



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**VALIDACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UN
EPÍTOPO DE LA ARGININA CINASA DE GARRAPATA CAFÉ
DEL PERRO (*Rhipicephalus sanguineus*), POTENCIAL
BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN**

Por

Ana Carolina Gómez Yanes

TESIS APROBADA POR LA

TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍAS DE ALIMENTOS DE
ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

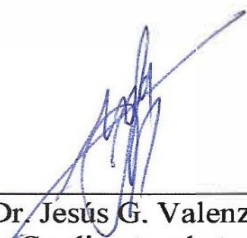
DOCTORA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ana Carolina Gómez Yanes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias



Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
Director de Tesis



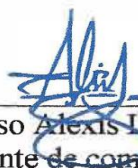
Dr. Jesús G. Valenzuela
Co-director de tesis



Dra. Verónica Mata Haro
Integrante de comité de tesis



Dr. Humberto González Ríos
Integrante de comité de tesis



Dr. Alonso Alexis López Zavala
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Caracterización Bioquímica e Inmunológica de Arginina Cinasa de la Garrapata Café de Perro (*Rhiphicephalus sanguineus*)" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Ana Carolina Gómez Yanes, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONAHCYT, por la beca doctoral otorgada.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A, C, (CIAD) por abrirme las puertas para poder realizar mis estudios.

Al proyecto de Ciencia de Frontera 2019-610264: Biología estructural del reconocimiento molecular en proteínas de la garrapata y araña violinista; que financió gran parte de mis experimentos.

Al Dr. Rogerio Sotelo Mundo, por abrirme las puertas de su laboratorio y por todo su apoyo, tanto de material, experiencia y por sus ánimos y aliento. Al Dr. Jesús Valenzuela, por las respuestas a las tantas dudas que fueron apareciendo a lo largo del trabajo, por el apoyo con los recursos y por esa cercanía que siempre hubo, a pesar de la distancia, también por siempre estar dispuesto a compartir sus experiencias y sabiduría. A la Dra. Verónica Mata Haro y al Dr. Humberto González Ríos, por sus consejos, sugerencias y apoyo brindado. A la Dra. Karina García Orozco, por sus consejos y ayuda técnica a la hora de realizar los experimentos. A la Dra. Elena Moreno Córdova, por su amistad, su apoyo y calidez, por siempre estar al pendiente y apoyarme con lo que fuera necesario. A la Dra. María Islas Osuna, por el apoyo con las revisiones de los protocolos y artículo. Al Q.B René Valenzuela Miranda por el apoyo brindado en la producción de anticuerpos policlonales y su purificación. A la Dra. Ana María Calderón de la Barca, por sus consejos y apoyo en la revisión de artículos. A la Dra. Marcia Leyva Gastélum, y al Laboratorio Estatal de Salud Pública por proporcionar los sueros de los pacientes con rickettsia. A José María Gastelum por sus consejos y apoyar con los sueros del banco de sangre de su proyecto.

A los MVZ Jesús Pedro Figueroa Valdez, Kassandra Gómez, Susana Saldaña, Isela Alfaro, Paola Curiel y David Rajme por colaborar con la obtención de sueros de perros sanos e infestados.

A los Clados, Armando, Tory, Fernanda y Luis Ángel, por estar al pendiente, por echarme ánimos y ayudarme a conseguir perros y garrapatas.

A la familia Camiso, en especial a Ernesto Figueroa, Ismel Nido, María José Carrillo, Fernando Villegas, Miriam Jiménez y Martín Gudiño, por apoyarme con lo que ocupara, ya fueran unas risas, a sus perros o garrapatas.

Al Lab family, Elena Moreno, Julia Estrella Munguía, José Rojas, Diego Bernabé, Verónica

Vázquez y Miguel Arenas por apoyarme en lo que necesitara, por ayudarme a des-estresarme en los momentos frustrantes del día a día.

A la familia Valenzuela Castillo por su cariño y por estar al pendiente de mi estado de ánimo.

A Esmeralda Morales y Gabriel Amavizca, por ayudar a superarme y estar al pendiente.

A mi hermano, por apoyarme en mis proyectos y estar presente cuando más lo ocupaba.

A mis papás, ya que ellos me dieron la oportunidad de estudiar y me han apoyado tanto emocional como económicamente a lo largo de mi vida, gracias por su amor y cariño.

A Adán, por su apoyo infinito, ya sea con la tesis o para salir del tedio, por su compañía, consejos amor y cariño.

DEDICATORIA

Adán, esta tesis va para ti. Agradezco el tiempo que la vida me prestó tu compañía. Siempre estarás en mi corazón.

Nos vemos a la vuelta del disco galáctico.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Garrapata Café (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>)	17
2.1.1. Ecología y Ciclo de Vida	18
2.1.2. Enfermedades Transmitidas por R. sanguineus	20
2.1.3. Garrapatas y Cambio Climático.....	21
2.2. Biomarcadores	23
2.3. Arginina Cinasa	23
2.4. Estudios Estructurales en Proteínas	25
2.4.1 Estudios Estructurales de Arginina Cinasa	27
2.5. Identificación de Epítomos	27
2.5.1. Estudios de Epítomos en Arginina Cinasas	28
3. HIPOTESIS	29
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo General.....	30
4.2. Objetivos Particulares.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. Cristalización de RsAK	31
5.2. Colecta de Datos de Rayos-X y Determinación de la Estructura Cristalográfica de la RsAK.....	31
5.3. Dispersión por Rayos X en Ángulo Reducido	32
5.4. Predicción de Epítomos Especie-específicos Discontinuos con DiscoTope	33
5.5. Sobreexpresión de Mutantes y RsAK Silvestre.....	33
5.5.1. Transformación de Bacterias con las Mutantes	34
5.5.2. Sobreexpresión de Mutantes	35
5.5.3 Sobreexpresión de la RsAK Recombinante.....	35
5.6. Purificación de mutantes y RsAK Recombinante	36

CONTENIDO (continuación)

5.6.1. Purificación de E1	36
5.6.2. Purificación de E2 y WT Recombinante	37
5.7. Actividad Específica y Cinética	37
5.7.1. Actividad Específica de RsAK WT, E1 y E2	37
5.7.2. Cinética de RsAK WT	38
5.8. Validación de Epítomos por Medio de ELISA.....	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1. Obtención de Cristales de RsAK.....	40
6.2. Determinación de la Estructura Cristalográfica de la RsAK.....	41
6.3. Dispersión de Rayos X en Ángulo Reducido	44
6.4. Predicción de Epítomos Especie-Específicos con DiscoTope	45
6.5. Sobreexpresión de Mutantes y RsAK Silvestre.....	49
6.6. Actividad Enzimática de RsAK WT y Mutantes.....	51
6.7. Cinética Enzimática de RsAK WT	51
6.8. Validación de Epítomos.....	54
7. RECOMENDACIONES.....	60
8. CONCLUSIONES.....	59
9. BIBLIOGRAFÍA.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Secuencia de RsAK WT y epítomos de RsAK mutados a alanina.....	34
2	Cristales de RsAK en 0.1 M bis tris, pH 6.5, 25% p/v PEG 3,350.....	41
3	Estructura cristalográfica de la RsAK apo.....	43
4	Superposición estructural de la estructura experimental RsAK.....	44
5	Función de distribución de distancia de pares de la arginina cinasa de garrapata café en su forma apo y TSAC.....	45
6	Identificación de epítomos en la secuencia y estructura de AKs.....	47
7	Epítomos especie-específicos de RsAK según DiscoTope.....	48
8	Cinética de sobreexpresión de las mutantes E1, E2, E3 y E4 de RsAK.....	50
9	Actividad específica de la arginina cinasa WT y las mutantes E1 y E2.....	51
10	Gráficos de Michaelis-Menten de los parámetros cinéticos de la RsAK con L-arginina y ATP como sustratos.....	53
11	Reactividad medida a una absorbancia de 415 nm de las diferentes versiones de RsAK con sueros con FMMR y con sueros de banco de sangre (controles).....	56
12	Alineamiento de secuencias de arginina cinasas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Litopenaeus vannamei</i> y <i>Panaeus chinensis</i>	57

LISTA DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Colección de datos de rayos X y estadísticas del refinamiento.....	42
2	Composición aminoacídica de los epítomos.....	49
3	Comparación de las constantes cinéticas de la <i>RsAK</i>	54

RESUMEN

Rhipicephalus sanguineus tiene la capacidad de transmitir patógenos, entre ellos a *Rickettsia rickettsii*, causante de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas. En México, es una enfermedad reemergente con alta tasa de mortalidad. Un biomarcador de exposición a garrapata permitiría encontrar áreas de la población con mayor exposición a este vector; localizadas estas áreas, se podrían implementar estrategias de control más eficientes, disminuyendo incidencias de la enfermedad. La arginina cinasa (AK) es una enzima vital en el metabolismo de invertebrados y se ha propuesto como biomarcador de diversas enfermedades; sin embargo, es una proteína bastante conservada entre especies, por lo que estudiar sus epítomos podría ayudar a determinar si pudiera ser usada como biomarcador de exposición. Para esto, se determinó la estructura cristalográfica de la arginina cinasa de *Rhipicephalus sanguineus* (*RsAK*) mediante difracción de monocristal utilizando rayos X a una longitud de onda de 1.19 Å. Adicionalmente se aplicó la técnica de SAXS para estimar el tamaño de la molécula en solución. Con la estructura tridimensional, se predijeron epítomos especie-específicos con ayuda del algoritmo de DiscoTope 2.0. Las secuencias predichas por el algoritmo se mutaron a alanina en secuencias separadas, utilizando genes sintéticos para cada variante. Tanto la secuencia silvestre de la garrapata (*wild-type*, WT), como las mutantes, fueron sobreexpresadas en *Escherichia coli*, se purificaron mediante IMAC y SEC, se comparó su actividad enzimática específica, y se realizó un ELISA, para el cual se utilizaron sueros de pacientes diagnosticados positivos a FMMR.

Se resolvió la estructura cristalográfica de la *RsAK* en ausencia de ligandos (*apo*) con una R_{work} de 15.52 y una R_{free} de 18.57. Mediante SAXS, se encontró que la *RsAK* tiene un radio de 80 Å en su conformación *apo* y 60 Å en TSAC. Se predijeron 4 epítomos especie-específicos (E1, E2, E3 y E4). Se sobreexpresaron de manera soluble y purificaron la WT y las mutantes E1 y E2. En los ensayos de actividad enzimática se vio una disminución significativa en la actividad en la mutante E2. Además, se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) en la reactividad en los sueros contra la E1, lo cual sugiere que E1 es un epítomo conformacional verdadero, que se conforma por un lazo y una alfa hélice y está en la superficie del antígeno. Lo anterior soporta el potencial uso de *RsAK* como un marcador de exposición a garrapata en serodiagnóstico para apoyar acciones de seguimiento en población vulnerable a FMMR.

Palabras clave: Arginina cinasa, garrapata, epítomos.

ABSTRACT

Rhipicephalus sanguineus has the ability to transmit various pathogens, including *Rickettsia rickettsii*, which causes Rocky Mountain Spotted Fever. In Mexico, it is a re-emerging disease with a high mortality rate. A tick exposure biomarker would make it possible to find areas of the population with greater exposure to this vector; Once these areas are located, more efficient control strategies could be implemented, reducing the incidence of the disease. Arginine kinase (AK) is a vital enzyme in invertebrate metabolism and has been proposed as a biomarker of various diseases; however, it is an antigenic protein conserved between species, so studying its epitopes could help determine if it could be used as a biomarker of exposure. The crystallographic structure of the *Rhipicephalus sanguineus* arginine kinase (*RsAK*) was resolved by single crystal diffraction using X-rays at a wavelength of 1.19 Å. Additionally, the SAXS technique was applied to estimate the size of the molecule in solution. With the three-dimensional structure, species-specific epitopes were predicted with the help of the DiscoTope 2.0 algorithm. The sequences predicted by the algorithm were mutated to alanine in separate sequences, using synthetic genes for each variant. Both, the wild-type sequence of the tick (WT) and the mutants were overexpressed in *Escherichia coli*, purified by IMAC and SEC, their specific enzymatic activity was compared, and an ELISA was performed, using sera from patients diagnosed positive for RMSF.

The crystallographic structure of *RsAK* was solved in the absence of ligands (apo) with an R_{work} of 15.52 and an R_{free} of 18.57. Using SAXS, the *RsAK* was found to have a radius of 80 Å in its apo conformation and 60 Å in TSAC. Four species-specific epitopes were predicted (E1, E2, E3 and E4). The WT and the E1 and E2 mutants were solubly overexpressed and purified. In enzyme activity assays a significant decrease in activity was seen in the E2 mutant. In addition, a significant decrease ($p < 0.05$) was found in the reactivity in the sera against E1, which suggests that E1 is a true conformational epitope, which is made up of a loop and an alpha helix and is on the surface of the increase. This supports the potential use of *RsAK* as a marker of exposure to ticks in serodiagnosis to support follow-up actions in a population vulnerable to RMSF.

Key words: Arginine kinase, ticks, epitopes.

1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos quelicerados pertenecientes a la superfamilia Ixodoidea, y son parásitos obligados hematófagos. Estos organismos se caracterizan por su forma aplastada antes de alimentarse, por poseer cuatro pares de patas, excepto en su estadio larvario, donde poseen tres pares; y por la presencia de un hipostoma, que es la estructura que insertan en el hospedero para succionar sangre; éste tiene una serie de dientes curvados. Se han identificado alrededor de 900 especies de garrapatas, las cuales se dividen en tres familias: Nuttallielidae, Argasidae (garrapatas blandas) e Ixodidae (garrapatas duras) (Jongejan y Uilenberg, 2004; Sonenshine y Roe, 2014). El 80% de las garrapatas caen en la familia Ixodidae (aproximadamente 700 especies) y solo una especie en Nuttallielidae, el resto (aproximadamente 200 especies) son de la familia Argasidae (Jongejan and Uilenberg, 2004; Sonenshine and Roe, 2014).

De todas las especies conocidas, aproximadamente el 10% están implicadas en la transmisión de diversos patógenos (Dantas-Torres, 2008) como protozoos, bacterias como rickettsias y espiroquetas además de algunos virus (Jongejan and Uilenberg, 2004) lo que provoca un impacto importante en la salud humana y animal, ya que estos patógenos pueden afectar tanto a humanos como a animales de compañía y de producción (Singh and Girschick, 2003).

En el sur de Estados Unidos y norte de México, existe una enfermedad reemergente transmitida por la garrapata café del perro llamada fiebre manchada de las montañas rocosas (FMMR), que puede tener una tasa de mortalidad del 30-80% si no es tratada a tiempo (Alvarez-Hernandez *et al.*, 2022; Openshaw *et al.*, 2010). Algunos de los síntomas son fiebre, dolor de cabeza, sarpullido, dolor muscular, náuseas y artritis, síntomas que pueden ser muy inespecíficos (Kjemtrup *et al.*, 2022), por ello el sub-diagnóstico y las altas tasas de mortalidad.

En cuanto a las poblaciones más propensas y expuestas a la FMMR por mordedura de garrapata café, se ha observado que las personas que tienen una mayor exposición a áreas rurales y a actividades al aire libre, como agricultores, ganaderos, cazadores y excursionistas, son más susceptibles a contraer la enfermedad. Asimismo, las personas que trabajan en contacto directo con animales infestados, como perros y ganado, también están en riesgo de adquirir la rickettsiosis (Labruna, 2009).

En cuanto a las estadísticas de prevalencia de la rickettsiosis a nivel mundial, en México, en el

estado de Sonora y en la ciudad de Hermosillo, los datos varían según los estudios y la disponibilidad de información epidemiológica actualizada. A nivel mundial, se estima que cada año se producen cientos de miles de casos de rickettsiosis, con tasas de mortalidad que oscilan entre el 1% y el 4% (Parola *et al.*, 2013). En México, se han reportado casos de rickettsiosis en diferentes estados, siendo Sonora uno de los más afectados debido a su clima cálido y la presencia de vectores como la garrapata café del perro (Alvarez *et al.*, 2014a). En la ciudad de Hermosillo, Sonora, se han registrado casos de rickettsiosis en los últimos años, aunque es necesario contar con estudios epidemiológicos más detallados para determinar la prevalencia exacta de la enfermedad en esta área específica.

En este contexto, la arginina cinasa (AK) surge como una posible biomolécula relevante en el estudio de las garrapatas y su relación con la rickettsiosis. La AK es una enzima que se encuentra presente en diversas especies de invertebrados, y se ha demostrado que desempeña un papel crucial en la respuesta inmunológica y en la defensa frente a patógenos (Shi *et al.*, 2012). Se ha observado que la AK participa en la síntesis de óxido nítrico y de otros metabolitos bioactivos que son importantes para el control de la infección y la inflamación en invertebrados (Ehsan *et al.*, 2017). La presencia de anticuerpos específicos contra esta enzima podría indicar la exposición previa al vector y, por lo tanto, una probabilidad de contraer la bacteria. La detección de estos anticuerpos podría realizarse mediante técnicas de inmunodiagnóstico, como ensayos de ELISA o técnicas de inmunofluorescencia, que permitirían identificar de manera rápida y precisa a los individuos expuestos a la rickettsiosis. Así mismo, la AK de garrapata café de perro, pudiera servir como herramienta para mantener una vigilancia epidemiológica al saber el porcentaje de la población que está expuesta a la garrapata; estos estudios ayudarían a ubicar las áreas donde las personas pudieran tener una mayor probabilidad de contraer FMMR y así se podrían dirigir los esfuerzos de mitigar al vector, poniendo énfasis en estas áreas.

La AK ya se ha propuesto anteriormente como biomarcador de la enfermedad de Chagas, toxocariasis, *Psoroptes ovis* y para el asma alérgico. (Gu *et al.*, 2019; Valera-Vera *et al.*, 2021; Varghese *et al.*, 2017). Sin embargo, la arginina cinasa es una enzima bastante conservada, estudiar sus epítomos podría ayudar a encontrar aquellos que sean específicos para la AK de garrapata café de perro, lo cual podría determinar si pudiera ser usada como biomarcador de exposición. En la actualidad existen algunas investigaciones donde estudian epítomos de arginina cinasas de diversas especies (Ayuso *et al.*, 2012a, 2010; Fu *et al.*, 2018; H. Y. Mao *et al.*, 2013; Valera-Vera *et al.*,

2021; Zhang *et al.*, 2023), así que el estudio de los epítomos de esta arginina cinasa y la comparación con los de otras especies pudiera servir para encontrar epítomos especie-específicos.

Por estas razones, en esta investigación se analizó la actividad de la AK, se buscó el epítomo de la AK utilizando un algoritmo, se caracterizó su especificidad en sueros de pacientes diagnosticados como positivos a FMMR.

2. ANTECEDENTES

2.1. Garrapata Café (*Rhipicephalus sanguineus*)

La garrapata café, *Rhipicephalus sanguineus*, es una especie de garrapata ampliamente distribuida en todo el mundo y de gran importancia médica y veterinaria. Esta especie se caracteriza por su coloración que varía de amarilla a café, y puede encontrarse en diferentes hábitats, desde áreas rurales hasta entornos urbanos (Gray *et al.*, 2013).

La garrapata café del perro es conocida por su capacidad para transmitir diversas enfermedades infecciosas, entre las que se incluyen las causadas por bacterias del género *Rickettsia*. Estos microorganismos son responsables de enfermedades como la rickettsiosis, la fiebre botonosa mediterránea y la fiebre manchada de las montañas Rocosas, todas ellas con impacto en la salud humana y animal (Parola *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que *R. sanguineus* es capaz de transmitir otros patógenos como *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli* y *Anaplasma platys*, que causan enfermedades como la erlichiosis, babesiosis y anaplasmosis en perros (Dantas-Torres, 2010).

A pesar de su nombre común, la garrapata café del perro no se limita exclusivamente a infestar caninos. También se ha encontrado en otros mamíferos, como gatos, conejos y roedores, así como en aves jóvenes y ocasionalmente en seres humanos (De Oliveira *et al.*, 2005). Esto evidencia su capacidad de adaptación a una amplia gama de hospedadores y su habilidad para colonizar diversos ambientes.

La capacidad de infestación de la garrapata café, combinada con su resistencia a diferentes condiciones ambientales y su habilidad para reproducirse rápidamente, la convierte en un desafío para el control y la prevención de enfermedades transmitidas por garrapatas. Además, se ha observado que esta especie ha desarrollado resistencia a diversos insecticidas y acaricidas utilizados en la práctica veterinaria, lo que dificulta aún más su control (Dantas-Torres, 2010).

2.1.1. Ecología y Ciclo de Vida

R. sanguineus, es una especie endófila que habita en refugios y madrigueras artificiales que secuestra de sus hospederos. Por lo general, se encuentra en hábitats con alta humedad, como la superficie de las plantas, donde acecha a los hospederos que pasan cerca. Esta especie es común en áreas urbanas y suburbanas, donde vive en estrecha proximidad con perros y humanos (Gray *et al.*, 2013). Se ha observado que tienden a habitar en áreas confinadas que no han sido tratadas con acaricidas, lo que resulta en una alta densidad de infestación en estas áreas, especialmente en perros (Lorusso *et al.*, 2010). Sin embargo, también se encuentran numerosos casos de infestación en zonas rurales (Gray *et al.*, 2013). En regiones templadas, su actividad es más intensa desde finales de primavera hasta principios de otoño (Dantas-Torres, 2008).

R. sanguineus, conocida como la garrapata café del perro, es un ectoparásito que sigue un ciclo de vida compuesto por cuatro estadios de madurez: huevo, larva, ninfa y adulto (Dantas-Torres, 2008). Los huevos, de forma esférica y color café oscuro, son depositados en el entorno por las hembras adultas después de alimentarse de sangre de su hospedero (Dantas-Torres, 2008). Tras un período de incubación de aproximadamente 2 a 5 semanas, eclosionan las larvas (Mumcuoglu *et al.*, 1993). Estas larvas recién nacidas miden alrededor de 0.54 mm de largo y 0.39 mm de ancho, poseen tres pares de patas y comienzan a buscar un hospedero para alimentarse (Dantas-Torres, 2008). Una vez alimentadas, las larvas se desprenden del hospedero para realizar su muda, durante la cual se transforman en ninfas (Dantas-Torres, 2008).

Las ninfas son similares a los adultos en apariencia, pero más pequeñas, midiendo entre 1.14-1.3 mm de largo y 0.57-0.66 mm de ancho. A diferencia de los adultos, las ninfas carecen de apertura genital. Estas también buscan un hospedero para alimentarse y, una vez saciadas, se desprenden para llevar a cabo otra muda y convertirse en garrapatas adultas (Dantas-Torres, 2008)

Los machos adultos miden alrededor de 2.28-3.18 mm de largo y 1.11-1.68 mm de ancho, tienen un cuerpo plano y un color café rojizo con pequeños pozos dispersos en la parte trasera. Por su parte, las hembras adultas son muy similares a los machos en términos de tamaño, forma y color, pero tras alimentarse y completar el proceso de engorda, su tamaño aumenta y su coloración cambia a verde oliva (Dantas-Torres, 2008).

La alimentación es crucial en el ciclo de vida de *R. sanguineus*. Las larvas y las ninfas requieren

sangre para llevar a cabo la muda, que ocurre fuera del hospedero. Además, los adultos necesitan sangre para fines reproductivos, y las hembras requieren una ingesta adecuada para la producción de huevos. Durante el proceso de engorda, las hembras aumentan su tamaño corporal aproximadamente 100 veces antes de desprenderse de su hospedero (Szabó *et al.*, 2005).

En condiciones de campo, el período de muda y engorda de *R. sanguineus* puede variar entre poblaciones, lo cual está influenciado por cambios en la temperatura y la disponibilidad de hospederos (Dantas-Torres, 2008). La duración de los periodos de alimentación también puede variar dependiendo del estadio de desarrollo de la garrapata. Por ejemplo, se ha observado que una larva puede alimentarse durante 2 a 5 días, las ninfas durante 3 a 6 días, y una hembra adulta durante aproximadamente 9 días (Mumcuoglu *et al.*, 1993).

La garrapata *R. sanguineus* es conocida por su resistencia a cambios abruptos de condiciones climáticas, así como a la desecación y la inanición. Esta resistencia sugiere una alta dependencia de mecanismos de adaptación y respuesta al estrés, así como de la homeostasis energética y otros factores asociados (Dantas-torres *et al.*, 2012; Yoder *et al.*, 2006). Por ejemplo, se ha identificado que la garrapata tiene mecanismos biológicos como la respuesta al choque térmico y el metabolismo de fosfágenos a través de la AK (Dantas-Torres, 2010).

Las garrapatas de la familia Ixodidae, incluyendo *R. sanguineus*, pasan aproximadamente el 97% de su vida fuera de su hospedero (Amin, 1970). Se ha observado que las larvas de *R. sanguineus* se desprenden de su hospedero durante el día, mientras que las ninfas lo hacen durante la noche (Amin, 1970). Estas garrapatas suelen encontrarse caminando en el entorno, dentro de viviendas y en agujeros cercanos a los lugares donde descansan sus hospederos. Sin embargo, en áreas tropicales se ha observado un comportamiento más frecuente de estar al aire libre en lugar de buscar refugio endofílico (Dantas-Torres, 2008).

Los perros son los hospederos principales de *R. sanguineus* y su presencia es fundamental para mantener poblaciones grandes de garrapatas. Sin embargo, estas garrapatas también pueden mostrar una selección oportunista de hospederos en ciertas áreas. Los estadios inmaduros de *R. sanguineus* pueden encontrarse en roedores y otros mamíferos pequeños, mientras que los adultos tienden a parasitar especies más grandes, incluyendo a los seres humanos (Dantas-Torres, 2010).

2.1.2. Enfermedades Transmitidas por *R. sanguineus*

El 90% de las enfermedades bacterianas transmitidas por garrapatas pertenecen a los órdenes de las espiroquetas y las rickettsias, según investigaciones recientes (Pascoe *et al.*, 2022). Estas enfermedades incluyen la borreliosis, la rickettsiosis, la anaplasmosis y la erliquiosis.

R. sanguineus en particular, actúa como vector de la bacteria *Rickettsia rickettsii*, causante de la enfermedad de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR). En México, esta enfermedad ha resurgido y presenta una tasa de mortalidad del 40% en adolescentes y niños. Estos grupos poblacionales son especialmente vulnerables debido a su mayor contacto con perros y a que pasan más tiempo jugando en áreas propicias para la supervivencia de las garrapatas (Alvarez *et al.*, 2014b; Álvarez-Hernández *et al.*, 2017; Straily *et al.*, 2016).

En la fase inicial de la enfermedad, los pacientes experimentan síntomas como malestar general, dolor de cabeza intenso, mialgia, anorexia, náuseas, dolor abdominal y fotofobia. Además, presentan fiebres superiores a los 38.9 °C. En esta etapa, la enfermedad suele ser mal diagnosticada debido a la similitud de los síntomas con enfermedades de origen viral. Es importante tener en cuenta que los anticuerpos contra la rickettsia no son detectables hasta 7-10 días después de la infección, cuando el estadio infeccioso y la sintomatología son mucho más graves (Phillips, 2017). Es fundamental mejorar la detección temprana de la enfermedad de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, especialmente en áreas donde *R. sanguineus* es prevalente como vector. Se requiere un mayor énfasis en la educación pública sobre las medidas de prevención, como el control de garrapatas en mascotas y la conciencia sobre los hábitats propicios para las garrapatas. Además, se necesitan mejores herramientas de diagnóstico y capacitación adecuada para los profesionales de la salud, para que puedan identificar y tratar adecuadamente esta enfermedad potencialmente mortal.

La detección temprana de la FMMR es de vital importancia, ya que en esta etapa la terapia con antibióticos es más efectiva (Biggs *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta el momento no se ha desarrollado un método adecuado para el diagnóstico preciso de la rickettsiosis en sus etapas tempranas. Además, no existe una metodología disponible que permita el diagnóstico diferencial de pacientes en las primeras etapas de la enfermedad.

Un enfoque prometedor para abordar esta problemática es el estudio de los epítomos estructurales de los biomarcadores de exposición a la garrapata café. Mediante esta investigación, podríamos

obtener el conocimiento necesario para desarrollar un método de diagnóstico adecuado que pueda resolver la situación actual del sector salud en relación con la infestación por garrapata.

Un biomarcador de exposición a garrapata nos permitiría enfocarnos en poblaciones más vulnerables, en áreas donde la gente tiene un mayor riesgo de exposición a garrapatas. Implementar estrategias de prevención y control de garrapatas en estas áreas puede ayudar a reducir la población de garrapatas y, por lo tanto, disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades.

2.1.3. Garrapatas y Cambio Climático

La relación entre las enfermedades transmitidas por garrapatas y el cambio climático ha sido ampliamente observada. La garrapata pasa la mayor parte de su ciclo de vida fuera del huésped, y durante este tiempo, su desarrollo, actividad y comportamiento en busca de un hospedero se ven directamente afectados por las condiciones ambientales, como la temperatura y la humedad (Eisen *et al.*, 2016). Un ejemplo claro de esta relación es la enfermedad de Lyme, la cual es transmitida por la garrapata *Ixodes scapularis*. De hecho, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos utiliza el número de casos de Lyme como un indicador biológico del cambio climático (<http://epa.gov/climate-indicators/climate-change-indicators-lyme-disease>)

El cambio climático ha generado preocupación debido a su influencia en la distribución de las garrapatas y, por ende, en la propagación de las enfermedades que transmiten. Las garrapatas tienen requerimientos específicos de temperatura y humedad para sobrevivir y reproducirse. A medida que las temperaturas aumentan y los patrones de precipitación cambian, se espera que las áreas donde las garrapatas pueden habitar y propagarse se expandan (Süss *et al.*, 2008).

El éxito de supervivencia y reproducción de la garrapata café está estrechamente relacionado con las condiciones de temperatura y humedad. Esta especie prefiere ambientes cálidos y húmedos, ya que estos factores influyen en su ciclo de vida y en su capacidad para buscar hospederos. Según estudios realizados, se ha determinado que la temperatura óptima para el desarrollo y actividad de *R. sanguineus* oscila entre los 25°C y 30°C, mientras que la humedad relativa óptima requerida se sitúa en torno al 80% (Dantas-torres *et al.*, 2012).

A la fecha, se han realizado investigaciones para predecir la distribución futura de *R. sanguineus* y

otras garrapatas, en respuesta al cambio climático. Estos estudios emplean modelos climáticos y datos ecológicos de las garrapatas para proyectar posibles cambios en los patrones de distribución geográfica a medida que las condiciones ambientales se modifican. Un estudio relevante en este sentido es el llevado a cabo en Europa, el cual se centró en la garrapata *Ixodes ricinus* (Medlock *et al.*, 2013).

En el estudio realizado por Medlock *et al.* (2013), se utilizaron modelos climáticos y datos sobre la biología y ecología de *I. ricinus* para evaluar los posibles cambios en su distribución geográfica en respuesta al cambio climático. Los resultados indicaron que, con el aumento de las temperaturas, se prevé una expansión de las áreas adecuadas para esta especie hacia el norte de Europa. Esto se debe a que las condiciones climáticas más cálidas y húmedas favorecen la supervivencia y proliferación de *I. ricinus*, lo que a su vez puede aumentar el riesgo de enfermedades transmitidas por esta garrapata, como la enfermedad de Lyme. Comparando este estudio con el realizado por Dantas-Torres *et al.* (2012) sobre *R. sanguineus*, podemos observar similitudes en cuanto al enfoque y las proyecciones. Ambos estudios utilizan modelos climáticos y datos biológicos para evaluar el impacto del cambio climático en la distribución de las garrapatas. Además, ambos concluyen que es probable que las áreas adecuadas para las garrapatas se expandan en respuesta al aumento de las temperaturas.

La relación entre las enfermedades transmitidas por garrapatas y el cambio climático es un tema de gran relevancia en la salud pública. Comprender cómo el cambio climático afecta la ecología y la distribución de las garrapatas es fundamental para desarrollar estrategias efectivas de prevención y control de enfermedades. Además, se requiere una vigilancia constante de las poblaciones de garrapatas y de los patrones de enfermedad asociados para poder anticiparse a los posibles impactos del cambio climático en la salud humana. Las predicciones antes mencionadas sobre la distribución futura de las garrapatas son fundamentales para comprender los posibles cambios en la epidemiología de las enfermedades transmitidas por estos artrópodos. Además, proporcionan información relevante para la implementación de estrategias de prevención y control, así como para el monitoreo de las poblaciones de garrapatas en áreas de riesgo.

2.2. Biomarcadores

El concepto de "biomarcadores" abarca una amplia gama de signos médicos que son indicadores objetivos del estado de salud de un individuo y que pueden medirse con precisión y reproducibilidad (Strimbu and Tavel, 2010). En el contexto de las enfermedades transmitidas por garrapatas, el estudio de biomarcadores se ha centrado en las proteínas que las garrapatas transmiten al hospedero durante la alimentación.

En un estudio realizado en 2012, se identificaron cinco proteínas presentes en la glándula salival de *R. sanguineus* que podrían servir como biomarcadores de exposición a las garrapatas. Estas proteínas incluyen la proteína de choque térmico de 70 kDa, la malato deshidrogenasa, la cementina, la proteinasa aspártica de unión al grupo hemo y la disulfuro isomerasa (Vu Hai *et al.*, 2013).

En investigaciones más recientes, se ha detectado la presencia de la enzima AK de la garrapata café en perros infestados (Gómez-Yanes, 2019). Este hallazgo sugiere que la garrapata transmite la AK al hospedero durante la alimentación. Además, se ha reportado la presencia de AK en el sialoma de distintos lepidópteros (de Celorio-Mancera *et al.*, 2011) y hemípteros (Bezdi *et al.*, 2012; Elias-Santos *et al.*, 2013; Konishi *et al.*, 2009; Montandon *et al.*, 2016). Estos estudios respaldan la idea de que la arginina cinasa tiene el potencial de ser utilizada como biomarcador de exposición a garrapata.

El desarrollo de biomarcadores para la detección temprana de enfermedades transmitidas por garrapatas es de vital importancia, ya que permite una intervención oportuna. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales para comprender mejor la utilidad y especificidad de estos biomarcadores en diferentes especies de garrapatas y en distintos contextos epidemiológicos.

2.3. Arginina Cinasa

En los organismos vivos, el trifosfato de adenosina (ATP) desempeña un papel crucial como fuente

de energía para diversas reacciones bioquímicas celulares. La enzima AK (EC 2.7.3.2) juega un papel importante en el mantenimiento de la reserva energética de fosfágeno de fosfato de arginina en el músculo (Simonis and Chin, 2015) y en el sistema nervioso de invertebrados (Schneider *et al.*, 1989). Se ha encontrado la presencia de AK en varios órganos de invertebrados, como el intestino medio, la glándula salival (de Celorio-Mancera *et al.*, 2011) y los ojos (Kucharski and Maleszka, 1998).

La AK cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato de la fosforilarginina a una adenosina difosfato (ADP), generando adenosina trifosfato (ATP) y arginina. Esta reacción es fisiológicamente importante, ya que la AK regula la síntesis máxima de ATP en células que experimentan períodos de alto y bajo consumo de energía (Sweeney, 1994).

Además de su función metabólica, se ha descubierto que las AK de diversos invertebrados actúan como alérgenos en humanos. Estos invertebrados incluyen mariscos (Chen *et al.*, 2013; Fei *et al.*, 2016; García-Orozco *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2012), cucarachas (Sookrung *et al.*, 2006), arañas (Bobolea *et al.*, 2011), termitas (Verhoeckx *et al.*, 2014), mosquitos (Montero *et al.*, 2005) y garrapatas (Perner *et al.*, 2016; Untalan *et al.*, 2005; van Nunen, 2015). Estos estudios demuestran la capacidad de las AK de estos invertebrados para desencadenar respuestas alérgicas en humanos sensibilizados.

Un estudio realizado por Liu *et al.*, (2009) investigó el potencial alérgico de la AK de la larva del gusano de seda (*Bombyx mori*). Los investigadores produjeron la proteína AK recombinante (*BmoriAKr*) y la utilizaron para evaluar su alergenicidad mediante ensayos de ELISA e inmunodetección en membrana electrotransferida (Western Blot) utilizando sueros de pacientes alérgicos al gusano de seda. Los resultados mostraron que la *BmoriAKr* reaccionó con la inmunoglobulina E (IgE) en los sueros de los pacientes, lo que indica su potencial alérgico.

Por otro lado, (Binder *et al.*, 2001) determinaron que la alergia a la polilla de la India (*Plodia interpunctella*) está relacionada con la AK de este insecto (*PinterpunctellaAK*). Además, propusieron el uso de proteínas recombinantes para detectar a individuos altamente sensibles a este alérgeno.

Se ha propuesto que la inhibición de la AK podría tener un impacto favorable en el control de diferentes invertebrados, actuando como un biocida (Brown *et al.*, 2004). Varios estudios han investigado la interacción de diferentes compuestos con la AK, con el objetivo de bloquear o inhibir su sitio activo. Entre estos compuestos se encuentran los flavonoides (Edward *et al.*, 2016; Paveto

et al., 2004), los análogos de arginina (Pereira *et al.*, 2003) y las nanopartículas de oro y plata (Adeyemi and Whiteley, 2013). Estos estudios fueron posibles gracias a la cristalización de proteínas y su análisis mediante difracción de rayos X.

En cuanto a la reactividad cruzada de las AKs de diferentes especies de artrópodos, Blethen y Kaplan (1968) llevaron a cabo análisis de inmunodifusión cruzada utilizando anticuerpos de conejo contra la AK de cangrejo azul (*Callinectes sapidus*), langosta de roca sudafricana (*Jasus lalandii*) y cacerola de mar (*Limulus polyphemus*). Observaron que los anticuerpos del cangrejo azul y la langosta sudafricana mostraron una fuerte reacción cruzada con las AKs de los artrópodos marinos, mientras que los anticuerpos de cacerola de mar solo tuvieron reacción cruzada con las AKs de los artrópodos terrestres evaluados. Estos resultados proporcionan información cualitativa sobre la homología de los epítomos de estas AKs, pero es necesario conocer la composición y estructura exactas de los epítomos para desarrollar métodos de diagnóstico más precisos en el futuro.

En resumen, la AK desempeña un papel crucial en la regulación de la energía celular en organismos vivos. Además de su función metabólica, las AK de diferentes invertebrados han demostrado actuar como alérgenos en humanos. Estudios específicos han investigado el potencial alérgico de la AK en invertebrados como el gusano de seda y la polilla de la India, proponiendo a esta enzima como un biomarcador, lo que podría tener implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de las alergias relacionadas. Lo cual tiene ingerencia directa en la aplicación putativa de la arginina cinasa de *R. sanguineus*, como un biomarcador para determinar la exposición a la mordida de garrapata.

2.4. Estudios Estructurales en Proteínas

En el campo de los estudios estructurales de proteínas, se emplean diversas técnicas para comprender la conformación tridimensional y las interacciones moleculares de estas biomoléculas. Algunas de las técnicas utilizadas son la Cristalografía de Difracción de Rayos X (X-ray crystallography), la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Dispersión de Rayos X a Pequeño Ángulo (SAXS).

A mediados de 1980, la RMN se ha establecido como una técnica para la determinación de la estructura de proteínas pequeñas (<10 kDa) en solución (Bax, 1994). En la RMN, se aprovecha el

comportamiento de los núcleos atómicos que poseen un espín nuclear para obtener información sobre la estructura y la dinámica de las proteínas. Mediante la aplicación de campos magnéticos y pulsos de radiofrecuencia, los núcleos atómicos generan señales de RMN que se utilizan para determinar su entorno químico y las interacciones moleculares que experimentan. La RMN es especialmente útil para el estudio de proteínas en condiciones fisiológicas, lo que permite comprender su comportamiento en solución y en interacción con otras moléculas (Wuthrich, 1990). La Dispersión de Rayos X a Pequeño Ángulo (SAXS) es una técnica que proporciona información sobre la estructura en solución de macromoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos. En el SAXS, se mide la dispersión elástica de los rayos X por parte de las macromoléculas en solución. A partir de los patrones de dispersión resultantes, se puede obtener información sobre el tamaño, la forma y la organización estructural de las proteínas en solución. El SAXS es especialmente útil para estudiar la flexibilidad y los cambios conformacionales de las proteínas, así como para analizar las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN/RNA en solución (Putnam *et al.*, 2007).

La Cristalografía de Difracción de Rayos X es un método líder en la obtención de estructuras tridimensionales de macromoléculas >35 kDa a nivel atómico, y ha sido utilizada para la determinación del 80% de las estructuras depositadas en el Protein Data Bank (PDB) (Pusey *et al.*, 2005). Su fundamento se basa en el fenómeno de difracción de los rayos X por los cristales de proteínas. Cuando se obtiene un cristal de una proteína de interés y se le expone a un haz de rayos X, los átomos en el cristal dispersan los rayos X, generando un patrón de difracción característico. A través del análisis matemático de este patrón, es posible reconstruir la estructura tridimensional de la proteína. La cristalografía de rayos X proporciona información detallada sobre la disposición de los átomos en la proteína y las interacciones espaciales entre ellos (Rupp, 2010).

Estos métodos generan diferentes tipos de datos que son relevantes para el estudio de las proteínas. La cristalografía de rayos X proporciona coordenadas atómicas precisas y permite visualizar la estructura tridimensional de la proteína en un estado estático. La RMN brinda información sobre la estructura y la dinámica de las proteínas en solución, permitiendo estudiar su flexibilidad y cambios conformacionales. Por otro lado, el SAXS proporciona datos sobre el tamaño, la forma y la organización en solución de las proteínas, complementando la información obtenida mediante la cristalografía de rayos X y la RMN.

Otras técnicas utilizadas en el estudio estructural de proteínas incluyen la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), la Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC), la Espectrometría de

Masas (MS) y la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), entre otras. Estas técnicas permiten obtener información complementaria sobre la estructura, la dinámica y las interacciones de las proteínas, brindando una visión más completa de su función biológica.

2.4.1. Estudios Estructurales de Arginina Cinasa

A la fecha, se ha determinado la estructura de la AK de *Limulus polyphemus* (Godsey *et al.*, 2016), *Anthopleura japonica* (Wang *et al.*, 2015), *Penaeus vannamei* (Lopez-Zavala *et al.*, 2012), *Apostichopus japonicus* (Wu *et al.*, 2010), *Polybetes pythagoricus* (Aldana Laino *et al.*, 2017), *Scylla paramamosain* (Yang *et al.*, 2019) y de *Trypanosoma cruzi* (Fernandez *et al.*, 2007). Su identidad con respecto a la de *R. sanguineus* es de 84% con *Polybetes pythagoricus*, 80% con *Limulus polyphemus*, 79.8% con *Penaeus vannamei* y *Scylla paramamosain* y 73% con *Trypanosoma cruzi*. Por lo cual, se espera que estas AKs tengan algunos epítomos conservados.

2.5. Identificación de Epítomos

Se conoce como epítomo, o determinante antigénico, a la parte de la estructura del antígeno que es reconocida por un anticuerpo (Murphy *et al.*, 2009). La identificación de epítomos en proteínas es de gran utilidad para propósitos de diagnóstico de enfermedades y desarrollo de inmunoterapias (Kolaskar and Tongaonkar, 1990; Rubinstein *et al.*, 2009), para esto puede ser necesaria la predicción de las regiones con alto potencial de antigenicidad. De igual forma, la predicción de epítomos resulta importante en el mapeo de los mismos, donde es utilizada una librería de fagos para escanear los anticuerpos que se unen al antígeno, seguido de esto, los péptidos que tuvieron afinidad a los anticuerpos son mapeados en la estructura tridimensional del antígeno para encontrar la localización exacta del epítomo (Rubinstein *et al.*, 2009).

Los epítomos se pueden clasificar en dos categorías, el 90% de los epítomos están compuestos por diferentes partes de la cadena polipeptídica que se encuentran en proximidad espacial al plegarse

la proteína, a estos epítomos se les conoce como discontinuos (Larsen *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2009), o epítomos topográficos ensamblados; muchos anticuerpos de este tipo de epítomo se unen al antígeno solo si la proteína está en su forma nativa, debido a que cuando la proteína es fragmentada en diferentes péptidos, las posiciones espaciales de los residuos que forman al epítomo, no son conservados (Stanfield *et al.*, 1991). Por otro lado, el resto de los epítomos, están formados por un fragmento lineal de péptido, (Larsen *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2009), en muchos casos, los anticuerpos que reconocen a este tipo de epítomo tienen reacción cruzada débil con cualquier fragmento peptídico lineal del antígeno, debido a que el fragmento peptídico representa solo una porción de un epítomo más complejo (Stanfield *et al.*, 1991).

Se ha demostrado que los epítomos se encuentran en la superficie de las proteínas, en regiones de la molécula que tienen alta exposición al solvente. Los aminoácidos que los componen suelen estar cargados y ser polar (Hopp and Woods, 1981), además, las zonas donde se encuentran los epítomos tienden a ser flexibles, dado que esto maximiza la complementariedad del epítomo con el anticuerpo (Parker *et al.*, 1986).

Generalmente, no se encuentra mucha antigenicidad en hélices alfa y hojas beta del núcleo de la proteína, excepto por las extremidades, que son más flexibles e hidrofílicas. Los lazos generalmente se encuentran situados en la superficie de la proteína y están en contacto con los átomos del solvente, estos cuentan con 3 características de las regiones antigénicas, se encuentran en la superficie, son polar y flexibles (Stanfield *et al.*, 1991).

2.5.1. Estudios de Epítomos en Arginina Cinasas

Los epítomos de algunas AKs han sido estudiados en invertebrados como *Sylla paramamosain* (H.-Y. Mao *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015), *Crassostrea gigas* (Zhao *et al.*, 2021), *Macrobrachium nipponense* (Liu *et al.*, 2023), *Penaeus vannamei* (Ayuso *et al.*, 2012b) y *Trypanosoma cruzi* (Valera-Vera *et al.*, 2021); sin embargo, el estudio de estos epítomos ha sido enfocado solamente a los lineales. Debido a que la AK es una proteína altamente conservada, es interesante estudiar también los epítomos conformacionales, donde existe más probabilidad de encontrar epítomos especie-específicos.

3. HIPOTESIS

La arginina cinasa de la garrapata café del perro (*R. sanguineus*) es un potencial biomarcador de exposición y sus epítomos se encuentran en los lazos de la superficie de la proteína, compuestos de aminoácidos básicos y polares.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Caracterizar bioquímica y estructuralmente epítomos de AK de garrapata café de perro (*R. sanguineus*), para su potencial uso como biomarcadores de exposición.

4.2. Objetivos Particulares

- Difractar y resolver la estructura de los cristales de la arginina cinasa de *R. sanguineus* y caracterizar la cinética de la enzima.
- Predicción computacional de epítomos especie-específicos de la RsAK por métodos bioinformáticos.
- Validar epítomos predichos mediante mutagénesis a alanina e interacción con sueros de pacientes de FMMR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cristalización de RsAK

Se utilizaron los kits de cristalización Index, Crystal Screen y Crystal Screen 2 de Hampton Research para buscar las condiciones adecuadas de cristalización de la RsAK en ausencia de sustratos. El cribado se realizó por el método de *microbatch*, para lo cual la proteína pura se concentró a 11.5 mg/mL en un buffer que contenía 50 mM Tris HCl pH 7.8 con un cartucho de ultrafiltración (marca Amicon) de 500 μ L de capacidad, con punto de corte de 10 kDa a una velocidad de 12,000 x g. En cada pocillo de una placa para microbatch se colocó 1 μ L de la proteína, seguido de 1 μ L de la solución de cristalización y 10 μ L de aceite de parafina, se cubrieron las placas con sus respectivas tapas y se mantuvieron a 16 °C. Después de una semana se observaron las placas con ayuda de un estereoscópio para visualizar el crecimiento de cristales y se seleccionaron los mejores cristales para difractarlos en el sincrotrón de Standford.

5.2. Colecta de Datos de Rayos-X y Determinación de la Estructura Cristalográfica de la RsAK

La colecta de datos cristalográficos se realizó en la línea 14-1 del sincrotrón de radiación de Standford (SSRL) a una longitud de onda de 1.19 Å utilizando un detector Eiger. La distancia del cristal al detector era de 150 mm con un rango de oscilación de 0.5°. Se integraron 360 imágenes con XDS (Kabsch, 2010), se convirtieron los archivos a .mtz con Combat y los datos fueron escalados con SCALA de la suite de CCP4 (Potterton *et al.*, 2018). El cristal pertenece al grupo especial P1 21 1 y las dimensiones de su celda unitaria son of a= 48.41 Å, b=61.41 Å, c=61.34 Å, y $\beta=96.56^\circ$. Se integraron 24426 reflexiones a una resolución de 1.53 Å y se combinaron para obtener 95,000 reflexiones únicas con una R-media de 0.37 y una completos de 98.7%. El análisis del contenido de la celda unitaria indica una molécula de RsAK por unidad asimétrica con una $V_m = 2.16 \text{ \AA}^3 \text{ D}^{-1}$ y un contenido de solvente de 43% (Matthews, 1968). Las fases se determinaron por

reemplazo molecular en Phaser (McCoy *et al.*, 2007) utilizando la AK de *Litopenaeus vannamei* (PDB 4AM1) como templado. Se realizaron una serie de ciclos de refinamiento en PHENIX (Adams *et al.*, 2010) y COOT (Emsley and Cowtan, 2004) para refinamiento manual para obtener la estructura final.

5.3. Dispersión por Rayos X en Ángulo Reducido

Se preparó *RsAK* en ausencia de ligandos (apo) a una concentración de 23 mg/mL en un total de 1 mL en buffer con Tris HCl 50 mM y NaCl 150 mM, TCEP 1 mM, glicerol al 1%, pH 7.0. Para obtener *RsAK* en TSAC, se añadieron al mismo buffer ADP 16 mM, MgCl₂ 20 mM, L-arginina 40 mM y NaNO₃ 75 mM. La concentración de proteína fue de 26 mg/mL. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 30 minutos antes del análisis y se centrifugaron durante 15 minutos a 12 000 *xg* a 4 °C.

Los datos de dispersión para *RsAK* apo y sus muestras en complejo análogo de su estado de transición (TSAC) se recopilieron utilizando un sistema de dispersión de rayos X de ángulo reducido (SAXSpace, Anton Paar GmbH, Graz, Austria) equipado con un generador de tubo de rayos X ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) y un CCD Detector de rayos X (SCX4300, Princeton Instruments, Massachusetts, EE. UU.). La distancia muestra-detector fue de 305 mm. Las muestras se colocaron en un capilar de cuarzo sellado de 1 mm de diámetro y la temperatura se mantuvo constante a $20 \pm 0.1 \text{ °C}$. Se utilizó un sistema de colimación de líneas para los rayos X incidentes en 40 μl de muestra que contenía *RsAK* en TSAC a 26, 19.5 y 14 mg/ml respectivamente, y 23, 17.25 y 12.93 mg/ml respectivamente para *RsAK* en sus muestras de forma apo, y buffer usado para *RsAK* en TSAC y forma apo. El tiempo de exposición fue de 110 min. Los conjuntos de datos SAXS de las muestras, el fondo (del solvente y el capilar) y la corriente oscura de las señales del detector de rayos X CCD se restaron utilizando los softwares SAXStreat y SAXSquant (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). El perfil del haz se consideró en el proceso de desprestigio de los datos del SAXS. La intensidad de dispersión, $I(q)$ se obtuvo en función de q , donde q se consideró como $4\pi \sin\theta/\lambda$. donde $q =$ vector de dispersión, $\lambda =$ longitud de onda y $2\theta =$ ángulo de dispersión, respectivamente. La función de distribución de distancia de par $P(r)$, el diámetro máximo de partícula (D_{max}) de las muestras

se calcularon utilizando el software GIFT (Universidad de Graz. Graz, Austria). Estas determinaciones se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Amir Maldonado Arce y realizadas por Daniel Berrellez Reyez, los análisis fueron asesorados por el Dr. André L.B. Ambrosio del Instituto de Física de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

5.4. Predicción de Epítomos Especie-específicos Discontinuos con DiscoTope

Se realizó un análisis de secuencias tipo BLAST utilizando la secuencia aminoacídica de *RsAK* como molde para identificar secuencias con mayor porcentaje de identidad. De estas proteínas, se seleccionaron tres secuencias de AKs que ya se encuentran depositadas en el Protein Data Bank (7RE6). Las estructuras identificadas con alto porcentaje de identidad con respecto a la de garrapata fueron *Panaeus vannamei*, *Polybetes pytagoricus* y *Limulus polyphemus*. Estas AKs, así como la de *R. sanguineus*, fueron analizadas con el algoritmo de DiscoTope 2.0 (Andersen *et al.*, 2006) con un umbral de puntaje de -3.7. Las cuatro estructuras de AK fueron alineadas utilizando el programa PyMOL y los epítomos predichos para cada especie fueron mapeados en la estructura tridimensional para analizar cuales aminoácidos conservan su antigenicidad. Los residuos antigénicos que fueron únicos para *R. sanguineus* fueron marcados como epítomos especie-específicos. Estos residuos fueron designados en 4 probables epítomos, según el área en el que se encontraban. El epitope 1 (E1) fueron los residuos 105-109, 240-241, 334 y 340. El epítomo 2 (E2) fue del residuo 247-256, el 3 (E3) fueron los residuos 156, 164-169, 214 y 216; y el epitope 4 (E4) fueron los residuos 111-123.

5.5. Sobreexpresión de Mutantes y *RsAK* Silvestre

Los epítomos especie específicos encontrados con la herramienta de DiscoTope 2.0, fueron mutados a alanina (Figura 1) y las secuencias se enviaron a sintetizar a GenScript, cada epítomo, en un constructo diferente. Los viales recibidos fueron centrifugados a 6,000 x g por 1 min, luego se

agregó a cada vial 20 μL de buffer TE pH 8, estéril, quedando el DNA plasmídico sintético a una concentración de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Posteriormente se agitaron los viales por vórtex y se calentaron a 50°C por 15 min, se centrifugaron de nuevo y se guardaron en el refrigerador toda la noche. Al día siguiente, se realizaron diluciones de trabajo a concentración final de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Tanto los stocks como las diluciones de trabajo se mantuvieron a -20°C.

```

WT
MSVDQATLDKLEAGFKKLQDAKDCKSLLKKYLKEIFDRLKTRKTAMGATLLDVIQSGVENLD SGVGVYAPDAE
SYTVFADLFPVIEDYHGGFKPTDKHPPTDFGDMNTIVNVDPENKYVSTRVRCGRSLQGYPFNPCLTEAQYK
EMEDKVSSQLKGMTGDLKGTYYPLTGMDKKTQQQLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDAKTF
LWVNNEEDHLRIISMQQGGDLKQVYSRMVSGVKEIEKKLPFSRDDRLGFLTF CPTNLGTTIRASVHIKLPKLAAD
KAKLDSIAAKYNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRMGLTEYQAVREM QDGIQELIKLEQAA

E1
MSVDQATLDKLEAGFKKLQDAKDCKSLLKKYLKEIFDRLKTRKTAMGATLLDVIQSGVENLD SGVGVYAPDAE
SYTVFADLFPVIEDYHGGFKPTDKHPPTDFAAAAIVNVDPENKYVSTRVRCGRSLQGYPFNPCLTEAQYK
MEDKVSSQLKGMTGDLKGTYYPLTGMDKKTQQQLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDAKTF
VWVNNEEDHLRIISMQQGGDLAAVYSRMVSGVKEIEKKLPFSRDDRLGFLTF CPTNLGTTIRASVHIKLPKLAADK
AKLDSIAAKYNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRMGLAEEAAVAEMQDGIQELIKLEQAA

E2
MSVDQATLDKLEAGFKKLQDAKDCKSLLKKYLKEIFDRLKTRKTAMGATLLDVIQSGVENLD SGVGVYAPDAE
SYTVFADLFPVIEDYHGGFKPTDKHPPTDFGDMNTIVNVDPENKYVSTRVRCGRSLQGYPFNPCLTEAQYK
EMEDKVSSQLKGMTGDLKGTYYPLTGMDKKTQQQLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDAKTF
LWVNNEEDHLRIISMQQGGDLKQVYSRMAAGAAAAIAAALPFSRDDRLGFLTF CPTNLGTTIRASVHIKLPKLAAD
KAKLDSIAAKYNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRMGLTEYQAVREM QDGIQELIKLEQAA

E3
MSVDQATLDKLEAGFKKLQDAKDCKSLLKKYLKEIFDRLKTRKTAMGATLLDVIQSGVENLD SGVGVYAPDAE
SYTVFADLFPVIEDYHGGFKPTDKHPPTDFGDMNTIVNVDPENKYVSTRVRCGRSLQGYPFNPCLTEAQYK
EMEDKVSSQLAAMTGDLAaaaaaLTGMDKKTQQQLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNAATF
LWVNNEEDHLRIISMQQGGDLKQVYSRMVSGVKEIEKKLPFSRDDRLGFLTF CPTNLGTTIRASVHIKLPKLAAD
KAKLDSIAAKYNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRMGLTEYQAVREM QDGIQELIKLEQAA

E4
MSVDQATLDKLEAGFKKLQDAKDCKSLLKKYLKEIFDRLKTRKTAMGATLLDVIQSGVENLD SGVGVYAPDAE
SYTVFADLFPVIEDYHGGFKPTDKHPPTDFGDMNTIAAAAAAAAAAAAAARVRCGRSLQGYPFNPCLTEAQYK
EMEDKVSSQLKGMTGDLKGTYYPLTGMDKKTQQQLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDAKTF
LWVNNEEDHLRIISMQQGGDLKQVYSRMVSGVKEIEKKLPFSRDDRLGFLTF CPTNLGTTIRASVHIKLPKLAAD
KAKLDSIAAKYNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRMGLTEYQAVREM QDGIQELIKLEQAA

```

Figura 1. Secuencia de RsAK WT y epítomos de RsAK mutados a alanina.

5.5.1. Transformación de Bacterias con las Mutantes

Se agregaron 2 μL (100 ng) de los constructos a un vial con *E. coli* BL21 cepa Gold, cada constructo en un vial aparte. Se mezclaron suave e inmediatamente se incubaron en hielo durante 30 min. Luego se les dio un choque térmico por 1 min. 30 segundos a 42°C y se mandaron de vuelta a hielo

por otros 5 minutos. Se agregaron 250 μ L de medio SOC a cada vial y se incubaron durante 1 h a 37°C con 220 rpm, luego se cultivaron en placas con medio sólido LB repartiendo 150 μ L de cada producto de transformación a una placa diferente. Las placas se dejaron incubando durante toda la noche a 37°C.

5.5.2. Sobreexpresión de Mutantes

Se cultivó durante toda la noche dos tubos de preinóculo de la mutante 1 (E1), conteniendo 5 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL). Al día siguiente se inocularon 2 matraces con 50 mL de medio LB y ampicilina con el preinóculo y se dejaron crecer a 37°C con 225 rpm hasta llegar a una O.D.₆₀₀ de 0.6. En este punto, a uno de los matraces se le agregó una concentración final de 0.2 mM de IPTG, mientras que al otro se le agregó una concentración final de 0.1 mM de IPTG y se dejaron incubando a 25°C con 225 rpm por 18 horas. Se tomaron muestras de 1 mL a diferentes tiempos entre las 0 y 18 h y se centrifugaron a 12,000 \times g, luego se descartó el sobrenadante. Las muestras fueron sonicadas en hielo con 500 μ L de buffer de lisis (2 mM Tris, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5 mM benzamidina, 500 mM NaCl, 0.1 mg/mL lisozima, 0.5 mM EDTA pH 7.5) con un duty cycle de 50% y un Output de 5 con 12 pulsaciones por 3 repeticiones, con un descanso de 10 segundos entre cada sonicado. Las muestras sonicadas, fueron centrifugadas a 12,000 \times g y se separó la fracción soluble de la insoluble. Ambas fracciones se analizaron por medio de SDS PAGE en condiciones reductoras.

Para el resto de las mutantes se siguió el mismo procedimiento, solo que se probó únicamente con una concentración de IPTG, que fue de 0.1 mM.

5.5.3. Sobreexpresión de la RsAK recombinante

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) con 80 ng de un plásmido que contenía la secuencia de la RsAK. Se inocularon 10 mL de un cultivo crecido durante toda la noche en un matraz Fernbach conteniendo 1 L de medio LB y antibióticos (100 μ g/mL de ampicilina) y

se creció a 37 °C con 225 rpm hasta que llegó a una O.D.₆₀₀ de 0.6. En este punto, se agregó IPTG a una concentración final de 0.2 mM. Se dejó incubando la bacteria a 25°C con 225 rpm y se recuperó la bacteria después de 18 h centrifugándola a 4,500 \times g por 15 min.

5.6. Purificación de mutantes y R κ AK Recombinante

5.6.1. Purificación de E1

El pellet fue lisado por sonicación en un baño de hielo con 12 pulsaciones durante 4 veces, con un intervalo de 10 segundos entre cada sonicación utilizando 3 volúmenes de buffer lisis (Tris HCl 2 mM pH 7.5, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, benzamidina 5 mM, NaCl 500 mM, 0.1 mg/mL lisozima y EDTA 0.5 mM). El sonicado fue centrifugado a 4,500 \times g a 4°C por 20 min, se guardó el sobrenadante y se repitió la sonicación con el pellet sobrante con 2 volúmenes de buffer lisis. Todo el sobrenadante fue filtrado con un filtro de 0.45 μ m. Para purificar la proteína, se realizó una cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) para lo cual se utilizó una columna de 1 mL de HiTrap TALON[®] crude columna de Cytiva. Para esto, la columna fue aclimatada con 5 volúmenes de columna (VC) de buffer A (Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.4), luego la muestra fue inyectada a la columna y esta fue lavada con 10 VC con buffer A. Posteriormente, se realizó un gradiente de 30 mL de 0 a 100% de buffer B (Tris HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 150 mM, pH 7.4) para obtener la mutante purificada. La proteína eluída se fraccionó en 3 mL y fue analizada por medio de SDS PAGE en condiciones reductoras para analizar su pureza. El SDS PAGE se corrió a 12 mA por 1 h 30 min.

Se realizó un segundo paso de purificación por medio de cromatografía de exclusión de masas, utilizando una columna Superdex 75 10/300 GL. La proteína colectada en IMAC se dializó en buffer Tris HCl 50 mM y NaCl 150 mM pH 7.0 y se concentró con un Amicon[®] de 30 kDa hasta llegar a un volumen de 1 mL. La cromatografía se corrió a un flujo de 0.5 mL/min. Se colectaron las fracciones donde se encontraba la proteína en 0.5 mL y se analizaron estas fracciones por SDS-PAGE en condiciones reductoras.

5.6.2. Purificación de E2 y WT Recombinante

El pellet fue preparado como en el apartado anterior, sonicando y centrifugando para quedarnos con la fracción soluble, luego la fracción soluble fue filtrada con un filtro de 0.45 μm . La *RsAK* recombinante fue purificada por IMAC con una columna HisTrap FF Cytiva® de 5 mL. La columna se equilibró con 5 VC de buffer A (Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.4), luego la muestra fue inyectada a la columna y se lavó con 10 VC con buffer B (Tris HCl 20 mM, NaCl 0.5 M and imidazol 0.5 M, pH 7.4) al 4%, posteriormente se pasó buffer B a 20% para eluir a la proteína recombinante. Las proteínas eluidas fueron fraccionadas en 3 mL y estas fracciones fueron analizadas por medio de SDS PAGE en condiciones reductoras. Del mismo modo que en el apartado anterior, se realizó un segundo paso de purificación por medio de cromatografía de exclusión de masas y se analizaron las fracciones por SDS PAGE en condiciones reductoras. Se precipitaron las proteínas con sulfato de amonio y se realizaron alícuotas en viales de 200 μL para su conservación en $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.7. Actividad Específica y Cinética

5.7.1. Actividad Específica de *RsAK* WT, E1 y E2

Las actividades específicas de las AKs fueron medidas de acuerdo a la metodología de Blethen y Kaplan (1968), con modificaciones (García-Orozco *et al.*, 2007). Se trata de un ensayo acoplado en el cual la oxidación del NADH fue medida en espectrofotómetro a 340 nm. Durante el ensayo, la AK fosforila arginina y produce ADP, el cual es de nuevo fosforilado por la enzima piruvato cinasa, produciendo piruvato, este último oxida al NADH con la enzima lactato deshidrogenasa. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C en una celda de cuarzo de 0.5 mL la cual contenía una concentración final de 178 mM de glicina, 0.33 mM 2-mercaptoetanol, 133 mM de cloruro de potasio, 13 mM de sulfato de magnesio, 20 mM de fosfoenol piruvato, 6.7 mM de ATP, 0.13 mM

NADH, 2 U de piruvato cinasa, 3 U de lactato deshidrogenasa, 17 mM de l-arginina y 0.75 mM de *RsAK* WT, E1 o E2. Una unidad de AK convierte 1 μ M de L-arginina y ATP a N-fosfo-L-arginina y ADP por minuto a pH de 8.6. Además, se corrieron muestras sin enzima, y sin sustratos como blanco. Los datos colectados fueron analizados en Excel para determinar la velocidad inicial y la actividad específica (U/mg) de las diferentes AKs. Se realizaron pruebas de hipótesis de T pareada, para determinar diferencias entre cada una de las mutantes y la WT.

5.7.2. Cinética de *RsAK* WT

Para determinar las constantes cinéticas de la L-arginina y ATP, se siguió la metodología previamente descrita en el apartado anterior, solo que las concentraciones para L-arginina variaron de 0-7.5 mM y las concentraciones de ATP de 0.05-6.7 mM. Los parámetros cinéticos V_{max} y K_m para ambos sustratos, se determinaron ajustando las velocidades de reacción iniciales al modelo de ecuación de Michaelis-Menten, usando un análisis de regresión no lineal en GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

5.8. Validación de Epítomos por Medio de ELISA

Para validar la inmunoreactividad de los epítomos, se recubrieron pocillos de microplacas de poliestireno Falcon® de 96 pocillos, con 50 μ l de 0.3 μ M de *RsAK* WT o cada una de las mutantes. Los antígenos estaban en buffer de carbonato (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9.6) y se incubaron a 4°C durante la noche. Se eliminó el exceso de antígeno y se lavaron los pocillos con buffer de carbonato durante 3 minutos. Los pozos fueron bloqueados con TBST (0.1 M Tris HCl, 0.05% tween 20, 5 mM azida de sodio, 0.1%, pH 7.3) con 0.1% de “Blotting grade blocker” de Bio-Rad® y 1% de BSA por 1 hora, luego lavado de nuevo 4 veces por 3 minutos. En cada microplaca, se incubaron 60 pocillos con 50 μ L de suero (1:100) de 30 diferentes pacientes de FMMR (por duplicado) y 20 pocillos con 50 μ l de 1:100 de 10 muestras de suero (por duplicado)

de un banco de sangre local durante 1 hora. Después de una hora, las microplacas se lavaron y se añadieron a cada pocillo 50 μ l de anti-IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina 1:4,000, se incubaron durante 30 minutos y luego se lavaron. El color se reveló durante 30 minutos con un sustrato de fosfatasa alcalina de Bio-Rad® y la placa se leyó a 415 nm. Se realizó un ANOVA de una vía y una comparación de medias post hoc por la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para buscar diferencias significativas entre la reactividad de los anticuerpos contra RsAK WT, E1 y E2, y también entre el FMMR y los sueros del Testigo. La prueba T de Welch se usó para comparar la reactividad de los sueros con FMMR contra los de banco de sangre. Se realizó la transformación $\log(x)$ para lograr la normalidad de los datos de absorbancia de cada una de las variables.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Obtención de Cristales de RsAK

La función y mecanismo de acción de las proteínas pueden determinarse según su estructura, y teniendo en cuenta que muchas de ellas tienen utilidad en el desarrollo de fármacos, vacunas y diagnósticos novedosos, la determinación de la estructura proteica por medio de cristalografía de rayos X, ha tenido gran relevancia en los últimos años (Cudney *et al.*, 1994; DeLucas *et al.*, 2005; Chayen y Saridakis, 2008). La obtención de cristales, no es un paso trivial, debido a que hay que realizar pruebas para determinar las condiciones óptimas de cristalización (Chayen y Saridakis, 2008). Para esto, se utilizaron 3 kits comerciales, Crystal Screen I, Crystal Screen II e Index de Hampton Research. Para realizar el cribado por el método de microbatch, se mezcló la proteína (11.5 mg/mL, en este caso) y el agente de cristalización a una concentración determinada.

La proteína debe estar en condiciones de sobresaturación moderada (región lábil), para que se lleve a cabo la nucleación y se desarrolle la semilla donde crecerá el cristal (Chayen y Saridakis, 2008). En el método de microbatch, en comparación con los métodos de difusión, se llega a la sobresaturación al momento de mezclar los componentes, y las condiciones cambian conforme la proteína sale de la solución para formar cristales (Chayen, 1998), llegando a una concentración de sobresaturación menor (región metaestable), donde los núcleos formados en la región lábil se desarrollan y crecen cristales (Chayen y Saridakis, 2008; McPherson, 1989). Se comenzó a observar formación de cristales dos semanas después de la aplicación de las gotas. Se eligieron los cristales de la condición 43 de Index, que contenía 0.1 M bis tris, pH 6.5, 25% *p/v* PEG 3,350 (Figura 2).

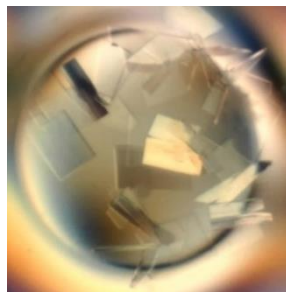


Figura 2. Cristales de *RsAK* en 0.1 M Bis Tris, pH 6.5, 25% p/v PEG 3,350.

6.2. Determinación de la Estructura Cristalográfica de la *RsAK*

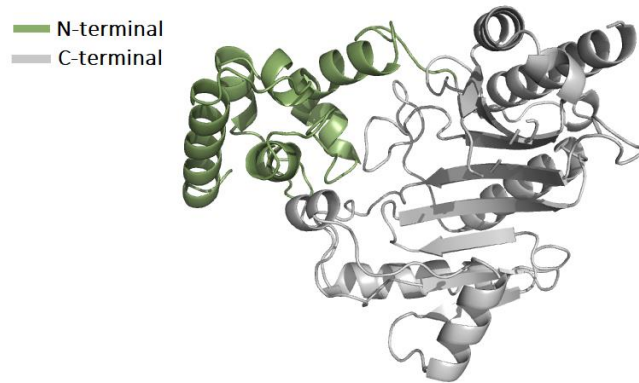
La estructura cristalina de la *RsAK* en su conformación abierta se obtuvo con una resolución de 1.53 Å. En la Cuadro 1 se proporciona un resumen de los datos de difracción y refinamiento. La *RsAK* se pliega en dos dominios, el N-terminal con aproximadamente 100 residuos, una hélice α y el dominio catalítico, que incluye la región C-terminal de una lámina β de ocho hebras antiparalelas flanqueada por siete hélices α (García-Orozco *et al.*, 2007) (Figura 3, panel A). La estructura de la apo*RsAK* es superponible a la estructura cristalina experimentales unidas a Arg y se describen como la conformación "abierta" en comparación con los modelos unidos al sustrato/producto (o TSAC) (Lopez-Zavala *et al.*, 2012).

La densidad de electrones para el sitio activo estaba bien definida en la estructura *RsAK* (Figura 3, panel B). El bucle de unión del grupo carboxilo de sustrato, compuesto por los residuos Asp62, Ser63, Gly64 y Val65, es fundamental para la unión de la arginina en un mecanismo de llave y cerradura (Azzi, 2004). También identificamos las coordenadas de los residuos que interactúan con los sitios de unión del grupo arginina-guanidinio (Glu225, Cys271 y Thr273) (Figura 3, panel C). Después de repetidos ensayos de cristalización fallidos utilizando los kits Crystal Screen 1, 2 e Index (Hampton Research) para obtener un modelo experimental del complejo de conformación cerrado (AK-Arg-NO₃-ADP), se modeló *RsAK* en la conformación del producto TSAC. El templado utilizado para obtener dicho modelo fue el complejo ternario de camarón PDB 4BG4 (López-Zavala *et al.*, 2013). Después de la alineación de los esqueletos de C α de la estructura cristalográfica apo de la *RsAK* (PDB 7RE6) y el conformero cerrado sustrato/producto *RsAK* (Arg-ADP), obtuvimos una desviación estándar cuadrática media (RMSD) de 1.48 Å (Figura 4).

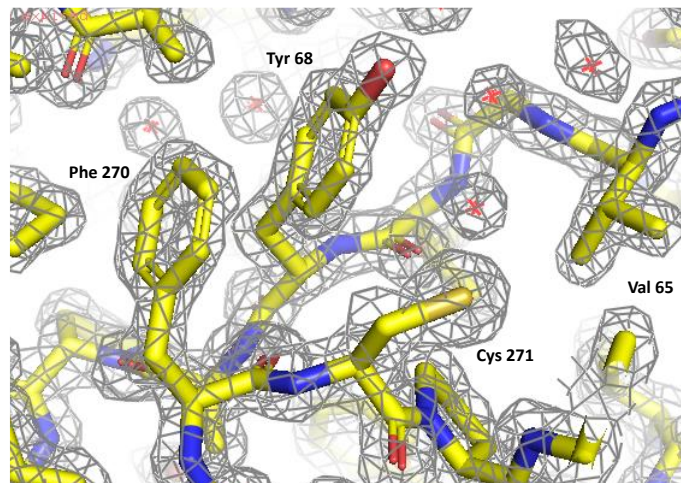
Cuadro 1. Colección de datos de rayos X y estadísticas del refinamiento de la estructura cristalina de la RsAK.

Parámetros	R_sAK
Estadísticos de la colección de datos	
Grupo espacial	P12 ₁ 1
Dimensiones de la celda unitaria	
a, b, c (Å)	48.41, 61.41, 61.34
α, β, γ (°)	90,96.56,90
Rango de resolución (Å)	40-1.53
No. de reflexiones	182,917 (24,964)
No. de reflexiones únicas	52,890 (4,999)
Completas (%)	98.7(95.3)
<i>R</i> _{meas} (%)	5.9 (37.2)
CC _{1/2} (%)	99.9 (90.7)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	12.04 (2.87)
Multiplicidad	3.4 (4.9)
Monómeros por unidad asimétrica	1
Estadísticos del refinamiento	
Rango de resolución (Å)	40-1.53
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%)	15.52/18.57
Número de reflexiones	52,782 (4,966)
Puntaje de choque	
Media de valores B (Å ²)	
Proteína	18.3
Solvente	49.1
RMSD de la estequiometría ideal	
Longitudes de enlace (Å)	0.49
Ángulos de enlace (degrees)	0.69
Gráfico de Ramachandran (%)	
Regiones más favorables	95
Regiones permitidas adicionales	4.7
Regiones no permitidas	0.3
PDB code	7RE6

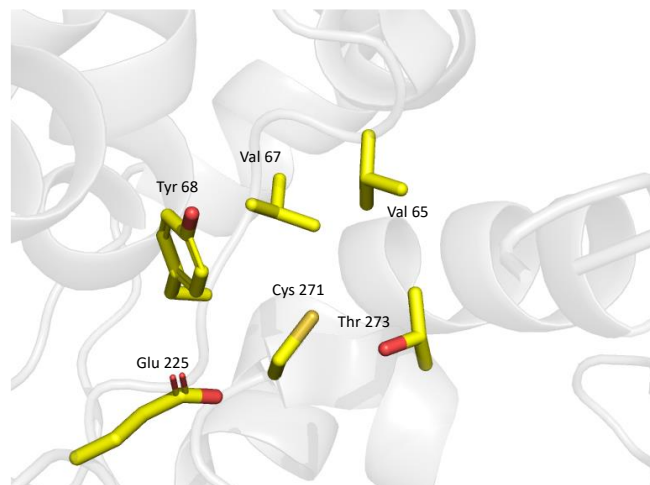
Valores en paréntesis son para el corte de alta resolución (1.87-1.53 Å).



(A)



(B)



(C)

Figura 3. Estructura cristalográfica de la *RsAK* apo. (A) Representación esquemática de *RsAK* con el dominio N-terminal en verde y el C-terminal en gris. (B) Densidad electrónica representativa del mapa 2Fo-Fc a 1 σ . (C) Representación del sitio de unión de arginina. Los residuos que interactúan se muestran como barras.

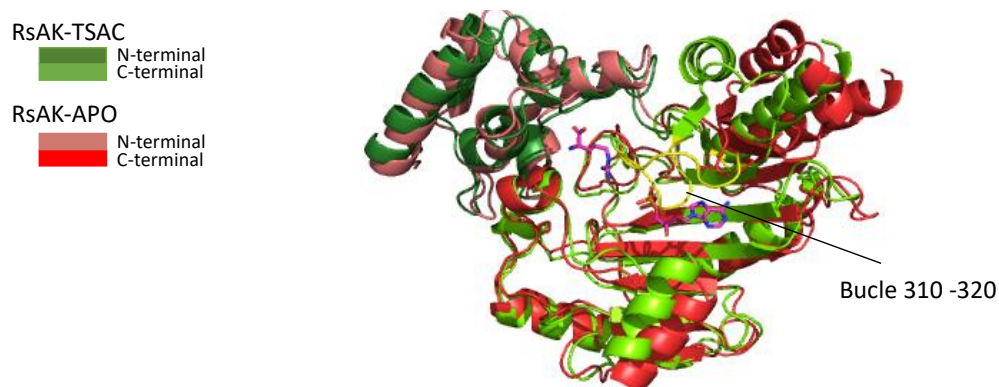


Figura 4. Superposición estructural de la estructura experimental *RsAK* apo (en rojo) con el modelo de conformación cerrada teórico *RsAK* sustrato/producto (Arg-ADP) (en verde), mostrando los sustratos ADP y Arg como barras.

6.3. Dispersión de Rayos X en Ángulo Reducido

La función de distribución de distancia de pares (PDDF) de *RsAK* en su forma apo y en TSAC se comparó utilizando SAXS. La PDDF mide la probabilidad de encontrar un par de átomos a cierta distancia dentro de la misma molécula, desde cualquier parte de la molécula y puede usarse para determinar su tamaño y forma (Hong and Hao, 2009). La Figura 5 muestra los resultados de PDDF de *RsAK* en su forma Apo, donde se observa que la distancia máxima entre átomo y átomo, por lo tanto, el tamaño de la molécula es de 80 Å. La distribución de los datos también muestra que es una molécula globular. Por otro lado, al observar la enzima en TSAC, observamos que la distancia máxima entre átomo y átomo es de 60 Å, lo que nos dice que la AK se compacta cuando está en su estado de transición. Esto puede deberse a la fuerte afinidad de la enzima por sus sustratos y cofactores, que cuando entra en contacto con ellos, sus átomos se mueven para favorecer este enlace y la molécula se comprime. Estos resultados son comparables con los encontrados por López-Zavala *et al* en 2013, donde compararon, a través de estudios cristalográficos, la AK de camarón blanco con arginina y en TSAC y encontraron que cuando la enzima está en TSAC, la estructura se compacta ligeramente. Estos resultados también son comparables con los encontrados con el homólogo de AK, la creatina cinasa, que tuvo el mismo comportamiento cuando la enzima se encuentra en su estado de transición (Forstner *et al.*, 1998). Cabe mencionar que estos cambios en las distancias interatómicas encontradas en ambas condiciones de la proteína no deberían afectar a

los epítomos, ya que la estructura en sí no se modifica y la fuerza de interacción entre epítomo y anticuerpo sigue siendo la misma.

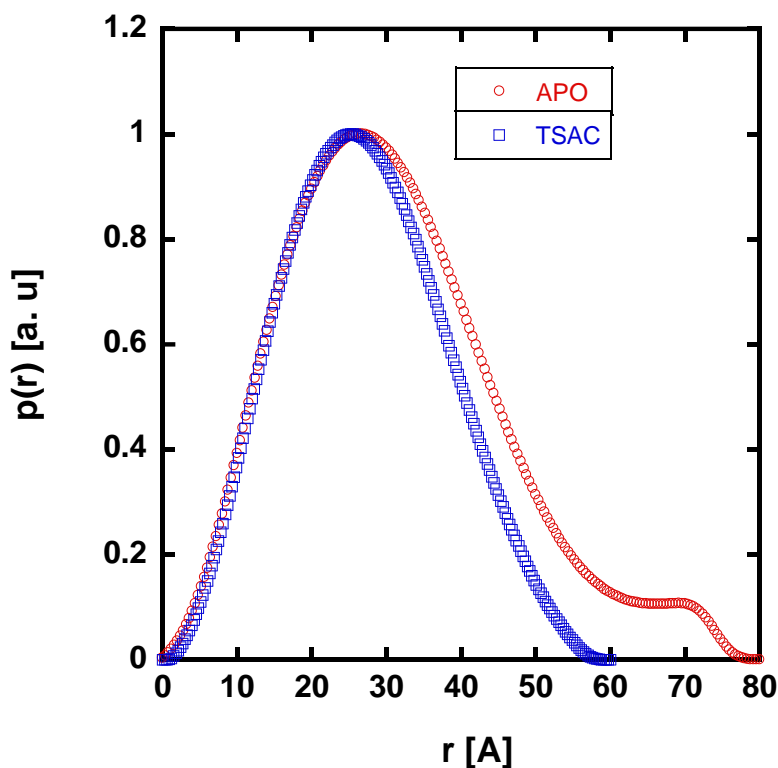


Figura 5. Función de distribución de distancia de pares de la arginina de garrapata café en su forma apo y TSAC.

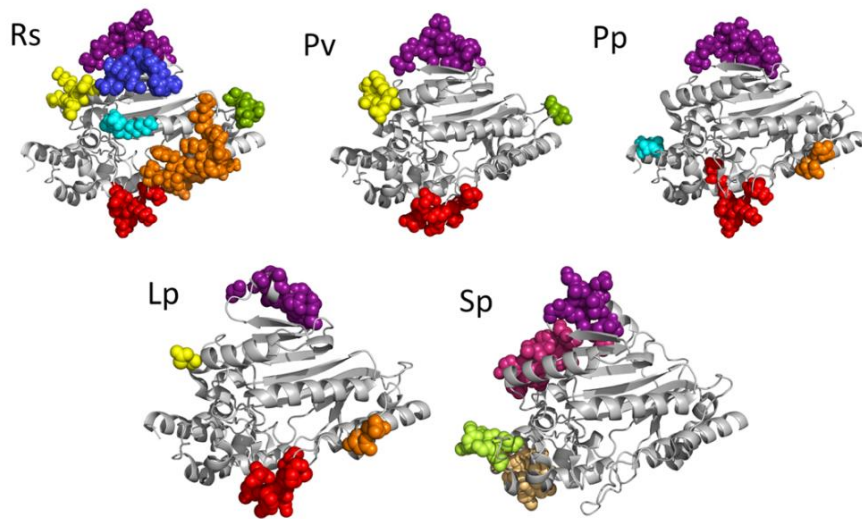
6.4. Predicción de Epítomos Especie-específicos con DiscoTope

La forma más precisa de identificar epítomos discontinuos es determinando la estructura de los complejos antígeno-anticuerpo mediante cristalografía de rayos X (Fleury *et al.*, 2000); sin embargo, a veces esto no es posible. Para estos casos, es posible hacer uso de algoritmos de predicción de epítomos. Hasta la fecha, existen algoritmos capaces de predecir epítomos tanto lineales como discontinuos. Cabe mencionar que el 90% de los epítomos son discontinuos (Barlow *et al.*, 1986). Dado que Ayuso y colaboradores (2012) estudiaron los epítomos lineales de la arginina quinasa de *Litopenaeus vannamei* y las secuencias entre las diferentes especies son muy similares,

centramos nuestro estudio en la predicción de epítomos discontinuos.

En este trabajo predijeron epítomos discontinuos de *RsAK* utilizando el algoritmo DiscoTope (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DiscoTope-2.0>) (Haste Andersen *et al.*, 2006). Este algoritmo utiliza una combinación de estadísticas de aminoácidos, información espacial y superficie de exposición, mediante una compilación de datos de epítomos discontinuos de 76 estructuras cristalográficas complejas antígeno-anticuerpo (Haste Andersen *et al.*, 2006). Además, sondea el esqueleto de carbono de la estructura de la proteína dentro de una esfera de 10 Å, sumando la puntuación de propensión de los residuos en la esfera y restando el número de residuos de aminoácidos dentro de la esfera (Kringelum *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2007). Este algoritmo encontró 57 residuos antigénicos probables en la *RsAK*, 29 para la AK de *L. vannamei*, 25 para *P. pythagoricus* y 23 para *L. polyphemus*, siendo la *RsAK* la más antigénica de las AK analizadas.

Las secuencias de proteína AK se compararon mediante alineación de secuencias múltiples, y los epítomos predichos para las especies estudiadas se mapearon en la secuencia y su estructura 3D correspondiente para visualizar los epítomos conservados entre las diferentes AK usando PYMOL (DeLano, 2002) (Figura 6).



(A)

Rhipicephalus	1	MSVDQATLDKLEAGFKKLDQAKDCKSLKLYLTKEIFDRLKTRKTAMGATLLDVIQSGVE
Penaeus	1	M-ADAAVIEKLEAGFKKLEAATDCKSLKLYLTKEVFDKLDKRTSLGATLLDVIQSGVE
Polybethes	1	M-VDQATLDKLEAGFKKLDQATDXKSLKLYLNREVFQCKSLKTALGATLLDCIQSGVE
Limulus	1	M-VDQATLDKLEAGFKKLEASDCKSLKLYLTKDVFDSIKNKKTMGMATLLDVIQSGVE
Scylla	1	M-ADAAVIAKLEAGFKKLEAATDCKSLKLYLTKSVFQDLGKRTSLGATLLDVIQSGVE
Rhipicephalus	61	NLDSGVGYAPDAESYTVFADLFNVPVIEDYHGGFKPTDKHPPPTDFGDMNTIVNVDPENKY
Penaeus	60	NLDSGVGIYAPDAEAYTLFAPLFDPIIEDYHVGFKQTDKHPNKDFGDVNSFVNVDPEGKF
Polybethes	60	NLDSGVGIYAPDAEAYTLFAPLFDPIIEDYHGGFKPTDKHPPPTDFGDMNTIVNVDPENKY
Limulus	60	NLDSGVGIYAPDAESYRTFGPLFDPIIDYHGGFKLTDKHPKKEWGDINTLVLDLDPAGQF
Scylla	60	NLDSGVGYAPDAEAYTLFAPLFDPIIEDYHGGFKQTDKHPNKDFGDVNVQFVNVDPDGKF
Rhipicephalus	121	VVSTRVRCGRSLQGYFPNCLTEAQYKEMEDKVSQQLKGMTGDLKGTYYPLTGMDKKTQQ
Penaeus	120	VISTRVRCGRSLQGYFPNCLTESQYKEMEDKVSQQLKGMTGDLKGTYYPLTGMSKEVQQ
Polybethes	120	VVSTHVRRCGRSLKGYFPNCLTEANYKEMEDKVSQQLKGMTGDLKGTYYPLTGMDKATQQ
Limulus	120	IISTRVRCGRSLQGYFPNCLTEAQYKEMEDKVSQQLKGMTGDLKGTYYPLTGMSKATQQ
Scylla	120	VISTRVRCGRSMEGYFPNCLTEAQYKEMEDKVSQQLKGMTGDLKGTYYPLTGMDKDVQQ
Rhipicephalus	181	QLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDAKTFLVWVNEEDHLRIISMQGGDL
Penaeus	180	KLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDNKTFLVWVNEEDHLRIISMQGGDL
Polybethes	180	QLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDAKTFLVWVNEEDHLRIISMQGGDL
Limulus	180	QLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDAKTFLVWVNEEDHLRIISMQGGDL
Scylla	180	KLIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDNKTFLVWVNEEDHLRIISMQGGDL
Rhipicephalus	241	KQVYSRMVSGVKEIEKLLPFSRDDRLGFLTFCTNLGTTIRASVHIKLPKLAADKAKLDS
Penaeus	240	GQVFRRLTSAVNEIEKRIPFSHDDRLGFLTFCTNLGTTIRASVHIKLPKLAANREKLEE
Polybethes	240	KTIQRLVNAVNTIESKLPFSRDDRLGFLTFCTNLGTTIRASVHIKLPKLAADKAKLDS
Limulus	240	KTVYKRLVAVDNIESKLPFSHDDRLGFLTFCTNLGTTIRASVHIKLPKLAADKAKLDS
Scylla	240	GQVYRRLVAVNEIEKRVVPSHDDRLGFLTFCTNLGTTIRASVHIKLPKLAANREKLEE
Rhipicephalus	301	IAAKYNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRLGTEYQAVREMQDGIQELIKLEQA-A
Penaeus	300	VAGKYNLQVRGTRGEHTEAEGGIYDISNKRRLGTEYQAVREMQDGIQELIKIEKE-M
Polybethes	300	IAAKYNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRLGTEYQAVREMQDGIQELIKIEKEA
Limulus	300	IASKYNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRRLGTEYQAVREMQDGIQELIKIEKEA
Scylla	300	VAGKYNLQVRGTRGEHTEAEGGIYDISNKRRLGTEYQAVREMQDGIQELIKIEKEA

(B)

Figura 6. Identificación de epítomos en la secuencia y estructura de AKs. (A): epítomos predichos por DiscoTope que se muestran en los modelos estructurales de AK de invertebrados. Rs representa a *R. sanguineus*, Lv a *L. vannamei*, Pp a *P. pythagoricus*, Lp a *L. polyphemus* y Sp a *S. paramamosain*. (B): alineación lineal de la secuencia de aminoácidos. Los colores coinciden tanto con los modelos estructurales como con las secuencias de aminoácidos lineales.

Las AK de las cinco especies (*R. sanguineus*, *L. vannamei*, *P. pythagoricus*, *S. paramamosain* y *L. polyphemus*) presentaron sitios antigénicos en los residuos 171-183. Las AK tienen epítomos conservados en los residuos 92-101, sin embargo, se encontraron cuatro posibles epítomos específicos de *RsAK* en los residuos 157-169, 240-241, 257-258 y 335-341. Estos residuos fueron designados como epítomo 1 (E1): residuos 105-109, 240-241, 334 y 340, epítomo 2 (E2): residuos 247-256, el 3 (E3): residuos 156, 164-169, 214 y 216 y el epítomo 4 (E4): residuos 111-123. Encontramos que el E1 está conformado por 1 lazo y 3 alfas hélice, el E2 por un lazo y 1 alfa hélice, el E3 por 1 lazo, 1 alfa hélice y 1 hoja beta; por último, el E3 está conformado por 1 lazo y una hoja beta (Figura 7, panel A).

Se esperaba que los epítomos fueran encontrados sobre todo en los lazos, debido a que son más flexibles que las hélices y hojas beta, además los lazos suelen encontrarse en la superficie de la proteína y esto también facilita el reconocimiento de los anticuerpos (Hopp and Woods, 1981). Todos los epítomos encontrados en este estudio contenían al menos un lazo y la mayoría tenían alta exposición al solvente, al analizar la superficie accesible al solvente en PyMOL; solo el E3 y E4 tenían una fracción inaccesible en las hojas beta (Figura 7, panel B).

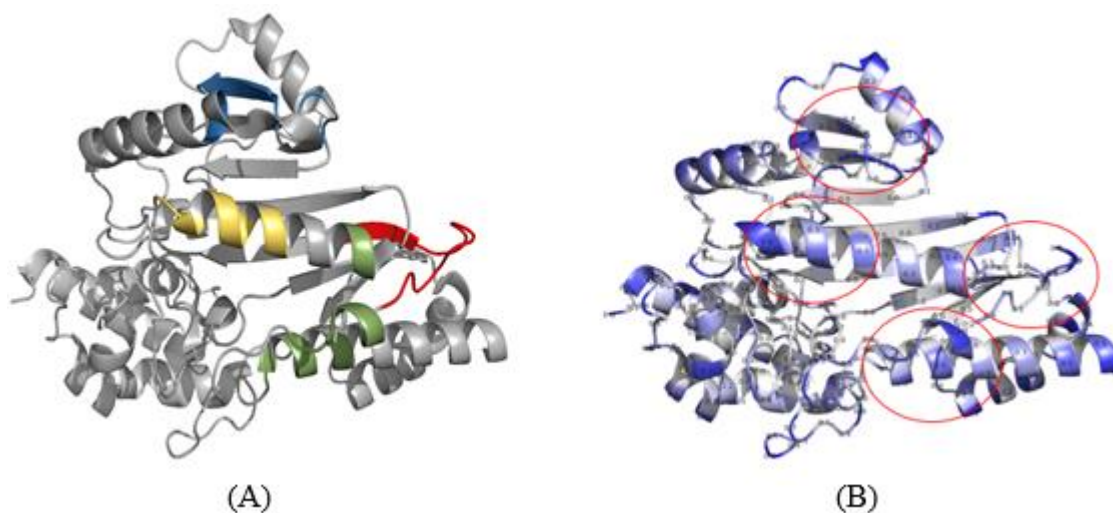


Figura 7. Epítomos especie-específicos de *RsAK* según DiscoTope. (A) muestra a color cada uno de los epítomos; En verde, se representa al epítomo E1, en amarillo al epítomo E2, en azul, al epítomo E3 y en rojo, al epítomo E4. (B) Se muestra la superficie accesible al solvente las áreas moradas representan las zonas que tienen accesibilidad al solvente, mientras que las grises muestran las zonas que están más enterradas.

Las características de los aminoácidos que componen los epítomos se describen en la Cuadro 2. Según la literatura, los epítomos suelen estar compuestos por aminoácidos polares y con carga positiva (Hopp and Woods, 1981). En los epítomos encontrados en este estudio, al menos la mitad de los aminoácidos que conforman a cada uno de ellos cumple con estas características.

Cuadro 2. Composición aminoacídica de los epítomos.

Aminoácido	Característica	E1	E2	E3	E4
Lisina, K	Carga positiva	1	3	3	1
Valina, V	Apolar		2		4
Treonina, T	Polar	2		1	1
Tirosina, Y	Aromático	1		2	1
Ac. Aspártico, D	Carga negativa	1		1	1
Asparagina, N	Polar	1			2
Ac. Glutámico, E	Carga negativa		2		1
Glicina, G	Apolar	1		1	
Glutamina, Q	Polar	1			
Serina, S	Polar		1		1
Prolina, P	Polar			1	1
Metionina, M	Apolar	1			
Arginina, R	Carga positiva	1			
Leucina, L	Apolar			1	

6.5. Sobreexpresión de Mutantes y *RsAK* Silvestre

La expresión de una proteína con el peso molecular esperado (42 kDa) se observó después de 2 horas en la mutante E1 y E2; sin embargo, la mutante E1 tuvo un mayor rendimiento de proteína después de 6 horas, utilizando 0.1 mM de IPTG. A las 18 horas no se observa la mutante soluble, lo que podría ser causado por degradación por proteasas. Después de recolectar las bacterias, a partir de 1 litro de medio, se obtuvo un pellet de 4 g, el rendimiento de la mutante fue de 3.64 mg por litro de cultivo. En el caso de la mutante E2, se obtuvo un mayor rendimiento de sobreexpresión a las 18 horas post-inducción, utilizando 0.2 mM de IPTG, el pellet cosechado a las 18 horas de un

litro de medio fue de 8 g y el rendimiento de la mutante fue de 1.5 mg por litro de cultivo. Las mutantes E3 y E4 se sobreexpresaron en cuerpos de inclusión (Figura 8). AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021) mostró que las áreas que presentaban hoja β que se cambiaron a alanina en estos epítomos alteraron el plegamiento de la proteína en esas áreas, lo que sugiere que los cambios en esta estructura secundaria conducen a un mal plegamiento en estos mutantes (Fink, 1998; Ladner, 2007).

La mutante E1 se purificó con éxito utilizando la columna cruda HiTrap TALON® de Cytiva, que tiene una alta especificidad para las etiquetas de histidina. La mutante E1 se eluyó en aproximadamente 18 mL con buffer B al 20% de imidazol (30 mM). Por otro lado, para la mutante E2 se utilizó una columna HisTrap FF® de Cytiva. La mutante eluyó en 15 mL con 200 mM de imidazol.

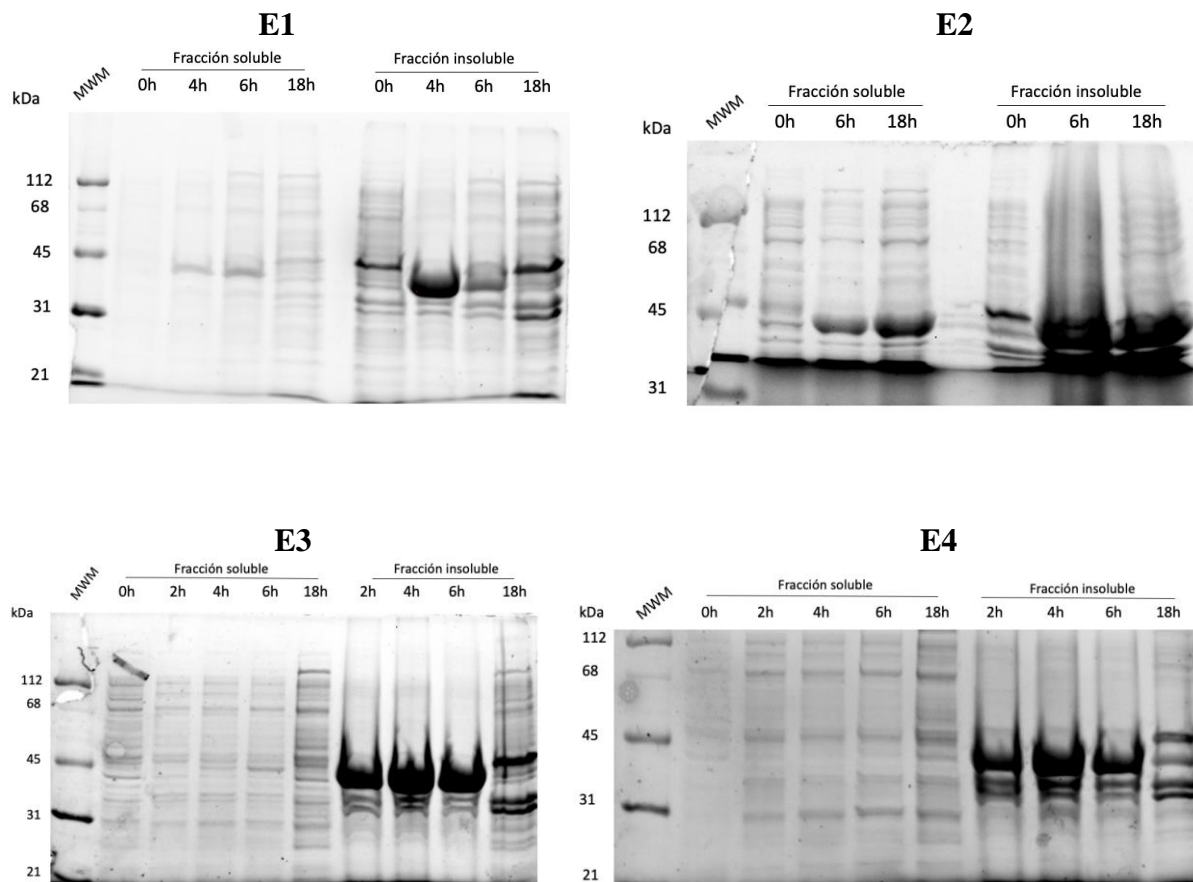


Figura 8. Cinética de sobreexpresión de las mutantes E1, E2, E3 y E4 de RsAK.

6.6. Actividad Enzimática de *RsAK* WT y Mutantes

Para ver si las mutaciones tenían un efecto sobre la actividad de las mutantes, se comparó la actividad de cada mutante con la actividad de la WT, se encontró que la WT tuvo una actividad de 4.47 U/mg, E1 de 4.21 U/mg y E2 de 2.74 U/mg (Figura 9). La prueba estadística mostró que no hubo diferencias significativas entre WT y E1 ($p < 0.05$), pero sí entre WT y E2 ($p < 0.05$). El análisis con AlphaFold con las mutantes no mostró diferencias en la estructura, por lo que sería interesante la cristalización de las mutantes para ver por qué se produjo la pérdida de actividad en E1. Además, se podrían realizar otros métodos más baratos y accesibles, como el dicroísmo circular o SAXS, para dar una idea de lo que podría estar ocurriendo.

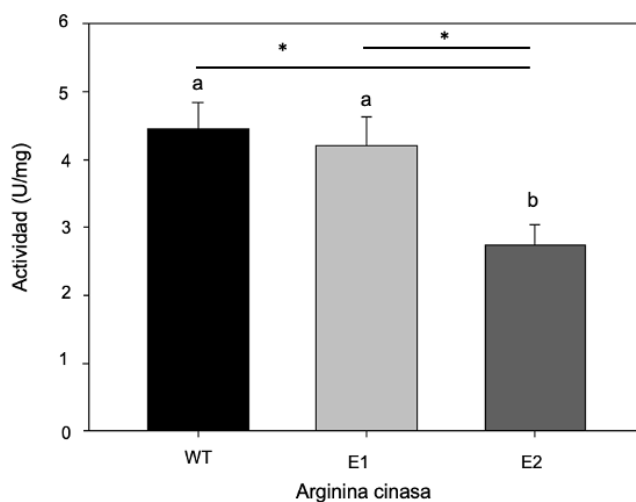


Figura 9. Actividad específica de la arginina cinasa WT y las mutantes E1 y E2. ^{ab} Barras con diferente literal, indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

6.7. Cinética Enzimática de *RsAK* WT

En cuanto a los parámetros de Michaelis-Menten para arginina y ATP que se muestran en la Cuadro 3, *RsAK* tuvo una mayor afinidad (menor K_m) al compararla con las especies *Ascaris suum* (Nagataki *et al.*, 2012), *Locusta migratoria* (Wu *et al.*, 2007), *Polybetes pytagoricus* (A. Laino *et*

al., 2017), *Aphonopelma (Dugesella) hentzi* (Blethen and Kaplan, 1968), *Cissites cephalotes* (Tanaka *et al.*, 2007) y *Periplaneta americana* (Sookrung *et al.*, 2006) lo que se refleja en excelentes eficiencias catalíticas (Figura 10, Cuadro 3).

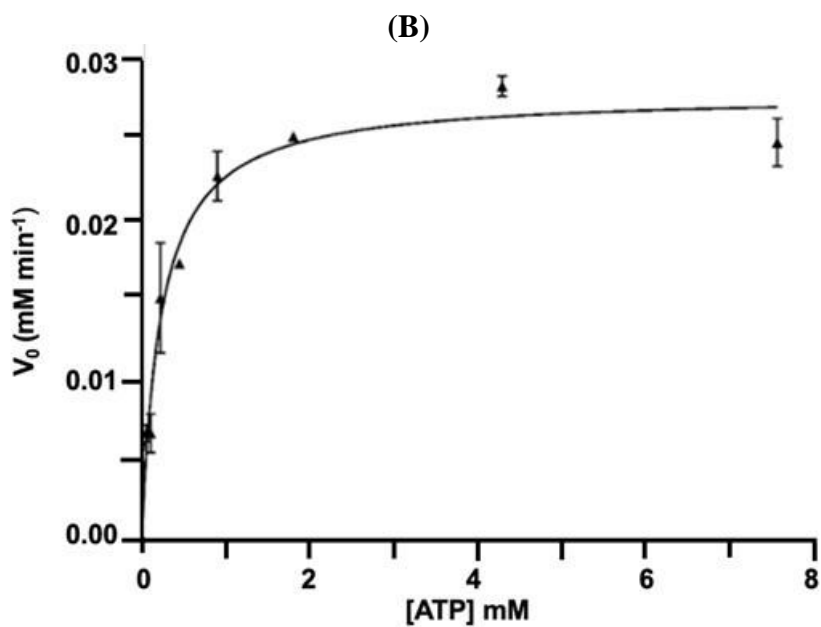
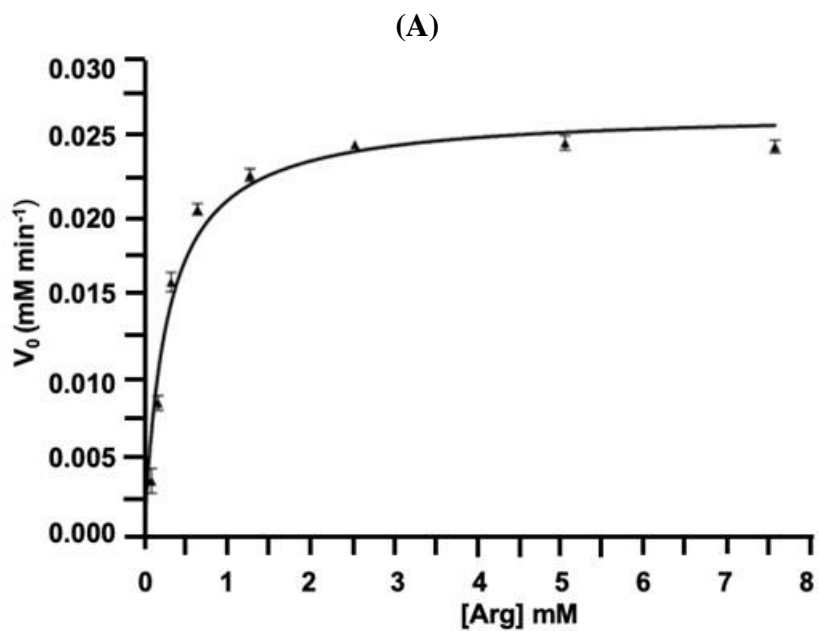


Figura 10. Gráficos de Michaelis-Menten de los parámetros cinéticos de la *RsAK* con L-arginina y ATP como sustratos. (A): representa la cinética con L-arginina. La concentración final de L-arginina varió de 0.078 mM - 7.5 mM. (B): representa la cinética con ATP. La concentración de ATP varió de 0.05 mM - 6.5 mM. Los datos están descritos como promedio \pm la desviación estándar del triplicado.

Cuadro 3. Comparación de las constantes cinéticas de la *RsAK*

Especie	Referencia	K_m^{Arg} (mM)	K_m^{ATP} (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	$k_{\text{cat}}/K_m^{\text{Arg}}$ (s ⁻¹ mM ⁻¹)	$k_{\text{cat}}/K_m^{\text{ATP}}$ (s ⁻¹ mM ⁻¹)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
<i>R. sanguineus</i> (Garrapata de perro)	Presente estudio	0.27 ± 0.08	0.31 ± 0.12	142 ± 0.21	523.2	458.1	26.1
<i>A. suum</i> (Nemátodo)	(Nagataki <i>et al.</i> , 2012)	0.13 ± 0.017	0.65 ± 0.056	45.9	353	NE	NE
<i>L. migratoria manilensis</i> (Saltamonte)	(Wu <i>et al.</i> , 2007)	0.95 ± 0.08	1.29 ± 0.23	159.4 ± 6.2	169	123.5	NE
<i>P. pytagoricus</i> (Araña)	(Laino <i>et al.</i> , 2017)	1.7	NE	75	44.4	NE	NE
<i>A. hentzi</i> (Araña)	(Blethen y Kaplan, 1968)	0.27	NE	NE	NE	NE	NE
<i>C. cephalotes</i> (Escarabajo)	(Tanaka <i>et al.</i> , 2007)	1.01 ± 0.07	0.95 ± 0.16	2 ± 0.05	2	2.1	3
<i>P. americana</i> (Cucaracha)	(Sookrung <i>et al.</i> , 2006)	0.49	0.14	1.3	2.7	9.3	21.7

6.8. Validación de Epítomos

El algoritmo DiscoTope 2.0 predijo varios epítomos especie-específicos para *RsAK* (Gomez-Yanes *et al.*, 2022). Estos epítomos se mutaron a alanina para investigar su especificidad a anticuerpos IgG de pacientes expuestos a picaduras de garrapatas. Como controles, se utilizaron muestras de un banco de sangre local, donde los sujetos fueron evaluados para ver si tienen un estado saludable. Los resultados de la prueba de ELISA mostraron que E1 perdió 30% de reactividad, y las diferencias en la reactividad a los anticuerpos fueron significativas entre *RsAK* WT y E1 ($p < 0.05$), además, se observaron diferencias entre *RsAK* WT y E2 ($p < 0.05$), a favor de E2, como se muestra en la Figura 11.

Las secciones mutadas a alanina en E1 fueron discontinuas e involucraron diferentes estructuras secundarias. Cuando se trata de epítomos discontinuos o conformacionales, la unión antígeno-anticuerpo está mediada por la interacción entre ciertas regiones de la secuencia del antígeno que se convierten en superficie de contacto del anticuerpo, separadas por una pequeña cantidad de

residuos que no entran en contacto con el anticuerpo. Entre estas diferentes secuencias hay residuos que ayudan a formar estructuras secundarias espaciales, que se consideran un factor clave cuando se forman interacciones proteína-proteína (Ferdous *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019). Por lo tanto, cuando dichos residuos de aminoácidos que promueven la estructura secundaria están mutados, podría dar lugar a la pérdida de afinidad entre las dos partes, siendo estas E1 y el anticuerpo.

Es difícil concluir si E1 es un epítipo especie-específico, ya que no hay muchos estudios experimentales acerca de los epítopos discontinuos de AK; sin embargo, los hallazgos aquí presentados, sugieren que las regiones mutadas de E1 son vitales para la afinidad de unión, ya que hay una pérdida significativa de absorbancia en la prueba de ELISA comparada con WT. Deben realizarse ensayos con diferentes AK para determinar la especificidad de este epítipo.

Aunque lo anterior está respaldado por los resultados del análisis estadístico, es importante señalar que, si bien se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre WT, E1 y E2, así como entre la reactividad de los sueros FMMR y los de banco de sangre utilizando la WT como antígeno, no se encontraron diferencias significativas cuando se compara la reactividad de los sueros FMMR contra los de banco de sangre al utilizar como antígeno a E1 y E2 (Figura 11), según la prueba t de Welch. Sin embargo, cuando se midió la potencia, resultó ser inferior a la deseada (0.800), lo que significa que era menos probable que detectáramos una diferencia cuando realmente existe. Otro punto que hay que tomar en cuenta es que muy probablemente los sueros del banco de sangre no tienen respuesta contra la RsAK, por lo que no se ve una reducción de reactividad al retar estos sueros con la mutante E1 a diferencia del caso en el que se retan a los sueros FMMR que si tienen respuesta a RsAK, esto podría explicar la razón de que no se muestren diferencias significativas.

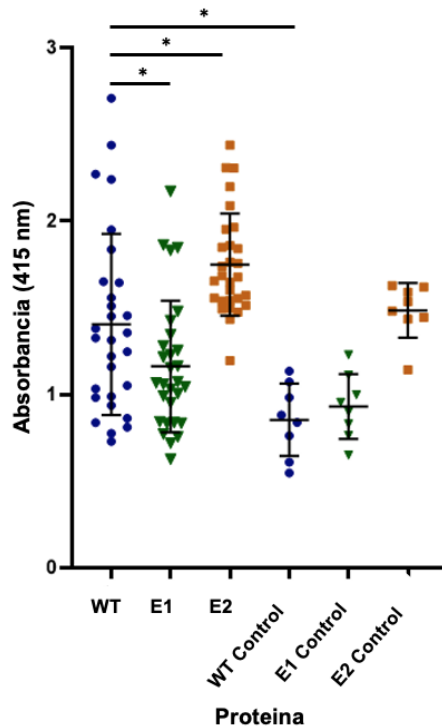


Figura 11. Reactividad medida a una absorbancia de 415 nm de las diferentes versiones de *RsAK* con sueros con FMMR y con sueros de banco de sangre (controles). * Indica que la diferencia fue significativa ($p < 0.05$).

En el caso de E2, las mutaciones conducen a una mayor respuesta en ELISA, esto último podría estar relacionado con reacciones cruzadas y pérdida de especificidad. La aparición de reactividad cruzada puede conducir a lecturas falsas durante los ensayos de interacción antígeno-anticuerpo, principalmente debido a la formación de un mayor número de interacciones no específicas que surgen en la superficie mutada. Al ser E2 un epítipo continuo, la pérdida de secuencia específica podría producir una nueva interacción proteína-proteína, un mayor número de puntos de interacción y una lectura de señal más alta. Esto podría significar que dicha secuencia mutada podría ser clave para la especificidad durante el reconocimiento antígeno-anticuerpo (Scheurer *et al.*, 1999). Respecto a la falta de significancias entre el ensayo con sueros FMMR y del banco de sangre en el caso de la E2, se observa que tanto sube la absorbancia con los sueros FMMR como con los sueros del banco de sangre, lo cual respalda la hipótesis acerca de que se crean interacciones no específicas, por lo tanto, tampoco deberían mostrarse diferencias entre ambos tratamientos.

E2 está conformado por los aminoácidos 247-256. Aunque no existen estudios acerca de epítopos de arginina cinasas de vectores, si existen para arginina cinasas de algunos camarones. En uno de

los estudios se encontró un epítipo entre los residuos 232-255 en *Litopenaeus vannamei* (Ayuso *et al.*, 2010), mientras que en otro estudio, se encontró un epítipo en los residuos 250-266 en *Penaeus chinensis* (Fu *et al.*, 2018); sin embargo, al realizar un alineamiento de secuencias, estos residuos no son conservados entre la AK de garrapata y la de los camarones (Figura 12), por lo tanto, podría ser que algunos de estos aminoácidos diferentes sean clave para dar antigenicidad a esta fracción de residuos. Según los resultados de este análisis, pareciera que E2 no es un epítipo real para RsAK.



Figura 12. Alineamiento de secuencias de arginina cinasas de *Rhipicephalus sanguineus*, *Litopenaeus vannamei* y *Penaeus chinensis*. En rojo, se muestran E2 y el encontrado en *L. vannamei* por Ayuso *et al.*, 2010.

Por otra parte, al encontrarse diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las absorbancias de los pacientes con FMMR y los donadores del banco de sangre, se sugiere que los pacientes con FMMR desarrollaron una respuesta inmune a la RsAK, lo cual indica que la RsAK pudiera ser utilizada como un biomarcador de exposición a garrapata café del perro, sin embargo, más estudios y más sueros, tanto de pacientes con FMMR como controles deben ser analizados para obtener resultados más conclusivos. Probablemente se puedan conseguir sueros de gente que viva en lugares como la Antártida, donde no hay garrapata café, o de bebés recién nacidos, para asegurarse que no hayan estado expuestos a la garrapata.

DiscoTope 2.0 es una herramienta de predicción de epítipos de alta calidad utilizada en todo el mundo. Sin embargo, como con cualquier otro algoritmo, debe usarse junto con ensayos experimentales que puedan arrojar luz sobre los epítipos potencialmente verdaderos predichos. Así

como un protocolo estadístico apropiado para evitar un análisis sesgado de los datos experimentales resultantes. Después de considerar la información anterior, opinamos que los hallazgos de este estudio tienen suficiente importancia metodológica para justificar una mayor investigación sobre el tema. Además, el estudio produjo nuevos datos en un campo que no había sido examinado previamente en relación con los parásitos.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de difracción circular o SAXS con las mutantes E1 y E2 para analizar un poco más a profundidad la razón de los cambios en la actividad enzimática.
- Realizar pruebas de replegamiento en las mutantes que resultaron insolubles para poder analizar la reactividad de sueros inmunes contra *R_sAK* y poder validar si son epítomos.
- Probar un péptido con la secuencia de E4 mediante pruebas de ELISA para validar este epítomo.
- Analizar una muestra más grande de personas infectadas con FMMR y de personas no expuestas a garrapata para poder desarrollar un método de detección de personas expuestas al vector.

8. CONCLUSIONES

Tras resolver la estructura cristalina de la AK de *R. sanguineus*, en el presente estudio se encontró un epítipo conformacional en los residuos 105-109, 240-241, 334 y 340, el cual está conformado por un lazo y una alfa hélice y se compone por dos aminoácidos de carga positiva, cuatro polares, uno con carga negativa y tres apolares. Estas estructuras se encontraron en la superficie de la proteína donde hay alta exposición al solvente, de manera que se facilita la interacción de epítipo con anticuerpo. Según los resultados encontrados en el algoritmo de DiscoTope 2.0, se trata de un epítipo especie-específico, sin embargo, se requieren más estudios experimentales para comprobarlo.

La diferencia en la señal del ensayo de ELISA entre los pacientes FMMR y los de banco de sangre contra la *RsAK*, sugieren que las personas que padecen de FMMR generan anticuerpos contra *RsAK*, lo cual hace a esta proteína un potencial biomarcador de exposición de garrapata café del perro.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2010. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213–221. <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>
- Adeyemi, O.S., Whiteley, C.G., 2013. Interaction of nanoparticles with arginine kinase from *Trypanosoma brucei*: Kinetic and mechanistic evaluation. *Int J Biol Macromol* 62, 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.008>
- Alvarez, G., Rosales, C., R, S., 2014a. Rocky Mountain Spotted Fever, A Reemerging Disease in Arizona and Sonora- Case Study. *Journal of Case Reports and Studies* 1, 11–14. <https://doi.org/10.15744/2348-9820.1.601>
- Alvarez, G., Rosales, C., Sepulveda, R., 2014b. Rocky Mountain Spotted Fever, A Reemerging Disease in Arizona and Sonora- Case Study. *JOURNAL OF CASE REPORTS AND STUDIES* 1. <https://doi.org/10.15744/2348-9820.1.601>
- Álvarez-Hernández, G., Roldán, J.F.G., Milan, N.S.H., Lash, R.R., Behravesh, C.B., Paddock, C.D., 2017. Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Alvarez-Hernandez, G., Trejo, A.V., Ratti, V., Teglas, M., Wallace, D.I., 2022. Modeling of Control Efforts against *Rhipicephalus sanguineus*, the Vector of Rocky Mountain Spotted Fever in Sonora Mexico. *Insects* 13. <https://doi.org/10.3390/insects13030263>
- Amin, O.M., 1970. The circadian rhythm of dropping of engorged larvae and nymphs of the American dog tick *Dermacentor variabilis* Say (Acarina: Ixodidae). *J Med Entomol* 7, 251–255. <https://doi.org/10.1093/jmedent/7.2.251>
- Andersen, P.H., Nielsen, M., Lund, O., 2006. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Science* 15, 2558–2567. <https://doi.org/10.1110/ps.062405906>
- Ayuso, R., Sánchez-García, S., Lin, J., Fu, Z., Ibáñez, M.D., Carrillo, T., Blanco, C., Goldis, M., Bardina, L., Sastre, J., Sampson, H.A., 2010. Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.03.010>
- Ayuso, R., Sánchez-García, S., Pascal, M., Lin, J., Grishina, G., Fu, Z., Ibáñez, M.D., Sastre, J., Sampson, H.A., 2012a. Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity? *Clinical and Experimental Allergy* 42, 293–304. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03920.x>
- Ayuso, R., Sánchez-García, S., Pascal, M., Lin, J., Grishina, G., Fu, Z., Ibáñez, M.D., Sastre, J., Sampson, H.A., 2012b. Is epitope recognition of shrimp allergens useful to predict clinical reactivity? *Clinical and Experimental Allergy* 42, 293–304. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

[2222.2011.03920.x](#)

- Azzi, A., 2004. The role of phosphagen specificity loops in arginine kinase. *Protein Science* 13, 575–585. <https://doi.org/10.1110/ps.03428304>
- Barlow, D.J., Edwards, M.S., Thornton, J.M., 1986. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 322, 747–748.
- Bax, A., 1994. Multidimensional nuclear magnetic resonance methods for protein studies. *Curr Opin Struct Biol* 4, 738–744. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90173-2](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90173-2)
- Bezdi, M.S., Pourabad, R.F., Toorchi, M., Zarghami, N., Komatsu, S., 2012. Protein patterns in the salivary gland of the sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Put.) (Hemiptera: Scutelleridae). *Turk Entomol Derg* 36, 215–223. <https://doi.org/10.16970/ted.34013>
- Biggs, H.M., Behravesh, C.B., Bradley, K.K., Dahlgren, F.S., Drexler, N.A., Dumler, J.S., Folk, S.M., Kato, C.Y., Lash, R.R., Levin, M.L., Massung, R.F., Nadelman, R.B., Nicholson, W.L., Paddock, C.D., Pritt, B.S., Traeger, M.S., 2016. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky mountain spotted fever and other spotted fever group rickettsioses, ehrlichioses, and anaplasmosis - United States a practical guide for health care and public health professionals. *MMWR Recommendations and Reports* 65, 1–44. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr6502a1>
- Binder, M., Mahler, V., Hayek, B., Sperr, W.R., Schöllner, M., Prozell, S., Wiedermann, G., Valent, P., Valenta, R., Duchêne, M., 2001. Molecular and Immunological Characterization of Arginine Kinase from the Indianmeal Moth, *Plodia interpunctella*, a Novel Cross-Reactive Invertebrate Pan-Allergen. *The Journal of Immunology* 167, 5470–5477. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.5470>
- Blethen, S.L., Kaplan, N.O., 1968. Characteristics of Arthropod Arginine Kinases. *Biochemistry* 7, 2123–2135. <https://doi.org/10.1021/bi00846a015>
- Bobolea, I., Pastor-vargas, C., Iraola, V., 2011. Arginine Kinase from the Cellar Spider (*Holocnemus pluchei*): A New Asthma-Causing Allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 155, 180–186. <https://doi.org/10.1159/000319822>
- Chen, H., Mao, H., Cao, M., Cai, Q., Su, W., Zhang, Y., Liu, G., 2013. Purification, physicochemical and immunological characterization of arginine kinase, an allergen of crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.014>
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors* 3, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
- Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Vet Parasitol* 152, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>
- Dantas-Torres, F., Giannelli, A., Otranto, D., 2012. Starvation and overwinter do not affect the reproductive fitness of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol* 185, 260–264. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.005>
- de Celorio-Mancera, M. la P., Courtiade, J., Muck, A., Heckel, D.G., Musser, R.O., Vogel, H., 2011. Sialome of a generalist lepidopteran herbivore: Identification of transcripts and

proteins from *Helicoverpa armigera* labial salivary glands. PLoS One 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026676>

De Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Saito, K.C., Nunes, E.T., Szabó, M.P.J., Mathias, M.I.C., 2005. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Vet Parasitol* 129, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.01.001>

DeLano, W.L., 2002. The PyMOL molecular graphics system. <http://www.pymol.org/>.

Edward, A., Vera, A.V., Say, M., Pereira, C.A., 2016. Resveratrol inhibits *Trypanosoma cruzi* arginine kinase and exerts a trypanocidal activity. *Int J Biol Macromol*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.014>

Ehsan, M., Gao, W.X., Gadahi, J.A., Lu, M.M., Liu, X.C., Wang, Y.J., Yan, R.F., Xu, L., Song, X.K., Li, X.R., 2017. Arginine kinase from *Haemonchus contortus* decreased the proliferation and increased the apoptosis of goat PBMCs in vitro. *Parasit Vectors* 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2244-z>

Eisen, R.J., Eisen, L., Ogden, N.H., Beard, C.B., 2016. Linkages of weather and climate with *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae), enzootic transmission of *Borrelia burgdorferi*, and lyme disease in North America. *J Med Entomol*. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv199>

Elias-Santos, D., Fialho, M.D.C.Q., Vitorino, R., Oliveira, L.L., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., 2013. Proteome of the head and thorax salivary glands in the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Apidologie* 44, 684–698. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0217-6>

Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>

Fei, D., Liu, Q., Chen, F., Yang, Y., Chen, Z., Cao, M., 2016. Assessment of the sensitizing capacity and allergenicity of enzymatic cross-linked arginine kinase, the crab. *Mol Nutr Food Res* 60, 1–12. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500936>

Ferdous, S., Kelm, S., Baker, T.S., Shi, J., Martin, A.C.R., 2019. B-cell epitopes: Discontinuity and conformational analysis. *Mol Immunol* 114, 643–650. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2019.09.014>

Fernandez, P., Haouz, A., Pereira, C.A., Aguilar, C., Alzari, P.M., 2007. The Crystal Structure of *Trypanosoma Cruzi* Arginine Kinase. *Proteins* 69, 209. <https://doi.org/10.2210/PDB2J1Q/PDB>

Fink, A.L., 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* 3.

Fleury, D., Daniels, R.S., Skehel, J.J., Knossow, M., Bizebard, T., 2000. Structural Evidence for Recognition of a Single Epitope by Two Distinct Antibodies.

Forstner, M., Kriechbaum, M., Laggner, P., Wallimann, T., 1998. Structural changes of creatine kinase upon substrate binding. *Biophys J* 75, 1016–1023. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77590-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77590-3)

Fu, L., Wang, J., Ni, S., Wang, C., Wang, Y., 2018. Identification of Allergenic Epitopes and Critical Amino Acids of Major Allergens in Chinese Shrimp (*Penaeus chinensis*) by

- Immunoinformatics Coupled with Competitive-Binding Strategy. *J Agric Food Chem* 66, 2944–2953. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06042>
- García-Orozco, K., Aispuro-Hernandez, E., Yepiz-Plascencia, G., Calderon-de-la-Barca, A.M., Sotelo-mundo, R.R., 2007. Molecular Characterization of Arginine Kinase , an Allergen from the Shrimp *Litopenaeus vannamei* 83000, 23–28. <https://doi.org/10.1159/000102610>
- Godsey, M.H., Davulcu, O., Nix, J.C., Skalicky, J.J., Bruschweiler, R.P., Chapman, M.S., 2016. The Sampling of Conformational Dynamics in Ambient-Temperature Crystal Structures of Arginine Kinase. *Structure* 24, 1658–1667. <https://doi.org/10.2210/PDB5J99/PDB>
- Gómez-Yanes, A.C., 2019. Caracterización estructural e Inmunológica de la Arginina Cinasa de Garrapata Café (*Rhipicephalus sanguineus*). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora.
- Gomez-Yanes, A.C., Moreno-Cordova, E.N., Garcia-Orozco, K.D., Laino, A., Islas-Osuna, M.A., Lopez-Zavala, A.A., Valenzuela, J.G., Sotelo-Mundo, R.R., 2022. The Arginine Kinase from the Tick *Rhipicephalus sanguineus* Is an Efficient Biocatalyst. *Catalysts* 12, 1178. <https://doi.org/10.3390/catal12101178>
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., Levin, M., 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>
- Gu, X., Gu, J., Ren, Y., Zheng, Y., Yang, G., Zhou, X., Xie, Y., 2019. Evaluation of an Indirect ELISA Using Recombinant Arginine Kinase for Serodiagnosis of *Psoroptes ovis* var. *cuniculi* Infestation in Rabbits. *Front Vet Sci* 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00411>
- Haste Andersen, P., Nielsen, M., Lund, O., 2006. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Science* 15, 2558–2567. <https://doi.org/10.1110/ps.062405906>
- Heinemann, U., Illing, G., Oschkinat, H., 2001. High-throughput three-dimensional protein structure determination. *Curr Opin Biotechnol* 12, 348–354. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00226-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00226-3)
- Hong, X., Hao, Q., 2009. High resolution pair-distance distribution function $P(r)$ of protein solutions. *Appl Phys Lett* 94. <https://doi.org/10.1063/1.3089360>
- Hopp, T.P., Woods, K.R., 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3824–3828. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3824>
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology.* <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohli, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125–132.

<https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>

- Kjemtrup, A.M., Padgett, K., Paddock, C.D., Messenger, S., Hacker, J.K., Feiszli, T., Melgar, M., Metzger, M.E., Hu, R., Kramer, V.L., 2022. A forty-year review of Rocky Mountain spotted fever cases in California shows clinical and epidemiologic changes. *PLoS Negl Trop Dis* 16. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010738>
- Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276, 172–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-Q)
- Konishi, H., Noda, H., Tamura, Y., Hattori, M., 2009. Proteomic analysis of the salivary glands of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Appl Entomol Zool* 44, 525–534. <https://doi.org/10.1303/aez.2009.525>
- Kringelum, J.V., Lundegaard, C., Lund, O., Nielsen, M., 2012. Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. *PLoS Comput Biol* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002829>
- Kucharski, R., Maleszka, R., 1998. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gene* 211, 343–349. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00114-0)
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of rickettsia in South America. *Ann N Y Acad Sci* 1166, 156–166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>
- Ladner, R.C., 2007. Mapping the epitopes of antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev* 24, 1–30. <https://doi.org/10.1080/02648725.2007.10648092>
- Laino, Aldana, Lopez-Zavala, A.A., Garcia-Orozco, K.D., Carrasco-Miranda, J.S., Santana, M., Stojanoff, V., Sotelo-Mundo, R.R., Garcia, C.F., 2017. Biochemical and structural characterization of a novel arginine kinase from the spider *Polybetes pythagoricus*. *PeerJ* 5, e3787. <https://doi.org/10.7717/peerj.3787>
- Laino, A., Lopez-Zavala, A.A., Garcia-Orozco, K.D., Carrasco-Miranda, J.S., Santana, M., Stojanoff, V., Sotelo-Mundo, R.R., Garcia, C.F., 2017. Biochemical and structural characterization of a novel arginine kinase from the spider *Polybetes pythagoricus*. *PeerJ* 5, e3787–e3787. <https://doi.org/10.2210/PDB5U92/PDB>
- Larsen, J.E.P., Lund, O., Nielsen, M., 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2, 2. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>
- Liang, S., Zheng, D., Zhang, C., Zacharias, M., 2009. Prediction of antigenic epitopes on protein surfaces by consensus scoring. *BMC Bioinformatics* 10, 302. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-302>
- Liu, K., Lin, S., Liu, Y., Wang, S., Liu, Q., Sun, K., Sun, N., 2023. Mechanism of the reduced allergenicity of shrimp (*Macrobrachium nipponense*) by combined thermal/pressure processing: Insight into variations in protein structure, gastrointestinal digestion and immunodominant linear epitopes. *Food Chem* 405, 134829. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134829>
- Liu, Z., Xia, L., Wu, Y., Xia, Q., Chen, J., Roux, K.H., 2009. Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int Arch Allergy*

Immunol 150, 8–14. <https://doi.org/10.1159/000210375>

- López-Zavala, A.A., García-Orozco, K.D., Carrasco-Miranda, J.S., Sugich-Miranda, R., Velázquez-Contreras, E.F., Criscitiello, M.F., Brieba, L.G., Rudiño-Piñera, E., Sotelo-Mundo, R.R., 2013. Crystal structure of shrimp arginine kinase in binary complex with arginine - A molecular view of the phosphagen precursor binding to the enzyme. *J Bioenerg Biomembr* 45, 511–518. <https://doi.org/10.1007/s10863-013-9521-0>
- Lopez-Zavala, A.A., Sotelo-Mundo, R.R., Garcia-Orozco, K.D., Isac-Martinez, F., Brieba, L.G., Rudino-Pinera, E., 2012. Crystallization and X-Ray Diffraction Studies of Arginine Kinase from the White Pacific Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *Acta Crystallogr.,Sect.F* 68, 783. <https://doi.org/10.2210/PDB4AM1/PDB>
- Lorusso, V., Dantas-Torres, F., Lia, R.P., Tarallo, V.D., Mencke, N., Capelli, G., Otranto, D., 2010. Seasonal dynamics of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, on a confined dog population in Italy. *Med Vet Entomol* 24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00885.x>
- Mao, H.Y., Cao, M.J., Maleki, S.J., Cai, Q.F., Su, W.J., Yang, Y., Liu, G.M., 2013. Structural characterization and IgE epitope analysis of arginine kinase from *Scylla paramamosain*. *Mol Immunol* 56, 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.04.016>
- Mao, H.-Y., Cao, M.-J., Maleki, S.J., Cai, Q.-F., Su, W.-J., Yang, Y., Liu, G.-M., 2013. Structural characterization and IgE epitope analysis of arginine kinase from *Scylla paramamosain*. *Mol Immunol* 56, 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.04.016>
- Matthews, B.W., 1968. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 33, 491–497. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90205-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90205-2)
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- Medlock, J.M., Hansford, K.M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J.C., Golovljova, I., Jaenson, T.G.T., Jensen, J.K., Jensen, P.M., Kazimirova, M., Oteo, J.A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S.E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M.M., Sprong, H., Vial, L., Hendrickx, G., Zeller, H., Van Bortel, W., 2013. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors*. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-1>
- Montandon, C.E., Barros, E., Vidigal, P.M., Mendes, M.T., Anhô, A.C.B.M., de Oliveira Ramos, H.J., de Oliveira, C.J.F., Mafra, C., 2016. Comparative proteomic analysis of the saliva of the *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* and *Panstrongylus herreri* triatomines reveals a high interspecific functional biodiversity. *Insect Biochem Mol Biol* 71, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.02.009>
- Montero, C., Garrido, M., Cortés, L., Henry, M., Hernández, F., 2005. Identificación y caracterización de Arginina Cinasa , un probable alérgeno del mosquito *Anopheles albimanus*. *Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar* 4, 41–47.
- Mumcuoglu, K.Y., Frish, K., Sarov, B., Manor, E., Gross, E., Gat, Z., Galun, R., 1993. Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in southern Israel and its relationship to spotted fever group rickettsiae. *J Med Entomol* 30, 114–21. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.1.114>

- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., 2009. *Inmunobiología de Janeway*, 7th ed. Mc Graw Hill, Mexico.
- Nagataki, M., Uda, K., Jarilla, B.R., Tokuhira, S., Wickramasinghe, S., Suzuki, T., Blair, D., Agatsuma, T., 2012. Molecular and catalytic properties of an arginine kinase from the nematode *Ascaris suum*. *J Helminthol* 86, 276–286. <https://doi.org/10.1017/S0022149X11000381>
- Openshaw, J.J., Swerdlow, D.L., Krebs, J.W., Holman, R.C., Mandel, E., Harvey, A., Haberling, D., Massung, R.F., McQuiston, J.H., 2010. Rocky mountain spotted fever in the United States, 2000–2007: interpreting contemporary increases in incidence. *Am J Trop Med Hyg* 83, 174–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0752>
- Parker, J.M.R., Guo, D., Hodges, R.S., 1986. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry* 25, 5425–5432. <https://doi.org/10.1021/bi00367a013>
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin Microbiol Rev*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
- Pascoe, E.L., Nava, S., Labruna, M.B., Paddock, C.D., Levin, M.L., Marcantonio, M., Foley, J.E., 2022. Predicting the northward expansion of tropical lineage *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks in the United States and its implications for medical and veterinary health. *PLoS One* 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271683>
- Paveto, C., Güida, M.C., Esteva, M.I., Martino, V., Coussio, J., Flawiá, M.M., Torres, H.N., 2004. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 69–74.
- Pereira, C.A., Alonso, G.D., Ivaudi, S., Bouvier, L.A., Torres, H.N., Flawia, M.M., 2003. Screening of Substrate Analogs as Potential Enzyme Inhibitors for the Arginine Kinase of *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* 53, 132–134.
- Perner, J., Provazník, J., Schrenková, J., Urbanová, V., Ribeiro, J.M.C., Kopáček, P., 2016. RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Nature Publishing Group* 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep36695>
- Phillips, J., 2017. Rocky Mountain Spotted Fever. *Workplace Health Saf* 65, 48. <https://doi.org/10.1177/2165079916683711>
- Potterton, L., Agirre, J., Ballard, C., Cowtan, K., Dodson, E., Evans, P.R., Jenkins, H.T., Keegan, R., Krissinel, E., Stevenson, K., Lebedev, A., McNicholas, S.J., Nicholls, R.A., Noble, M., Pannu, N.S., Roth, C., Sheldrick, G., Skubak, P., Turkenburg, J., Uski, V., Von Delft, F., Waterman, D., Wilson, K., Winn, M., Wojdyr, M., 2018. CCP 4 i 2: The new graphical user interface to the CCP 4 program suite. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 74, 68–84. <https://doi.org/10.1107/S2059798317016035>
- Pusey, M.L., Liu, Z.J., Tempel, W., Praissman, J., Lin, D., Wang, B.C., Gavira, J.A., Ng, J.D., 2005. Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. *Prog Biophys Mol Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.07.011>

- Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., Tainer, J.A., 2007. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* 40, 191–285. <https://doi.org/10.1017/S0033583507004635>
- Rodrigues, C.H.M., Myung, Y., Pires, D.E.V., Ascher, D.B., 2019. MCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 47, W338–W344. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz383>
- Rubinstein, N.D., Mayrose, I., Pupko, T., 2009. A machine-learning approach for predicting B-cell epitopes. *Mol Immunol* 46, 840–847. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.09.009>
- Rupp, B., 2010. *Biomolecular Crystallography*. Garland Science, New York.
- Scheurer, S., Son, D.Y., Boehm, M., Karamloo, F., Franke, S., Hoffmann, A., Hausteiner, D., Vieths, S., 1999. Cross-reactivity and epitope analysis of Pru a 1, the major cherry allergen. *Mol Immunol* 36, 155–167. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(99)00033-4)
- Schneider, A., Wiesner, R.J., Grieshaber, M.K., 1989. On the role of arginine kinase in insect flight muscle. *Insect Biochem* 19, 471–480. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(89\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0020-1790(89)90029-2)
- Shen, H.W., Cao, M.J., Cai, Q.F., Ruan, M.M., Mao, H.Y., Su, W.J., Liu, G.M., 2012. Purification, cloning, and immunological characterization of arginine kinase, a novel allergen of octopus fangshiao. *J Agric Food Chem* 60, 2190–2199. <https://doi.org/10.1021/jf203779w>
- Shi, X., Wang, Lingling, Zhou, Z., Yang, C., Gao, Y., Wang, Leilei, Song, L., 2012. The arginine kinase in Zhikong scallop *Chlamys farreri* is involved in immunomodulation. *Dev Comp Immunol* 37, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.008>
- Simonis, D., Chin, M., 2015. Physiological Characterization of Arginine Kinase Found in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB Journal* 29, 720–725.
- Singh, S.K., Girschick, H.J., 2003. Tick – host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Curr Sci* 85, 1284–1298.
- Sonenshine, D.E., Roe, R., 2014. *Biology of Ticks*, 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- Sookrung, N., Chaicumpa, W., Tungtrongchitr, A., Vichyanond, P., Bunnag, C., Ramasoota, P., Tongtawe, P., Sakolvaree, Y., Tapchaisri, P., 2006. *Periplaneta americana* arginine kinase as a major cockroach allergen among the patients with major cockroach allergies. *Environ Health Perspect* 114, 875–880. <https://doi.org/10.1289/ehp.8650>
- Stanfield, R., Hassig, C., Schulze-ccahmen, U., Densley, W., 1991. Molecular design and modeling: concepts and applications. Part B. Antibodies and antigens, nucleic acids, polysaccharides, and drugs. *Methods Enzymol* 203, 1–764.
- Straily, A., Drexler, N., Cruz-Loustaunau, D., Paddock, C.D., Alvarez-Hernandez, G., 2016. Community-based prevention of rocky mountain spotted fever — Sonora, Mexico, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 65, 1302–1303. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6546a6>
- Strimbu, K., Tavel, J.A., 2010. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5, 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328333ed177>
- Süss, J., Klaus, C., Gerstengarbe, F., Werner, P.C., 2008. What Makes Ticks Tick? *Climate*

Change, Ticks, and Tick-Borne Diseases. *J Travel Med* 15, 39–45.
<https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2007.00176.x>

- Sweeney, H.L., 1994. The importance of the creatine kinase reaction: the concept of metabolic capacitance. *Med Sci Sports Exerc* 26, 30–6.
- Szabó, M.P.J., Mangold, A.J., João, C.F., Bechara, G.H., Guglielmone, A.A., 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet Parasitol* 130, 131–140.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.008>
- Tanaka, K., Ichinari, S., Iwanami, K., Yoshimatsu, S., Suzuki, T., 2007. Arginine kinase from the beetle *Cissites cephalotes* (Olivier). Molecular cloning, phylogenetic analysis and enzymatic properties. *Insect Biochem Mol Biol* 37, 338–345.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.12.006>
- Untalan, P.M., Guerrero, F.D., Haines, L.R., Pearson, T.W., 2005. Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 141–151. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2004.10.009>.
- Valera-Vera, E.A., Concepción, J.L., Cáceres, A.J., Acevedo, G.R., Fernández, M., Hernández, Y., Digirolamo, F.A., Duschak, V.G., Soprano, L.L., Pereira, C.A., Miranda, M.R., Gómez, K.A., 2021. IgE antibodies against *Trypanosoma cruzi* arginine kinase in patients with chronic Chagas disease. *Mol Immunol* 138, 68–75.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.06.024>.
- van Nunen, S., 2015. Tick-induced allergies: Mammalian meat allergy, tick anaphylaxis and their significance. *Asia Pac Allergy* 5, 3–16. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2015.5.1.3>.
- Varghese, A., Raina, O.K., Chandra, D., Mirdha, B.R., Kelawala, N.H., Solanki, J.B., Kumar, N., Ravindran, R., Arun, A., Rialch, A., Lalrinkima, H., Kelawala, R.N., Samanta, S., 2017. Sero-detection of *Toxocara canis* infection in human with *T.canis* recombinant arginine kinase, cathepsin L-1 and TES-26 antigens. *Acta Parasitol* 62, 775–778.
<https://doi.org/10.1515/ap-2017-0093>.
- Verhoeckx, K.C.M., Broekhoven, S. Van, Hartog-jager, C.F. Den, Gaspari, M., Jong, G.A.H. De, Wichers, H.J., Hoffen, E. Van, Houben, G.F., Knulst, A.C., 2014. House dust mite (Der p 10) and crustacean allergic patients may react to food containing Yellow mealworm proteins. *Food and Chemical Toxicology* 65, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.049>.
- Vu Hai, V., Almeras, L., Audebert, S., Pophillat, M., Boulanger, N., Parola, P., Raoult, D., Pages, F., 2013. Identification of salivary antigenic markers discriminating host exposition between two European ticks: *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor reticulatus*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 36, 39–53. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2012.09.003>.
- Wang, Z., Qiao, Z., Ye, S., Zhang, R., 2015. Structure of a double-domain phosphagen kinase reveals an asymmetric arrangement of the tandem domains. *Acta Crystallogr., Sect. D* 71, 779–789. <https://doi.org/10.2210/PDB4RF6/PDB>.
- Wu, Q.Y., Li, F., Zhu, W.J., Wang, X.Y., 2007. Cloning, expression, purification, and characterization of arginine kinase from *Locusta migratoria manilensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 148, 355–362.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.002>.

- Wu, X., Ye, S., Guo, S., Yan, W., Bartlam, M., Rao, Z., 2010. Structural basis for a reciprocating mechanism of negative cooperativity in dimeric phosphagen kinase activity. *Faseb J.* 24, 242–252. <https://doi.org/10.2210/PDB3JU5/PDB>.
- Wuthrich, K., 1990. Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)45665-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)45665-7).
- Yang, Y., Cao, M.J., Alcocer, M., Liu, Q.M., Fei, D.X., Mao, H.Y., Liu, G.M., 2015. Mapping and characterization of antigenic epitopes of arginine kinase of *Scylla paramamosain*. *Mol Immunol* 65, 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.02.010>.
- Yang, Y., Liu, G.Y., Yang, H., Hu, M.J., Cao, M.J., Su, W.J., Jin, T., Liu, G.M., 2019. Crystal structure determination of *Scylla paramamosain* arginine kinase, an allergen that may cause cross-reactivity among invertebrates. *Food Chem* 271, 597–605. <https://doi.org/10.2210/PDB5ZHQ/PDB>.
- Yoder, J.A., Benoit, J.B., Rellinger, E.J., Tank, J.L., 2006. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. *Med Vet Entomol* 20, 365–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00642.x>.
- Zhang, Z., Li, X.M., Wang, H., Lin, H., Xiao, H., Li, Z., 2023. Seafood allergy: Allergen, epitope mapping and immunotherapy strategy. *Crit Rev Food Sci Nutr*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2181755>.
- Zhao, X., Li, G., Feng, X., Cheng, Q., Lu, Z., Gu, R., Lu, J., Liu, W., 2021. Physicochemical characterization and linear epitopes identification of arginine kinase allergen from *Crassostrea gigas*. *J Sci Food Agric*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11691>.
- Zhou, G., Ellington, W.R., Chapman, M.S., 2000. Induced fit in arginine kinase. *Biophys J* 78, 1541–1550. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76706-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76706-3)