sugiere que las subunidades comparten la misma topografía en la membrana celular (Keramidas y cols., 2004).

Los pLGICs se componen de cinco subunidades de proteínas, en una disposición en forma pentamérica que conforman un poro central. Por lo general contienen dos subunidades alfa y tres subunidades que pueden ser beta, gamma o delta (en algunos casos están formados por

5 subunidades alfa). Su característica principal es la presencia de un bucle de tamaño fijo, formado por un enlace disulfuro entre dos cisteínas, que encierra una secuencia de 13 aminoácidos, cerca del dominio N-terminal extracelular (Mowrey y cols., 2014).

Cada subunidad consiste en un dominio extracelular de unión al neurotransmisor (DEC) y un dominio de formación de poros transmembrana (DTM), que contiene cuatro hélices transmembranales (TM1-TM4). Los bucles que conectan a TM1 con TM2 y TM2 con TM3 son segmentos de péptidos cortos (de 4 a 5 aminoácidos de longitud), mientras que el dominio que conecta a TM3 con TM4, es relativamente más grande; se encuentra de forma intracelular (DIC), está compuesto por dos bucles y está implicado en tráfico celular. Se sabe que los dominios TM2 están involucrados principalmente en la formación de las paredes del canal (Keramidas y cols., 2004; Mowrey y cols., 2014).

La unión del neurotransmisor al sitio ortostérico del DEC desencadena la apertura del canal y permite el paso de los iones a través de la membrana celular. El sitio de unión a ligando se ubica en la interfaz de dos subunidades vecinas, denominadas como el lado principal (+) y el lado complementario (-). Se forma por 6 regiones que no se encuentran de forma contigua y a las que se les conoce como "bucles" (nombrados por letras de la A a la F). Los bucles A, B y C se encuentran en el lado principal, mientras que los bucles D, E y F, que en realidad son residuos de láminas beta, se localizan en el lado complementario. El sitio de unión del ligando se encuentra revestido por varios residuos aromáticos, que se conservan en los diferentes miembros de la familia, dependiendo del ligando al cual responden (Keramidas y cols., 2004; Nys y cols., 2013; Mowrey y cols, 2014).

Hallazgos recientes muestran la expresión de un receptor tipo glicina en la garrapata *R*. *microplus*. Esta secuencia tiene un marco de lectura abierto de 1392 pb que codifica para una proteína de 464 aminoácidos; este receptor contiene características comunes a las subunidades que conforman a los pLGICs, como lo es un dominio amino-terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales y un bucle grande extracelular que se forma por la unión de dos cisteínas, englobando 13 aminoácidos (característico de la familia de

receptores Cys-loop). El polipéptido caracterizado aparentemente no contiene péptido señal. Conserva un residuo de glicina en el tercer dominio transmembranal, el cual, en otros estudios se ha visto que es esencial para la alta sensibilidad a la IVM (Flores y cols., 2014).



Figura 9. Representación de la estructura de los receptores Cys-loop (Figuras tomadas de Calimet y cols., 2013; Keramidas y cols., 2004). Subunidad principal y complementaria, mostrando los cuatro pases transmembranales (TM1-TM4), el dominio extracelular de unión al neurotransmisor (Bucles del A al F) y el sitio de unión de la Ivermectina.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente en la especie de garrapata *Rhipicephalus microplus* sólo se han caracterizado molecular y funcionalmente dos receptores que forman canales iónicos de cloro; el primero es un receptor GABA y el segundo un canal de cloro activado por glutamato (GluCl). Recientemente el receptor GABA se asoció con resistencia al acaricida dieldrina, mediante una mutación presente en dicho receptor (Hope y cols., 2010).

Así mismo, estudios de fisiología en GluCls, revelan que éstos tienen un papel predominante en el mecanismo de acción de las lactonas macrocíclicas (familia a la cual pertenece la Ivermectina), potenciando el efecto agonista del glutamato, o activando directamente a estos canales iónicos.

La reciente caracterización molecular de un receptor tipo glicina por Flores y cols., (2014), que contiene características propias de una subunidad de la familia de receptores Cys-loop, así como la presencia de un residuo de glicina en el tercer pase transmembranal, que le conferiría sensibilidad a Ivermectina, genera la interrogante de determinar cuál es el ligando que regula a dicha estructura y si es blanco molecular del acaricida Ivermectina y su posible asociación en el mecanismo por medio del cual se genera resistencia a este agente químico.

HIPÓTESIS

El canal de cloro modulado por ligando, recientemente caracterizado molecularmente, en la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus)* microplus, será capaz de formar un canal funcional, al ser expresado en un sistema heterólogo y será activado alostéricamente por Ivermectina.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un análisis funcional preliminar de un canal de cloro modulado por ligando, recientemente reportado en la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y determinar si es activado por el agente acaricida Ivermectina.

Objetivos particulares

- Verificar la caracterización molecular de la secuencia del ARNm del canal de cloro activado por ligando, recientemente reportado en la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a través de análisis bioinformáticos y el ensayo de determinación de extremos faltantes 5⁻ RACE.
- Expresar heterólogamente la secuencia del canal de cloro activado por ligando, empleando ensayos de transfección celular, en la línea celular HEK 293. De igual manera expresar heterólogamente la secuencia del canal, en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, a través de la microinyección de ARNm.
- Determinar la presencia de la proteína en las células transfectadas y los ovocitos de rana microinyectados con la secuencia del canal de cloro activado por ligando, empleando el ensayo de western blot.
- Realizar ensayos funcionales exploratorios en ovocitos de rana *Xenopus laevis* microinyectados con ARNm del canal de cloro modulado por ligando, para determinar si existe respuesta de los ovocitos, al enfrentarlos con los posibles agonistas moduladores glicina, glutamato y GABA, empleando la técnica electrofisiológica Voltage clamp. Así mismo determinar si existe cambio en la respuesta al aplicar el agonista alostérico Ivermectina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recursos y análisis bioinformáticos

Se realizaron análisis bioinformáticos empleando diversas herramientas. La búsqueda de similitud de secuencias se realizó mediante el uso del servicio BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, USA). El diseño de oligonucleótidos se realizó con el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000). La traducción de la secuencia del ARN mensajero a proteína se realizó con la herramienta Translate en ExPaSy (Gasteiger *et al.*, 2003). La predicción de las regiones transmembranales se realizó con el programa TMHMM (Krogh *et al.*, 2001). El alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos y aminoácidos se realizó en el programa Clustal W (Larkin *et al.*, 2007). La representación en 2 dimensiones se llevó a cabo con el programa TMRPres2D. La predicción del péptido señal se realizó con el programa signal P 4.1 (Nordahl et al., 2011). El peso molecular y punto isoeléctrico teórico fueron predichos por la herramienta ProtParam ExPASy (Gasteiger, 2005).

Obtención de garrapatas y tejidos

Garrapatas hembras repletas adultas, *R. microplus* fueron colectadas de bovinos ubicados en el rancho La Media Joya en Tapalpa Jalisco, México. Se seleccionaron de 7 a 10 garrapatas hembras adultas, las cuales fueron colocadas en cajas Petri y se mantuvieron en una incubadora a condiciones específicas hasta su ovoposición, temperatura de 27° C y humedad relativa del 85%. Se obtuvieron huevos de un día y larvas de 12 días. La obtención de tejidos adultos de ovario e intestino fue a partir de la disección de 15 a 20 garrapatas hembras repletas adultas, que fueron sumergidas en buffer fosfato salino frío (PBS, pH 7.4), empleando un par de pinzas de tejidos blandos y con la ayuda de una navaja de bisturí; se cortó la cutícula dorsal y se procedió a separar el ovario e intestino en tubos de microcentrífuga, los cuales fueron lavados nuevamente con PBS. Estos tejidos fueron empleados para la extracción de ARN total.

Tratamiento de huevos y extracción de ARN total

Tratamiento de huevos

Previo a la extracción de ARN total, 100 mg de huevos fueron tratados con 5 volúmenes de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3.8%, durante 2 minutos, después fueron centrifugados a 370 g por 2 minutos. Se retiró el sobrenadante, para ser resuspendidos nuevamente en 5 volúmenes de NaClO e incubados por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se observó que los huevos flotaban en la superficie, se retiró con cuidado el NaClO y se procedió a hacer 5 lavados con agua destilada, en una proporción de 5 volúmenes cada lavado, con intervalos de centrifugación de 2 minutos a 370 g (Flores Fernández et al., 2016).

Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total se pesaron 100 mg de larvas, así como de cada tejido adulto y se utilizaron los huevos tratados, como se mencionó anteriormente. Se realizó la extracción de ARN total empleando el método de extracción fenólica; se añadió a cada muestra 1 ml de TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a temperatura ambiente y se procedió a homogenizar de forma independiente cada una de ellas, empleando un homogenizador de tejidos tipo Tenbroeck de vidrio. Los tejidos homogenizados se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se añadieron 200 µl de cloroformo a 4°C, se agitó fuertemente y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, enseguida se di un ciclo de centrifugación a 11,500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se formaron dos fases y se recuperó en un nuevo tubo la fase acuosa situada en la parte superior. Para la precipitación del ARN se añadieron 500 µl de isopropanol a la fase acuosa a 4°C y se incubó por 10 minutos a -20°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó nuevamente a 11,500 rpm durante 10 minutos a 4°C; se descartó el sobrenadante y se conservó la pastilla, a la que se le añadió etanol frío al 75% en agua-DEPC, se desprendió y se lavó. Posteriormente se centrifugó a 9000 rpm durante 5 minutos a 4 °C; se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, hasta evaporación completa del etanol remanente. La pastilla de ARN se disolvió en 30 µl de agua-DEPC; se determinó la concentración y pureza por medio de la medición de absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop[™] 2000, a una longitud de 260 y 280 nm; finalmente se almacenó a -80°C para su posterior uso.

Síntesis de ADNc

Se realizó la síntesis de ADNc a través de la reacción de transcripción reversa, a partir de 4.5 µg de ARN de cada muestra: ovario, intestino, huevo y larva, empleando el Kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Inicialmente la reacción se llevó a un volumen de 13 µl, que contenían, 4.5 µg de ARN de cada muestra de ovario, intestino, huevo y larva, 1 µl de oligo (dT)20 a una concentración de 50 µM, 1 µL dNTP Mix a una concentración de 10 mM cada dNTP y agua destilada estéril. Esta mezcla se sometió a desnaturalización en un termociclador (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad) a 65 °C por 5 minutos, seguido de una incubación de 2 minutos en hielo, para evitar la renaturalización. Posteriormente se adicionó una segunda mezcla de 6 µL, que contenía 4 µL de buffer de reacción (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂ a temperatura ambiente) y 2 µL de DTT 0.1 M. La unión de ambas mezclas se agitó y se centrifugó, se incubó a 42 °C por 2 minutos, para poder añadir 1 µL de enzima SuperScript® II. Después se agitó, se centrifugó y se colocó en termociclador a una temperatura de 42 °C durante 50 minutos, para realizar la síntesis de ADNc. Finalmente se inactivó la enzima por medio de un periodo de incubación de 15 minutos a 70 °C. El ADNc se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

Caracterización del extremo 5' de la secuencia RmGlyR (KJ476181)

Se determinó el extremo 5´faltante de la secuencia **KJ476181**, mediante el sistema para la rápida amplificación de extremos de ADNc (5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se diseñaron los oligonucléotidos específicos **GSP1** (CAAGGTGAACGTGGCATTGA), **GSP2** (GAACACGCCTGTGTCGATAGC) y **GSP3** (GAATGTGACAGCGTTGCGTG).

Se sintetizó ADNc como se describió previamente, pero con ciertas variaciones: La reacción se llevó a cabo con 5 μ g de ARN total y se empleó el oligonucleótido GSP1 para la síntesis del ADNc. Después de la síntesis se le hizo un tratamiento a la muestra con 1 μ l de RNsa mix y se procedió a purificar.

Para la purificación se añadieron 120 µl de yoduro de sodio 6 M y se transfirió a una columna S.N.A.P., la cual se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 segundos; posteriormente se realizaron 4 lavados utilizando el buffer de lavado a una temperatura de 4 °C y 2 lavados con etanol al 70 % a la misma temperatura (4 °C); la muestra fue centrifugada en cada lavado a las mismas condiciones. Después del lavado final se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasas, calentada a una temperatura de 65 °C. Se le añadió una etiqueta de citosinas al ADNc purificado en el extremo 3'; en dicho proceso inicialmente se tomaron 10 µl de ADNc purificado y se le añadieron 5 µl de tailing buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 25 mM KCl y 1.5 mM MgCl₂), 2.5 µl de dCTP 2 mM y 6.5 µl de agua DEPC. Se incubó la reacción a 94 °C por 3 minutos; después se colocó en hielo por 1 minuto y se le añadió 1 µl de la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT); se sometió a un ciclo de 10 minutos a 37 °C y finalmente la enzima fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos, guardándose la reacción a -20 °C.

Después de la adición de la etiqueta de citosinas en el extremo 3´ del ADNc, se procedió a amplificar el extremo 5´ desconocido a través de PCR, utilizando el oligonucléotido sentido Abridged Anchor Primer (AAP) 5'GGCCACGCGTCGACTAGTAC GGGIIGGGIIGGGIIG-3' y como antisentido el GSP2.

Para la PCR se utilizaron 5 μ l de ADNc etiquetado, 2 μ l de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmoles/ μ l, 25 μ l del master mix 2X (dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 16 μ l de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron 94 °C/5 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 55 °C/30 s y 72 °C/1.5 min; finalmente 72 °C/10 min.

Se realizó una segunda PCR para reamplificar el fragmento, utilizando el oligonucleótido antisentido GSP3 y el oligonucleótido sentido AUAP (GGCCACGCGTCGACTAGTAC). Se hizo una dilución 1 a 100 de la PCR anterior. En la reacción de PCR se utilizaron 2 μ l del templado diluido, 1 μ l de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmoles/ μ l, 10 μ l del master mix 2X (dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 6 μ l de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron 94 °C/5 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 55 °C/30 s y 72 °C/1.5 min; finalmente 72 °C/10 min.

Los productos amplificados del extremo 5´se sometieron a electroforesis en un gel de 35 ml de agarosa al 1% con 1.5 µl de Bromuro de etidio (10 mg/ml Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 55 minutos a 80 volts. Dicho gel se visualizó en un fotodocumentador (Gel Doc™ EZ Imager - Bio-Rad), exponiendo el gel a la luz UV.

Posteriormente, se procedió a purificar el producto del amplificado directamente del gel, se cortó la banda de interés y se empleó el kit de extracción QIAquick Gel extraction (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Se añadieron 3 volúmenos de Buffer QG (tiocianato de guanidina 5.5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 6.6), por cada columen de gel en masa y se incubó a 50 °C por 10 minutos, con intérvalos de agitación cada 2 minutos. Después de disolver la agarosa, se añadió un volumen de isopropanol y se transfirió la muestra a una columna QIAquick, dicha columna se centrifugó durante 1 minuto y se descartó el líquido eluido. Se realizaron 2 lavados, inicialmente se lavó con 500 µl de buffer QG, seguido de un lavado con 750 µl de buffer PE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, etanol al 80%), se centrifugó entre cada lavado durante 1 minuto a 13,500 rpm. Finalmente, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se eluyó por medio de centrifugación el ADN con 10 µl de agua destilada, grado molecular, a 13,500 rpm durante 1 minuto. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Una vez purificado el producto del ensayo 5´ RACE, se procedió a realizar la clonación en el vector de secuenciación PCR[™]2.1-TOPO®. Para dicho proceso se tomaron 1.3 µl del producto de PCR purificado del gel de agarosa, se añadieron 0.5 µl de solución salina (NaCl

0.3M, MgCl₂ 15mM) y 1 µl del vector. Se mezcló la reacción y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocó en hielo y se procedió a la transformación de bacterias competentes *E. coli* Top 10. Se seleccionaron colonias y se realizó la extracción de ADN plasmídico; se procedió a confirmar transformantes mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos del vector de clonación, oligonucleótido sentido F-M13 (TGTAAAACGACGGCCAGT) y antisentido R-M13 (CAGGAAACAGCTATGAC). En la reacción de PCR se utilizaron 0.5 µl del templado, 1 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmoles/µl, 10 µl del master mix 2X (dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 7.5 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron 94 °C/5 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 55 °C/30 s y 72 °C/1 min; finalmente 72 °C/10 min.

La secuencia de nucleótidos se determinó mediante el servicio de secuenciación requerido a la compañía Macrogen Inc (Maryland, USA).

Caracterización de la secuencia codificante completa, RmGlyRv

Para obtener la secuencia codificante completa de la variante del receptor tipo glicina (RmGlyRv), se tomaron como referencia las secuencias EST777211 (CK187896.1) y EST777210 (CK187895.1), de la base de datos de ESTs de *R. microplus*, las cuales guardan identidad con la secuencia del receptor tipo glicina (*RmGlyR*, KJ476181).

Con el objetivo de determinar y/o confirmar la secuencia EST777211 en la especie *R*. *microplus*, se realizaron dos PCRs de manera independiente; para la primera se diseñaron los oligonucleótidos, sentido F-EST211 (ACCACGACTCGCCACAGC) y antisentido R-EST211 (AGAACAGGTCGGGCTTCCAG), mientras que para la segunda PCR se diseñó un segundo oligonucleótido sentido F-EST211B (TCTCTTCCACGCATCATCGCTG). En ambas PCRs se utilizó el mismo oligonucleótido antisentido R-EST211. Se utilizó como templado el ADNc sintetizado a partir de tejido de ovario; se utilizaron 0.5 µl del templado, 0.5 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmoles/µl, 10 µl del master mix 2X

(dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 8.5 μ l de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/5 min; 35 ciclos de 95 °C/30 s, 60 °C/30 s y 72 °C/1 min; finalmente 72 °C/10 min.

La amplificación de la subunidad completa de la variante *RmGlyRv* se logró mediante el diseño del oligonucleótido sentido F-RmGlyRv (AGTGGCAAGACCGGAAGAA) que alineaba en la región 5' de la secuencia EST777211, y el oligonucleótido antisentido R-RmGlyRv (TCAGGTGAACTCGCTCATGT) que alineaba en la región 3' de la secuencia EST777210. La reacción de PCR se realizó empleando ADNc de tejido de ovario; se utilizaron 0.5 µl del templado, 0.5 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmoles/µl, 10 µl del master mix 2X (dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 8.5 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/5 min; 35 ciclos de 95 °C/30 s, 60 °C/30 s y 72 °C/1.5 min; finalmente 72 °C/10 min.

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron en un fotodocumentador (Gel Doc[™] EZ Imager - Bio-Rad).

El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos F-RmGlyRv y R-RmGlyRv se purificó como se describe en protocolos anteriores y se clonó en el vector de secuenciación pCRTM4-TOPO[®] TA. La reacción de clonación se realizó con 2 µl del producto de PCR purificado a partir de agarosa, se añadieron 0.5 µl de solución salina (NaCl 0.3M, MgCl₂ 15mM) y 1 µl del vector pCRTM4-TOPO[®] TA . Se mezcló la reacción y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación se colocó en hielo y se procedió a la transformación de bacterias *E. coli*.

Para la confirmación de la presencia del inserto en el vector de secuenciación, se seleccionaron colonias producto de la transformación y se extrajo ADN plasmídico de estas colonias. Se realizó la digestión de ADN plasmídico, utilizando 1 µg del vector de

secuenciación, 1µl (10 U/µl) de la enzima de restricción EcoR I (Promega, Madison, WI, USA), junto con 2 µl de buffer D 10X (Tris-HCl 6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 150 mM, DTT, 1 mM), 0.2 µl BSA acetilado (10 µg/µl) y llevando la reacción a un volumen final de 20 µl con agua destilada grado molecular. La reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imager - Bio-Rad).

La secuencia de nucleótidos se determinó mediante el servicio de secuenciación requerido a la compañía Macrogen Inc (Maryland, USA). Las clonas que contenían el fragmento se conservaron con glicerol al 10%.

Transformación de bacterias E. coli

Para la transformación de bacterias se empleó una alícuota de 50 µl de células electrocompetentes *E. coli* TOP10; se le añadió 1.5 µl de la reacción de clonación. Esta mezcla se colocó dentro de una cubeta de electroporación de 0.1 cm, utilizando las condiciones de electroporación de 1.7 kV, 25μ F y 200 Ohms. Posteriormente se añadieron 500 µl de medio S.O.C (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a la cubeta de electroporación y se recuperaron las bacterias en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, el cual se mantuvo en agitación a 250 rpm, 37 °C durante 1 h. Se procedió a centrifugar las bacterias a 5,000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en el medio remanente; enseguida se procedió a realizar el sembrado de las bacterias por extensión, empleando todo el botón resuspendido, en una placa con medio agar-LB (agar 1.5%, triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 100 µg/ml de ampicilina) y se incubó a 37° C durante 18 h.

Extracción de ADN plasmídico y confirmación de transformantes

Se procedió a seleccionar 3 colonias, se picaron y resembraron en medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 100 μ g/ml de ampicilina). Se aisló ADN plasmídico por medio del kit QIAprep[®] Spin Miniprep. 5 ml del cultivo de bacterias fueron centrifugados a 13,000 rpm por 3 min a temperatura ambiente para obtener un botón celular, el cual se

resuspendió en 250 µl de buffer P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, 100 µg/ml RNasa A) y se añadieron 250 µl de buffer P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%). Se mezcló invirtiendo el tubo 5 veces hasta que la solución se tornara color azul y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, enseguida se añadieron 350 µl de buffer N3 (Gu-HCl 4.2 M, Acetato de potasio 0.9 M, pH 4.8) para detener la reacción y se volvió a invertir el tubo hasta que se volvió incoloro. Se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a una columna QIAprep 2.0 spin y se centrifugó a 13,500 rpm durante 1 min y se descartó el líquido eluido. Posteriormente se realizaron 2 lavados, el primero con 500 µl de buffer PB (Gu-HCl 5 M, isopropanol 30%) y el segundo con 750 µl de buffer PE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, etanol 80%), con intervalos de centrifugación de 1 minuto a 13,500 rpm. Se descartó el líquido eluido y se centrifugó nuevamente para retirar el alcohol residual. Después, se colocó la columna QIAprep 2.0 en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se eluyó el ADN con 50 µl de agua libre de nucleasas a 13,500 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Se almacenó la muestra a -20 °C hasta su posterior análisis.

Perfil de expresión de los mARNs

Los perfiles de expresión se determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa final. Se diseñaron los oligonucleótidos específicos F-RGLY2 (PCR) punto (GCAAGACCGGAAGAAAAGAC) y R- RGLY2 (GTGCCTCCG GTACTGCTTC). Se utilizó ADNc de huevo, larva y tejidos adultos como templado. La reacción de amplificación control se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos diseñados a partir del gen de actina de microplus (Número de acceso en GenBank AY255624.1) F-B-Actina-Rm *R*. (CCCATCTACGAAGGTTACGCC) y R-B-Actina-Rm (CGCACGATTTCACGCTCA G). La reacción de PCR se realizó empleando ADNc de cada tejido; se utilizaron 0.5 µl del templado, 0.5 μ l de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmoles/ μ l, 10 μ l del master mix 2X (dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 8.5 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/5 min; 35 ciclos de 95 °C/30 s, 60 °C/30 s y 72 °C/1 min;

finalmente 72 °C/10 min. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizaron en un fotodocumentador (Gel Doc[™] EZ Imager - Bio-Rad). Los niveles de expresión se determinaron como una relación de la densidad del amplificado del gen de interés con respecto a la densidad del producto amplificado de actina para el mismo templado.

Diseño de gen sintético de *RmGlyR* y clonación de la variante *RmGlyRv* Diseño de gen sintético de *RmGlyR*

Se diseñó el gen sintético del receptor tipo glicina *RmGlyR*, tomando como referencia la secuencia reportada por Flores y cols (2014) con número de acceso KJ476181. En el extremo 5' se añadió la secuencia consenso kozak (ACCATG). Se clonó la secuencia en el vector de expresión pcDNATM3.1/*myc*-His A (Mammalian Expression Vector). Se solicitó el servicio de síntesis y clonación en el vector de interés a la compañía GenScript Inc. (Piscataway, NJ, USA).

Se recibió el plásmido conteniendo el gen sintético del receptor putativo de glicina RmGlyR, en un papel filtro a una concentración de 4 μ g de ADN. Se procedió a reconstituir el plásmido, para ello, se colocó el papel filtro en un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril, se le añadieron 150 μ l de agua libre de nucleasas para humedecerlo, se mezcló, se calentó a 60 °C por 15 seg, se trituró un poco con ayuda de una punta de micropipeta estéril y se compactó el papel en el fondo del tubo. Finalmente, se centrifugó por 5 minutos a 13,500 rpm. Se tomaron 5 μ l del sobrenadante y se procedió a transformar una alícuota de 50 μ l de bacterias *E. coli* TOP 10.

Para la confirmación de la presencia del inserto en el vector de expresión, se seleccionaron colonias producto de la transformación y se extrajo ADN plasmídico; utilizando como templado el ADN plasmídico de cada colonia seleccionada, se realizó PCR con oligos específicos de la secuencia FsinRgly (TCTGCCCACCTTTCTGATCG) y RsinRgly (CCGATCCACACGTCAATTGC). La reacción de PCR se realizó empleando ADN plasmídico como templado; se utilizaron 0.5 µl del templado, 0.5 µl de cada oligonucleótido

a una concentración de 10 pmoles/µl, 10 µl del master mix 2X (dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 8.5 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/5 min; 35 ciclos de 95 °C/30 s, 57 °C/30 s y 72 °C/30 s; finalmente 72 °C/10 min. El producto de amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imager - Bio-Rad).

También se procedió a liberar el fragmento mediante digestión de ADN plasmídico, utilizando 1 µg del vector de expresión, 1µl (10 U/µl) de la enzima de restricción BamHI (Promega, Madison, WI, USA), 1µl (8-12 U/µl) de la enzima de restricción XbaI (Promega, Madison, WI, USA), junto con 2 µl de buffer multicore 10X (Tris-HCl 25 mM, Mg(CH₃COO)₂ 10 mM, K(CH₃CO₂) 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.5 a 37 °C), 0.2 µl BSA acetilado (10 µg/µl) y llevando la reacción a un volumen final de 20 µl con agua destilada grado molecular. La reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imager - Bio-Rad).

La secuencia de nucleótidos se determinó mediante el servicio de secuenciación requerido a la compañía Macrogen Inc (Maryland, USA). Las clonas que contenían el fragmento se conservaron con glicerol al 10%.

Amplificación y clonación de la variante RmGlyRv

Se procedió a amplificar la secuencia codificante completa de la variante del receptor tipo glicina (*RmGlyRv*), añadiendo la secuencia conscenso kozak (ACCATG) en el extremo 5′. Así mismo también se incluyeron los sitios de restricción Hind III y Not I para proceder a clonar por medio de restricción. Se diseñaron los oligonucleótidos específicos sentido F-HindIII (TTAAGCTTACCATGGGCAGTGGCAAGACCGGAAGAATT) y antisentido R-NotI (TTGCGGCCGCGGTGAACTCGCTCATGTAGAGGTT). La reacción de PCR se realizó empleando ADN plasmídico como templado, del vector de secuenciación pCRTM4-TOPO[®] TA, que contenía la secuencia codificante completa de *RmGlyRv*; se utilizaron 1 µl del templado, 1 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmoles/µl, 20 µl del

master mix 2X (dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 17 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/5 min; 5 ciclos de 95 °C/30 s, 67 °C/30 s, 57 °C/30 s y 72 °C/1.5 min; 35 ciclos de 95 °C/30 s, 70 °C/20 s, 60.5 °C/20 s y 72 °C/1.5 min; finalmente 72 °C/10 min. 10 µl del producto amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador (Gel Doc[™] EZ Imager - Bio-Rad), el resto se purificó como se menciona previamente, para posterior digestión.

Se procedió a hacer doble digestión con las enzimas de restricción HindIII y NotI, del producto de PCR y el vector de expresión pcDNATM3.1/*myc*-His A (Mammalian Expression Vector), utilizando para una reacción 1 µg del vector de expresión y para otra reacción todo el producto de PCR purificado, 1µl (10 U/µl) de la enzima de restricción HindIII (Promega, Madison, WI, USA), con 2 µl de buffer E 10X (Tris-HCl 6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 7.5 a 37 °C), 0.2 µl BSA acetilado (10 µg/µl) y llevando la reacción a un volumen final de 20 µl con agua destilada grado molecular.

Después de la primera digestión se procedió a purificar ambas reacciones, como se menciona anteriormente. Se tomó todo el producto de ambas reacciones para la segunda digestión con 1µl (10 U/µl) de la enzima de restricción NotI (Promega, Madison, WI, USA), junto con 2 µl de buffer D 10X (Tris-HCl 6mM, MgCl₂ 6mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 7.9 a 37 °C), 0.2 µl BSA acetilado (10µg/µl) y llevando la reacción a un volumen final de 20 µl con agua destilada grado molecular. La reacción de digestión del vector de expresión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imager - Bio-Rad), para posterior purificación desde el gel de agarosa; mientras que la reacción de digestión del producto de PCR se purificó directamente.

Ligación del fragmento

Se procedió a hacer la ligación del fragmento de interés con el vector de expresión; se tomaron 5 μ l (193 ng) del vector de expresión y 3 μ l (1100 ng) del fragmento. Se añadió 1 μ l

de buffer de ligación 10X (Tris-HCl 300mM, pH 7.8, MgCl₂ 100mM, DTT 100mM y ATP 10mM) y 1 μ l de la enzima T4 DNA ligasa; las reacciones se llevaron a un volumen final de 10 μ l y se sometieron a ligación, incubándose a 4 °C toda la noche. Transcurrido este tiempo, se tomaron 1.5 μ l de la reacción para transformar una alícuota de 50 μ l de bacterias *E. coli* TOP 10.

Para la confirmación de la presencia del inserto en el vector de expresión, se seleccionaron colonias producto de la transformación, y se realizó PCR de colonia; además, se extrajo ADN plasmídico para realizar digestión.

PCR de colonia

Se picó cada colonia con una punta estéril, directamente de la placa con medio agar-LB, y se mezcló la colonia en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml, que contenía 10 µl de agua libre de nucleasas. Esta mezcla se sometió a calentamiento durante 10 minutos a 95 °C, con intervalos de agitación en vórtex cada 2 minutos. Después se centrifugó 3 minutos a 12,000 rpm. Se tomaron 5 µl del sobrenadante para realizar la reacción de PCR, empleando oligonucleótidos específicos del vector de expresión, sentido F-T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) y antisentido R-BGH (TAGAAGGCACAGTCGAGG), usando 0.5 µl de cada oligonucleótido a una concentración de 10 pmoles/µl, 10 µl del master mix 2X (dNTPs 0.4 mM, 2.5 U de ADN polimerasa DreamTaq, KCl 500 mM y MgCl₂ 20 mM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y 4 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C/5 min; 35 ciclos de 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 52 °C/30 s y 72 °C/1.5 min; finalmente 72 °C/10 min. La reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imager - Bio-Rad).

La digestión se realizó utilizando 1 μ g del vector de expresión, 1 μ l (10 U/ μ l) de la enzima de restricción Xho I (Promega, Madison, WI, USA), junto con 2 μ l de buffer D 10X (Tris-HCl

6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, pH 7.9 a 37 °C), 0.2 μ l BSA acetilado (10 μ g/ μ l) y llevando la reacción a un volumen final de 20 μ l con agua destilada grado molecular. La secuencia de nucleótidos se determinó mediante el servicio de secuenciación requerido a la compañía Macrogen Inc (Maryland, USA).

Las clonas que contenían el fragmento se conservaron con glicerol al 10%.

Extracción de ADN plasmídico utilizando midi prep

Se hizo un preinóculo de 5 ml con las clonas que contenían el plásmido de interés a extraer, en caldo LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 100 µg/ml de ampicilina) y se incubó 16 horas, a 37 °C y 250 rpm. Se agregó el contenido del preinóculo en un frasco que contenía 500 ml de caldo LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, 100 µg/ml de ampicilina) y se incubó de 12 a 16 horas a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente se centrifugó el contenido en tubos falcon de 50 ml, a 5,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se dividió en dos el botón resultante de los 500 ml de medio y se resuspendió cada botón con 4 ml de Buffer P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, 100 µg/ml RNasa A). Para realizar la lisis, se añadieron 4 ml de Buffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS m/v) a cada tubo, se mezcló vigorosamente hasta desarrollar un color azul y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a neutralizar la muestra con 4 ml de Buffer P3 (Acetato de potasio 3 M pH 5.5), agitando vigorosamente y se mantuvo en hielo por 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron los tubos por 40 minutos a 5,000 rpm a 4 °C. Se removió el sobrenadante, que contenía el ADN plasmídico y se centrifugó nuevamente por 40 minutos a 5,000 rpm a 4 °C. Previo a terminar el segundo ciclo de centrifugación, se tomó una columna QIAGENtip 100 y se equilibró, sobre una base dentro de un tubo falcon de 50 ml; se dejaron pasar por ella 4 ml de Buffer QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM pH 7, isopropanol al 15 % v/v, tritón X-100 v/v), hasta que por efecto de la gravedad fluyera todo el Buffer. Se tomó el sobrenadante resultante del segundo ciclo de centrifugación y se hizo pasar por la columna, previamente equilibrada. Se procedió a lavar el ADN retenido en la columna, mediante dos lavados con Buffer QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM pH 7, isopropanol al 15 % v/v), aplicando 10 ml de Buffer en cada lavado.

Posteriormente, se procedió a eluir el ADN con 5 ml de buffer QF (NaCl 1.25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, isopropanol al 15 % v/v); se precipitó el ADN eluido, por medio de la adición de isopropanol frío y la incubación de la mezcla a -20 °C durante 30 minutos. Después se procedió a alicuotar el total de la muestra en tubos eppendorf de 1.5 ml para poder centrifugarlos a 13,500 rpm, durante 15 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se conservaron los botones de ADN, los cuales se lavaron con 1 ml de etanol frío al 70 %. Se desprendieron los botones y se centrifugaron nuevamente a 13,500 rpm, por 5 minutos a 4 °C. Se dejaron secar los botones de los tubos y se procedió a resuspender el ADN con 100 μ l de agua libre de nucleasas, pasando los 100 μ l por cada tubo, hasta conservar un solo tubo. Se determinó la concentración de ADN por medio de la absorbancia en un espectrofotómetro, a una longitud de 260 y 280 nm, en un equipo NanoDropTM 2000.

Proliferación de la línea celular HEK 293

Se proliferó la línea celular 293 [HEK-293] (ATCC[®] CRL-1573[™]), empleando el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose; Sigma-Aldrich), suplementado con suero fetal bovino (ATCC[®]) al 10 %. Se realizó cambio de medio de cultivo cada 3 días.

Las células se visualizaron en un microscopio invertido (Optika, microscopes, Italy).

Ensayos de transfección celular

Estandarización de los ensayos de transfección

Los ensayos de estandarización de transfección celular se realizaron en placas de 96 pozos (Multiplacas Nunc™tratadas para cultivo celular), que contenían células HEK 293 a una densidad de 4x10⁴ células por pozo. Se utilizaron dos vectores para

hacer los ensayos iniciales, el vector de expresión Monster Green® Fluorescent Protein phMGFP Vector (Promega) y el vector pcDNATM3.1/myc-His A (Mammalian Expression Vector), que contenía la secuencia del receptor tipo glicina *RmGlyR*.

Se realizaron triplicados, a fin de probar diferentes concentraciones de lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent). En un triplicado se utilizó sólo el vector phMGFP, en otro triplicado se utilizó sólo el vector pcDNATM3.1/myc-His A y en un tercer triplicado se co-transfectó con una mezcla de ambos vectores, en una proporción 1:1. Se siguieron los siguientes pasos para transfectar cada pozo: En un tubo eppendorf de 0.5 ml estéril se agregó medio de cultivo DMEM sin suplementar más plásmido de expresión, a una concentración final (por pozo) de 200 ng en 15 µl de medio de cultivos sin suplementar; de igual manera en otros 3 tubos eppendorf estériles, se agregaron diferentes concentraciones de lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent), al tubo A se le agregó 0.75 µl de lipofectamina en 45 µl de medio de cultivo DMEM sin suplementar, que se dividió en 3 para probar con cada vector y la co-transfección (concentración final, 0.25 µl de lipofectamina por pozo), al tubo B se le agregó 1.1 µl de lipofectamina en 45 µl de medio de cultivo DMEM sin suplementar, que se dividió en 3 para probar con cada vector y la co-transfección (concentración final, 0.37 µl de lipofectamina por pozo) y al tubo C se le agregó 1.87 µl de lipofectamina en 45 µl de medio de cultivo DMEM sin suplementar, que se dividió en 3 para probar con cada vector y la co-transfección (concentración final, 0.625 µl de lipofectamina por pozo). Se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se mezcló el contenido de cada tubo donde se encontraba el ADN, con su respectiva concentración de lipofectamina y se mezcló suavemente, se dejó reposar por 30 minutos para permitir la formación del complejo ADN-Lípidos.

Se procedió a lavar las células adheridas al pozo con PBS 1X, y se agregaron 60 µl de medio de cultivo DMEM sin suplementar; luego se agregó el complejo ADN-Lípidos a cada pozo y se mezcló suavemente con ayuda de punta estéril. Se mantuvieron las células con la mezcla sin suero, por 1 hora, con intervalos de agitación cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo,

se añadió el suero fetal bovino, a fin de mantener una concentración final del 10 %. Se dejó este medio de cultivo toda la noche y se realizó el cambio por medio fresco suplementado al día siguiente.

Las células transfectadas con el vector phMGFP o su mezcla se visualizaron en un microscopio invertido con fluorescencia (Optika, microscopes, Italy) empleando un filtro de excitación de 470/40 nm y un filtro de emisión de 515 nm.

Transfección celular, empleando las variantes del receptor tipo glicina RmGlyR y RmGlyRv

Los ensayos de transfección celular se realizaron en placas de 6 pozos (Multiplacas NuncTM tratadas para cultivo celular), que contenían células HEK 293 a una densidad de 1×10^6 células por pozo. Para transfectar cada pozo con el vector pcDNATM3.1/myc-His A (Mammalian Expression Vector), que contenía la secuencia del receptor tipo glicina, ya fuese *RmGlyR* o *RmGlyRv*, se siguieron los siguientes pasos para cada variante por separado: En un tubo eppendorf de 0.5 ml estéril se agregó medio de cultivo DMEM sin suplementar más el plásmido, a una concentración final de 4,000 ng en 125 µl de medio de cultivo; de igual manera, en otro tubo eppendorf estéril se agregaron 112.5 µl de medio de cultivo DMEM sin suplementar más 12.5 µl del reactivo de transfección lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent). Se mezclaron suavemente ambos tubos y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se colocó el contenido de ambos tubos en un solo tubo y se mezcló suavemente, después se dejó reposar por 30 minutos, para permitir la formación del complejo ADN-Lípidos.

Se procedió a lavar las células adheridas al pozo con PBS 1X, y se agregaron 1,500 µl de medio de cultivo DMEM sin suplementar y luego se agregó el complejo ADN-Lípidos a cada pozo; se mezcló suavemente con ayuda de una punta estéril. Se mantuvieron las células con la mezcla sin suero por 1 hora, con intervalos de agitación cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió el suero fetal bovino, a fin de mantener una concentración final del 10

%. Se dejó este medio de cultivo toda la noche y se realizó el cambio por medio fresco suplementado al día siguiente.

Las células transfectadas se mantuvieron por 3 días con el medio de cultivo suplementado y se procedió a tripsinizar, a fin de estimular la proliferación celular, con 100 μ l de tripsina (Trypsin-EDTA Solution, 0.25% (1X); Caisson), manteniendo las células en el mismo pozo. Al cuarto día después de la transfección se añadió el antibiótico selectivo G 418 (G 418 disulfate salt; Sigma-Aldrich), a una concentración de 500 μ g/ml. Se mantuvieron las células con la misma concentración de antibiótico selectivo, hasta contar con un número suficiente de células para su posterior análisis. De forma contigua, un grupo de células control sin transfectar se trató con el antibiótico selectivo G 418 a una concentración de 500 μ g/ml, para establecer la dosis letal celular y el tiempo de la muerte celular total.

Extracción de proteína de membrana de células HEK 293

Para la extracción de proteína de membrana de la línea celular HEK 293, se utilizó un frasco de cultivo T-75, con células adherentes HEK 293. Se emplearon 2 soluciones para la extracción de proteína de citoplasma y de membranas:

Solución A (HEPES 40 mM pH 7.9, HCl 20 mM, EDTA 0.4 mM, EGTA 2 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 2 mM, PMSF 2 mM, ortovanadato 2 mM, NaF 100 mM, glicerol al 40 %, 20 mg/ml inhibidor de proteinasas cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail, ROCHE).

Solución B (HEPES 40 mM pH 7.9, NaCl 0.8 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 100 mM, ortovanadato 20 mM, DTT 2 mM, NaF 100 mM, glicerol al 40 %, 20 mg/ml inhibidor de proteinasas cOmplete[™] Protease Inhibitor Cocktail, ROCHE).

Se tomó el frasco con las células adherentes, a las que se les retiró el medio de cultivo y se lavaron en dos ocasiones con PBS 1X. Posteriormente se agregaron 10 ml de Buffer PBS 1X

frío, adicionado con PMSF 1 mM y se mantuvieron en hielo, por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se desprendieron las células con ayuda de un raspador celular (scraper). Se resuspendieron las células desprendidas dentro del frasco, con el PBS. Se retiró el PBS con las células, empleando una pipeta de 10 ml estéril y se colocó en un tubo falcon de 15 ml. Se centrifugó el contenido a 500 g por 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se conservó el botón con las células, el cual se resuspendió con 0.4 ml de la solución A; se dejó incubando con esta solución por 15 minutos en hielo. Se adicionaron 8 μl de NP-40 al 10 %, se agitó en vórtex, por 10 segundos, y después se centrifugó a 15,000 g por 2 minutos a 4 °C.

Para extraer la proteína correspondiente a membrana, se adicionaron 100 μ l de solución B y 1 μ l de NP-40 al 10 %, se mezcló y se dejó reposar en hielo, por 1 hora. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante, que contenía la proteína correspondiente a membrana.

Se almacenaron las fracciones de proteína a -80 °C, hasta su uso.

Extracción de proteína de membrana de ovocitos de rana Xenopus laevis

Para la extracción de proteína de membrana de ovocitos de rana *Xenopus laevis*, se utilizaron 20 ovocitos. Se emplearon 3 soluciones para la extracción de proteína de citoplasma y de membrana:

Buffer 1 (NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.6, PMSF 1 mM)

Buffer 2 (NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.6, PMSF 1 mM, sucrosa al 20 %)

Buffer 3 (NaCl 150 mM, HEPES 40 mM pH 7.8, MgCl₂ 6 mM, NP-40 0.05 %, glicerol al 10 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM)

Se colocaron los 20 ovocitos de rana en un tubo eppendorf de 1.5 ml; se procedió a hacer 2 lavados con 500 μ l de solución Barth, retirando el total de la solución agregada en cada lavado, con ayuda de una punta de micropipeta.

Posteriormente, se añadieron 100 µl de Buffer 1 a los 20 ovocitos y se rompieron, haciéndolos pasar por una punta de micropipeta de 200 µl. Después de romper los ovocitos, se les añadieron 100 µl de Buffer 2, se homogenizó con la micropipeta y se centrifugó a 13,500 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, que correspondía a las proteínas del citoplasma.

Al botón remanente se le añadieron 75 µl del Buffer 3, se mezcló e incubó por 20 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó nuevamente a 13,500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, que correspondía a la fracción de proteínas de membrana.

Se almacenaron las fracciones de proteína a -80 °C, hasta su uso.

Western blot

Western blot línea celular HEK 293

El ensayo de western blot se realizó utilizando geles de poliacrilamida preparativos al 12%, con los extractos de proteína de la línea celular HEK 293. Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido (Precision Plus Protein[™] All Blue Prestained Protein Standards, Bio-Rad). Se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa, en cámara de transferencia húmeda. Se bloqueó la membrana con leche descremada al 5 % en PBS-Tween 20 al 0.05 %, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces, con PBS-Tween al 0.1 %, durante 5 minutos cada lavado. Después se incubó la membrana con anticuerpo primario Anti-histidinas (Monoclonal Anti-polyHistidine, Clone HIS-1; Sigma-Aldrich) a una dilución 1:500 en PBS-Tween al 0.05 %, con leche descremada al 2.5 %, toda la noche a 4 °C. Seguido nuevamente de 3 lavados con PBS-Tween al 0.1 % y se incubó con

anticuerpo secundario (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad), a una dilución 1:1,000 en PBS-Tween al 0.05 %, con leche descremada al 2.5 %, durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados más con PBS-Tween al 0.1 % y se procedió a revelar la membrana utilizando HRP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se prepararon 10 ml de buffer de desarrollo de color, haciendo una dilución del stock, que se encontraba a 10X, a 1X con agua inyectable estéril. A esta mezcla se le añadieron 60 μ l de la solución B y 2 ml de la solución A. Se agitó y se agregó a la membrana.

Western blot línea celular Ovocitos de rana Xenopus laevis

El ensayo de western blot se realizó utilizando geles de poliacrilamida preparativos al 12%, con los extractos de proteína de los ovocitos de rana *Xenopus leavis*. Se utilizó el marcador de peso molecular BenchMark[™] His-tagged Protein Standard (Novex). Se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa, en cámara de transferencia semi húmeda, utilizando el sistema Trans-Blot® Turbo[™] Transfer System RTA Transfer Kits. Se bloqueó la membrana con BSA al 5 %, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween al 0.1 %, durante 5 minutos cada lavado. Después se incubó la membrana con anticuerpo primario monoclonal Anti-histidinas, con HRP acoplada (6xHis mAb/HRP Conjugate, clontech) a una dilución 1:1,500 en PBS-Tween al 0.05 %, toda la noche a 4 °C. Seguido nuevamente de 3 lavados con PBS-Tween al 0.1 %. Se procedió a revelar la membrana por medio de quimioluminiscencia, utilizando el reactivo Pierce[™] ECL Western Blotting Substrate.

Síntesis de ARNm In vitro

Para la síntesis de ARNm *in vitro*, inicialmente se procedió a preparar el ADN que se utilizó como templado, en donde es necesaria la presencia del promotor T7 para poder realizar la síntesis del ARNm.

Inicialmente, se linearizaron 15 μ g del vector en el extremo 3´ después del codón de paro de la secuencia de interés, con 3.75 μ l de la enzima de restricción Xba I (NEB®) y 4 μ l de CutSmart® Buffer (acetato de potasio 50 mM, Tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, BSA 100 μ g/ml, pH 7.9 a 25 °C), ajustando el volumen final a 40 μ l con agua libre de nucleasas; se incubó la reacción a 37 °C durante toda la noche. Después se le dió un tratamiento con proteinasa K (10 mg/ml) a la reacción; se le añadieron 0.5 μ l, más 1.25 μ l de SDS al 20 % y se ajustó la reacción a un volumen de 100 μ l. Se incubó a 50 °C por 15 minutos.

Después del tratamiento con proteinasa K, se purificó el ADN, adicionando 1 volumen de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1); se agitó la mezcla en vórtex, se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ADN tomando la fase acuosa, a la cual se le añadió 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, del volumen recuperado en la fase acuosa, se mezcló y se incubó a -20 °C durante 3 minutos. Después se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se conservó el botón y se descartó el sobrenadante. Se procedió a lavar el ADN con 1 ml de etanol al 70 %. Se agitó en vórtex para desprender el botón y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar el botón a una temperatura de 50 °C durante 10 o 15 minutos. Se resuspendió el botón con 10 µl de agua libre de nucleasas. Se determinó la concentración de ADN por medio de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de 260 y 280 nm en un equipo NanoDrop™ 2000.

Se tomó 1 µg del ADN linearizado y purificado, para iniciar la síntesis del ARNm con mMessage mMachine T7 ultra kit (Life Technologies, Texas, USA). Se descongelaron los reactivos de transcripción: Buffer de reacción 10X T7 (Tris, MgCl₂, Spermidina y DTT, el proveedor no indica las cantidades de cada componente en el Buffer), y la solución tamponada y neutralizada T7 2X NTP/ARCA (ATP 15 mM, CTP 15 mM, UTP 15 mM, GTP 3 mM, ARCA 12 mM). El buffer de reacción 10X T7 se debe mantener a temperatura ambiente, mientras que la solución tamponada se mantiene en hielo.

Se prepara la reacción a temperatura ambiente añadiendo cada componente en el siguiente orden: agua libre de nucleasas suficiente para un volumen final de reacción de 10 μ l, 5 μ l de solución tamponada T7 2X NTP/ARCA, 1 μ l de buffer de reacción 10X T7, 1 μ g ADN linearizado (idealmente que se encuentre esta concentración en no más de 2 μ l) y 1 μ l del mix de la enzima T7 (Buffer al 50 % de glicerol, ARN polimerasa, inhibidor de RNasa y otros componentes, que no menciona el proveedor). Se mezcló la reacción y se centrifugó por 10 segundos, para colocarse en un termociclador a 37 °C por 2 horas (80% de rendimiento, después de 1 hora; para un máximo rendimiento incubar 2 horas).

Después de la transcripción del ARNm se procedió a degradar el templado de ADN, añadiendo 0.5 μ l de TURBO DNase 1 (2 U/ μ L) e incubando por 15 minutos a 37 °C. Se procedió a descongelar los reactivos para la adición de la cola poli A. El agua libre de nucleasas, el Buffer 5X E-PAP (el proveedor no indica los componentes del Buffer), MnCl₂ 25 mM y la solución de ATP 10 mM.

Se inició la adición de la cola de poli A, añadiendo los componentes en el siguiente orden: 10 µl de la primera reacción de la transcripción de ARN, 18 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl de Buffer 5X E-PAP, 10 µl de MnCl₂ 25 mM y 5 µl de solución de ATP 10 mM. Se mezcló y se retiró 1 µl para analizar el ARN en gel desnaturalizante. Finalmente, se añadieron 2 µl de la enzima E-PAP (2 U/µL), se mezcló e incubó en termociclador a 37 °C por 45 minutos.

Se tomaron 18 μ l de la muestra y se hicieron alícuotas de 2 μ l. El resto del volumen de la reacción (30 μ l), se precipitó empleando LiCl; se le añadió ½ volumen de LiCl (15 μ l) y se incubó a -20 °C por al menos 30 minutos. Después se centrifugó a 13,500 rpm por 15 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante. El botón de RNA precipitado se lavó con etanol al 70 %. Se desprendió la pastilla y se procedió a centrifugar nuevamente a 13,500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se dejó secar la pastilla a 50 °C por 10 o 15 minutos y se resuspendió en 15 μ l de agua DEPC.

Se procedió a cuantificar tanto el ARNm precipitado como el no precipitado; también se analizó el ARNm a través de un gel desnaturalizante de agarosa al 1 %.

Microinyección de ARNm y ensayos de voltage clamp

La evaluación fisiológica del receptor se llevó a cabo en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, a través de la técnica electrofisiológica "Voltage Clamp".

La técnica de Voltage Clamp consiste en la medición de las conductancias celulares, mientras se mantiene un voltaje de membrana fijo. Las variables dependientes de voltaje y de tiempo de las ecuaciones de conductancia se interpolan a partir de las mediciones. El potencial de membrana se mide con un microelectrodo colocado en el interior de la célula y se compara electrónicamente con el voltaje que se quiere mantener, gracias a un amplificador y con comando de voltaje. Posteriormente, el circuito de control pasa una corriente retrógrada a la célula, a través de otro electrodo intracelular. Si el potencial de membrana es diferente del potencial comando, el amplificador de pinzamiento envía una corriente al axón a través del segundo electrodo. Esta retroalimentación permite que el voltaje se mantenga en las condiciones necesarias. Esta técnica permite obtener una mejor información del comportamiento de los canales, especialmente de los procesos de apertura y cierre, según el potencial de membrana establecido.

Extracción y defoliculación de ovocitos

Inicialmente se realizó cirugía a una hembra adulta de la especie *Xenopus laevis*, para la extracción de los ovocitos. La rana fue anestesiada en un contenedor con 500 ml de agua y el anestésico 3-aminobenzoico etil éster (Sigma-Aldrich) al 0.03 % peso/volumen; se dejaron transcurrir de 15 a 20 minutos, hasta que el animal no respondía a estímulos externos.

Posteriormente, se colocó la rana en posición frontal sobre una cama de hielo y se procedió a realizar laparotomía; a través de una incisión en el abdomen se extrajo un fragmento del lóbulo ovárico. Después se suturó la herida y se dejó pasar el efecto del anestésico al animal, en agua potable a temperatura ambiente. Los ovocitos se colocaron en cajas Petri (60 x 15 mm) con agar, sobre el cual se adicionó solución de Barth (NaCl 88 mM, Ca(NO₃)₂ 0.33 mM, CaCl₂ 0.41 mM, KCl 1 mM, MgSO₄ 0.82 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4), y se mantuvieron inmersos hasta su posterior defoliculación.

Se seleccionaron ovocitos en estadio de maduración V y VI, que fueron defoliculados de forma manual en solución Ringer (NaCl 115 mM, CaCl₂ 1.8 mM, KCl 2 mM, HEPES 5 mM, pH 7.4), con ayuda de pinzas de tejidos blandos. Los ovocitos defoliculados se dejaron reposar en solución Barth, para su recuperación durante unas horas o toda la noche, previo a la microinyección.

Microinyección de ARNm

Previo a la inyección el ARNm se desnaturalizó, incubándolo a una temperatura de 70 °C durante 3 minutos; posteriormente se mantuvo en hielo.

Se utilizaron capilares de vidrio 3 $\frac{1}{2}$ (Drummond, Scientific Company, USA), para elaborar la micropipeta en el estirador de pipetas Flaming/Brown P-87. Se llenó la micropipeta con aceite mineral y se colocó en el microinyector Nanoliter 2000 (World Precision Instruments), para aspirar el ARNm a inyectar; se inyectaron 50 nl/ovocito de ARNm a una concentración que oscilaba entre 0.7 y 2 µg/µl.

La microinyección se hizo en el citoplasma del ovocito, en el polo claro, utilizando ARNm de RmGlyR, ARNm de RmGlyRv y una mezcla de ambas variantes. Después de la inyección, se incubaron los ovocitos en solución Barth a 14 °C hasta su uso (12-36 horas), previo a los experimentos electrofisiológicos.

Registros electrofisiológicos

Se realizaron los registros de corriente de membrana con dos electrodos, usando un amplificador Axoclamp 2B (Axon instruments), conectado a un convertidor análogo a digital

MiniDigi 1A y el programa AxoScope 9.2 (Axon Instruments, Molecular Devices, Foster City, CA). Las pipetas empleadas para los registros se elaboraron con capilares para hematocrito, con una resistencia entre 0.3-0.8 Ω , utilizando el estirador de pipetas Flaming/Brown P-87. Se llenaron las pipetas con una solución interna (KCl 2 M, EGTA 10 mM; pH 7.8).

Los ovocitos se colocaron en una cámara de plástico, donde se realizaron los registros electrofisiológicos. Se observaron con estéreomicroscopio para colocarlos con el polo claro hacia arriba y ponerlos en contacto con los electrodos, utilizando un micromanipulador (WR-88; Narishigue Scientific Instrument Lab, Tokyo Japan). Durante los registros los ovocitos estuvieron en perfusión continúa con solución externa (NaCl 88 mM; KCl 2 mM; CaCl₂ 1 mM; MgCl₂ 1 mM y HEPES 5 mM pH 7.4), a una velocidad de 3.3 ml/min.

Se prepararon stocks de soluciones de los agonistas a una concentración de 200 mM de Ivermectina, GABA, glicina y glutamato (Sigma-Aldrich). Se empleó solución externa para disolver las sales y el pH del stock de glutamato se ajustó a 7.4 con NaOH 5M. La aplicación de las soluciones se realizó mediante un sistema de perfusión con 8 tubos, en donde se colocó solución externa para lavar los ovocitos, después de agregar las soluciones de los agonistas.

Se probaron diferentes concentraciones de los agonistas GABA, glicina y glutamato, para evaluar la funcionalidad del receptor putativo de glicina y su variante. Las concentraciones utilizadas de cada agonista fueron: 10μ M, 100μ M, 1 mM, 10 mM, 25 mM, 35 mM, 50 mM, 100 mM y 150 mM. De igual manera se probó la combinación de los agonistas previamente mencionados a 1 mM y 50 mM con IVM a una concentración de 10 μ M, 50μ M y 100 μ M.

Después de la aplicación de los agonistas se realizaron lavados de 5 minutos con solución externa, para remover la sustancia y poder realizar otra aplicación.

RESULTADOS

Caracterización del extremo 5' de la secuencia RmGlyR (KJ476181)

Como antecedente directo a este trabajo se contaba con el reporte de la secuencia del receptor tipo glicina *RmGlyR*, con número de acceso **KJ476181**; el reporte indica que la secuencia no contiene metionina como codón inicial y que no predice péptido señal; en el presente trabajo se corroboraron estos datos, realizando nuevamente la caracterización del extremo 5´ de dicha secuencia, a través del diseño de oligonucleótidos específicos GSP1, GSP2 y GSP3, y mediante el ensayo 5´ RACE. Se obtuvo un producto de aproximadamente 700 pb (Fig. 10).



Figura 10. Determinación del extremo 5'de la secuencia KJ476181. Producto del RACE 5', amplificado de aproximadamente 700 pb, se muestra en el carril 4. **GSP1** (CAAGGTGAACGTGGCATTGA), **GSP2** (GAACACGCCTGTGTCGATAGC) y **GSP3** (GAATGTGACAGCGTTGCGTG).

El producto del ensayo 5´ RACE se clonó en el vector de secuenciación PCRTM2.1-TOPO®, se procedió a transformar bacterias *E.coli*, se seleccionaron 2 colonias para la confirmación del inserto, y a través de PCR con los oligonucleótidos específicos del vector de secuenciación (F-M13 y R-M13), se obtuvo un fragmento de 670 pb (Fig. 11), de acuerdo a los datos de secuenciación.

Los resultados de la secuenciación de una de las clonas confirmaron lo reportado previamente, que la secuencia no inicia con metionina y no cuenta con péptido señal. No se encontraron diferencias con respecto a la secuencia ya reportada; el alineamiento se muestra en la figura 12.



Figura 11. Transformación de bacterias *E. coli*, con el producto del RACE 5' y confirmación del inserto por PCR con F-M13 y R-M13 (670 pb) se muestra en los carriles 1 y 2. **F-M13** (TGTAAAACGACGGCCAGT) y antisentido **R-M13** (CAGGAAACAGCTATGAC).

Se realizó solicitud comercial de síntesis del gen codificante para *RmGlyR*, así como la subclonación en el vector de expresión vector pcDNATM3.1/*myc*-His A. Se corroboró la presencia del inserto mediante PCR, empleando oligonucleótidos específicos de la secuencia (Fig. 13). También se procedió a realizar la liberación del fragmento, utilizando enzimas de restricción y se realizó la secuenciación de la construcción.

Identificación de la secuencia RmGlyRv, variante del receptor tipo de glicina

Se realizó un análisis de BLAST de la secuencia del receptor tipo glicina de *R. microplus* previamente reportado (*RmGlyR*) con la base de secuencias ESTs, presentando una identidad en sus extremos 5'y 3' con dos secuencias ESTs de la misma especie de garrapata: EST777211 y EST777210, respectivamente. La primera guarda una identidad del 99% con una cobertura del 29%, y a diferencia de *RmGlyR*, esta secuencia sí predice péptido señal, mientras que la segunda secuencia EST presentó una identidad del 97%, con una cobertura del 41% (Fig. 14).

RACEGLI341M13F	TTAATQWPPLFQYRAGASRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERESDSP
RACEGLI341GSP3	TTAATQWPPLFQYRAGASRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERESDSP
RACEGLI341M13-RpUC	TTAATQWPPLFQYRAGASRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERESDSP
RACEGLI342GSP3	TTAATQWPPLFQYRAGASRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERESDSP
RACEGLI342M13F	TTAATQWPPLFQYRAGASRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERESDSP
RACEGLI342M13RpUC	TTAATQWPPLFQYRAGASRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERESDSP
RGLIKJ476181	SVNQTTAATQWPPLFQYCAGAPRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERESDSP

RACEGLI341M13F	ATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIYVNSI
RACEGLI341GSP3	ATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIYVNSI
RACEGLI341M13-RpUC	ATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIYVNSI
RACEGLI342GSP3	ATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIYVNSI
RACEGLI342M13F	ATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIYVNSI
RACEGLI342M13RpUC	ATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIYVNSI
RGLIKJ476181	ATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIYVNSI

RACEGLI341M13F	GPVNANNMEYGMDIYLRQSWQDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMGKIWKPDLFFRNVKEA
RACEGLI341GSP3	GPVNANNMEYGMDIYLRQSWQDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMGKIWKPDLFFRNVKEA
RACEGLI341M13-RpUC	GPVNANNMEYGMDIYLRQSWQDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMGKIWKPDLFFRNVKEA
RACEGLI342GSP3	GPVNANNMEYGMDIYLRQSWQDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMGKIWKPDLFFRNVKEA
RACEGLI342M13F	GPVNANNMEYGMDIYLRQSWQDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMGKIWKPDLFFRNVKEA
RACEGLI342M13RpUC	GPVNANNMEYGMDIYLRQSWQDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMGKIWKPDLFFRNVKEA
RGLIKJ476181	GPVNANNMEYGMDIYLRQSWQDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMSKIWKPDLFFRNVKEA

RACEGLI341M13F	SFHYVTVPNKLVKLGPDGEVLYSMRLTLRLA
RACEGLI341GSP3	SFHYVTVPNKLVKLGPDGEVLYSMRLTLRLA
RACEGLI341M13-RpUC	SFHYVTVPNKLVKLGPDGEVLYSMRLTLRLA
RACEGLI342GSP3	SFHYVTVPNKLVKLGPDGEVLYSMRLTLRLA
RACEGLI342M13F	SFHYVTVPNKLVKLGPDGEVLYSMRLTLRLA
RACEGLI342M13RpUC	SFHYVTVPNKLVKLGPDGEVLYSMRLTLRLA
RGLIKJ476181	sfhyvtvpnklvklgpdgevlfsmrltlrla> *257 AA

Figura 12. Alineamiento de secuencia de aminoácidos del producto RACE 5´ clonado y secuenciado vs la secuencia previamente reportada KJ476181. *En la figura sólo se muestra el extremo 5´, la secuencia original reportada, cuenta con 257 AA más que no se muestran en la imagen.



Figura 13. Gen sintético y confirmación de inserto (A) PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la secuencia **FsinRgly** (TCTGCCCACCTTTCTGATCG) **RsinRgly** (CCGATCCACACGTCAATTGC).

Tamaño de amplicón 180 pb. Se muestran tres clonas, carriles 1,2 y 3. (B) Liberación de fragmento con enzimas de restricción BamHI y XbaI, 1419 pb. Se muestran dos clonas, carriles 1 y 2.

Para confirmar la expresión de la secuencia identificada se llevaron a cabo dos reacciones de PCR empleando los oligonucleótidos F-EST211 y R-EST211 para la primera reacción y F-EST211B y R-EST211 para la segunda, obteniendo dos fragmentos de 768 pb y 630 pb, respectivamente (Fig. 15). El análisis de la secuenciación de los fragmentos amplificados confirmó la predicción de péptido señal.

		Color	key for alig	nment s	cores							
	<40	40-50	50-8	80	80-200	>=200						
	1	250	500	2000 1 750	1000	1250						
criptions												
Sequences producing significant alignments: Select: <u>All None</u> Selected:0	Dietanco troe of result	lte										
Sequences producing significant alignments: Select: <u>All None</u> Selected:0 Alignments Download ~ <u>GenBank Graphics D</u>	Distance tree of result	Its Description					Max score	Total score	Query	E value	Ident	Accession
Sequences producing significant alignments: Select: <u>All None</u> Selected:0 Alignments Download - <u>GenBank Graphics</u> D EST774282 BEA Rhipicephalus microplus cDNA clone.	Distance tree of result e BEAC208, mRNA sequ	Its Description Iuence					Max score 1304	Total score 1304	Query cover 50%	E value 0.0	Ident 100%	CAccession CK184967.1
Sequences producing significant alignments: Select: <u>All None</u> Selected:0 Alignments: Download ~ GenBank Graphics: D EST774282 BEA Rhipicephalus microplus cDNA clone EST660210 RAB Rhipicephalus appendiculatus cDNA:	Distance tree of result e BEAC208, mRNA sequ A clone RABAD38 5' end	Its Description Luence d, mRNA sequence	28				Max score 1304 1166	Total score 1304 1166	Query cover 50% 53%	E value 0.0 0.0	Ident 100% 95%	CK184967.1 CD788849.1
Sequences producing significant alignments: Select: All None Selected 0 Alignments Download - GenBank Graphics D EST774282 BEA Rhipicephalus microplus cDNA clone EST660210 RAB Rhipicephalus appendiculatus cDNA: EST777210 BEA Rhipicephalus microplus cDNA clone	Distance tree of result e BEAC208, mRNA seq A clone RABAD38 5' end e BEACJ17, mRNA sequ	Description uence d. mRNA sequence uence	22				Max score 1304 1166 983	Total score 1304 1166 983	Query cover 50% 53% 41%	E value 0.0 0.0 0.0	Ident 100% 95% 97%	CK184967.1 CD788849.1 CK187895.1
Sequences producing significant alignments: Select: All None Selected:0 Alignments Download CenBank Graphics D EST774282 BEA Rhiplcephalus microplus CDNA clone EST660210 RAB Rhiplcephalus appendiculatus CDNA. EST77210 BEA Rhiplcephalus appendiculatus CDNA. HAL P4-051 G07 Adult female salivary gland cDNA.lli	Distance tree of result e BEAC208, mRNA sequ A clone RABAD38 5' end e BEACJ17, mRNA sequ library HyalmarqSG1 H	Its Description uence d, mRNA sequence uence walomma margina	28 atum rufipes cDN	IA, mRNA se	equence		Max score 1304 1166 983 804	Total score 1304 1166 983 804	Query cover 50% 53% 41% 41%	E value 0.0 0.0 0.0 0.0	Ident 100% 95% 97% 92%	CK184967.1 CD788849.1 CK187895.1 GR907396.1
Sequences producing significant alignments: Select: All None Selected:0 Alignments Download GenBank Graphics D EST774282 BEA Rhipicephalus microplus cDNA clone EST660210 RAB Rhipicephalus appendiculatus cDNA EST777210 BEA Rhipicephalus microplus cDNA clone HAL P4-051. G07 Adult female salivary utand cDNA lil EST777211. BEA Rhipicephalus microplus cDNA clone.	Distance tree of result e BEAC208. mRNA sequ a clone RABAD38 5' enc e BEACJ17. mRNA sequ library HallmarqSC11 H e BEACJ17. mRNA sequ	Description usence d.mRNA sequence usence Walomma margina usence	28 atum rufipes cDN	IA, mRNA se	equence		Max score 1304 1166 983 804 749	Total score 1304 1166 983 804 749	Query cover 50% 53% 41% 41% 29%	E value 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0	Ident 100% 95% 97% 92% 99%	CK184967.1 CD788849.1 CK187895.1 GR907396.1 CK187896.1

Figura 14. Alineamiento local de la secuencia KJ476181, empleando el servicio BLAST (NCBI, USA) vs la base de datos de las ESTs.



Figura 15. Amplificación por PCR de la secuencia EST777211. PCR1, **F-EST211** (ACCACGACTCGCCACAGC) y **R-EST211** (AGAACAGGTCGGGGCTTCCAG) (768 pb), carril 1. PCR2, **F-EST211B** (TCTCTTCCACGCATCATCGCTG) y **R-EST211** (630 pb), carril 2.
Para determinar la secuencia codificante completa de *RmGlyRv*, se realizó una PCR con los oligonucleótidos F-RmGlyRv y R-RmGlyRv, donde se obtuvo un fragmento de ~1400 pb (Fig.16A), el cual fue clonado en el vector pCRTM4-TOPO[®] TA y se confirmó la presencia del inserto mediante digestión, utilizando la enzima de restricción EcoR I, se liberó un fragmento de ~1400 pb y se observó una banda por encima de este fragmento liberado, en un peso de ~3950 pb que corresponde al vector vacío (Fig. 16B).



Figura 16. Amplificación y clonación de RmGlyRv. (A) PCR de la secuencia codificante de la varianteRmGlyRv.F-RmGlyRv(AGTGGCAAGACCGGAAGAA)yR-RmGlyRv(TCAGGTGAACTCGCTCATGT), aproximadamente ~1400 pb, carriles del 1 al 4 (B) Confirmación de laclonación del fragmento amplificado en el vector pCR®4-TOPO® y liberación del fragmento con EcoR I ~1400pb, Colonias 4, 5 y 6. Además se muestra una banda en la parte superior del fragmento liberado, correspondienteal vector vacío con un peso aproximado de 3950 pb, carriles del 1 al 3.

Con base en el análisis de los resultados de secuenciación, *RmGlyRv* cuenta con un marco de lectura abierto de 1401 pb que codifican para 467 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 52.86 kDa y un punto isoeléctrico de 8.32 (Fig. 17). No contiene metionina como codón inicial, lo que coincide con la secuencia *RmGlyR* reportada previamente por Flores *et al.* (2014), con la que guarda un 92% de identidad, y muestra las características propias de una subunidad que conforma los pLGICs, tales como un dominio N-terminal extracelular, cuatro dominios transmembranales y un bucle que se forma por la unión de dos cisteínas (Fig. 19).

Los alineamientos muestran identidad con los pLGICs caracterizados en *R. microplus*, 32% con el GluCl y 29 % con el receptor GABA (Fig. 18).

1	tggcaa W O	lgac D	cgq R	qgaa G	agaa R	aaa K	gac D	tcq S	acq T	gtgo V	cgg R	tggo W	ctto L	ctco L	ctgt L	c C	gcti A	S S	tqc C	60
61	cttgca	igtg V	caa	ctg	gcat z	.gc	agc	gtg V	ctg	CCC3	acgo	gtgo v	cgao R	gcad z	ctgo	gato D	JCC Z	ggaa C	agc	120
121	agtaco	:gga	.ggc	acgo	ggta	agc	agt	agt	gago E	gtgi	tac	ctga	agca	agco	gtgo	jago	cgco	jaga	agt	180
181	gattct	.ccc	gcg.	acaa	agco	s gac	s gtg	cct	ь gcga	v acgi	ı togo	дссо	ъ Jaga	acgo		в Jgao	к ggto	ь gga	з gac	240
0.4.1	D S	P	A	Т	S	D	V	Р	A	Т	S	A	E	Т	Р	G	G	G	D	200
241	P S	ig cg V	P	gcto A	P	.gg R	L L	A	F	L	Jaca D	aaga K	M	L	jago E	2agi Q	Y	Jaca D	aag K	300
301	cgcgcc	tgg	ccc	acct	taco	gga	atg	ggg	cat	ccaa	acg	taco	gtca	aaaq	gtga	aca	atat	caco	gtg	360
361	R A	W ata	P	T	Y atoa	G	M aca	G	H	P atou	T Taat	Y tato	V	K	V	N	I	Y	V	420
501	N S	I	G	P	V	N	A	N	N	M	E	Y	G	M	D	I	Y	L	R	120
421	cagtct	tgg	cag	gaco	ctco	cgg	ttg	aac	gtg	ggca	aagi	taco	ggag	gtga	acca	acto	ccg	gtga	acc	480
481	Q S atcaac	w	Q nag	D daca	ь atca	к ata	аас Т	N aaα	v atc:	G taa:	K aagu	Y CCC	G Taco	v tat	T tot	T tco	P	V	T ata	540
101	I N	G	E	D	I	M	G	K	I	W	K	P	D	L	F	F	R	N	V	010
541	aaggag K E	gcc Z	agc s	ttco F	cact н	tac v	gtc v	acg T	gtt v	CCC3	aaca N	aago ĸ	tgo T.	ytca v	aago ĸ	tgo T.	ggto G	CCC(P	gat D	600
601	ggagag	làcà	ctg	ttca	agca	atg	cgc	ctc	acg	ttg	cgg	ctc	gcct	gct	tca	atgt		tc	agg	660
661	G E	A	L	F	S	М	R	L	Т	L	R	L	A	C	F	М	S	F	R	720
001	H F	.000 P	L	D	acyc T	Q	R	C	H	I	L	L	ggao G	P	Y	A	Q	T	I	120
721	gaacaa	aca	gcg	att	tcad	cgg	caa	gac	acg	gat	ccca	atto	gtad	ctto	gaad	cggo	ccca	atco	gaa	780
781	E Q	T	A +++	I nati	S	R rta	Q Cac	D	T t car	D	P	I ~ = t t	V	L	E	R	P	I	E	840
101	I P	.yay E	F	D	L	V	H	N	S	Y	gga G	H	C	N	R	A	I	D	T	040
841	ggcgtg	sttc	agt	ttco	ctca	aat	gcc	acg	ttta	acci	tg	gago	cgco	caga	aato	ggct	aco	cac	ttg -	900
901	G V atacac	E. Iaca	s tac	E Cta	ц СССА	N	A ttc	T cta	F atc	T at Ca	L ata	E at ct	R Cat	Q Q	N nt ct	G	Y tot	H - aa	Lato	960
501	I Q	T	Y	L	P	T	F	L	I	V	M	V	S	W	V	S	F	W	L	TM1
961	aacgto	gac	gca	acgo	ccc	gcg	cga	gtc	acc	ctco	gga	gtca	acca	acgo	ctgo	tca	acca	atga	acc	1020
1021	accgtt	aca	tcc	aaco	r atad	a cac	к аса	v caq	cta	сса:		v atat	 .cat	Laca	ц atta	aad	T T	atco	Tac	1080
	TV	A	S	G	V	R	Т	Q	L	P	Ρ	V	S	Y	I	K	A	Ι	D	
1081	gtgtgg	fata T	ggc C	gca†	tgct	cct	gtc v	atg M	gtc [.]	ttco F	ggao C	gcco z	ctgo T.	taq T	yagt म	tca F	acgo T	cta T.	gtc v	1140 TM3
1141	aactac	ttg	tcg	agaa	agca	aaa	ctg	cgc	ccc	gago	gagi	ttto	- gca	agt	ccta	atca	aaca	ata	ttc	1200
	<u>N</u> Y	L	S	R	S	K	L	R	Ρ	Е	Е	F	R	ĸ	S	Ι	Ν	I	F	
1201	catcgo H R	jaac N	cgg	aaaq ĸ	ggto	ggc G	gaa F	aaa ĸ	cga P	gato	ggc	gago F	jaaq F	ggto c	D D	aca N	agt v	zaco v	gag F	1260
1261	acccgo	:ggg	cac	atg	gaad	ctt	cag	aag	aac	ctca	aaga	aggt		caga	aaco	gtto	jaca	aaa	gtg	1320
	TR	G	Η	М	Ε	L	Q	K	Ν	L	K	R	S	Q	N	V	D	K	V	TM4
1321	tgtcgc	atc T	atg M	ttt: F	ccat P	tc F	gtg v	ttc F	ttco F	gtci v	ttc: F	aaco N	ytco v	ytct v	zact v	zggt ໜ	tc। ह	tac v	tac v	1380
1381	ctctac	atg	age	gagi	ttca	acc.	tga	14	04	v	Ľ	TN	v	v	T	vv	Е	1	<u> </u>	
	L Y	M	S	E	F	Т	_													

Figura 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducida de la variante del receptor tipo glicina de *R*. *microplus* (RmGlyRv). Se marca en un rectángulo con líneas punteadas el péptido señal. Se remarca en color

gris el bucle característico de la familia Cys-loop y se resaltan con un cuadro las cisteínas que lo forman. Se subrayan los cuatro pases transmembranales y se indica al lado derecho el número del pase transmembranal (TM1-TM4). El guion indica el codón de paro.

RmGlyRv RmGlyR	WQDRGRKDSTVRWLLLCASCLAVQLACSVLPTVRALDAGSSTGGTGSSSEVYLSSVERES SVNQTTAATQWPPLFQYCAGAPRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERES
RmGlut	MSVHSWRFCVPLVALAFFLLILLSCPSAWGKANFRAIEKRI
RmGABA	MRQAMAFSCWSFVLFVAVAVTSAGRDNGPAPLRPGQTQRGQNITQI *
RmGlvRv	DSPATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFT.DKMLEOYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNTYV
RmGlvR	
RmGlut	LDSIIGOGRYDCRIRPMGINNTDGPCVVRVNIFI
RmGABA	
NIIGADA	* * * * * *
DmclasDer	
NIIGI YKV	NOTOF VNANNMETGMDTTLEQOWQDELEN VGAVAVAVATOTINGEDINGATWAPDEFANV
RIIGLYR	
RmGlut	RSISKIDDLSMEYTVQMTFREQWRDERLQYDDLGGQVRYLTLTE-PDKLWKPDLFFSNE
RmGABA	ISISTVSEVQMDFTSDFYFRQSWRDERLSFQKS-PDLESMTVGAEVAEKIWVPDTFFANE **. :*:: :: :*:.*: **. *: **. *: *:*
RMGLYRV	KEASFHYVTVPNKLVKLGPDGEALFSMRLTLRLACFMSFRHFPLDTQRCHILLGPYAQTI
RmGlyR	KEASFHYVTVPNKLVKLGPDGEVLFSMRLTLRLACFMSFRHFPLDTQRCHILLGPYAQTI
RmGlut	KEGHFHNIIMPNVLLRIHPNGDVLFSIRISLVLSCPMNLKFYPLDKQICSIVMVSYGYTT
RmGABA	KSAYFHAATTPNTFLRIGSGGEVFRSIRLTVTASCPMDLRYFPMDROACTIEIESFGYTM
	* **
RmGlyRv	EQTAISRQDTDP-IVLERPIEIPEFDLVHNSYGHCNRAIDTGVFSFLNATFTLERQNGYH
RmGlyR	EQTAISWQDTDP-IVLERPIEIPEFDLVHNSYGHYNRAIDTGVFSFLNATFTLERQNGYH
RmGlut	EDLVFLWKEGDP-VQVTKNLHLPRFTLERFQTDYCTSRTNTGEYSCLRVDLVFKREFSYY
RmGABA	KDIRYRWSDGDTSVRIAKEVELPQFKVLGHVQKAKEVALTTGNYSRLVCEIRFARSMGYY
	:: .: *. : : : :: *. * : ** : ** : : **:
RmGlyRv	LIOTYLPTFLIVMVSWVSFWLNVDATPARVTLGVTTLLTMTTVASGVRTOLPPVSYIKAI
RmGlvR	LIOTYLPTFLIVMISWVSFWLNVDATPARVTLGVTTLLTMTTVASGVRTOLPPVSYIKAI
RmGlut.	LIOIYIPCCMLVIVSWVSFWLDPTSTPARVSLGVTTLLTMATOISGINASLPPVSYTKAT
RmGABA	LTOTYTPACLTVVTSWVSFWLHRNASPARVALCVTTVLTMTTLMSSTNAALPKTSYVKST
Tunoribri	*** *:* ::*::******: : ***************
RmGlvRv	DVWIGACSVMVFGALLEFTLVNYLSRSKLRPEEFRKSINIFHRNRKGGEKRDGEEGPNKY
RmGlvR	DVWIGACSVMVFGALLEFTLVNYLSRSKLRPEEFRKSINIFHRNRKGGEKRDGEEGPNKY
RmGlut	DVWTGVCLTEVEGALLEEALVNYASRSDSRRONTOKOKORKWELEPPLDSDHLEDGATTE
RmGARA	DVYLCTCFVMVFTALLEYAAVCYLCKRTTMRKTRCOOLAKLAEOHRORCAAASSNEPSSE
runoribri	
PmCl vPv	ЕФРCUMFI ОКИ
RIIIGI YRV DmClurD	
RIIIGI YK DmClut	
RMGIUT	
RmGABA	PLLASPEVS1VKTVGSCQVCPAAVASQGQPREAPPTGFTMGRRGADQCCPGLQGSCQVCP :
RmGlyRv	TK
RmGlyR	LK
RmGlut	LCKAWLSRFPT
RmGABA	AAVASQTQQQAPPPGIPMEVRLKMVDPKGFSKSSTLENTVNGAPDIEAAFCKNPNKLFGV
RmGlyRv	RSQNVDKVCRIMFPFVFFVFNVVYWFYYLYMSEFT
RmGlyR	RSQNVDKVCRIMFPFVFFVFNVVYWFYYLYMSEFT 92%
RmGlut	RSKRIDVVSRIFFPLMFALFNLVYWTTYLFREDEEDE 32%
RmGABA	SPSDIDKYSRVVFPVCFVCFNLMYWIIYLHISDVLPDDVGDD 29%
	:* .*:.**. * **::** **:

Figura 18. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la secuencia deducida de la variante del receptor tipo glicina (*RmGlyRv*), los receptores de GlyR (KJ476181), GluCl (AHE41097) y GABA (AHE41094). Las cisteínas que forman el bucle Cys-loop se resaltan en un cuadro, los pases transmembranales (TM1-TM4)

sombreados en gris. El dominio PAR se resalta en un cuadro con líneas punteadas y se indica con una flecha el residuo de glicina en el tercer pase transmembranal.

Se predijo la presencia de péptido señal con un tamaño de 29 aminoácidos (WQDRGRKDSTVRWLLLCASCLAVQLACSV) (Fig. 19A). Después del corte de dicho péptido la proteína cuenta con un extremo N-terminal extracelular de 239 aminoácidos (aa), cuatro hélices transmembranales con 22 aa cada una de ellas a excepción de la 2^a que contiene 23 aa. Dos regiones intracelulares, la primera de 5 aa y la segunda de 55 aa, una región extracelular intermedia de 13 aa y un C-terminal extracelular de 4 aa (Fig. 19B). Se procedió a realizar la representación de la secuencia de aminoácidos en dos dimensiones, donde se observa la conformación de la proteína en la membrana (Fig. 20). Estos resultados muestran la existencia de una variante del receptor tipo glicina previamente reportado por Flores *et al.* (2014), el cual también posee el residuo de glicina en el tercer pase transmembranal que tentativamente le conferiría sensibilidad a IVM, así como el motivo PAR para la selectividad a iones cloro, pero que además contiene péptido señal (Fig 18).



Figura 19. Predicción del péptido señal (A) y de las regiones transmembranales (B) de la variante del receptor tipo glicina (*RmGlyRv*) en la garrapata del ganado bovino *R. microplus*.



Figura 20. Representación en 2D de la variante del receptor tipo glicina de la garrapata *R. microplus*, donde se muestran los dominios extracelulares, transmembranales e intracelulares.

Perfil de expresión de RmGlyRv

Los niveles de expresión de la variante *RmGlyRv* se normalizaron con los niveles de *actina*. Los niveles de expresión más altos de la variante *RmGlyRv* se observaron en el tejido adulto de ovario, seguido de larva, tejido adulto de intestino y huevo. *RmGlyRv* muestra un patrón de expresión similar al reportado para *RmGlyR* (Flores y cols., 2014), lo que podría sugerir que estas dos secuencias están participando en la formación del receptor putativo de glicina (Fig. 21).



Figura 21. Expressión de la variante del gen *RmGlyRv* en diferentes etapas del desarrollo de *R. microplus*. Las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando ARN total de huevos, larvas y tejidos adultos (ovario e intestino), y los oligonucléotidos específicos **F-RGLY2** (GCAAGACCGGAAGAAAAGAC) y **R- RGLY2** (GTGCCTCCG GTACTGCTTC). El gen de la *actina* de la garrapata se utilizó como control; oligonuclétidos específicos **F-B-Actina-Rm** (CCCATCTACGAAGGTTACGCC) y **R-B-Actina-Rm** (CGCACGATTTCACGCTCA G). Los datos se expresan como una relación de densidad entre los productos *RmGlyRv* y *actina*.

Clonación de RmGlyrRv

Para la clonación de la secuencia de la variante RmGlyRv dentro del vector de expresión pcDNATM3.1/myc-His A, se procedió a diseñar oligos específicos incluyendo los sitios de restricción Hind III en el extremo 5´ y Not I en el extremo 3´. Se realizaron reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos, sentido F-HindIII (TTAAGCTTACCATGGGCAGTGGCAAGAACCGGAAGAATT) y antisentido R-NotI (TTGCGGCCGCGGTGAACTCGCTCATGTAGAGGTT) y se obtuvo un amplicón de 1420 pb (Fig. 22).



Figura 22. Amplificación por PCR de la variante *RmGlyRv*, incluyendo los sitios de restricción HindIII y NotI.F-HindIII(TTAAGCTTACCATGGGCAGTGGCAAGACCGGAAGAATT)**R-NotI**(TTGCGGCCGCGGTGAACTCGCTCATGTAGAGGTT), tamaño de amplicón 1420 pb, carriles del 1 al 3.

Se realizó la digestión del producto de PCR y el vector de expresión pcDNATM3.1/myc-His A; posteriormente se realizó la ligación y clonación del vector en bacterias *E. coli* TOP 10. Se seleccionaron 3 clonas y se confirmó la presencia del inserto, por medio de PCR de colonia, donde se obtuvo un fragmento de 1,500 pb; también se realizó la digestión del

plásmido extraído de dos colonias, utilizando la enzima de restricción XhoI; la secuencia cuenta con un sitio interno de corte y el tamaño del fragmento liberado fue de 1,100 pb (Fig 23).



Figura 23. Amplificación y clonación de *RmGlyRv* en el vector de expresión pcDNATM3.1/myc-His A. (A) PCR de colonia con oligonucleótidos del vector pcDNATM3.1/myc-His A, **F-T7** (TAATACGACTCACTATAGGG) y **R-BGH** (TAGAAGGCACAGTCGAGG), colonias 1, 2 y 3, se muestra en los carriles 1,2 y 3 respectivamente. (B) Digestión con XhoI. Sitio interno dentro de la secuencia, se libera un fragmento de 1,100 pb, colonias 1 y 2, se muestra en los carriles 1 y 2, respectivamente.

De igual manera, los resultados de la secuenciación mostraron la presencia del fragmento de interés dentro del vector.

Ensayos de transfección celular

Después de haber confirmado la presencia de las secuencias codificantes del receptor tipo glicina, en el vector pcDNATM3.1/*myc*-His A, ya fuese *RmGlyR* o *RmGlyRv*, se procedió a realizar los ensayos de estandarización de transfección celular en la línea celular HEK 293; para ello se empleó el vector de expresión pcDNATM3.1/*myc*-His A y el vector Monster Green® Fluorescent Protein phMGFP, que expresa GFP como gen reportero. Se realizaron ensayos de transfección de cada vector en forma individual, así como ensayos de co-transfección, para determinar la concentración óptima a emplear en la transfección (Fig. 24). El proceso de transfección fue agresivo para las células y en los primeros días después de la transfección se observó una alteración de la morfología celular y la muerte de un alto

porcentaje de células, las cuales comenzaron a recuperar su morfología y a proliferar de forma regular, con el transcurso del tiempo.

Se determinó que con la concentración más alta de lipofectamina, recomendada por el proveedor, era con la que se presentaba una mayor expresión del gen reportero GFP, por lo que se decidió utilizar esta concentración para posteriores ensayos de transfección celular. Así mismo, también se pudo observar un pico máximo de expresión a las 48 horas, post-transfección.





Figura 24. Estandarización de la transfección celular. Ensayos de transfección con el vector Monster Green® Fluorescent Protein phMGFP y co-transfección con el vector Monster Green® Fluorescent Protein phMGFP y el vector de expresión pcDNATM3.1/*myc*-His A (*RmglyR*) al día 1 (A), 2 (B) y 3 (C).

Se procedió a transfectar nuevamente las células HEK 293 con el vector de expresión pcDNA^{TM3}.1/myc-His A (*RmglyR*) y el vector con la variante del receptor *RmglyRv*, utilizando un pasaje más joven para dichos ensayos y así obtener una línea estable, a partir de la cual se pudiera realizar el análisis de expresión de los receptores; para ello se utilizó el antibiótico selectivo G418 y se monitoreó la proliferación de las células transfectadas a través del paso de los días (Fig. 25 A y B); de forma conjunta, se sometió a tratamiento con el antibiótico, un grupo de células control para establecer la dosis letal celular y el tiempo de la muerte celular total. Se pudo obtener una línea resistente al antibiótico selectivo G418 al cabo de 20 días, puesto que el control de células sin transfectar no presentaba células viables desde el día 10 después de aplicar el tratamiento con el antibiótico selectivo G418. La proliferación celular al día 20 fue en incremento y al día 40 ya se contaba con un número de células considerable y suficiente para realizar extracción de proteína y ensayos de western blot.



Figura 25A. Representación de la transfección y selección las de células transfectadas con las variantes del receptor tipo glicina (RmglyR y RmglyRv). Seguimiento de las células transfectadas y seleccionadas con el antibiótico G418 a los días 1 y 2.



Figura 25B. Representación de la transfección y selección de las células transfectadas con las variantes del receptor tipo glicina (RmglyR y RmglyRv). Seguimiento de las células transfectadas y seleccionadas con el antibiótico G418 a los días 7, 20 y 40.

Extracción de proteína de membrana, células HEK 293

Se realizó la extracción de proteínas de citoplasma y membrana de las células resistentes al antibiótico selectivo G418 y células control. Se procedió a realizar el análisis de las proteínas extraídas a través de SDS-PAGE (Fig. 26).

Después de analizar las proteínas a través de SDS-PAGE, se procedió a detectar la etiqueta de histidinas de la proteína del receptor de glicina por medio de Western Blot. Se pudo detectar la proteína en la fracción extraída de proteínas de membrana, encontrándose en el peso esperado de 50 kDa (Fig. 27).



Figura 26. Análisis de la expresión de proteínas en células HEK 293. Extracción de proteínas de citoplasma (C), membrana (M) y botón remanente (B).

Western blot línea celular HEK 293



Figura 27. Detección de la etiqueta de histidinas en la proteína del receptor tipo glicina (RmGlyR) en células HEK 293. Control positivo (+), Marcador de peso molecular, Proteínas de citoplasma (C) y Proteínas de membrana (M).

Extracción de proteína de membrana, ovocitos de rana Xenopus laevis

Se realizó la extracción de proteínas de citoplasma y membrana de los ovocitos de rana *Xenopus laevis* y se procedió a realizar el análisis de las proteínas extraídas a través de SDS-PAGE (Fig. 28).



Figura 28. Análisis de la expresión de proteínas en ovocitos de rana *Xenopus laevis*. Extracción de proteínas de citoplasma (C) y membrana (M), de ovocitos control, ovocitos microinyectados con ARNm de *RmGlyR*, ovocitos microinyectados con ARNm de *RmGlyRv* y los microinyectados con una mezcla de ambas variantes (Mix).

Western blot ovocitos de rana Xenopus laevis

Después de analizar las proteínas a través de SDS-PAGE, se procedió a detectar la etiqueta de histidinas de la proteína del receptor de glicina por medio de Western Blot. Se pudo detectar la proteína en la fracción extraída de proteínas de membrana, sólo de los ovocitos microinyectados con la mezcla de las variantes, encontrándose en el peso esperado de 50 kDa (Fig. 29).



Figura 29. Detección de la etiqueta de histidinas en la proteína del receptor tipo glicina en ovocitos de rana *Xenopus laevis*. Control positivo (+), el marcador de peso molecular (BenchMarkTM His-tagged Protein Standard, Novex), Proteínas de citoplasma (C), Proteínas de membrana (M), de ovocitos microinyectados con ARNm de *RmGlyR*, ovocitos microinyectados con ARNm de *RmGlyR*, ovocitos microinyectados con una mezcla de ambas variantes (Mix).

Registros electrofisiológicos: Voltage Clamp

Se realizaron registros electrofisiológicos utilizando ovocitos control, a los que se les realizó microinyección con agua, ovocitos microinyectados con ARNm de *RmGlyR*, ovocitos microinyectados con ARNm de *RmGlyRv* y ovocitos microinyectados con una mezcla de ambas variantes.

Se probaron diferentes concentraciones de los agonistas GABA, glicina y glutamato; las concentraciones utilizadas de cada agonista fueron 10 μ M, 100 μ M, 1 mM, 10 mM, 25 mM,

35 mM, 50 mM, 100 mM y 150 mM. De igual manera se probó la combinación de los agonistas previamente mencionados a 1 mM y 50 mM con IVM a una concentración de 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M.

No se observaron corrientes en los ovocitos, al aplicar los agonistas GABA y glicina en las concentraciones previamente descritas. Sin embargo, sí se observaron pequeñas corrientes desde la concentración 25 mM del agonista glutamato, tanto en los ovocitos control, como en los ovocitos microinyectados con ARNm de ambas variantes. Se procedió a realizar registros posteriores, empleando la concentración de 50 y 100 mM de glutamato. Se observaron diferencias significativas al comparar las corrientes de los ovocitos control vs los ovocitos microinyectados con ARNm de la variante RmGlyRv a la concentración de 100 mM se observaron diferencias significativas al comparar con el control (Fig. 30).



Registro de corrientes

Figura 30. Registro de corrientes en ovocitos de rana *Xenopus laevis*. Ovocitos control, ovocitos microinyectados con ARNm de la variante *RmGlyR*, con ARNm de la variante *RmGlyRv* y la mezcla de ambas variantes. * Indica significancia estadística.

No se observó incremento de la respuesta al co-aplicar el agonista glutamato con el agonista alostérico IVM. En la figura 31 se muestran ejemplos de las respuestas al aplicar el agonista glutamato en los ovocitos control y en los ovocitos microinyectados con ARNm.



Figura 31. Representación de las cinéticas de los receptores, después de la aplicación de glutamato 100 mM durante 5 y 10 segundos. Las barras sólidas indican la aplicación del glutamato.

DISCUSIÓN

La garrapata del ganado bovino *R. microplus* es un ectoparásito que tiene un enorme impacto en el sector ganadero, causando pérdidas económicas importantes, debido a la afección directa de la salud animal.

A pesar de que existen diversos métodos de control, donde se destaca el uso de agentes acaricidas, las medidas de prevención y control no son suficientemente efectivas, mostrando la gran capacidad de este ectoparásito para desarrollar resistencia a los agentes acaricidas.

En el presente estudio se logró caracterizar molecularmente una variante del receptor tipo glicina (RmGlyR, no. de acceso KJ476181), previamente reportado por nuestro grupo de trabajo (Flores-Fernández y cols., 2014). La presencia de una variante del receptor putativo de glicina, así como niveles de expresión similares en los diferentes tejidos de la garrapata, sugieren que estas dos secuencias podrían estar participando en la formación de un canal funcional. Ambas secuencias comparten identidad del 92 %, encontrándose que difieren en el extremo 5', donde se predice la presencia de péptido señal en la variante RmGlyRv, a diferencia de la secuencia previamente reportada.

Otro punto importante a mencionar es que las secuencias no cuentan con metionina como codón inicial. Existen reportes en los que se ha observado que el uso de codones alternativos en la iniciación de la traducción de un único ARNm, puede dar origen a isoformas de la proteína; gracias a este tipo de mecanismos es que se puede generar una gran diversidad de proteínas, por la expresión alternativa de genes, incrementando la complejidad del organismo (Touriol y cols., 2003; Rodriguez-Valle y cols., 2010).

Teniendo esto como antecedente, se decidió evaluar la funcionalidad de ambas secuencias, a través de registros electrofisiológicos. Como se mencionó anteriormente, en la garrapata R. *microplus* sólo se han caracterizado molecular y funcionalmente dos receptores, que son capaces de formar un canal homomérico funcional que permite el paso del anión cloro,

gracias a la modulación de los neurotransmisores GABA y glutamato (Hope y cols., 2010; Gassel y cols., 2014).

Los ensayos electrofisiológicos del presente estudio muestran baja conductancia del receptor en respuesta al agonista glutamato, lo que podría indicar que es probable que el neurotransmisor glutamato esté regulando a este receptor; sin embargo, las concentraciones son muy elevadas y se encuentran fuera del rango normal fisiológico.

El glutamato es un neurotransmisor indispensable, responsable de desencadenar señales postsinápticas al ser reconocido por los receptores post-sinápticos; en un estudio previo se cuestionó la posición filogenética y los detalles moleculares de cuándo y dónde ocurre el reconocimiento de este agonista en canales de cloro activados por ligando. Los resultados mostraron que para el reconocimiento del glutamato es necesaria la presencia de un residuo de arginina en la base del sitio de unión, que se originó por lo menos tres veces distintas, según los análisis filogenéticos; en la Figura 32 se pueden apreciar los sitios de unión del agonista glutamato, a través de un alineamiento parcial de la secuencia de aminoácidos de las subunidades GluCl de Ecdisozoos, moluscos y platelmintos. También se muestran dos subunidades GABAAR de Ecdisozoos y una subunidad GlyR de un vertebrado. En la imagen sólo se muestran los bucles de unión a ligando A-G y la parte de la hélice M2 (Lynagh y cols., 2015).

Así mismo, Lynagh y cols (2015), a través de mutación dirigida en la secuencia del modelo GluCl (AVR-14B), en los residuos que intervienen en la unión del agonista glutamato R76, R95, Q141, S169, A197, Y199, Y248 y T245, Figura 33A, determinaron los sitios críticos que afectan la unión del ligando en el superfilo Ecdysozoa. Los registros electrofisiológicos realizados en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, microinyectados con ARNm de la secuencia nativa de AVR-14B y ARNs mensajeros mutados de AVR-14B (R95A, S169A, A197E, Y199F, K219A, T245A, Y248F), mostraron que las mutaciones en R95A, S169A, A197E, Y199F y T245A, provocaban una notable disminución en la afinidad al agonista glutamato,

Figura 33 B y C. Los artrópodos como la garrapata pertenecen al superfilo Ecdysozoa, por lo que en el presente estudio se procedió a hacer un análisis de las variantes del receptor tipo glicina, para determinar si existía la presencia de estos sitios de unión al agonista glutamato (Figura 34).

		G	D	А	E	В	F	С	M2
Dme	GluCla	VRS	FREQW	FFSN	YSI	ASYGW	QQKD	TGEYSC	PARVS
Mdo	GluCla	VRS	FREQW	FFSN	YSI	ASYGW	QVVK	TGEYSC	PARVS
Cel	GLC-1	LRT	LRESW	FFPN	YSV	ASYAY	QLKV	TGIYSC	PARVT
Cel	GLC-2	IRM	FREQW	FFPT	YSS	VSYAH	QLKP	TGIYSC	PARVT
Cel	GLC-3	IRS	FREEW	FFQN	YSV	ASYAY	QLKK	TGTYSC	PARVT
Нсо	GLC-5	LRS	FREEW	FFQN	YSC	ASYAY	QIKD	TGAYSC	PARVT
Нсо	AVR-14B	LRS	FREEW	FFQN	YSV	ASYAY	QQKD	TGEYSC	PARVS
Cel	AVR-15	LRS	FRESW	FFQN	YSV	ASYAY	QLKA	TGSYSC	PARVT
Aca	GluCl	LLS	LSMTW	YFRN	YSM	QSYTY	THDA	TPKFAC	PARVS
Aca	GluC2	VLS	LRQRW	FFRN	YSM	ASYGY	DYQD	TGSFSC	PARIS
Sma	GluCl-2	VLA	LRQVW	FFRN	YSQ	GSYGY	ELAE	TGQYTC	PARVP
Sma	GluCl-3	IHS	LRQRW	FFRN	FSQ	GSYGY	SMAV	TGRFSC	PARIS
Нсо	UNC49B	VSS	MRQTW	FFPN	TSQ	ESYCY	SAVV	SGSYRR	PARVG
Dme	RDL	VLS	FRQFW	FFVN	RSI	ESFGY	SVGV	TGNYSR	PARVA
Hsa	GlyRa1	INS		FFAN	YSI	ESFGY	QVAD	TGKFTC	PARVG

Figura 32. Sitios de unión del agonista glutamato. Alineamiento parcial de la secuencia de aminoácidos de las subunidades GluCl de Ecdisozoos (en color verde), moluscos (en color naranja) y platelmintos (en color rojo). También se muestran dos subunidades GABAAR de Ecdisozoos y una subunidad GlyR de un vertebrado (en color negro). En la imagen, sólo se muestran los bucles de unión a ligando A-G y la parte de la hélice M2. Dme, *Drosophila melanogaster*; Mdo, *Musca domestica*; Cel, *Caenorhabditis elegans*; Hco, *Haemonchus contortus*; Aca, *Aplysia californica*; Sma; *Schistosoma mansoni*; Hsa, *Homo sapiens*. Las flechas indican los residuos de unión al agonista del motivo AAA o los residuos críticos de arginina (color azul, letra resaltada en negrita). (Figura tomada de Lynagh y cols., 2015).



Figura 33. Mutaciones en el modelo GluCl, AVR-14B, que confirman un modo de unión común en GluCls de Ecdisozoos. (A) Residuos que intervienen en la unión del agonista glutamato R76, R95, Q141, S169, A197, Y199, Y248 y T245. (B) Ejemplos de las cinéticas de los receptores mutados en el modelo GluCl, AVR-14B, las barras sólidas indican la aplicación del glutamato (1 mM para K219A y Y248F; 100 mM para los otros) (C) Curva dosis respuesta del registro de corrientes en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, microinyectados con ARNm de la secuencia nativa de AVR-14B y ARNs mensajeros mutados de AVR-14B. (Figura tomada de Lynagh y cols., 2015).

Se realizó un alineamiento de las secuencias de las variantes del receptor tipo glicina, con la secuencia de *GluCl* de *H.contortus* (Modelo AVR-14B) y se pudo observar la presencia de 4 residuos que intervienen en la unión del agonista glutamato en ambas variantes, con algunos cambios en el **Loop G** R118N (RmGlyR) y R121N (RmGlyRv); **Loop A** Q174R (RmGlyR) y Q177R (RmGlyRv); **Loop B** A230G (RmGlyR) y A233G (RmGlyRv); **Loop C** Y277F (RmGlyR) y Y300F (RmGlyRv).

RmGlyrv	SGKTGRKDSTVRWLLLCASCLAVQLACSVLPTARALDAGSSTGGTGSSSEVYLSSVERES
RmGLyR	SVNQTTAATQWPPLFQYCAGAPRTSLRFHQQEKVVISSTGGTGSSSEVYLSSVERES
<i>H</i> .ContortusGluCl	MRNSVPLATRIGPMLALICTVSTIMS
	: : *. : :*::
R <i>mGlyrv</i>	${\tt DSPATSDVPATSAETPGGSDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIY} \underline{{\tt V}}$
RmGLyR	${\tt DSPATSDVPATSAETPGGGDPSVPAPRLAFLDKMLEQYDKRAWPTYGMGHPTYVKVNIY} \underline{{\tt V}}$
H.ContortusGluCl	AVEAKRKLKEQEIIQRILNNYDWRVRPRGLNASWPDTGGPVLVTVNIY
	: : : : : : : ** * *. *.**:
<u>Lc</u>	bop G Loop D
RmGlyrv	NS IGPVNANNMEYGMDIY LRQSW QDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMGKIWK
RmGLyR	NS IGPVNANNMEYGMDIY LRQSW QDLRLNVSKYGVTTPVTINGEDIMSKIWK
H.ContortusGluCl	RS ISKIDDVNMEYSAQFT FREEW VDARLAYGRFEDESTEVPPFVVLATSENADQSQQIWM
	.**. :: ****. :: :*:.* * ** .::* :. * :**
	Loop A Loop E
RmGlyrv	PDLFFRN VKEASFHYVTVPNKLVKLGPDGEV LFSMR LTLRLACFMSFRHFPLDTQRCHIL
RmGLyR	PDLFFRN VKEASFHYVTVPNKLVKLGPDGEV LFSMR LTLRLACFMSFRHFPLDTQRCHIL
H.ContortusGluCl	PDTFFQN EKEARRHLIDKPNVLIRIHKDGSI LYSVR LSLVLSCPMSLEFYPLDRQNCLID
	** **:* *** * : ** *::: **.:***:* *:* *:
	Loop B Loop F Loop C
RmGlyrv	LGPYAQTIEQTAISWQDTDPIVLERPIEIPEFDLVHNSYGHYNRAIDTGVFSFLNATF
RmGLyR	LGPYAQTIEQTAISWQDTDPIVLERPIEIPEFDLVHNSYGHYNRAIDTGVFSFLNATF
H.ContortusGluCl	LASYAY TTQDIKYEWKEQNPVQQKDGLRQSLPSFELQDVVTKYCTSKTNTGEYSCLRTQM
	*** * :: .*:: :*: : .:*.*: : . :** :* *.: :
	<u>M2</u>
RmGlyrv	TLERQNGYHLIQTYLPTFLIVMISWVSFWLNVDAT <mark>PARVT</mark> LGVTTLLTMTTVASGVRT
RmGLyR	TLERQNGYHLIQTYLPTFLIVMISWVSFWLNVDAT <mark>PARVT</mark> LGVTTLLTMTTVASGVRT
H.ContortusGluCl	VLRREFSYYLLQLYIPSFMLVIVSWVSFWLDKDSV <mark>PARVT</mark> LGVTTLLTMTTQESHSGINA
	.*.*: .*:*:* *:*:*::*******************
RmGlyrv	QLPPVSYIKAIDVWIGACSVMVFGALLEFTLVNYLSRSKLRPEEFRKSINIFHRNRKGGE
RmGLyR	QLPPVSYIKAIDVWIGACSVMVFGALLEFTLVNYLSRSKLRPEEFRKSINIFHRNRKGGE
H.ContortusGluCl	KLPPVSYTKAIDVWIGVCLAFIFGALLEFALVNYAARKDMSCGQRMMKQLPQDGYR
	***** *********************************
RmGlyrv	KRDGEEGPNKYETRGHMELQKNLKRSQNVDKVCRIMFPFVFFVFNVVYWFYYLYMSEFT-
RmGLyR	KRUGEEGPNKYETRGHMELQKNLKRSQNVDKVCRIMFPFVFFVFNVVYWFYYLYMSEFT-
H.ContortusGluCl	PLAGSQPRTSFCCRIFVRRYKERSKRIDVVSRLVFPIGYACFNVLYWAVYLM
	*.:: * : ::: :**:.:* *.*::** : ***:** **

Figura 34. Alineamiento de aminoácidos de las secuencias RmGlyR, RmGlyRv de *R. microplus* y GluCl de *H. contortus* (Modelo AVR-14B). Se resaltan en negritas los bucles de unión a ligando A-G y la parte de la hélice M2, en rojo los residuos que intervienen en la unión del agonista glutamato R76, R95, Q141, S169, A197, Y199, Y248 y T245.

La presencia de Asparagina (N) en lugar de Arginina (R) en el Loop G, es común en los receptores modulados por glicina, sin embargo en los receptores tipo glicina, también es importante la presencia del Loop B, conservando los residuos G231-T236, y la presencia del

Loop C con los residuos N272-F282, los cuales no se observan de manera clara en las secuencias de las variantes del receptor tipo glicina, ya que predominan los residuos involucrados en la unión del agonista glutamato, aunado a una baja respuesta al agonista glutamato y nula al agonista glicina, en los ovocitos microinyectados con las variantes del receptor; esta información sugiere que el agonista que modula a este canal de cloro modulado por ligando, muy probablemente es el glutamato.



Figura 35. Residuo de arginina en el sitio de unión, principal o complementario, que reconoce al grupo α carboxilo del glutamato en GluCls de Ecdisozoos. (A) Ejemplos de las cinéticas de los receptores microinyectados con la secuencia WT o ARN´s mensajeros mutados; el glutamato genera corrientes robustas en el receptor nativo, y en la triple mutante R76N/Q141R/K219A, pero no en la mutante con un solo cambio R76N. (Aplicación de glutamato de 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 y 1 mM, para la WT; 100 mM para R76N; 1, 3, 10, 30 y 100 mM para la triple mutante). (B) Curva dosis respuesta del registro de corrientes en ovocitos de rana *Xenopus laevis*, microinyectados con ARNs mensajeros mutados de AVR-14B. (Figura tomada de Lynagh y cols., 2015).

La baja respuesta al agonista glutamato se podría atribuir a la presencia de un cambio en el Loop G de R118N (RmGlyR) y R121N (RmGlyRv), puesto que la arginina en esta posición juega un papel clave en la afinidad del agonista. Como se muestra en la figura 35, en los ensayos de Lynagh y cols (2015), la sustitución de este residuo provoca la latencia del

receptor, ya que los residuos de arginina reconocen al grupo α -carboxilo del glutamato en los GluCls de Ecdisozoos.

Dentro de los objetivos en el presente estudio se resalta el determinar si este canal es activado por el agente acaricida Ivermectina, ya que se conoce poco sobre los mecanismos de acción de la IVM y se desconocen los mecanismos moleculares a través de los cuales la garrapata del ganado bovino *R. microplus*, desarrolla resistencia a este agente acaricida. Sin embargo, no fue posible determinar si la IVM es capaz de activar alostéricamente al canal modulado por ligando, ya que no se observó cambio en las corrientes al co-aplicar IVM con el agonista glutamato. Nicke y cols. (2004) realizaron un estudio sobre el mecanismo de ensamble del receptor nicotínico de la rata en ovocitos de rana *Xenopus leavis*, encontrando que la subunidad alfa1 se expresaba en diferentes estados de ensamblaje, incluyendo trímeros, tetrámeros, pentámeros y agregados. Sólo las subunidades que lograron formar un homopentámero, adquirieron hidratos de carbono complejos y fueron acarreados hacia la superficie celular. Aquellas que no fueron capaces de formar dicha estructura, fueron retenidas en el retículo endoplásmico, lo que limita la expresión superficial de los receptores.

Por esta razón, se sugiere que hay un ensamblaje incompleto de las variantes del canal de cloro modulado por ligando, aunado a que se observaron respuestas también en los ovocitos control, y la baja expresión de la proteína, detectada en los ensayos de western blot.

Existen reportes donde se muestra que los ovocitos de rana *Xenopus laevis* expresan de forma endógena subunidades de receptores modulados por glutamato; estas proteínas pueden, bajo ciertas condiciones, ser electrofisiológicamente detectables e influir en los registros electrofisiológicos realizados sobre los receptores recombinantes que se busca analizar en los ovocitos (Schmidt, Klein, y Hollmann, 2009).

Por otro lado, estudios funcionales de receptores Cys-loop provenientes de invertebrados, se han visto limitados por la inhabilidad de ciertas subunidades a expresarse funcionalmente en sistemas heterólogos, como ovocitos de *Xenopus laevis* o líneas celulares. Así mismo, existen

reportes en los cuales se observa dependencia directa de la presencia de otras subunidades para la formación de un canal heteromérico, al no tener la subunidad por sí misma, la capacidad de formar un canal homomérico (Nicke y cols., 2004; Kim y cols., 2015).

Se sabe que una gran variedad de agentes acaricidas actúan en el sistema nervioso de *R. microplus*, provocando alteraciones en las funciones vitales y derivando en la muerte. De ahí, la importancia de conocer los sitios de unión o de actividad de los acaricidas, para evitar la presencia de resistencia cruzada, que es muy común cuando las moléculas comparten sitios de unión. Hope y cols (2010) reportaron la presencia de una mutación en la secuencia del receptor modulado por GABA de la garrapata *R. microplus*, en la posición 868-9, que genera un cambio del aminoácido treonina por leucina, confiriéndole resistencia al plaguicida dieldrina. Sin embargo, no existen reportes de este tipo de mutaciones asociadas a IVM, puesto que, en primera instancia, se desconocen los blancos moleculares en este ectoparásito. Existe aún una gran brecha en cuanto al conocimiento del genoma y las funciones de un sinfín de genes en la garrapata *R.microplus*. Dilucidar el genoma de los organismos, así como la función de las proteínas a las que codifican, aporta información vital para el estudio de un sistema biológico. Este conocimiento a su vez asiste en la resolución de problemas que afectan la salud humana y animal (Ullmann y cols., 2005).

CONCLUSIONES

En el presente estudio se pudo confirmar que la secuencia del receptor tipo glicina (KJ476181) no cuenta con metionina como codón inicial, como ya se había reportado previamente. Los análisis de homología de la secuencia KJ476181, mostraron la presencia de dos secuencias en la base de datos de las ESTs de la misma especie de garrapata, con las que comparte identidad en sus extremos 5'y 3': EST777211 y EST777210, respectivamente. Estas secuencias se tomaron como referencia para caracterizar la secuencia de la variante del receptor tipo glicina (*RmGlyRv*); una vez caracterizada, se realizaron ensayos semicuantitativos de expresión en los tres estadios de desarrollo de la garrapata *R. microplus*, huevo, larva y tejidos adultos (intestino y ovario). Dicha variante comparte características propias del receptor tipo glicina, presentando variaciones en la región donde se predice el péptido señal. Por otro lado, el alineamiento con la secuencia del GluCl de *H. contortus* (Modelo AVR-14B), muestra la presencia de residuos que son característicos de los canales de cloro modulados por glutamato del superfilo Ecdysozoa, en el posible sitio de unión a ligando, con cambios de residuos básicos para el anclaje del glutamato y que pueden estar influyendo en la respuesta del canal.

Ambas variantes del receptor se expresaron en dos sistemas heterólogos, la línea celular HEK 293 y ovocitos de rana *Xenopus laevis*, sin embargo, los niveles de expresión fueron muy bajos, lo cual se vio reflejado en los ensayos funcionales, puesto que los registros electrofisiológicos realizados en ovocitos de rana, microinyectados con las variantes de forma independiente, así como co-expresados, mostraron bajas corrientes al aplicar el agonista glutamato a altas dosis y sin cambios en la corriente, al co-aplicar el agonista alostérico IVM. Por tal motivo, se sugiere que el receptor no es capaz de formar un canal pentamérico funcional, al ser expresado de forma homomérica, ni como heterómero.

PERSPECTIVAS

Nos enfrentamos a grandes limitantes, como el hecho de que el genoma de la garrapata *R*. *microplus* aún no se encuentra secuenciado, ni caracterizado en su totalidad, y uno de los objetivos de este proyecto es aportar información al conocimiento de la biología de la garrapata.

Como perspectiva directa, es necesario realizar estudios de los complejos proteicos presentes en los ovocitos microinyectados con el canal, puesto que el uso de marcaje y elaboración de geles nativos nos podrían indicar si es capaz de formarse un dímero, trímero, tetrámero o un pentámero con estas subunidades, así como determinar si son atrapados por el retículo endoplásmico de los ovocitos, lo que limitaría su expresión en la superficie de la membrana.

De igual manera, se requiere la co-expresión de estas variantes del canal de cloro modulado por ligando, en conjunción con los receptores de la familia Cys-loop, presentes en la garrapata *R. microplus* y que ya han sido caracterizados funcionalmente de forma homomérica, para verificar si es necesaria la presencia de otras subunidades para el transporte y ensamble de las mismas, en vías de la formación de un canal funcional.

Actualmente se está trabajando con ensayos de PCR en tiempo real, para determinar la expresión de ambas variantes en tejidos de diferentes etapas de desarrollo de este ectoparásito.

La obtención de un canal funcional, podría darnos indicios de la posible participación de estas estructuras en el mecanismo de acción de la IVM, así como su asociación a resistencia. Es necesaria la búsqueda de estrategias racionales, para el diseño de agentes acaricidas, a fin de generar agentes más efectivos y con menores posibilidades de desarrollar resistencia.

REFERENCIAS

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*. Elsevier.
- Anderson, J. F. (2002). The natural history of ticks. Medical Clinics of North America.
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. Infectious Disease Clinics of North America.
- Baenziger, J. E., & Corringer, P.-J. (2011). 3D structure and allosteric modulation of the transmembrane domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 60(1), 116–125. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.08.007
- Binnington, K. C. (1981). Innervation of coxal muscles, heart and other organs in the cattle tick, Boophilus microplus Canestrini (Acarina: Ixodidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 10(2), 109–119.
- Binnington, K. C., & Stone, B. F. (1977). Distribution of catecholamines in the cattle tick Boophilus microplus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 58(1), 21–28. https://doi.org/10.1016/0306-4492(77)90004-1
- Calimet, N., Simoes, M., Changeux, J.-P., Karplus, M., Taly, A., & Cecchini, M. (2013). A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), E3987-96. Retrieved fromhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3801054&tool=pmce ntrez&rendertype=abstract
- Casida, J. E., Gammon, D. W., Glickman, A. H., & Lawrence, L. J. (1983). Mechanisms of

Selective Action of Pyrethroid Insecticides. Annual Review of Pharmacology andToxicology,23(1),413–438.Retrieved fromhttp://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pa.23.040183.002213

- Castro-Janer, E., Rifran, L., Gonz??lez, P., Niell, C., Piaggio, J., Gil, A., & Schumaker, T.
 T. S. (2011). Determination of the susceptibility of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, *178*(1–2), 148–155.
- CFPH (Biologics, T. C. for F. S. and P. H. I. for I. C. in A. (2007). Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino, 1–3. Retrieved from http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/rhipicephalus-microplus.pdf
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006
- Dourmishev, A. L., Dourmishev, L. A., & Schwartz, R. A. (2005). Ivermectin: Pharmacology and application in dermatology. *International Journal of Dermatology*.
- Flores-Fernández José Miguel, Gutiérrez-Ortega Abel, Padilla-Camberos Eduardo, Rossario-Cruz Rodrigo, H.-G. R. and M.-V. M. (2014). *Molecular cloning and characterization of a glycine-like receptor from the cattle tick Rhipicephalus* (Boophilus) microplus (Acari : Ixodidae).
- Flores Fernández, J. M., Barragán Álvarez, C. P., Sánchez Hernández, C. V., Padilla Camberos, E., González Castillo, C., Ortuño Sahagún, D., & Martínez Velázquez, M. (2016). Molecular characterization and expression analysis of three novel autophagyrelated genes from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari:

Ixodidae). *Parasitology*, *143*(13), 1802–1809. https://doi.org/10.1017/S0031182016001542

- Gassel, M., Wolf, C., Noack, S., Williams, H., & Ilg, T. (2014a). The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ-aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45, 111–24. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.009
- George, J. E., Pound, J. M., & Davey, R. B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, *129 Suppl*, S353–S366.
- Graf, J. F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G. a, Molento, M. B., Bordin, E. L., & Arantes, G. J. (2004). Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129 Suppl(2), S427–S442.
- Guerrero, F. D., Miller, R. J., Rousseau, M. E., Sunkara, S., Quackenbush, J., Lee, Y., & Nene, V. (2005). BmiGI: A database of cDNAs expressed in Boophilus microplus, the tropical/southern cattle tick. *Insect Biochemistry and Molecular Biology 35*(6), 585– 595.
- Hibbs, R. E., & Gouaux, E. (2011). Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, 474(7349), 54–60. https://doi.org/10.1038/nature10139
- Hille, B. (2001). Ion Channel Excitable Membranes. *Book*. https://doi.org/10.1007/3-540-29623-9_5640
- Hope, M., Menzies, M., & Kemp, D. (2010). Identification of a dieldrin resistance-associated

mutation in Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology*, *103*(4), 1355–1359. https://doi.org/10.1603/EC09267

- Jonsson, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (Boophilus microplus) infestation on cattle, with particular reference to Bos indicus cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, *137*(1–2), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010
- Jonsson, N. N., & Hope, M. (2007). Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick Boophilus microplus. *Veterinary Parasitology*, 146(3–4), 193–198. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.006
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). Principles of Neural Science. Neurology (Vol. 3). https://doi.org/10.1036/0838577016
- Kazimírová, M., & Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(August), 43. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3747359&tool=pmcentrez &rendertype=abstract
- Keramidas, A., Moorhouse, A. J., Schofield, P. R., & Barry, P. H. (2004, October). Ligandgated ion channels: Mechanisms underlying ion selectivity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
- Kim, G. R., Yoon, T.-H., Park, W. gyu, Park, J.-Y., Kang, J., & Kim, H.-W. (2015). Five nicotinic acetylcholine receptor subunits from the Morotoge shrimp, *Pandalopsis japonica*: cloning, tissue distribution, and functional expression in *Xenopus* oocytes. *Animal Cells and Systems*, 19(6), 393–406. https://doi.org/10.1080/19768354.2015.1109547

- Kita, T., Hayashi, T., Ohtani, T., Takao, H., Takasu, H., Liu, G., ... Ozoe, Y. (2016). Amitraz and its metabolite differentially activate α- and β-adrenergic-like octopamine receptors. *Pest Management Science*, (August). https://doi.org/10.1002/ps.4412
- Lees, K., & Bowman, A. S. (2007, December). Tick neurobiology: Recent advances and the post-genomic era. *Invertebrate Neuroscience*.
- Léger, E., Vourc'h, G., Vial, L., Chevillon, C., & McCoy, K. D. (2013). Changing distributions of ticks: Causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, 59(1–2), 219–244. https://doi.org/10.1007/s10493-012-9615-0
- Lynagh, T., Beech, R. N., Lalande, M. J., Keller, K., Cromer, B. A., Wolstenholme, A. J., & Laube, B. (2015). Molecular basis for convergent evolution of glutamate recognition by pentameric ligand-gated ion channels. *Scientific Reports*, 5, 8558. https://doi.org/10.1038/srep08558
- Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2010). A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. *International Journal for Parasitology*, 40(13), 1477–81. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.07.010
- Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2012a). Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin. *Frontiers in Molecular Neuroscience*.
- Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2012b). Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cysloop receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*.
- Mahar, H. V., Saravanan, B. C., Kesavan, M., Karthik, K., Rathod, P., Gopi, M., ... Balaraju,
 B. L. (2014). Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*, S770–S779. https://doi.org/10.1016/S2222-

1808(14)60725-8

- Mapholi, N. O., Marufu, M. C., Maiwashe, A., Banga, C. B., Muchenje, V., MacNeil, M. D.,
 ... Dzama, K. (2014b). Towards a genomics approach to tick (Acari: Ixodidae) control in cattle: A review. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(5), 475–483. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.006
- Martinez-Velazquez, M., Castillo-Herrera, G. A., Rosario-Cruz, R., Flores-Fernandez, J. M., Lopez-Ramirez, J., Hernandez-Gutierrez, R., & Del Carmen Lugo-Cervantes, E. (2011).
 Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from Cuminum cyminum, Pimenta dioica and Ocimum basilicum against the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 108(2), 481–487.
- Mendes, E. C., Mendes, M. C., & Sato, M. E. (2013). Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. *Experimental and Applied Acarology*, 61(3), 357–369.
- Mowrey, D. D., Kinde, M. N., Xu, Y., & Tang, P. (2014). Atomistic Insights into Human Cys-loop Receptors by Solution NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.03.014
- Nicke, A., Thurau, H., Sadtler, S., Rettinger, J., & Schmalzing, G. (2004). Assembly of nicotinic α7 subunits in Xenopus oocytes is partially blocked at the tetramer level. *FEBS Letters*, 575(1–3), 52–58. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.035
- Nuñez, J. L., Mufioz-cobefias, M. E., Moltedo, H. L., Common, T., & Tick, C. (1985). Boophilus Microplus The Common Cattle Tick. Springer-Verlag.
- Nys, M., Kesters, D., & Ulens, C. (2013). Structural insights into Cys-loop receptor function

and ligand recognition. *Biochemical Pharmacology*, 86(8), 1042–1053. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.001

- Rachinsky, A., Guerrero, F. D., & Scoles, G. A. (2007). Differential protein expression in ovaries of uninfected and Babesia-infected southern cattle ticks, Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1291– 1308.
- Rajput, Z. I., Hu, S., Chen, W., Arijo, A. G., & Xiao, C. (2006). Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal of Zhejiang University*. *Science*. *B*, 7(11), 912–21. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1635821&tool=pmcentrez &rendertype=abstract
- Rivera, E. D. (2012). Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos Rhipicephalus microplus. *Revista Colombiana de Ciencia Animal.* Retrieved from http://revistas.ut.edu.co/index.php/ciencianimal/article/view/128
- Rodriguez-Valle, M., Lew-Tabor, A., Gondro, C., Moolhuijzen, P., Vance, M., Guerrero, F.
 D., ... Jorgensen, W. (2010). Comparative microarray analysis of Rhipicephalus (Boophilus) microplus expression profiles of larvae pre-attachment and feeding adult female stages on Bos indicus and Bos taurus cattle. *BMC Genomics*, *11*, 437. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-437
- Roma, G. C., Nunes, P. H., Remédio, R. N., & Camargo-Mathias, M. I. (2012). Synganglion histology in different stages of Rhipicephalus sanguineus ticks (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 110(6), 2455–2463.

- Schmidt, C., Klein, C., & Hollmann, M. (2009). Xenopus laevis Oocytes Endogenously Express All Subunits of the Ionotropic Glutamate Receptor Family. *Journal of Molecular Biology*, 390(2), 182–195.
- Sogorb, M. A., & Vilanova, E. (2002, March 10). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*.
- Sonenshine, D., & Roe, R. M. (2014). Biology of ticks (volume 2). In *Biology of ticks* (pp. 278–312).
- Szlendak, E., & Oliver, J. H. (1992). Anatomy of Synganglia, Including Their Neurosecretory Regions, in Unfed, Virgin Female Ixodes-Scapularis Say (Acari, Ixodidae). *Journal of Morphology*, 213(3), 349–364. Retrieved from isi:A1992JM24500007
- Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A. C., & Vagner, S. (2003, May). Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biology of the Cell*.
- Ullmann, A. J., Lima, C. M. R., Guerrero, F. D., Piesman, J., & Black IV, W. C. (2005). Genome size and organization in the blacklegged tick, Ixodes scapularis and the Southern cattle tick, Boophilus microplus. *Insect Molecular Biology*, 14(2), 217–222.
- Urdaz-Rodriguez, J. H. (2007). Epidemiology of Bovine Anaplasmosis and Babesiosis in Commercial Dairy Farms of Puerto Rico. *Dissertation, Univ of Florida*, 1–260.

ANEXOS

Mapa del vector de secuenciación pCRTM2.1-TOPO®



Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991 pUC origin: bases 3136-3809

Mapa del vector de secuenciación pCRTM4-TOPO[®] TA



Mapa del vector de expresión pcDNATM3.1/myc-His A


PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Molecular characterization and expression analysis of three novel autophagy-related genes from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae)

¹ Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, AC, Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270. Guadalajara, Jalisco, México ² Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Carretera Guadalajara-Nogales km 15.5, 45110, Zapopan, Jalisco, México ³ Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas (IICB), CUCS, Universidad de Guadalajara, Sierra Mojada 950,

Col. Independencia, 44340. Guadalajara, Jalisco, México

(Received 23 May 2016; revised 26 July 2016; accepted 27 July 2016)

SUMMARY

The cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus is a hematophagous ectoparasite of major importance for the livestock industry. It shows a remarkable ability to survive over long periods without feeding. However, the mechanisms used to endure long-term starvation are poorly understood. It is believed that autophagy, a process of intracellular protein degradation, may play a significant role to confront adverse environmental conditions. To advance our understanding of autophagy in R. microplus, in the present study we report the molecular characterization of three autophagy-related (ATG) genes, namely, RmATG3, RmATG4 and RmATG6, as well as their expression profiles in different developmental stages and organs of the parasite. The deduced amino acid sequences derived from the characterized gene sequences were subjected to Basic Local Alignment Search Tool analysis. The testing produced significant alignments with respective ATG proteins from Haemaphysalis longicornis and Ixodes scapularis ticks. Real-time polymerase chain reaction assays revealed that RmATG4 and RmATG6 transcripts were elevated in egg and ovary tissue, when compared with larva and midgut samples, while RmATG3 expression in midgut was 2-fold higher than in egg, larva and ovary samples

Key words: Autophagy, ATG3, ATG4, ATG6, Rhipicephalus microplus, real-time PCR, development, embryogenesis.

IN TR OD UC TION

The cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus is a hematophagous ectoparasite of major importance for the livestock industry. Feeding by large numbers of ticks causes reduction in live weight gain and milk production as well as deterioration of the skin on parasitized cattle. Further, R. microplus transmits diseases of economic importance such as babesiosis and anaplasmosis (Sharma et al. 2012). Its remarkable ability to survive without feeding over long periods makes its control and eradication difficult.

Under optimal environmental conditions R. microplus is able to complete its life cycle in 3-4 weeks; however, in cooler temperatures larvae may survive without feeding for up to 24 weeks (Spickler, 2007). The mechanisms used to survive long-term starvation are poorly understood in ticks. However, it is believed that autophagy may play a significant role, as a

* Corresponding author: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, AC, Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270. Guadalajara, Jalisco, México. E-mail: moisesmartinezv@ vahoo com mx

strategy to confront adverse environmental conditions (Umemiya-Shirafuji et al. 2010).

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a cytoplasmic degradation process where organelles and proteins undergo proteolysis to obtain polypeptides in order to maintain amino acid pools and energy balance in the cell. Autophagy is regulated by a set of evolutionarily conserved gene products, known as the ATG proteins (Mizushima et al. 2010). Among ATG genes one subset, composed of 17 genes, is required for efficient autophagosome formation. The corresponding gene products are referred to as the core machinery for autophagosome formation (Xie and Klionsky, 2007).

In a previous work, we reported the first molecular characterization of two autophagy-related genes, RmATG8a and RmATG8b, homologues of mammalian GABARAP and MAP1LC3, respectively, in R. microplus. We found that transcripts of both RmATG8a and RmATG8b were up-regulated during starvation, suggesting that autophagy was active in R. microplus (Flores et al. 2014). To advance our understanding of autophagy in this tick, in the present study we report the molecular characterization of RmATG3,

Parasitology (2016), 143, 1802-1809. © Cambridge University Press 2016 doi:10.1017/S0031182016001542

JOSÉ MIGUEL FLORES FERNÁNDEZ¹†, CARLA PATR ICIA BARR AGÁN ÁLVA REZ¹†, CAR LA VANESSA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ², EDUARDO PADILLA CAMBEROS¹, CELIA GONZÁLEZ CAS TILLO³, DANIEL ORTUÑO SAHAGÚN³ and MOISÉS MARTÍNEZ VELÁZQUEZ1*

[†] These authors contributed equally to this work.

RmATG4 and RmATG6 as well as their expression profiles in different developmental stages and organs of the parasite. The products of all of these genes are part of the core machinery for the autophagosome formation.

The autophagy process seen as a survival strategy of ticks could also be important for the survival of pathogens they transmit. Therefore, targeting autophagy mediators could lead to the development of novel control strategies for ticks and associated pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Ticks and tissues

Rhipicephalus microplus ticks were obtained from a susceptible strain reared under laboratory conditions at CENID-PAVET-INIFAP, located in the State of Morelos, Mexico. Ovarian and intestinal tissues were obtained from engorged female ticks the following day after the spontaneous detachment from calves, as described by Tsuda et al. (2001). Some engorged female ticks were maintained at 28 °C and 80% relative humidity (RH) to collect eggs 8 days after oviposition and larvae 8 days after hatching.

Treatment of eggs

100 mg of eggs were treated with 5 volumes of 3.8%NaClO for 2 min and centrifuged at 370 g for 2 min. The supernatant was removed and eggs were resuspended in 5 volumes of 3.8% NaClO and incubated for 10 min. Floating eggs were removed and the remaining eggs were rinsed 5 times with 5 volumes of distilled water.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from eggs, larvae and adult tissues using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). Briefly, midgut and ovary tissues were dissected and pooled from 15-20 engorged females; tissues were maintained on ice-cold phosphate-buffered saline immediately after dissection and then stored at -80 °C until RNA extraction. Pools of 100 mg eggs (approximately 2000 eggs) and larvae (approximately 1000 larvae) were collected. Eggs were treated as mentioned previously before RNA extraction. Samples were mixed and crushed with liquid nitrogen. RNA integrity was assessed by denaturing electrophoresis on 1% agarose gels and quantified by a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). cDNA was synthesized from 2 µg of RNA using the SuperScript III[®] First-Strand Synthesis System (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

Characterization of the complete coding sequences

To obtain the complete coding sequence of RmATG3, ited in GenBank with accession number RmATG4 and RmATG6 we started from the QR KR822806 and KR822807, respectively.

predicted putative sequences reported by Flores-Fernández et al. (2014). Briefly, the nucleotide sequences of HIATG3, HIATG4 and HIATG6 genes from Haemaphysalis longicornis tick (GenBank accession numbers AB513349, AB513350 and AB601889, respectively) were queried against the GenBank R. microplus Expressed Sequence Tags (EST) database, using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) tool. We retrieved the nucleotide sequences CK182322 (EST771642) and CV442344 (EST896257) for ATG3; CK181180 (EST770500) and CK181181 (EST770501) for ATG4; CV442171 (EST896084) and CV442170 (EST896083) for ATG6 and proceeded with their characterization. Adopting the nomenclature followed by Umemiya-Shirafuji et al. (2010) to name tick ATG genes, we designated the characterized genes as RmATG3, RmATG4 and RmATG6, respectively. Specific primers were designed to the above sequences (online Table S1). The forward RmATG4 primer was designed from a conserved region of the sequence of HIATG4 of H. longicornis and two Expressed Sequence Tag (EST) sequences of Ixodes scapularis and Amblyomma americanum (GenBank accession no. AB513350, EW946975 and JZ176775, respectively). End-point polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed using cDNA synthesized from larvae as a template. PCR conditions were 94 °C for 5 min followed by 35 cycles, each consisting of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 60 s. A final extension step at 72 °C for 10 min was included. The amplified products were visualized on 1% agarose gels on a UV transilluminator (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA).

Cloning and sequencing

To confirm positive PCR products, amplicons were purified and then cloned into the pCR[®]2.1-TOPO T/A plasmid vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) which was used to transform electro-competent Escherichia coli TOP10 cells. Escherichia coli cells were then incubated overnight at 37 °C on LB plates containing ampicillin (50 μ g mL⁻¹) and 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal; 40 mg mL⁻¹). Five white colonies were isolated and cultured overnight in LB medium containing $50 \ \mu g \ m L^{-1}$ ampicillin. Plasmid DNA was extracted using QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. To confirm the positive transformants the plasmids were analyzed by PCR using forward and reverse M13 primers. Once the correct clones were identified, the plasmids were submitted for sequencing at Macrogen Corp. (Rockville, Maryland, USA). The new sequences of RmATG3, RmATG4 and RmATG6 were deposited in GenBank with accession number KP317124,

Gene expression by quantitative PCR

To determine the expression profiles of RmATG3, RmATG4 and RmATG6 genes in eggs, larvae and adult tissues of R. microplus, specific primers were designed (online Table S1). Elongation factor $1-\alpha$ (ELFIA) and β -actin (ACTB) genes were used as reference genes (Nijhof et al. 2009). Real-time PCR amplifications were performed in 96-wellplates using SYBR Green detection chemistry in a StepOnePlus[™] Real-time PCR System (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA). Reactions were prepared in a total volume of 15 µL containing $0.4 \,\mu\text{L}$ of first strand cDNA template (100 ng μL^{-1}), 0.45 uL of forward and reverse primers (10 um), 7.5 µL of SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) and 6.2 µL of sterile deionized water. The cycling conditions were set as follows: initial denaturation step at 95 °C for 10 min to activate the AmpliTaq[®] DNA Polymerase, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. At the end of PCR amplification, a melting curve analysis was performed immediately to confirm the specificity of the reactions. Baseline and threshold cycles (Ct) were automatically determined using Real-Time PCR System software. PCR reactions were run in triplicate for each sample in three independent experiments. Relative expression was calculated using the comparative cycle threshold method (Livak and Schmittgen, 2001). The transcript abundance data were normalized by the average transcript abundance of two endogenous control genes ELFIA and ACTB, between each sample.

Bioinformatic analysis

Primers were designed with the Primer3 software v.4.0.0 (http://primer3.wi.mit.edu/; Rozen and Skaletsky, 2000). The search for similarity among sequences was conducted by the BLAST service from the National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) (http://blast.ncbi.nlm. nih.gov/Blast.cgi; Altschul et al. 1990). The nucleotide to aminoacid sequence translation was made using the Translate Tool (http://web.expasy.org/ translate/; Gasteiger et al. 2003). Multiple alignments of the nucleotide and amino acid sequences were performed using the multiple sequence alignment program ClustalW (http://www.genome.jp/ tools/clustalw/; Larkin et al. 2007). The molecular weight and theoretical isoelectric point were predicted by ProtParam tool (http://web.expasy.org/ protparam/; Gasteiger et al. 2005).

Statistical analysis

Expression data of RmATG3, RmATG4 and RmATG6 were analyzed by one-way ANOVA

using StatgraphicsTM 5.1 software. Tukey's test was used to determine significant differences of each gene at different developmental stages and adult tissues in R. microplus. The data represent mean \pm s.D. from three independent experiments.

RESULTS

RmATG3

We amplified a PCR product of 1125 bp length. The flanked region is 1085 bp, has an ORF at position 106-1092 and codes for a 328-amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 36.29 kDa and a pI of 4.57 (online Fig. S1). The deduced polypeptide appears to have no signal peptide. The protein is similar in length to Atg3 from H. longicornis and I. scapularis. The identified protein was queried against the non-redundant protein database using the BLAST tool. BLAST analysis showed 86.23, 80.49, 65.53, 64.70, 60.67 and 60.06% identities between RmAtg3 and HlAtg3 of H. longicornis, putative Atg3 of I. scapularis and Atg3 of Spodoptera litura, Bombyx mori, Aedes aegypti and Drosophila melanogaster, respectively. All compared sequences contain three predicted domains, the autophagocytosis associated protein (Atg3), N-terminal domain (Autophagy_N), autophagocytosis associated protein, active-site domain (Autophagy_act_C) and the autophagocytosis associated protein C-terminal (Autophagy_Cterm) domain (Fig. 1). The region of active-site cysteine residue is conserved between RmAtg3 and other Atg3s within Autophagy_act_C domain (Fig. 1).

RmATG4

We amplified a PCR product of 1263 bp length. The flanked region is 1221 bp and it has an ORF at position 13-1176 that codes for a 387-amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 44.30 kDa and a pI of 5.22 (online Fig. S2). No signal peptide was found in the predicted polypeptide. The protein is similar in length to Atg4 s from other species. The deduced sequence was subjected to BLAST analysis. Among sequences that produced significant alignments, RmAtg4 showed an identity of 82.94, 71.20, 56.84, 49.08 and 48.32% with HlAtg4 of H. longicornis, putative Atg4 of I. scapularis, cysteine peptidase 2 family C54 protein of Tityus serrulatus, cysteine protease ATG4A of Coptotermes formosanus and cysteine protease ATG4B of Zootermopsis nevadensis, respectively. All compared sequences contain a Peptidase_C54 domain. Putative active sites, cysteine (C), aspartic acid (D) and histidine (H) at positions 76, 270 and 272 of RmAtg4, respectively, are widely conserved in all Atg4 homologues (Fig. 2).

Autophagy related genes in Rhipicephalus microplus

ATG3

n minumius		60
N. MANANJANNA	THE REAL PROPERTY AND A DESCRIPTION OF A	60
N. Jongicornia	WOVINT VINTALISPADILIPIDEDATATE TOVETPER VLASCILLYINCPINGRASSES	00
1.scapularis	MOSMINTVROTALOFADRLTPICRESEFEETGVITFEEFVLAGDRLVHHCPTWGWATGEG	60
S.litura	MQSVINTVKGTALGVAGYLTPVLKEBKFQETGVLTPEEFVAAGDHLVHHCPTWQHAKGEE	60
8.mori	MOSVINTVKGTALGVAGYLTPVLKESKFRETGVLTPEEFVAAGDHLVHHCPTWQNAKGEE	60
A.aegypti	MONVINEVRGTALGVAEVLTPVLKESKFRETGVLTPEEFVAAGDHLTHHCPTWSWAVGDE	60
D.melanogaster	MOSVLNTVEGTALINVAEVLTPVLKESKFRETGVLTPEEFVAAGDRLVHNCPTWOWAAGDE	60
		200
R.microplus	EPAKSYL PPOKOFLWTRNVPCYKRCKHMEYSMEHERVLEKEGDEDGGWVDTHHYADAAAS	120
N longicornis	L DAREYT DADKORT UTBNUDCYRDCRIMEYRMEHERVT PERCOPOCINUTHHYA DAARH	120
T econitaria	It is not the third of the bit is a structure of the bit is a structure of the bit of	120
2.acapulatis	APARA LAPPING ATTANY CIARCAN CONTRACT A CONTRACT AND A CONTRACTACT AND A CONTRACT AND A CONTRACT AND A CONTRACT AND A CONTRACT	120
S.litura	ARLINPILPADEQF LITHNYPC INC. QIETLEDAEKVIEDENDIDGGWVDIRHTDNIGSP	120
B.mori	AKIRPTLPADROFLITERVPCTRECKQIETCEDREKVIEDENDADGGWVDTHETDRAGSP	120
A.aegypti	TRIKPYLPKOKOFLITENVPCYRRCKOMETVGEETLVEESDODGGWVETHHFNPDGAS	118
D.melanogaster	TKTKPYLPKOKQFLITRNVPCYRRCKOMEYVGEETLVEEESGDGGWVETHQLNDDGTT	118
	1.111 1.111 1.111 1.111 1.111 1.111	
R.microplus	GLAEOVOENTLEPSKPASTLTATORLGCGDDDDDDDDDDDDDDEEAALMDAFVESGLL	174
M.longicornis	GLSEQVOENTLGPSKPAAABSLPOROGDDDDDDDDDDDEEEASDNDAFVESGLL	172
t.scapularis	LAROVOENTLEPNVSIESAFINDGDADNDDDDDDDEEAADMDDFVESGLL	171
C litura		174
D mani		1.1.1
B.mori	ADDDDDDDAADGDDDDDDDDDDDDDDDDDDD	272
A.aegypt1	USG LEDKYLLMI LEGAN DDOVAADMDDPPN LEDGDGNGDDDDDEGAAI UMDEPEESGML	170
D.melanogaster	-QLEDKICEUTMEETKEEMHTPDEDKSAPGAGGQAEDEDODEAIDMDDPEESGML	172
	1 • 1 • 1	
R.microplus	DAEDT AAVVERAEATDESLN-AGGEGEPGSLDGAIVSTRTYDLNITYDNYYRTPRIME	231
H. Longicornia	DADDRATVI SKOPALABABABABABABABADODRSSI DOGTUSTRTVDI NTTVDI VVDI VEDRI NT	230
Treamilaria		300
1.Scaperazzo	BUILD - ALVIAGESTRACEGUARDES - GIVERNULLINITIALTERET	202
S.IICUIM	DEVDPSIDLAPREPRIRPERAPS-DODELVRIRITDERITORITYPREAL	661
B.mori	DEVDPSTDLAQKTELKLKADKKQRQGEGDEIVRTRTYDLHITYDKIYQTPRLWL	225
A.aegypt1	DQVDPSLATVVPTENVPKKPSEQDGDSVVHTRTYDLHITYDKYYQTPRLWV	229
D.melanogaster	ELVDPAVATTTRKPEFEAKASPVAAASGDAEASGDSVLHTRTYDLHISYDKYYQTPRINV	232
	1 *. 11 11 ****************************	
R.microplus	YGYDENROPLSMEANYEDI SODHAKKTVTMETHPHLPGPPMPJVHPCRHAEVNKI	287
H.longicornis	YGYDEKREPLSMEAMYEDISQDRAKKTVTMEARPHLPGPPMDEVHPCRHAEVMKKI	286
I.scapularis	Y GYDENROPLT I EEMYED I SODHAKKTYTMEAH PRI PGPPMARVH PGTVLCRH AF VN GRI	282
5. litura	TOVDEDETLI SUEONVERUSODIAKKTUTNE SUBIL SOPONEURD	283
B mori	TOY DE LET I PREMAVE MISSING & EVELOPINE SUBJE S ADDRESSING	201
8		204
A.aegypt1	VGIDENRKPLIVEQRIEDVSQDHAKKIVIREIHPHLPGPNNDDVHPCKHADINCKI	285
D.melanogaster	VGYDEORKPLTVEORYEDVSODHAKKTVTMESHPHLPGPNMPEVHPCRHADINKXI	288
R.microplus	IQTVTEGGGELGVHHYLIVFLKEVQAWIPTIEYDYTQNFAM 328 Identity	
N.longicornis	IQTVTEGGGELGVHHYLIVFLKFVQAVIPTIEYDYTQNFAM 327 86.23%	
I.scapularis	IQTVTEGGGELGVHHYLIVFLKFVQAVIFTIEYDYTQNFAM 323 80.49%	
S.litura	IETVTESGGEMGVRSYLIVELKEVOTVIETIEVDETONFAIN 325 65.531	
B.mori	TETUTESCOTWOMENT TO FLAG OUT OF TEVOLETONESTN 323 64 201	
A appoint i	TAPUPPAAAPI AUDUST TT PENERATUTUTT PAAPTA PAAPTA PARTA 254 64 71	
A.aegypti D.aegypti	TO A DESCRIPTION AND A DESCRIP	
u.meianogaster	IQIVEROCOQUOWHEINIIIINNI VQIVINTIENDETQNFNMS 330 60.06%	

Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequence of RmAtg3 (accession no. AKH60756), HIAtg3 of Haemaphysalis Iongicornis (accession no. BAI82575), putative Atg3 of Ixodes scapularis (accession no. XP_002402769), Atg3 of Spodoptera litura (accession no. AFS31123), Atg3 of Bombyx mori (accession no. NP_001135961), Aedes aegypti (accession no. XP_001657463) and Drosophila melanogaster (accession no. NP_649059). Autophagy_N, Autophagy_act_C and Autophagy_Cterm domains are shaded in gray dark, gray light and gray dark, respectively. The region of active-site cysteine residue 17 is based. An asterisk (*) indicates positions which have a single, fully conserved residue; a colon (:) indicates conservation between groups of strongly similar properties; a period () indicates conservation between groups of weakly similar properties.

Rm ATG6

We amplified a PCR product of 1575 bp length which was cloned and sequenced. The manked tide. The protein is 19 as smaller than HIAtg4 region is 1537 bp, and it has an ORF at position 133-1470 that codes for a 445-amino acid

polypeptide with a predicted molecular mass of 51.44 kDa and a pI of 5.03 (online Fig. S3). No signal peptide was found in the predicted polypepfrom H. longicornisbut 2 as larger than that from I. scapularis. The deduced sequence of RmAtg6,

ATG4

R.microplus H.longicornis I.scapularis T.serrulatus C.formosanus Z.nevadensis	MADVFNASLTYEVGAVEYDDFKPSEEPVYILGTKYSTFHELDDLRSNITSKIWL MADVFNASLTYEVGALEYDDFKPSAEPVYILGTKYSTLHELDDLRSDVTSKIWL ACLTYEVGAVEYDDFKPSAEPVYILGTKYSTLHELDDLRSDVTSKIWL MNFEVEIILSMTACMAYEPSYKEYADFPYTEEPVWILGKKYSVLHDLEELRLDICSKIWF MDMMFEAYLTQEAGHMEPDDIPHTKDPVWVLGKKYNAIRDLEIIRKDIHSKLWF MDMMFEAYLTQEAGHLDPDDIPHTKDPVWVLGKKYNAIRDLEIIRKDIRSKLWF * :: * . : *: : *::**.**	54 54 48 60 54 54
R.microplus H.longicornis I.scapularis T.serrulatus C.formosanus Z.nevadensis	TYRKNFPSISGTDYTSDTGWG MLRCGQMVVAEAVMRRHLGKDWQWSQRTKDEKYLRILR TYRRNFPAISGTDYTSDTGWG MLRCGQMVVAEALMRRHLRRGWQWAPGINDESYLRVLR TYRKNFPAIGGTGPTSDSGWG MLRCGQMVLAQALMRRHLGREWRWEPGTKNKDYLYILR TYRKNFPPIGGTGPTSDSGWG MLRCGQMVLAQALWCLHLGRDWCWNPREPDPIYLDILK TYRRGFVQIGDTGITTDKGWG MLRCGQMVLAQALVCLHLGRDWCWNPESQNTAYLQILH TYRRGFVQIGDTGLTSDKGWG MLRCGQMVLAQALVCLHLGRDWCWTPDSRNKSYLQTLH ****:* *.**	114 114 108 120 114 114
R.microplus H.longicornis I.scapularis T.serrulatus C.formosanus Z.nevadensis	MFQDKKNCTYSIHQIAQMGVSEGKEVGQWFGPNTIAHVLRKLSTFDKWSSLAMHVAMDNV MFQDKKNCTFSIHQIAQMGVSEGKAVGQWFGPNTVAHVLRKLAAFDKWSSLAIHVAMDNV MFQDKKNCTFSIHQIAQMGVSEGKTVGEWFGPNTVAHVLRKLAIFDKWSSLAIHVAMDNT MFQDKKDCPYSIHQIAQMGVSEGKGIGQWFGPNTVAQVLRKLATVDEWSHLIVHVALDNA MFEDRRAATYSIHQIALMGASEGKEVGQWFGPNTVAQVLKKLAVVDEWSSIVIHVALDNT MFEDRRAATYSIHQIALMGASEGKEVGQWFGPNTVAQVLKKLAVVDEWSSIVIHVALDNT **:*::****** **.****	174 174 168 180 174 174
R.microplus H.longicornis I.scapularis T.serrulatus C.formosanus Z.nevadensis	VVMDDIRKICRVEATNTEDGIRNRMQPHGGLAAARSWKPLVLFIPLRLGL VIMDDIRKVCRLEATAESGVRNRAEPAGLAAAAESWKPLLLFIPLRLGL VIINEISKFRCHIWAAADGLVRNRTNSEPSRPANSEGSWKPLLLFIPLRLGL VITDDLKTLCKVNEEIPCNKYEVNESTSRQISNNHPLTNNRSDSNWKPLLLFIPLRLGL VIVNEIRKLCKSSSQQSSGDRDFHHTRNWKPLVLIVPLRLGL VIVNEIRQLCKSPSAHHNPNSSLQSSGEESFPRFVKGRWKPLVLVVPLRLGL *: ::: .	224 224 220 240 216 226
R.microplus H.longicornis I.scapularis T.serrulatus C.formosanus Z.nevadensis	SEINPVYYCGLKRTFALKQSLGIIGGKPNHALYIIGVVGDDLVFLDPHTTQLAVDLDVEC SEINPIYYCGLKRTFALKQSLGIIGGKPNHALYIIGVVGDDLVFLDPHTTQLAVDLDVEC SEINRIYAFGLKRTFALKQSLGMIGGKPNHALYFIGVVEDELIFLDPHTTQLACDLDVDS SEINPVYLKALKITFCLKQSLGIIGGKPNHALYFIGVVGNEVVYLDPHTTQQATDISLEI NEINPVYVQGLKTCFTFKQSLGVIGGKPNHALYFIGCVGDEVIYLDPHTTQPAGFVEEKE SEINPVYVQGLKTCFTFKQSLGVIGGKPNHALYFIGCVGDEVIYLDPHTTQPAGFVEEKE .*** :* .** * :*****	284 284 280 300 276 286
R.microplus H.longicornis I.scapularis T.serrulatus C.formosanus Z.nevadensis	PEDESYHCAHASRMDIGQLDPSIALCFYMATEAEFDSWCNLAHKHLISQMKQP PDDESYHCAHASRMDIGQLDPSIALCFYLPTEAEFDSWCNLAHKHLISEMSQP PDDQSYHCAHASRMNISELDPSVALCFYMATESDFDVWCNLVQKHLISRMQQP PNDSSYHCPYGNSRRMNLNQMDPSVALCFYFQTEEEFDSWCIQVHKFLIAAETQP HEHERALDSSYHCQYASRMHILHMDPSVAACFFCNTEEEFDSLCQLIQKRLVHPEKQP QEHEEVFDSSYHCQYASRMHILHMDPSVAACFFCNTEDEFDSLCQLIQKRLVHPEKQP *.**** : **.: :***: **: ** :* * :* *	337 337 333 355 334 344
R.microplus H.longicornis I.scapularis T.serrulatus C.formosanus Z.nevadensis	LFEITEHRPLGWPELAEDQQRLDEEPQSTEFTVVEQERKFDTSDDEFEIL- 387 Ident LFEITEHRPLGWPDFVDEEQRLDQEPQTADFTVLEQERKYDTSDDEFEIL- 387 82.9 LFEITQDRPVGWPLPDSELG-TEAEPQSVEFTLLDQERKYDTSDDEFEIL- 382 71.2 LFELSKERPLHWPPLQIADDKQTDSSLEFTFVEERAFEASDEFEIL- 402 56.0 LFELCNERPRGWSP-LEDGAEEALGATACMSFEDFERQFDDSDEEFEILG 383 49.0 LFELCNERPRHWSPLEDGAEEALGATACMSFEDFERQFDDSDEEFEILG 393 48.3 ***: : .** *.	tity 20% 34% 28% 32%

Fig. 2. Alignment of the deduced amino acid sequence of RmAtg4 (accession no. ALK28521), HlAtg4 of Haemaphysalis longicornis (accession no. BAI82576), putative Atg4 of Ixodes scapularis (accession no. XP_002434192), cysteine peptidase 2 family C54 protein of Tityus serrulatus (accession no. CDJ26740), cysteine protease ATG4A of Coptotermes formosanus (accession no. AGM32346) and Cysteine protease ATG4B of Zootermopsis nevadensis (accession no. KDR21327). Peptidase_C54 domain is shaded in gray. The putative active sites (Cys, Asp and His) are boxed. An asterisk (*) indicates positions which have a single, fully conserved residue; a colon (:) indicates conservation between groups of strongly similar properties; a period (.) indicates conservation between groups of weakly similar properties.

subjected to BLAST analysis, showed 84.94, 71.55, 51.68, 51.74 and 51.50% identities with HIAtg6 of H. longicornis, putative Beclin of I. scapularis and Stegodyphus mimosarum, and Beclin-1like protein isoform X2 and X1 of Camponotus floridanus and Cerapachys biroi, respectively. All compared sequences contain the autophagy protein Apg6 domain (Fig. 3).

ATG6

R.microplus	MAGLSVTLTKDRTFPVNFTCQRCCQPPRLDASFSSIDEQTLSELSEPMLSQSDPV	55
H.longicornis	MASLSVALTKDRTFPVNFTCORCCOPLRLDASFSSIDDOTLSELSEPMLSOSDPT	55
I.scapularis	MASLSVTLTKDRTYPVNFTCORCCOPLKLDSSFSTIDDOTLSELSEPMLGOSDPA	55
S.mimosarum	MDSGIMAFPEKYASKDRTFAVNFTCORCCOPLKLHSSFTELDDOTLSELSLPLYPNTD	58
C.floridanus	MVDLKTNVSFACORCLOPLKLDSSFDHLGEHTLAELSLPIOOOVVG-	46
C.bizoi	MVDLKTNVSFACORCLOPLKLDSSFDHLGEHTLAELSLPICOOIVG-	46
	• . •.•!•••• •• !•.!•• !.!!••!••• •! }	
R.microplus	ELCGP-SPAVHYRVPEEGVSRRAVEPIRFVESGNGFMLVGESAAVVDTAISHKL	108
H.longicornis	ELCGP-SPAVHYRVPGEGVSRRTVEPLRFVESGNGFMLVGASSSAAAAPVDTTISHKL	112
I.scapularis	ESYDVPSPTLAYRFPNDDSAVSRRTIEPWRIVESGNGFMLVGDNAAPAETVISHKL	111
S.mimosarum	GDENELIKAYQQQCDESSVMRKIVMPINCADATSDFMVVGELTSLPLDSCQSL	111
C.floridanus	ELEPQSDSIEHLVPPFRLTESGNGTNGFMLVGDSGETESLSHHL	90
C.biroi	ELEPQSDSIEHLVPPFRLTESGNGTNGFMLVGDSGETESLSHHL	90
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
R.microplus	DVETRIFELMINOSAVNYPICEECIDNLLDOMEROLDLAEDECKDYRKYLEOLINGE	165
H.longicornis	DVETRLFELMTNQSAVDYPICEECTDNLLDQMERQLDLAEDECKDYKKYLDQLTGGD	169
I.scapularis	QVEARLFDIMTNQSDVDYPICEECADNLLDQMEHQLDLTEDECKDYKKYLEQLATDE	168
S.mimosarum	KVTAALFNIMSSQSDVDRPLCEECTDTLLDOMDQQLRIAEDECREYRDFLEHLEMGS	168
C.floridanus	KVRATLFDILSSSSSADHPLCDECTDNLLVLMDQQLRMTEGEWSDYNQYLKKLEIEQQYQ	150
C.biroi	KVRATLFDILSSSSSADHPLCDECTDSLLLLMDQQLRMTEGEWSDYNEYLKKLEIEQQYQ	150
R.microplus	-DEVVNLDELDAEFRKLEREERELLEAVEKIEKERSDVASERTQLADRLERLRADEDRYW	224
H.longicornis	-EEDPDLEQLDEELRRLEENERELLAAIGEIETQRQEADSERRYAEQLERLRADEERYW	228
I.scapularis	-DEE-DVEQLDEEVROLELKONELLGKIESIEAERAEVEKORRTFAEELERLOVOEDRYW	226
S.mimosarum	- DED-DLEKLONDLMKLKEEBEQLEAQLCEMETKEKELRKILKECEDENDALQREEDKRW	226
C.floridanus	GHEDVEMENLTKELQDIKAEEERMIRELEALRKEEIVTKNAIAEQEREKERLQSEEDRYW	210
C.biroi	GHEDVEMENLTKELQDVKAEEERMIRELEALRKEEIATKNAIAEQEREKERLQSDEDRYW	210
R.microplus	REYSDLNRQLMQCSDDHASVERQLRYSESKLSQLHKTNVFNATFHIWHNGHFGTINNFRL	284
H.longicornis	REYSDLSRQLMQCADDHASVERQLRYSEAKLGQLQKTNVFNATFHIWHNGHFGTINNFRL	288
I.scapularis	RDYSDIKRQLLLCEDDHVSVEGQLRYAQAQLDKLVKTNVFNATFHIWHDGHFGTINNFRL	286
S.mimosarum	QDYCRIKROLLISEDDORSVNNOLKYAQAOLDKLTKTNVFNATFHIWHSGHFGTINNFRL	286
C.floridanus	KEYSKHRRDLMLAEDECRSLDNQLAYAASQLERLKKTNVFNATFHIWHSGHFGTINSFRL	270
C.biroi	KEYSKBRRDLMLAEDECRSLDNQLAYAASQLERLKKTNVFNATFHIWHSGHFGTINSFRL	270
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
R.microplus	GRLPNVPVEWSEINMAWGQTVLLLHSLAEKMEMTFLRYRLVPFGNHSYLMCLEDPTRELP	344
N.longicornis	GRLPNVPVEWSEINIAWGQTVLLLHSLANKMDMTFQRYRLVPFGNHSYLVCLDDRTRELP	348
I.scapularis	GRLPNVPVEWSEINVAWGQTVLLLHSLAKKINLTFERYRLVPYGNHSYLECLEDRSRELP	346
S.mimosarum	GRLPNVPVDWPEINAAWGQTVLLLHSLAKKINLTFERFRLVPYGNLSYLESLESKSKDLP	346
C.floridanus	GRLPSAFVDWSEINAAWGQTTLLLVALAREMNLTFKRFRLVPFGNHSYIEALD-QNKELP	329
C.biroi	GRLPS&FVDWSEINAAWGQTTLLLVALARKMNLTFKRFRLVPFGNHSYIEALD-QNKELP	329
		n Transa
R.microplus	LYFAGGFKFLWDTKFDHAMVAFLDCLQQFKEQVSKMDSNFCLPYRTDKGKIEDSNTGRSC	404
H.longicornis	LYFAGGFKFLWDTKFDQAMVAFLDCLQQFKEQVSKMDSNFCLPYKIDKGRMEDSSTGQSC	408
I.scapularis	LHFAGGFKFLWDTKFDQAMVAFLDCLQQFKEDVERGNPGFCLPYRMDKGKIEDVKTGQSC	406
S.mimosarum	LYCHGGIRYMIDSKFDQAMVAFLDCLQQFKEKVESGDASFHLPYKMDKGKIEDKSTGKSY	406
C.floridanus	LYGSGGFKFLMDTKFDAAMVAFLDCLQQFKEQVEKGDSGFCLPYRMDRGKIEDSATGNSY	389
C.biroi	LYGSGGFKFLWDTKFDAAMVAFLDCLQQFKEQVERGDSGFCLPYRMDRGKIEDSATGNSY	389
100 000		270.35
R.microplus	SIKIQFNSEEQWTKALKFMLTNLKWGLAWVSAHFAARGAAS 445	Identity
H.longicornis	BIRIGENSEEQWIKALKEMLINLKWGLAMVSAHFAGREAASTTPATATTTTTSSS 464	84.94%
I.scapularis	SIKIQFNSEEQWIKALKFMLTNLKWGLAWVSAQFASS443	71.55%
5.mimosarum	SVKIQFNSEEQWIKALKFMLTNLKWALAWVSTQFQNNAPSRF 448	51.68%
C.floridanus	BIRIGENSEEQWIKALKFLUTNLKWGLAMVSSQFTKDELNIN 431	51.74%
C.DITOI	SIKIQFNSEEQWIKALKFLLTNLKWGLAHVSSQFIKDELNIN 431	51.50%

Fig. 3. Alignment of the deduced amino acid sequence of RmAtg6 (accession no. ALK28522), HIAtg6 of Haemaphysalis longicomis(accession no. BAK26532), putative Beclin of Ixodes scapularis and Stegodyphus mimosarum (accession no. XP_002414849 and KFM67317, respectively) and Beclin-1-like protein isoform X2 and X1 of Camponotus noridanus and Cerapachys birol (accession no. XP_011257590 and XP_011344236, respectively). Autophagy protein Apg6 domain is shaded in gray. An asterisk (*) indicates positions which have a single, fully conserved residue, a colon (:) indicates conservation between groups of strongly similar properties; a period (.) indicates conservation between groups of weakly similar properties.



Fig. 4. RmATG3, RmATG4 and RmATG6 mRNA expression in different development stages of Rhipicephalus microplus. Real-time polymerase chain reaction (PCR) reactions were performed of total RNA from egg, larva and adult ovary and midgut tissues. Relative gene expression was calculated using the comparative cycle threshold method. The transcript abundance data were normalized by the average transcript abundance of two endogenous control genes, Elongation factor $1-\alpha$ (ELFIA) and β -actin (ACTB) between each sample. Data represent the mean \pm s.p. from three independent biological replicates. Be aware that each graph on the y-axis has a different scale.

Expression of RmATG genes in different development stages of R. microplus

The expression of RmATG genes showed a different pattern among development stages (Fig. 4). In midgut, RmATG3 expression was 2-fold higher than in ovary, and egg and larva stages. In egg and ovary, RmATG4 was overexpressed ~10-fold and 20-fold, respectively, compared to larva and midgut. Finally, RmATG6 showed the highest expression level in ovary, followed by egg, midgut and larva.

DISCUSSION

In a previous work, we reported the molecular characterization of RmATG8a and RmATG8b genes and predicted the existence of the putative ATG genes ATG3, ATG4 and ATG6 in R. microplus (Flores et al. 2014). To give continuity on those findings, in this work we reported the complete sequences and expression analyses of RmATG3, RmATG4 and RmATG6, providing new insights into autophagy in R. microplus. It is known that autophagy is activated in many species firstly by starvation conditions. The process involves the participation of multiple ATG proteins. To date, over 30 ATG genes, which are involved in various subtypes of macroautophagy, have been identified in yeast (Xie and Klionsky, 2007). Among ATG genes one subset, composed of 17 genes, is required for autophagosome formation. However, few ATG genes have been characterized in ticks. The genes H1ATG3, H1ATG4, H1ATG6, H1ATG8 and H1ATG12 were recently characterized in H. longicornis ticks, while at least seven putative ATG genes (ATG3, ATG5, ATG6, ATG7, ATG8, ATG13 and ATG16) have been found in I. scapularis ticks (Umemiya-Shirafuji et al. 2010).

ATG3, ATG4 and ATG6 gene products, among others, are involved in autophagosome formation. Upon autophagosome induction ATG6 is recruited for vesicle nucleation (autophagosome biogenesis), while ATG3 and ATG4 participate in the elongation step (autophagosome maturation).

Even though the autophagy process is regulated by many ATG proteins, several studies have revealed that a complete set of ATGs may not be necessary in all organisms; some ATG proteins are not essential for starvation-induced autophagy, as is the case of the homologs ULK1 and ULK2 in the chicken, or perform a dual function; for example, in B. mori and other lepidoptera insects it is hypothesized that the function of ATG10 could be compensated for by ATG3 (Zhang et al. 2009; Mizushima and Sahani, 2014). Given the central role that ATG3, ATG4 and ATG6 play in the autophagosome formation, the characterization of their genes provides crucial information to better understand the autophagy process in R. microplus. Autophagy related genes in Rhipicephalus microplus

The autophagy pathway is not only involved in starvation, but can also act in such diverse processes as cell death, immunity, embryogenesis, development, growth and nutrient utilization (McPhee and Baehrecke, 2009). In this study, the expression levels of RmATG4 and RmATG6 genes were found elevated in egg and ovary tissue, while RmATG3 showed lower expression; these results are consistent with previous studies in H. longicornis tick, excepting the low expression of RmATG3 (Kawano et al. 2011; Umemiya-Shirafuji et al. 2014). Our results, showing a similar gene expression pattern, suggest an involvement of the autophagy process in embryogenesis of R. microplus, as previously has been described in H. longicornis, where the silencing of ATG6 mRNA affected the reproductive and ovipositional systems (Kawano et al. 2011).

To deepen the study of autophagy in R. microplus, a combination of methods such as real-time PCR, western blotting, immunostaining and transmission electronic microscopy, as well as RNAi-mediated gene silencing to analyze the function of ATG genes, are recommended. Moreover, a R. microplus genome sequencing project is an urgent need to characterize the complete set of genes that regulate autophagy in this tick.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material for this article can be found at http://dx.doi.org/10.1017/S003118201600 1542.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Kirk Allen for support in drafting and revising this manuscript.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (CONACYT; grant numbers 216321 and 246310, both to M.M.V.). JMFF and CPBA received a scholarship from CONACYT.

REFERENCES

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215, 403–410.

Flores Fernández, J. M., Gutiérrez Ortega, A., Rosario Cruz, R., Padilla Camberos, E., Alvarez, A. H. and Martínez Velázquez, M. (2014). Molecular cloning and characterization of two novel autophagyrelated genes belonging to the ATG8 family from the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology 64, 533–542.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Research 31, 3784–3788.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In The proteomics Protocols Handbook (ed. Walker John, M.), pp. 571–607. Humana Press, New York.

Kawano, S., Umemiya-Shirafuji, R., Boldbaatar, D., Matsuoka, K., Tanaka, T. and Fujisaki, K. (2011). Cloning and characterization of the autophagy-related gene 6 from the hard tick, Haemaphysalis longicornis. Parasitology Research 109, 1341–1349.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947–2948.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Methods 25, 402–408.

McPhee, C. K. and Baehrecke, E. H. (2009). Autophagy in Drosophila melanogaster. Biochimica et Biophysica Acta 1793, 1452-1460.

Mizushima, N. and Sahani, M. H. (2014). ATG8 localization in apicomplexan parasites: apicoplast and more. Autophagy 10, 1487–1494.

Mizushima, N., Yoshimori, T. and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. Cell 140, 313-326.

Nijhof, A. M., Balk, J. A., Postigo, M. and Jongejan, F. (2009). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in Rhipicephalus (Boophilus) microplus and Rhipicephalus appendiculatus ticks and determination of the expression profile of Bm86. BMC Molecular Biology 10, 112.

Rozen, S. and Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology (ed. Krawetz, S. and Misener, S.), pp. 365–386. Humana, Totowa.

Sharma, A. K., Kumar, R., Kumar, S., Nagar, G., Singh, N. K., Rawat, S. S., Dhakad, M. L., Rawat, A. K., Ray, D. D. and Ghosh, S. (2012). Deltamethrin and cypermethrin resistance status of Rhipicephalus (Boophilus) microplus collected from six agro-climatic regions of India. Veterinary Parasitology 188, 337–345.

Spickler, A. R. (2007). Rhipicephalus (Boophilus) Microplus. http:// www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php.

Tsuda, A., Mulenga, A., Sugimoto, C., Nakajima, M., Ohashi, K. and Onuma, M. (2001). cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of Haemaphysalis longicornis tick saliva proteins. Vaccine 19, 4287–4296.

Umemiya-Shirafuji, R., Matsuo, T., Liao, M., Boldbaatar, D., Battur, B., Suzuki, H. and Fujisaki, K. (2010). Increased expression of ATG genes during nonfeeding periods in the tick Haemaphysalis longicornis. Autophagy 6, 473–481.

Umemiya-Shirafuji, R., Galay, R. L., Maeda, H., Kawano, S., Tanaka, T., Fukumoto, S., Suzuki, H., Tsuji, N.Fujisaki, K. (2014). Expression analysis of autophagy-related genes in the hard tick Haemaphysalis longicornis. Veterinary Parasitology 201, 169–175.

Xie, Z. and Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nature Cell Biology 9, 1102–1109.

Zhang, X., Hu, Z. Y., Li, W. F., Li, Q. R., Deng, X. J., Yang, W. Y., Cao, Y. and Zhou, C. Z. (2009). Systematic cloning and analysis of autophagy-related genes from the silkworm Bombyx mori. BMC Molecular Biology 10, 50.

COLABORACIÓN



© 2016 Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, 4 (5), 165-173 ISSN 0719-4250 http://ippres.com/ippres

Original Article | Artículo Original

Wound healing and antioxidant capacity of *Musa paradisiaca* Linn. peel extracts

[Cicatrización de heridas y capacidad antioxidante de extractos de cáscara de Musa paradisiaca Linn.]

Eduardo Padilla-Camberos^{1*}, José M. Flores-Fernández², Alejandro A. Canales-Aguirre¹, Carla P. Barragán-Álvarez¹, Yanet Gutiérrez-Mercado¹, Eugenia Lugo-Cervantes¹

⁵Unidad de Biotecnología Medica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, AC, Avenida Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270. Guadalajara, Jalisco, México.

^aDepartamento de Investigación. Tecnológico de Estudios Superiores de Villa Guerrero, Carretera Federal Toluca-Ixtapan de la Sal, Km 64.5, La Finca, Villa Guerrero, Estado de México.

*E-mail: epadilla@ciatej.mx

Resumen

Abstract

Context: Musa paradisiaca has several biological activities within them wound healing, hypoglycemic, hepatoprotective, antimicrobial, antioxidant, among others. However, these properties in peel have been poorly explored.

Aims: Evaluate the wound healing activity induced by an incision wound model using methanolic, hexanoic and chloroformic extracts from M. paradisiaca peel.

Methods: Dehydrated M. paradisiaca peel was mixed with methanol, hexane, and chloroform. The presence of bioactive substances of the M. paradisiaca peel extracts was carried out by the Trease and Evans methods. Antioxidant capacity was evaluated by the 2,2-diphenyl-2picrylhydrazyl (DPPH) method. Acute toxicity was realized according to up and down OECD procedure in BALB/c mice. Wound healing activity was evaluated in male Wistar rats. Histological analyses of tissues were made by microscopy using staining methods of hematoxylin and eosin and Masson-trichrome.

Results: Treated groups with methanolic and hexanoic extracts of M. paradisiaca peel showed better wound healing activity in comparison with the group treated with chloroformic extract, with an inhibition of DPPH radical bleaching of $\$_{9}$ -90%. It may be due to the presence of alkaloids, tannins, saponins and phenols as principal constituents by conferring antioxidant capacity. The extract did not induce any toxicity.

Conclusions: The findings showed the wound healing and antioxidant capacity of *M. paradisiaca* peel extract. It was observed that depending on the extraction solvent; there is a variation in the antioxidant capacity that also affects the effectiveness of the restoration of tissue, suggesting that the antioxidant capacity could play a major role in the process of wound healing.

Keywords: Antioxidant capacity; banana peel; Musa paradisiaca; wound healing activity.

Contexto: Musa paradisiaca tiene diversas actividades biológicas como la cicatrización de heridas, hipoglicemiante, hepatoprotector, antimicrobiano, antioxidante, entre otros. Sin embargo, estas propiedades en la cáscara han sido poco exploradas.

Objetivos: Evaluar la actividad de cicatrización en un modelo de herida inducida por incisión usando extractos metanólico, hexanoico y clorofórmico de la cáscara de M. paradisiaca.

Métodos: La cáscara deshidratada de M. paradisiaca se mezcló con metanol, hexano y cloroformo. La presencia de sustancias bioactivas se realizó de acuerdo a los métodos reportados por Trease y Evans. La capacidad antioxidante se evaluó por el método de 2,2-difenil-2picrilhidrazil (DPPH). La toxicidad aguda se realizó de acuerdo al método arriba y abajo de la OCDE, en ratones BALB/c. Los extractos se evaluaron en ratas Wistar. El análisis histológico de tejidos se realizó por microscopia, utilizando tinción de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson.

Resultados: Los grupos tratados con el extracto metanólico y hexanoico de cáscara de M. paradisiaca mostraron una mejor cicatrización de la herida en comparación con el grupo tratado con extracto dorofórmico, con una inhibición de la decoloración del radical DPPH del 89-90%. Esto puede deberse a la presencia de sustancias antioxidantes como alcaloides, taninos, saponinas y feno les. El extracto no indujo toxicidad.

Conclusiones: Estos hallazgos muestran la capacidad tanto de cicatrización como antioxidante del extracto de la cáscara de *M. paradisiaca*. Dependiendo del solvente para la extracción, existe variación de la capacidad antioxidante que afecta la eficacia de restauración del tejido, mostrando que la capacidad antioxidante desempeña un papel importante en el proceso de cicatrización de la herida.

Palabras Clave: Actividad de cicatrización de heridas; cáscara de plátano; capacidad antioxidante; Musa paradisiaca.

