

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN DEL CANAL DE ANIONES DEPENDIENTE DE VOLTAJE (VDAC) EN *Rhipicephalus sanguineus* Latreile, 1806 (IXODIDA: IXODIDAE) Y *Rhipicephalus annulatus* Say (IXODIDA: IXODIDAE)

Iván Corona-Guerrero^{1,3}✉, Minerva Camacho-Nuez², Bertha Isabel Carbajal-Gómez³ y Juan Mosqueda^{1,3}

¹Licenciatura en Microbiología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma De Querétaro. Carretera a Chichimequillas s/n, Ejido Bolaños, C. P. 76140 Santiago de Querétaro, Qro.

²Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. San Lorenzo 290, esquina Roberto Gayol, Col. del Valle Sur, Del. Benito Juárez, México D.F., C. P. 03100.

³Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Carretera a Chichimequillas s/n, Ejido Bolaños, C. P. 76140 Santiago de Querétaro, Qro.

✉ Autor de correspondencia: Joel.mosqueda@uaq.mx

RESUMEN. Las garrapatas del género *Rhipicephalus* son ectoparásitos de animales domésticos que además de causar daños a sus hospedadores actúan como importantes vectores de parásitos de importancia en salud humana y veterinaria. En México, el desarrollo de vacunas contra garrapatas ha sido poco explorado. El canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) es una proteína presente en múltiples taxa que está involucrada en interacciones entre las células hospedadoras y los patógenos. Recientemente se ha descrito que VDAC se expresa en membrana de células intestinales de *Rhipicephalus microplus* y es considerado un candidato vacunal importante al ser un antígeno oculto siempre y cuando se encuentre conservado y sea inmunogénico. En este trabajo se reporta la clonación y secuenciación de VDAC de *R. sanguineus* y *R. annulatus*, así como su análisis *in silico* donde se identifica la presencia de epítomos B conservados. Al comparar las secuencias de *R. sanguineus* y *R. annulatus* se observó más del 80 % de identidad con secuencias de *vdac* en otras especies, lo cual sugiere que la secuencia codificante para esta proteína se encuentra muy conservada entre especies de importancia en la salud animal. Finalmente, se confirmó la presencia de 4 epítomos B predichos, conservados en VDAC de *R. microplus*, *R. sanguineus* y *R. annulatus*, lo que lo propone como un antígeno vacunal multiespecies.

Palabras clave: Bioinformática, *Rhipicephalus*, vacunas.

Molecular characterization of the *Rhipicephalus sanguineus* Latreile, 1806 (Ixodida: Ixodidae) and *Rhipicephalus annulatus* Say, 1821 (Ixodida: Ixodidae) voltage dependent anion channel (VDAC) gene

ABSTRACT. Ticks of the genus *Rhipicephalus* are ectoparasites from domestic animals which can cause harm to their hosts and serve as important vectors of diseases with importance in human and veterinary medicine. In Mexico, few efforts have been put into the development of anti-tick vaccines. The voltage dependent anion channel (VDAC) is a protein present in multiple taxa, which plays a role into host-pathogen interactions. Recently, it has been shown that VDAC is expressed in *Rhipicephalus microplus* intestinal cell membranes and it is considered a vaccine candidate because it is a hidden antigen, only if proven it is highly conserved and immunogenic. In this work, we report the cloning and sequencing of the *R. sanguineus* and *R. annulatus* *vdac* gene, as well as an *in-silico* analysis where we identified conserved B-epitopes. Comparing the *R. sanguineus* and *R. annulatus* nucleotide sequences, we observed an 80% or higher identity with *vdac* from other species, which suggest that the protein coding sequence is highly conserved between species of ticks with animal health relevance. Finally, we confirmed the presence of 4 predicted B-epitopes, conserved in VDAC from *R. microplus*, *R. sanguineus* and *R. annulatus*, which places the antigen as a multi-species vaccine antigen.

Keywords: Bioinformatics, *Rhipicephalus*, vaccine.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas del género *Rhipicephalus* son ectoparásitos de los animales domésticos que no solo causan daños severos a sus hospedadores sino, además, son vectores importantes de enfermedades. *R. sanguineus* es una garrapata que para completar su ciclo de vida requiere de tres hospederos. Con las condiciones climáticas adecuadas, puede completar 2.5 veces su ciclo de vida en un año. Sus principales hospederos son los perros, aunque puede llegar a parasitar humanos. Esta especie de garrapatas puede transmitir parásitos de importancia en salud humana y animal, como *Rickettsia rickettsii*, por ejemplo. Debido a los efectos del cambio climático estos parásitos han logrado colonizar nuevos nichos (Cruz-Vazquez y Garcia-Vazquez, 1999).

El control de *R. sanguineus* se basa en la aplicación de fármacos garrapaticidas, los cuales han generado el desarrollo de poblaciones resistentes a ellos (Manjunathachar *et al.*, 2014). Esto ha obligado a la búsqueda de nuevas estrategias de control que sean efectivas, económicamente viables y amigables con el medio ambiente. La implementación de vacunas, a pesar de que cumple con estas características, ha sido poco explorada (De La Fuente y Kocan, 2006). VDAC es una proteína transmembranal que actúa como un poro selectivo, está presente en múltiples taxa y se sabe que está involucrada en procesos de apoptosis. Recientemente, se ha descrito que se expresa en membrana de células intestinales de *Rhipicephalus microplus* y se ha demostrado que interactúa con fases sexuales de *Babesia bigemina*; esta unión representa un paso crítico en el desarrollo del patógeno (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015).

Al ser un antígeno oculto (que no está expuesto de manera continua al sistema inmune del hospedero), VDAC es considerado un candidato vacunal siempre y cuando sea inmunogénico y se encuentre conservado. Hasta la fecha no se ha encontrado un homólogo de VDAC en otras especies del género *Rhipicephalus*. Por otra parte, se sabe que *Pichia pastoris* tiene la capacidad de poder plegar proteínas eucariontes de manera muy similar a sus organismos nativos y se ha usado como un muy eficiente sistema de producción debido a la gran cantidad de proteína recombinante que puede ser obtenida, razón por la cual ha sido elegida como organismo modelo para la expresión de proteínas recombinantes para uso vacunal, por ejemplo, la vacuna GavacTM (Canales *et al.*, 1997). El objetivo de este estudio fue identificar el gen homólogo que codifica a *vdac* en las especies de garrapatas *R. sanguineus* y *R. annulatus*, y comprobar su grado de conservación a nivel de secuencia de nucleótidos y de proteína predicha, así como el diseño de primers para su clonación en un vector de expresión para *P. pastoris*.

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron ejemplares de *R. sanguineus* colectados de perros con dueño de Cuautla, Morelos, así como una cepa de referencia de *R. annulatus* obtenida a partir de un brote de esta especie de garrapatas en Texas, EUA. La extracción del DNA de los ejemplares se realizó utilizando el kit DNEasy Blood and Tissue (Qiagen, EUA) mediante un protocolo modificado basado en la disrupción de los tejidos de los ejemplares utilizando baños en hielo seco, seguido de maceración en un buffer de lisis. La concentración de DNA de cada extracción, así como su calidad fueron determinados mediante espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop. La integridad del material genético se comprobó realizando electroforesis de la muestra en gel de agarosa al 1 %.

Se amplificó el gen *vdac* mediante PCR utilizando los primers publicados anteriormente (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2012). Se obtuvieron amplicones del tamaño esperado, los cuales fueron clonados en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen, EUA). Este plásmido fue transformado en células competentes One Shot de *E. coli* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Colonias aisladas de células transformantes fueron crecidas en medio líquido durante 16 horas para incrementar el número de copias del plásmido.

El DNA plasmídico fue recuperado utilizando el kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA). Los plásmidos fueron enviados al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT) para su secuenciación. Los resultados se analizaron con el programa FinchTv en busca de picos anómalos producidos por la calidad del DNA. Las secuencias corregidas se compararon con la base de datos del NCBI utilizando BLAST y alineadas utilizando Clustal Omega con la secuencia de *vdac* de *R. microplus* con el código GU994210.1 y de *Ixodes scapularis* con número de acceso XM_002408021.1 en la base de datos GenBank. De igual manera, se obtuvieron las secuencias de amino ácidos predichos utilizando la herramienta translate disponible en ExPASy y estas se alinearon. Posteriormente, se realizó una predicción de epítomos B utilizando la herramienta BCPRED del laboratorio de investigación de inteligencia artificial de la Universidad Estatal de Pensilvania.

Finalmente, se hizo un alineamiento con todas las secuencias para diseñar primers específicos para amplificar una región conservada de la secuencia de *vdac* en *R. sanguineus*. Se eligió el vector pPICZ α . Para asegurar que el amplicón se inserte en la dirección correcta, se diseñaron primers con los sitios de restricción para EcoRI en el primer forward y para XbaI en el primer reverso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un amplicón de 750 pares de bases utilizando los primers de Rodríguez-Hernández, *et al.*, 2012. Al comprar las secuencias obtenidas de *R. sanguineus* y *R. annulatus* utilizando BLAST se observó que la cobertura es mayor a 96 % con más del 80 % de identidad con secuencias del reportadas de *vdac* en *R. microplus*, *Amblyomma variegatum* e *Ixodes scapularis* (Fig. 1 y 2), lo cual sugiere que la secuencia codificante para esta proteína se encuentra altamente conservada entre especies de importancia en la salud animal (por lo menos en las secuencias de garrapatas reportadas hasta el momento).

Al realizar el alineamiento con Clustal Omega, se observó una diferencia de 14 aminoácidos con respecto a la secuencia predicha de *R. sanguineus* al ser comparadas con la secuencia de *R. microplus* y 45 con respecto a *I. scapularis* (Fig. 3). Mientras que la secuencia predicha de *R. annulatus* presentó una diferencia de seis aminoácidos con respecto a *R. microplus* y 43 con respecto a *I. scapularis* (Fig. 4). La predicción de epítomos B confirmó que los 4 epítomos B predichos en *R. microplus* se encuentran conservados en VDAC de *R. sanguineus* y *R. annulatus* (Fig. 5). Cabe mencionar que el epítomo predicho en la posición 32 de las secuencias de *R. microplus* y *R. annulatus* se encuentra desfasado en la secuencia de *R. sanguineus*, debido al cambio de un aminoácido en el residuo 35 (una glutamina por una histidina). El epítomo predicho únicamente en *R. sanguineus* comienza en la posición 37 y su secuencia se encuentra completamente conservada en las tres especies, aunque tiene una puntuación menor de acuerdo al algoritmo de predicción de BCPred.

Finalmente, utilizando la secuencia de *vdac* de *R. sanguineus* se diseñaron los oligos: Rsang_ *vdac*_EcoR 5' GCTGAATTCAAGAACTACCACTTCGGCG 3' y Rsang_ *vdac*_XbaI 5' TTGTTCTAGAGTCGTTGACGTTTCGTGTG 3', con los cuales se logró amplificar un fragmento de 520 pares de bases en línea con el marco de lectura nativo. Debido a las construcciones diseñadas en el extremo 5' de los primers, se tiene la certeza de que al clonarse en el vector pPICZ α tendrá la dirección correcta al momento de la transcripción.

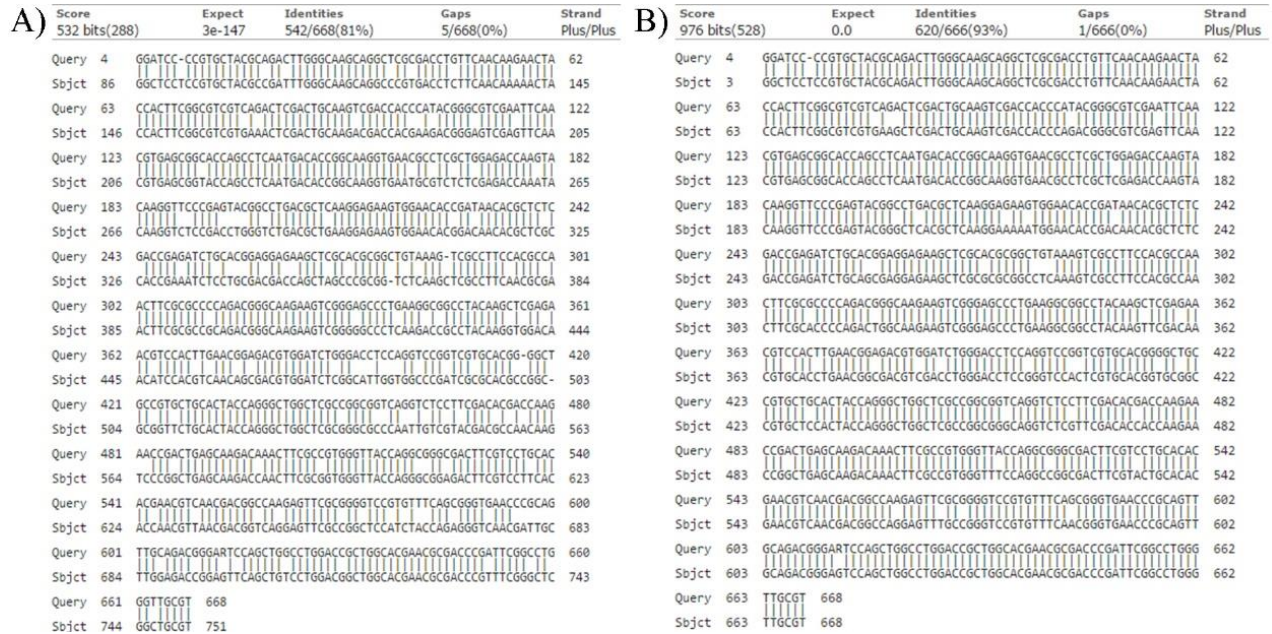


Figura 1. Comparación de la secuencia de *vdac* de (A) *R. sanguineus* vs *I. scapularis* (81 % de identidad) y (B) *R. microplus* (93 % de identidad).

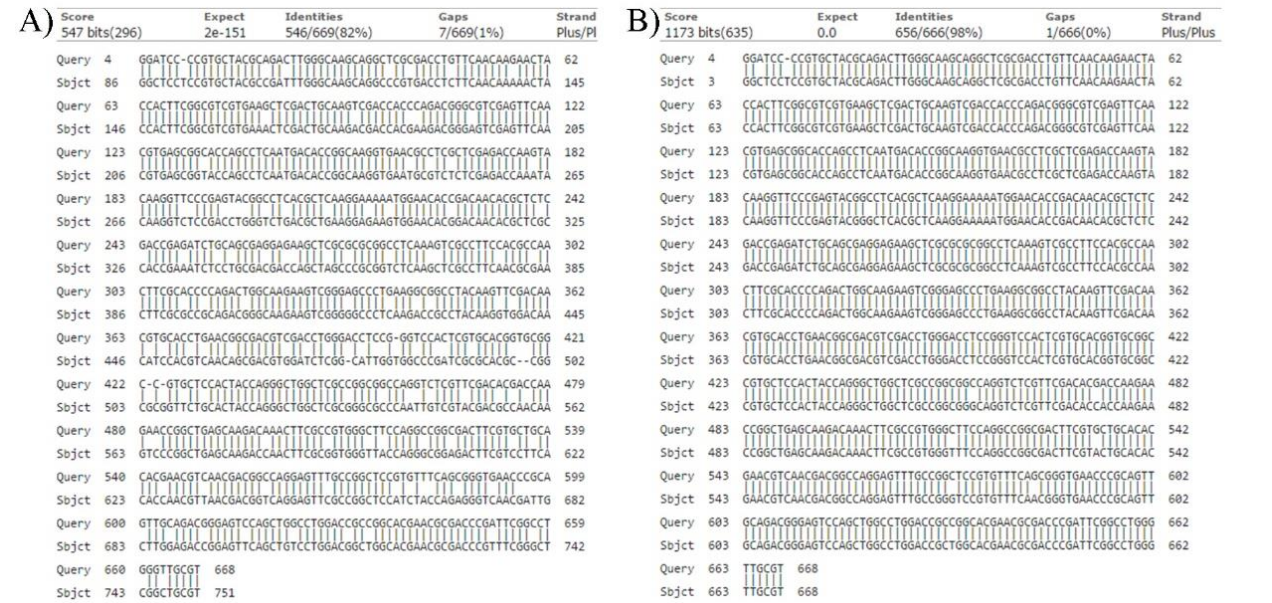


Figura 2. Comparación de la secuencia de *vdac* de (C) *R. annulatus* vs *I. scapularis* (82 % de identidad) y (D) *R. microplus* (98 % de identidad).



Figura 3. Alineamiento de aminoácidos de las secuencias de (A) *R. microplus* comparado con la de *R. sanguineus* (93.83% de similitud) y (B) *R. sanguineus* comparado con la de *I. scapularis* (80.18% de similitud).



Figura 4. Alineamiento de aminoácidos de las secuencias de (A) *R. microplus* comparado con la de *R. annulatus* (97.36% de similitud) y (B) *R. sanguineus* comparado con la de *I. scapularis* (81.06% de similitud).

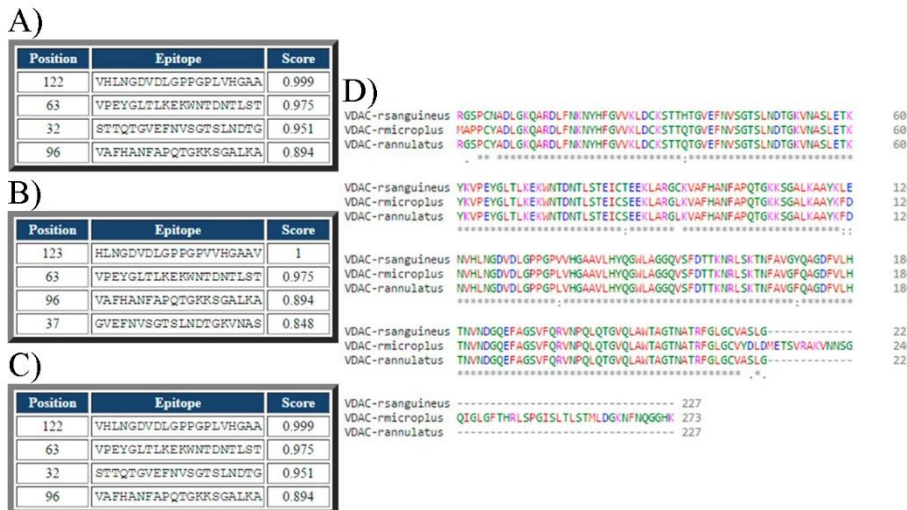


Figura 5. Predicción de epítomos B en VDAC de *R. microplus* (A), *R. sanguineus* (B) y *R. annulatus* (C) y alineamiento de aminoácidos de los aminoácidos utilizando Clustal Omega (D).

CONCLUSIÓN

Después de comparar las secuencias tanto de DNA como de proteína se determinó que VDAC es un antígeno que se encuentra muy conservado en tres diferentes especies de garrapatas del género *Rhipicephalus*, lo cual perfila a esta proteína como un fuerte candidato para una vacuna contra múltiples especies. Al clonar la secuencia que se logró amplificar utilizando los oligos diseñados se puede asegurar que la clonación del amplicón estará en la dirección correcta, lo cual permitirá obtener una proteína recombinante utilizando un sistema de expresión eucarionte, ideal para un inmunógeno vacunal contra las garrapatas de los animales domésticos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado gracias a un proyecto CONACyT-Problemas Nacionales 2013 y de PRODEP-REDES, del cual Iván Corona Guerrero recibió una beca para su tesis de licenciatura. De igual manera, se agradece a todos los miembros del Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada por su apoyo académico.

Literatura Citada

- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A. and J. de la Fuente, J. 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. *Vaccine*, 15(4): 414–422. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00192-2](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00192-2).
- Cruz-Vazquez, C. and Z. Garcia-Vazquez. 1999. Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, Mexico. *Experimental and Applied Acarology*, 23(3): 277–280. <http://doi.org/10.1023/A:1006075232455>.
- De La Fuente, J. and K. M. Kocan. 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*, 28(7): 275–283. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x>.
- Manjunathachar, H. V., Saravanan, B. C., Kesevan, M., Karthik, K., Rathod, P., Gopi, M. and B. L. Balaraju. 2014. Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(Suppl 2). [http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60725-8](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60725-8).
- Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., Alvarez-Sánchez, M. E., Neri, A. F., Mendoza-Hernández, G. and M. Camacho-Nuez. 2012. The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of *Babesia bigemina* sexual stages with *Rhipicephalus microplus* midgut cells. *Veterinary Parasitology*, 187(3-4): 538–541. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.028>.
- Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., León-Ávila, G., Castañeda-Ortiz, E. J., Álvarez-Sánchez, M. E., Camacho, A. D. and M. Camacho-Nuez. 2015. BmVDAC upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology*, 212(3-4): 368–374. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.016>.