



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**"CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE LA VITELOGENINA
DE *Boophilus microplus* MEXICANAS Y SU EVALUACIÓN
COMO INMUNÓGENO EN GANADO"**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

GABRIELA GRANJENO COLÍN

TUTOR: DR ZEFERINO GARCÍA VÁZQUEZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA EDDA SCIUTTO CONDE

DR JULIO V. FIGUEROA MILLÁN

México, Distrito Federal

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

La presente investigación va dedicada a la memoria de dos mujeres, que en esencia, hoy, me acompañan.....

Mi Madre, Luz Colín Vázquez y Mi hermana, Georgina Granjeno Colín. Por su valor ante la adversidad, por su inquebrantable espíritu de lucha y de trabajo, por su apoyo, su confianza e inmenso cariño hacia mí. Por motivarme a perseguir y culminar este sueño, por la confianza en un futuro mejor..... Porque estén, muy cerca de Dios.

Con todo mi cariño a lo más valioso que tengo..... mi familia.

Mi Padre, por enseñarme a seguir siempre adelante, y formar mujeres exitosas.

Mis hermanas, Andrea Elizabeth, Rocío Adriana y Eva Graciela. Por su fortaleza y apoyo en los momentos más difíciles que hemos vivido, por los momentos más hermosos compartidos, porque seguimos juntas siempre adelante. Gracias por el mejor regalo.....Mis Sobrinos.

Mis sobrinos: Luz Andrea, David Jair, Luís Roberto, Sebastián y Edson Daniel. Con todo mi cariño, por todos los momentos que nos hacen vivir, porque en ellos se han reunido los más bellos sentimientos. Por ser los Granjeno corregidos y aumentados.

A los hermanos, que mis hermanas me eligieron Roberto y Ciro David.

A Elizabeth, mi amiga de siempre, por su amistad y su visión positiva de la vida, por tantos momentos robados.

A la Dra Graciela Guadalupe Tapia Pérez, por su amistad, por mostrarme el lado positivo de cada situación y enseñarme que es cierto, lo que no mata te hace mucho más fuerte, por sus palabras de aliento en los momentos más dolorosos que he vivido. Por introducirme al maravilloso mundo del doctorado.

A la Dra Guillermina Ávila Ramírez, por ser un rayo de luz, cuando el cielo se nubla, por su tiempo invertido por su apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr Zeferino García Vázquez, por el apoyo para hacer realidad este sueño, por su confianza en mí para hacerlo, por motivarme a levantarme en tantas ocasiones en las que me derrube, por su amistad.

El mayor de mis agradecimientos al Dr Rubén Hernández Ortiz, por regalarme el sueño de esta investigación, por su participación y por el enriquecimiento con sus comentarios en la realización de la misma, por su amistad y su compañerismo

Al Dr Juan Mosqueda, por su apoyo desinteresado y sus sugerencias durante el desarrollo de mi trabajo.

Al Dr Sandino Estrada Mondaca, por su apoyo en la realización de esta tesis en los momentos más difíciles, por la motivación para seguir adelante, por su amistad.

A los Drs Edda Sciutto y Julio Figueroa Millán por sus aportaciones para enriquecer esta investigación.

A los miembros del jurado: Dra María Teresa Quintero Martínez, y a los Drs Alfredo Sahagún Ruiz, Rogelio Alonso Morales, Fernando Alba Hurtado, por sus sugerencias a esta investigación.

A la MC Patricia Vargas Uriostegui, MC Verónica Marusa Borgonio Cuadra, Dra Minerva Camacho Nuez, MC Rocío Soledad Argotte Ramos, MC Edgar Castro Saines y al MVZ Juan Diego Pérez de la Rosa, por su asesoría técnica y sugerencias para el enriquecimiento de esta investigación, por su tiempo y amistad.

A los Doctores: Martín López Rojas, Miguel Ángel García Ortiz, Alfonso Falcón Neri, Juan Alberto Ramos Aragón, Jesús Antonio Álvarez Martínez, Francisco Preciado de la Torre, Edmundo Rojas Ramírez, por compartir conmigo sus experiencias y conocimientos, por sus alientos para continuar adelante hasta llegar al final.

A mis compañeros estudiantes: Gabriela Aguilar Tipacamú, Georgina Hernández, Aurora Hidalgo Castillo, Rodrigo Vichido Chávez, porque es más importante la amistad, el compañerismo y el apoyo, por ser la parte agradable del trabajo del laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia me permitió realizar mis estudios. Beca CONACYT número 176415.

Al CENID-PAVET-INIFAP, por las facilidades proporcionadas para la realización de esta investigación, en el laboratorio de Artropodología.

INDICE

	PÁGINA
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	34
FIGURAS.....	41
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES.....	75
LITERATURA CITADA.....	76
APÉNDICE.....	87

RESUMEN.

La vitelogenina (Vg), precursor de la vitelina, la proteína del huevo de insectos y otros artrópodos se ha considerado como inmunógeno. Al evaluar su capacidad inmunogénica en borregos presentó efectos protectores del 68% al ser desafiados con garrapatas *Boophilus microplus*. Se planteo la hipótesis de que existen diferencias entre la secuencia del gen que codifica Vg en poblaciones de *Boophilus microplus* mexicanas comparadas con secuencias reportadas en garrapatas de otras partes del mundo, además que la vitelogenina recombinante obtenida de cepas nativas mexicanas y aplicada como inmunógeno, es antigénica en ganado bovino. Los objetivos del estudio fueron clonar, secuenciar y expresar una proteína recombinante en células eucariontes, el producto del gen de Vg y evaluar la capacidad antigénica de la proteína recombinante en bovinos. Se obtuvieron intestinos y ovarios de garrapatas adultas *Boophilus microplus* cepa "Media Joya" y fue aislado RNAm, del cual se sintetizó el DNAC utilizando un kit comercial. El diseño y síntesis de oligonucleótidos para la amplificación del gen de la vitelogenina se llevó a cabo con base en secuencias reportadas en el Gen Bank. Para la técnica de PCR se utilizó DNAC y los productos obtenidos fueron clonados en el vector TOPO 2.1 TA. Se transformaron células competentes *E. coli* TOP 10. El plásmido con el inserto fue purificado, secuenciado y analizado en forma en el IBT y por computadora con el software VECTOR NTI. La secuencia fue insertada en el vector de transporte pBlue-Bac His V5, el cual sirvió para subclonartransformar un baculovirus y co-transfectar en células eucariontes línea Sf9 de *Spodoptera frugiperda*. La proteína recombinante inoculada en bovinos generó una respuesta inmunogénica, la cual fue medida mediante el ensayo de Western blot.

Palabras clave: *Boophilus microplus*, vitelogenina, inmunógeno.

ABSTRACT

The vitellogenin (Vg) precursor of vitellin, which is the protein of the insect eggs and other arthropods has been considered as a potential immunogen. The evaluation of Vg as immunogen on *Boophilus microplus* infested sheep showed overall protection of 68%. The objectives of this study were to clone, to sequence and to express *in vitro* a recombinant protein (Vg) in eukaryotic cells, and to evaluate its immunogenic capacity in cattle. mRNA was isolated from adult *B. microplus* tick midgut and ovaries using Media Joya strain and cDNA was synthesized with a commercial kit. The primers used were derived from sequences previously reported in the GeneBank. PCR was carried out in order to amplify and clone the cDNA in TOPO 2.1 TA plasmid, then *E coli* TOP 10 cells were transformed and the plasmid containing the insert was purified and sequenced. The purified cDNA fragment was inserted in pBlue-Bac His V5 vector plasmid and the transformation was carried out within the baculovirus system by co-transfection in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cell line. The recombinant protein was purified by affinity chromatography and it was inoculated in cattle which showed an immunological response as determined by Western blot analysis. It is concluded that the isolated Vg gene expressed as a recombinant protein is well conserved since BLAST analysis showed 99% homology compared with the previous reported sequence, also that the protein is able to induce antibody specific response in cattle. Recombinant Vg could be considered as a potential immunogen for the control of the common cattle tick.

Keywords: *Boophilus microplus*, vitellogenin, immunogen

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas ixodidas son los artrópodos más importantes para la industria ganadera en México por los daños directos que producen, por ser vectores de agentes infecciosos de animales domésticos o silvestres, además son los segundos vectores más importantes de patógenos al hombre. La industria ganadera anualmente estima pérdidas económicas en cientos de millones de dólares debido al daño causado por las garrapatas y a la transmisión directa de enfermedades (Wikel, 1988; Mulenga, 1999). En Australia, las pérdidas en la producción ganadera por causas de garrapatas se estiman entre 100 y 150 millones de dólares por año (Rodríguez, 2001). Los daños económicos ocasionados por las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* a los bovinos, se ven reflejados en la reducción en la producción de carne, leche, cuero y en la muerte de los animales. Se ha estimado que en México en el período comprendido entre 1975-1981, las pérdidas en la producción de carne fueron de aproximadamente 617.5 millones de dólares (Woodham *et al.*, 1983). Las pérdidas económicas se ven incrementadas por dos enfermedades transmitidas por garrapatas a los bovinos que son motivo de preocupación en América y particularmente en México, la babesiosis y la anaplasmosis bovina (Soulsby, 1987; Vega, 1991), así como también los gastos de tratamiento, el manejo especial y paliativos en la convalecencia de los animales afectados. Estas enfermedades se consideran endémicas, donde el aislamiento del agente etiológico es común, pero en muchos casos no se cuenta con los registros adecuados o confiables en cuanto al número de ganado afectado (Alvarez y Cantó, 1985).

En ambas enfermedades las pérdidas son atribuibles a factores tanto de morbilidad como de mortalidad (Toro, 1994) y están asociadas con fiebre hemolítica progresiva, siendo menos severas en animales jóvenes que en adultos (Alvarez y Cantó, 1985), los animales afectados se caracterizan por una baja ganancia de peso, la disminución en la producción láctea y aborto o muerte neonatal (Toro, 1994). En el caso de las vacas lecheras los abscesos están involucrados en el daño y la pérdida de la producción láctea (Quiroz, 1991). El daño causado por las garrapatas depende de la cantidad de

ingestión de sangre en sus distintas etapas de desarrollo (Lodos *et al.*, 2000). La adaptación de las garrapatas a climas extremos (por ejemplo se alimentan de pingüinos en el Antártico y lagartos en el trópico), y la diversidad de hospederos en los cuales se pueden alimentar (mamíferos, aves y reptiles), la hacen altamente exitosa (Wang, 1999).

La presencia de las garrapatas y las enfermedades que transmiten reducen las posibilidades de producir proteína de origen animal para el consumo nacional, ocasionando problemas para la exportación del ganado y consecuentemente pérdidas económicas para el país (Vega, 1991).

Una de las formas de control de la garrapata del ganado, incluye el uso de razas de ganado productor de carne y leche resistentes a la garrapata, así como el manejo del pastoreo, la movilización del ganado en pastoreo para reducir la posibilidad de encuentro con la garrapata y disminuir la sobrevivencia y la reproducción de éstas (Jonsson *et al.*, 2000). También se ha utilizado la quema controlada de potreros, y el control biológico por hongos o nematodos (Nolan y Schnitzerlin, 1986).

HIPÓTESIS

Existen diferencias en la secuencia del gen que codifica para la vitelogenina en cepas de *Boophilus microplus* mexicanas comparadas con secuencias reportadas en cepas de garrapatas de otras partes del mundo.

La vitelogenina recombinante obtenida del gen que codifica a partir de cepas nativas mexicanas y aplicada como inmunógeno, confiere protección al ganado bovino.

OBJETIVOS

- 1.) Clonar y secuenciar un fragmento del gen de la vitelogenina a partir de ovarios e intestinos de garrapatas *B. microplus*.
- 2.) Expresar la vitelogenina recombinante en células eucariontes, producto del gen clonado.
- 3.) Evaluar la capacidad de suero anti-vitelogenina producido en bovinos sobre el índice reproductivo de garrapatas *Boophilus microplus* alimentadas *in vitro*.

JUSTIFICACIÓN

La vitelogenina es una proteína esencial para el desarrollo del embrión en garrapatas *Boophilus microplus*, y abundante tanto en el huevo como en ovarios, así como en el intestino de garrapatas adultas donde se sabe que es sintetizada. La interrupción en la producción de Vg provoca disfunción en el desarrollo embrionario.

Se plantea la hipótesis que existe diferencia en la secuencia de aminoácidos de la Vg en las poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus* de México comparada con las reportadas en las diferentes partes del mundo. Considerando que la secuencia de vitelogenina, fue obtenida de una cepa de Australia y si los experimentos que han realizado utilizando vitelogenina proveniente de *Boophilus microplus* de garrapatas de Australia ha inducido una respuesta inmune en el hospedero, es muy probable que la Vg de garrapatas *Boophilus microplus* mexicanas puedan también inducir una respuesta inmunológica, pero se podría encontrar algunas diferencias en la secuencia, lo que podría influenciar la protección a garrapatas *Boophilus microplus* heterólogas (Tellam *et al.*, 2002). Los estudios de vitelogenina realizados hasta la fecha se llevaron a cabo en ovinos el cual no es el hospedero natural, por lo tanto resulta primordial realizarlo en bovinos, para obtener información confiable sobre la capacidad antigénica de Vg como inmunógeno protector en infestaciones de *Boophilus microplus*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Control químico de la garrapata *Boophilus microplus*

El método de control convencionalmente usado contra *B. microplus* ha sido el uso de ixódicidas químicos, con resultados exitosos. Las familias de ixódicidas utilizados para el control químico de *B. microplus* son: organosfosforados, piretroides, amidinas, fenilpirazolonas, endectocidas e inhibidores del desarrollo. La resistencia en contra de estos ixódicidas debido a su uso ha seleccionado poblaciones resistentes y se ha hecho presente en diversas partes del mundo incluyendo a México (Foil *et al.*, 2004). Actualmente se ha diagnosticado resistencia a los organosfosforados, piretroides, amidinas y endectocidas en diversas regiones del mundo. Adicionalmente, estos tratamientos implican desventajas tales como la presencia de residuos en leche y carne. El continuo uso de ixodidas ha seleccionado cepas resistentes de garrapatas (Boué *et al.*, 1999), además de costos altos y dificultad para ser eliminados por el ganado (Lodos *et al.*, 2000). Hay reportes de diferentes grados de resistencia a las principales familias de ixodidas a los que puede ser resistente la garrapatas *B. microplus* (Wikel, 1988). Existen evidencias de cepas de garrapatas resistentes a ixodidas en diferentes regiones del mundo incluyendo México y esto ha complicado su control (García-García *et al.*, 1999).

La resistencia a acaricidas ocurre mas rápidamente en la garrapata de un sólo hospedero del género *Boophilus*. Sin embargo, la resistencia también es expresada en garrapatas de múltiples hospederos (Wikel, 1988).

Con el problema del desarrollo de resistencia por la garrapata a los acaricidas y la persistencia de residuos químicos en los productos de origen animal, los métodos inmunológicos son considerados una alternativa sustentable para el control de éste parásito (Willadsen *et al.*, 1989). Así, el uso de vacunas ha sido una alternativa de interés, existiendo en el mercado una que fue desarrollada a partir de intestinos de garrapata *B. microplus*, es una vacuna recombinante basada en la proteína Bm86. Surge esta vacuna cuyos

resultados no han sido favorables debido a que su efectividad ha sido comparada con la de los ixodicidas, pero es una alternativa para evitar el desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas.

Inmunidad natural contra garrapatas

En condiciones naturales la respuesta del hospedero ante la agresión del artrópodo consiste en reparar el daño y eliminar el parásito, lo cual se ve reflejado en una reacción de hipersensibilidad inmediata en el sitio de fijación por infiltración de neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Se presenta una degranulación de las células cebadas con liberación de histamina, produciendo un desprendimiento de un gran número de larvas en las primeras horas después del contacto, principalmente en animales que han adquirido inmunidad, además se observa una respuesta de un proceso de coagulación en el sitio donde se fija la garrapata con el fin de reparar la lesión (Preston y Jongejan, 1999). Sin embargo, evidencias recientes en *Rhipicephalus appendiculatus* han identificado proteínas con una alta afinidad a la histamina, posiblemente como mecanismo para contrarrestar el efecto de rechazo del hospedero (Willadsen y Jongejan, 1999).

Se ha reportado que el suero de animales expuestos a garrapatas reconoce varios antígenos, algunos con reacción cruzada entre especies, se desconoce si provocan protección cruzada, ya que los antígenos protectivos de la inmunidad natural no han sido identificados (Willadsen y Jongejan, 1999). Se debe mencionar que la respuesta inmune con la producción de anticuerpos no siempre es protectora y que los hallazgos en ratones y conejos no son extrapolables a los bovinos. Es difícil diferenciar reacciones inmunológicas protectoras de aquellas que no confieren protección (Willadsen y Jongejan, 1999).

Antígenos crudos y de glándulas salivales

Los primeros intentos para inmunizar bovinos contra garrapatas consistieron en inocular macerados de extractos crudos del parásito completo,

evidentemente había respuestas variables de protección, ya que el hospedero estaba expuesto a un gran número de antígenos difíciles de identificar (Trager, 1939). Intentos posteriores se encaminaron a imitar la infestación natural con la finalidad de estimular la respuesta inmune, principalmente con glándulas salivales completas y extractos derivados de éstas, ya que son los antígenos (Ag's) que tienen contacto con el hospedero bovino mamífero (Wikel, 1988).

En bovinos expuestos a extractos de glándulas salivales de *Dermacentor andersoni*, se produce histamina la cual altera la alimentación de garrapatas y ha sido asociada a la inmunidad del ganado a posteriores infestaciones. Es posible que basófilos y eosinófilos puedan tener influencia en los sitios de fijación del parásito al hospedero, donde se presentan altos niveles de histamina. Los leucocitos pueden causar daño directo al tejido del parásito o presentar signos nerviosos que afectan la repleción (Wikel, 1988).

Métodos inmunológicos

La vacunación con Ag's específicos ofrece la oportunidad de inducir protección sin inmunosupresión, como ocurre en el caso de infestaciones naturales donde se adquiere inmunidad pero con un alto costo para el hospedero (Willadsen, 2001).

Idealmente una vacuna debe contener dos o más antígenos que deriven de diferentes etapas de vida parásita de la garrapata, para que la vacuna induzca inmunidad en el hospedero, y a la vez, éste tenga un mayor número de oportunidades de dañar al parásito que se alimenta de sangre, en sus diferentes estadios (Tellam *et al.*, 2002).

Las vacunas ofrecen un número de ventajas sobre los ixodicidas convencionales para el control de artrópodos, por ejemplo el efecto protector por inmunización puede ser más largo y sin complicación de residuos, las vacunas son seguras en el ambiente, son específicas en los sitios blancos y el control de los artrópodos mediante la vacunación es una alternativa para evitar el desarrollo de resistencia a los productos químicos (Pruett, 1999).

El control del parásito por vacunación tiene la posibilidad de que desarrollar inmunidad en el hospedero hacia los artrópodos previniendo tanto daños directos como indirectos así como la transmisión de patógenos (Pruett, 1999).

Antígenos ocultos

El término antígenos ocultos fue usado en 1978, estos normalmente no están expuestos al sistema inmune del hospedero, presentan un amplio potencial de sitios blancos para el sistema inmune, que difieren de los restringidos a las moléculas expuestas inmunogénicas en la interacción normal hospedero-parásito. La ingestión de anticuerpos (Ac's), permite que lleguen a varios órganos del parásito, que en condiciones naturales no tienen contacto con el sistema inmune del hospedero (Willadsen, 2001) El desarrollo de vacunas con antígenos ocultos fue propuesto por Galun en 1978 (Lodos *et al.* 2000).

Varios investigadores han utilizado el intestino de garrapata, para inducir inmunidad en el ganado bovino. Las proteínas integrales de membrana en la superficie del lumen del intestino, demostraron ser una buena elección para la inducción de inmunidad en el hospedero a la alimentación del vector (Wikel, 1988; Jonsson *et al.*, 1986), demostraron que la vacunación del ganado con extractos de hembras adultas inducen inmunidad efectiva en contra el parásito (Lodos *et al.*, 2000).

Un Ag protector oculto fue aislado de las células epiteliales del intestino de *B. microplus*, este Ag fue llamado Bm86 (García-García *et al.*, 1999). El Ag Bm86 es una glicoproteína de la membrana, presente en poca abundancia en extractos de hembras adultas parcialmente repletas. Se indujo una protección efectiva con 100 µg de Bm86 en el ganado contra la garrapata (Willadsen *et al.*, 1989). La vacunación de ganado bovino con Bm86 y su posterior infestación con larvas de *B. microplus* provocó una respuesta reflejada en la lisis de las células epiteliales del intestino de la garrapata adulta, además de una

reducción en el número de las hembras que completan su ciclo de vida (García-García *et al.*,1999).

En 1996 la vacuna (TickGARD) elaborada con el Ag Bm86, fue nuevamente registrada como TickGARD Plus adicionando a la formulación un adyuvante modificado, en hatos vacunados se observó un aumento de dos a tres veces el título de Ac's y se presentó un efecto más prolongado de la inmunidad (Willadsen, 1997). Observaciones *in vitro* sugieren, que la presencia del complemento origina lisis de las células del intestino de la garrapata, porque el daño ocurre en ausencia de leucocitos de animales vacunados (Kemp *et al.*, 1985), ocasionado la disminución del número de hembras repletas, menor producción de huevo y reducción de la viabilidad, esta vacuna ha sido utilizada tanto en ganado productor de carne como de leche, resultando en una disminución del 56% en la cantidad de garrapatas en campo y un 72% en pruebas de establo (Jonsson *et al.*, 2000).

En un estudio realizado en 1992 por un período de dos años en hatos que presentaban un promedio de 5.7 casos de babesiosis por cada mil cabezas de ganado, después de la vacunación con Bm86 se presentó una reducción significativa en la transmisión de babesiosis y ésta era debida a la reducción de la infestación por *B. microplus* y por lo tanto el rango de inoculación de *Babesia* bajo, como se observó dos años después de la última vacunación en que se encontraron promedios de 1.5 casos por cada 1000 cabezas de ganado (Boué *et al.*, 1999).

Respuesta inmune del hospedero a la vacunación con Bm86

Después de la vacunación con Ag's purificados (Bm86), se estimula la producción de Ac's específicos y son principalmente de la clase IgG, los cuales activan al sistema de complemento a través de la vía clásica, formando el complejo de ataque a las membranas de las células epiteliales del intestino de la garrapata *B. microplus* (Willadsen *et al.*, 1989; Tizard, 1995; Boué *et al.*, 1999). Lo anterior conduce a la lisis de las células intestinales las cuales se especializan en endocitosis y digestión del alimento sanguíneo, incrementándose la salida drástica del material orgánico del intestino hacia el

hemocele de la garrapata (Willadsen *et al.*, 1989; García-García *et al.*, 1999; Boué *et al.*, 1999; Lodos *et al.*, 2000).

Estas reacciones conducen a la muerte de algunas hembras repletas y en las sobrevivientes provocan alteraciones en la oviposición, lo cual afectará la eclosión de larvas. Estos efectos son medidos experimentalmente por el decremento en la producción de garrapatas adultas, reducción en el peso de las hembras repletas y una reducción o eventual inhibición de la oviposición de las garrapatas hembras que sobreviven (Willadsen *et al.*, 1989; Willadsen, 1997).

Como otras alternativas para inducir el control a las garrapatas por inmunización se han utilizado Ag derivados de glándulas salivales con la finalidad de estimular la respuesta inmunológica en el hospedero (Wikel, 1988).

La vitelogenina como inmunógeno

La vitelogenina (Vg) es una hemoglicoproteína de la hemolinfa en garrapatas adultas (Gudderra *et al.*, 2002). La Vg, es la proteína fundamental de la yema en los huevos de los insectos. Las vitelogeninas son generalmente grandes glicofosfolipoproteínas oligoméricas compuestas de monómeros o dímeros (James *et al.*, 1997). La Vg de la garrapata *Dermacentor variabilis*, contiene del 5.5% a 8.5% de lípidos y 4.5% de carbohidratos (Gudderra *et al.*, 2002). El peso molecular de la Vg varía de 210 a 652 kDa. Los grandes rangos de subunidades de Vg son de 150 a 200 kDa y pequeñas subunidades de 40-65 kDa (Salerno *et al.*, 2002). La Vg de *D. variabilis* consiste de dos proteínas nativas Vg-A (330 kDa) y Vg-B (320 kDa) y comprenden 7 subunidades de 22 a 215 kDa de peso molecular (Gudderra *et al.*, 2002). Vg es una proteína muy importante dentro de la fisiología de *B. microplus*, ya que participa en actividades vitales como la formación de la yema que sirve de alimento a los cigotos y posteriormente a los embriones. La interrupción en la producción de Vg provoca la disfunción de las células intestinales, y varias de las actividades primordiales de la garrapata (Tellam *et al.*, 2002).

La Vg es una proteína, que es sintetizada en el ovario, los cuerpos grasos de los insectos (Salerno *et al.*, 2002), y en *D. variabilis* en los cuerpos grasos y en el intestino medio (Rosell y Coons, 1991). En las especies donde la Vg es sintetizada en el ovario, el proceso es completado en uno de los cuerpos grasos (Salerno *et al.*, 2002) y posteriormente transportada por la hemolinfa al ovario (Sankhon *et al.*, 1999; Salerno *et al.*, 2002). La síntesis complementaria de Vg por el ovario, fue demostrada en varios insectos como: *Thermobia domestica*, *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica*, *Calliphora erythrocephala*, *Leptinotarsa decemlineata* y *Coccinella septempunctata*. La mosca del establo *Stomoxys calcitrans*, no produce la proteína de la yema en la grasa corporal, su síntesis ocurre extensamente en los ovarios. Recientemente fue demostrado el proceso en *Rhodnius prolixus* donde las células epiteliales de los grandes folículos tienen la capacidad de sintetizar Vg en el ovario (O-Vg) (Salerno *et al.*, 2002). En la garrapata *D. variabilis* (Sankhon *et al.*, 1999) y *Armadillum vulgare*, los cuerpos grasos son el sitio de producción de Vg. En el cangrejo de tierra *Potamo potamios*, el hepatopáncreas y los ovarios son el sitio de síntesis de Vg (Gudderra *et al.*, 2002).

La vitelogenina ha sido localizada en las células del retículo endoplásmico, los gránulos secretores, productos secretores de los trofocitos de los cuerpos grasos y las células vitelogénicas del intestino medio de las garrapatas hembras que se alimentan o las que ovipositan. También fue localizada en los cuerpos de la yema durante alimentación u oviposición (Rosell y Coons, 1992).

Al salir la vitelogenina de los cuerpos grasos, ocurren modificaciones adicionales, las más comunes son la glicosilación la cual es esencial para la maduración y secreción de Vg por la hemolinfa, posteriormente la fosforilación después de la endocitosis como reportan en *Ornithodoros moubata*, *Blattella germanica* y *Locusta migratoria*, y finalmente sufre la proteólisis (James *et al.*, 1997; Salerno *et al.*, 2002), la cual se lleva a cabo durante el pasaje de la vitelogenina dentro de la hemolinfa y sobre el receptor mediando la endocitosis (Tellam *et al.*, 2002). Lo anterior fue evidenciado por la presencia de

estructuras celulares tales como capas vesiculares asociadas con la endocitosis. Este proceso genera subunidades de Vg lo cual ocurre en los cuerpos grasos (Sankhon *et al.*, 1999); las subunidades de Vg que se generan posteriormente son almacenadas en formas cristalinas y convertida en vitelina (Vt) (James *et al.*, 1997; Salerno *et al.*, 2002).

La vitelogénesis es el proceso de la producción de yema en insectos y otros artrópodos. Esto incluye la producción de precursores de la proteína de la yema y las vitelogeninas de origen extraovárico, tales como los que se producen en cuerpos grasos (James *et al.*, 1997). El cuerpo graso, es la fuente de las proteínas, las cuales provienen casi en su totalidad de la hemolinfa, éste durante la vitelogénesis, sintetiza y libera una gran cantidad de proteínas específicas de la hembra o vitelogeninas, que son acumuladas selectivamente por los oocitos terminales (Llanderal, 2000).

Durante la vitelogénesis los oocitos son expuestos a una rápida tasa de crecimiento (Salerno *et al.*, 2002). A medida que el oocito crece, aparecen gránulos y vacuolas de material de reserva en su plasma, que principalmente consiste en proteínas, grasas y carbohidratos. Durante éste período, el oocito acumula los materiales de reserva o yema. Por lo general la vitelogénesis ocurre en un extremo del ovario (Sankhon *et al.*, 1999), sólo en el oocito terminal que es el mas cercano al oviducto (Llanderal, 2000), el cual incrementa su volumen en el proceso notablemente. La yema está compuesta de vacuolas conocidas como esferas de la yema y entre éstas hay proteínas, lípidos y carbohidratos, estos últimos representados por una pequeña cantidad de glucógeno. También se detectan pequeñas cantidades de ácidos nucleicos (Llanderal, 2000). Este proceso ocurre por la acumulación de biomoléculas para el desarrollo de oocitos. Estas pueden ser el origen de la energía y los bloques de construcción para el desarrollo del embrión (Salerno *et al.*, 2002).

En la garrapata *Ixodes scapularis*, la actividad sintética de la vitelogenina ocurre durante el período de alimentación (James *et al.*, 1997) y repleción (Rosell y Coons, 1991; Toro-Ortíz *et al.*, 1997), seis días después de la caída, la síntesis se incrementa con el proceso de la oviposición que ocurre

dos días posteriores al desprendimiento del hospedero (James *et al.*, 1997). La oviposición es considerada la etapa más productiva. Este proceso es asociado con la iniciación de la elaboración de la proteína y participan los trofocitos de los cuerpos grasos, las células vitelogénicas del intestino medio y los oocitos (Rosell y Coons 1992), observándose un incremento gradual en el título de Vg en la hembra. Los títulos de vitelogenina caen rápidamente, justo al final de la oviposición, y próxima a la muerte de la garrapata (Rosell y Coons, 1991).

Casi todos los organismos son capaces de sintetizar su propio grupo heme, con excepción de algunas bacterias patógenas de vertebrados. Recientemente fue descubierto que *B. microplus* es incapaz de sintetizar el grupo heme y lo obtiene por la degradación de la hemoglobina obtenida del hospedero, el grupo heme es necesario para su propio desarrollo. Durante la evolución de la garrapata, posiblemente haya desarrollado un mecanismo para reciclar al grupo heme, debido a que se ha demostrado que los huevos de *B. microplus* tienen proteinasas capaces de unirse al grupo heme y existen evidencias que dicho mecanismo modula ésta actividad hacia el sustrato fisiológico. Debido a que se encontró la primera proteinasa que es regulada por el grupo heme para la degradación de hemoglobina de la ingestión de sangre ingerida (Sorgine *et al.*, 2000). Los artrópodos hematófagos tienen poca eliminación de los derivados del grupo heme de la sangre que ingieren, el grupo es catalizado para la formación del oxígeno reactivo de muchas especies. En las garrapatas adultas ésta asociado a su metabolismo, el grupo heme ingresa con la sangre ingerida por el parásito y por la tanto participa en la oxigenación de las células de la hemolinfa y transporte de proteínas. La unión del grupo heme a la Vt de la garrapata quizá sirve para neutralizar la reacción oxidativa y actuar como sistema para la oviposición de los huevos de las hembras (Tellam *et al.*, 2002).

La Vt puede ser un portador de proteína del grupo heme (Tellam *et al.*, 2002). Una característica de las vitelinas es que todas tienen proteínas heme requeridas para el crecimiento del embrión de las garrapatas. Este grupo también es necesario para la síntesis de aminoácidos de nuevas proteínas. La

degradación de Vt puede ser regulada de acuerdo a las necesidades del grupo heme del embrión (Sorgine *et al.*, 2000).

Durante la vitelogenesis en *Rhipicephalus sanguineus*, *Ornithodoros moubata* y *Boophilus microplus*, se encuentran asociadas hemoproteínas y hemoglicoproteínas, dentro de éstas últimas la proteína transportadora del grupo heme (DvCP), que contiene colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos libres, es una proteína ubicua, predominante de la hemolinfa, que aparentemente se encuentra en los cuerpos homogenantes del huevo, las larvas alimentadas y no alimentadas y las hembras durante el proceso de vitelogénesis. En *D. variabilis*, se cree que funciona como biliproteína que secuestra al grupo heme o como almacén de proteínas en insectos. Sin embargo, su función exacta se desconoce (Gudderra *et al.*, 2002).

En insectos y garrapatas, las hormonas conocidas como ecdiesteroides están involucradas en la producción de Vg, donde controlan la degeneración de las glándulas salivales y la muda en el argásido *Ornithodoros moubata*. Presumiblemente el incremento de ecdiesteroides inicia la producción de Vg. En *D. variabilis*, los niveles de esta hormona se incrementan durante la alimentación y oviposición (Sankhon *et al.*, 1999).

En garrapatas duras, en un estudio reciente, se demostró que un neuropéptido del singlanglión estimula la producción de ecdiesteroides en hembras *Amblyoma hebraeum*. Otra investigación reportó que un péptido del singlanglión en la familia Argasidae o garrapatas blandas, estimulan la producción de Vg por los cuerpos grasos, no se conoce si actúa como ecdiesteroides (Sankhon *et al.*, 1999).

En garrapatas hembras *I. scapularis*, antes de la alimentación no se detectan los dos principales ecdiesteroides presentes durante la vitelogénesis, la ecdisona y 20-hidroxiecdisona. Seis días después de la infestación del hospedero, hay aumento de ecdiesteroides, que precede al incremento en la síntesis de Vg. Las concentraciones de Vg comienzan a incrementarse después de la interacción hospedero-parásito, culminando durante la repleción, el proceso disminuye totalmente al desprendimiento de la garrapata adulta del

hospedero para reiniciar dos días posteriores, durante el proceso de la oviposición (James *et al.*, 1997).

La 20-hidroxiecdisona, regula en menor proporción la síntesis de Vg, también se ha sugerido que la hormona juvenil, estimula la vitelogénesis, lo cual es medido por el tamaño y masa del huevo (Sankhon *et al.*, 1999)

La vitelina (Vt) es descrita como una lipoglicoproteína de la yema, formada de varios polipéptidos. Es sintetizada en la hembra a partir de un polipéptido precursor grande (vitelogenina M ~ 200 kDa), la cual es procesada en polipéptidos de vitelina por divisiones proteolíticas específicas (Tellam *et al.*, 2002). En *Bombyx mori* la Vt experimenta un proceso proteolítico después de la fosforilación por cAMP dependiente de la proteína quinasa. Durante la degradación de la Vt están implicadas diferentes enzimas proteolíticas que incluyen cistein proteinasas ácidas y catepsinas B y L, también están relacionadas proteinasas aspárticas. En *B. microplus* el precursor de la proteinasa aspártica (BYC), es propuesta para participar en la degradación de la Vt durante la embriogénesis (Sorgine *et al.*, 2000). La vitelina (Vt) ésta presente en altas concentraciones en oocitos donde es necesaria para satisfacer el papel nutricional en el desarrollo del embrión y como portador de hormonas incluidas en la embriogénesis (Tellam *et al.*, 2002).

La concentración de Vt en los ovarios comienza a incrementarse cuando la hembra empieza la rápida repleción (0.3 mg por hembra) y declina después de la oviposición (0.1 mg por hembra) (James y Oliver 1996). En *B. microplus* un aumento en el título de Vt ocurre durante la ovogénesis (Sankhon *et al.*, 1999). En *D. variabilis* el incremento de Vt es de 1.55 a 11.48 mg/ μ l (James y Oliver 1996; Sankhon *et al.*, 1999). La Vt ha sido reconocida en diferentes niveles y concentraciones en el embrión, intestino y extractos de glándulas salivales. La detección en glándulas salivales puede ser debido a la regurgitación demostrada en *Amblyomma americanum*, o a la porción de Vt sintetizada en el intestino, otra posibilidad es la absorción de Vt circulando en la hemolinfa hacia los tejidos de las glándulas.

Las Vg sintetizadas en el intestino y en los ovarios de *D. variabilis* son distintas, la diferencia radica en que la síntesis en el intestino es endógena y completa, mientras que la síntesis en el ovario es exógena y parcial, la proteína necesita viajar al intestino para completar su estructura y nuevamente ser incorporada al ovario (Toro-Ortiz *et al.*, 1997).

Recientemente han sido identificadas tres poblaciones de Vt en oocitos de *Rhodnius prolixus*, las poblaciones fueron llamadas Vt₁, Vt₂, Vt₃, y se caracterizan por la variación en el contenido de fosfato en cada población y puede ser explicada por la presencia de dos enzimas una fosfatasa ácida y caseinquinasa II presentes en los oocitos de *R. prolixus*, que son incluidas en el mecanismo de fosforilación y desfosforilación (Salerno *et al.*, 2002).

La presencia de glucosa en Vt₁ y Vg, en la hemolinfa sugieren que las vitelogeninas de los cuerpos grasos y ovarios son secretadas después que sus oligosacáridos son procesados en el aparato de Golgi. Entre los insectos no es frecuente la presencia de glucosa y la escasez y complejidad del carbohidrato parece ser común. El azúcar unida a las proteínas es reconocida por los oocitos (Salerno *et al.*, 2002).

La Vg y Vt tienen una estructura y conformación bioquímica (contenido de lípidos, carbohidratos y aminoácidos) muy similares en la mayoría de los insectos (Salerno *et al.*, 2002; James *et al.*, 1997); sin embargo, las vitelogeninas pueden diferenciarse de las vitelinas en la composición y cantidad total de lípidos (Salerno *et al.*, 2002; James *et al.*, 1997). En *Locusta migratoria*, se presenta un mayor porcentaje de diacilglicéridos y colesterol en Vg que en Vt. La composición de lípidos en la Vt aislada de los huevos de *Philosomia cyinthia* es diferente, en esta han tenido lugar la proteólisis para ser utilizada por los oocitos en la hemolinfa, la Vg aún no experimenta cambios conformacionales (James *et al.*, 1997).

La Vg de *B. microplus* ha sido evaluada como inmunógeno en borregos infestados con esta garrapata, con resultados satisfactorios por lo que es posible que los Ag's seleccionados utilizando estos hospederos puedan ser

aplicados a bovinos con mayor efecto debido a que el bovino es el hospedero habitual (Tellam *et al.*, 2002).

Al evaluar la capacidad inmunoprotectora entre vitelina purificada, una glicoproteína larval llamada GP80 y una proteína recombinante hexahis GP80 de *B. microplus*, los efectos protectores entre las dos primeras obtuvieron el 66-68% de reducción de larvas después de un ciclo de vida, mientras que con la proteína recombinante no hubo protección. La hexahis GP80 fue expresada en *E. coli* y la falta de protección en contra de larvas de *B. microplus* fue asociada al inadecuado plegamiento y ausencia de glicosilación de la proteína (Tellam *et al.*, 2002). Con la proteína Bm86 expresada en *E. coli*, se obtiene una protección del 77%, y al ser expresada en baculovirus en células de insectos la protección generada por la vacunación alcanza el 88% (Toro-Ortíz *et al.*, 1997; Boué *et al.*, 1999; Willadsen, 2001).

Variación en la secuencia de aminoácidos del Ag Bm86

Reportes recientes han informado sobre variación de la secuencia del Ag Bm86, informando la sustitución de 21 aminoácidos entre los aislados de la cepa Yeerongpilly y una cepa Argentina (A). En bovinos vacunados con GAVAC (Heber Bistec SA, Havana, Cuba) y posteriormente desafiados con la cepa A, se observó una baja proporción de garrapatas que fueron afectadas por la vacuna, esta falta de efectividad fue atribuida a la divergencia en la secuencia de aminoácidos (Willadsen, 2001).

En otro estudio utilizando cepas de garrapatas *B. microplus* de Australia, México, Cuba y Venezuela, con la vacuna cubana GAVAC, quedó demostrada la heterogeneidad en la secuencia del gene de Bm86. El DNAc de Bm86 fue secuenciado y se detectaron las mutaciones dispersas en la molécula. Para la comparación de la secuencia se utilizó un fragmento de 539-573 aminoácidos. Cuando las muestras fueron comparadas con la cepa australiana Yeerongpilly la secuencia de aminoácidos en la proteína de Bm86 varió de 5.7-8.6%. Las cepas Mora, Mex Bm86 (mexicanas) y la argentina (A) presentaron alta variabilidad en la proteína de 8.6% de divergencia en aminoácidos, la cual es la más alta reportada en comparación con cepas australianas, lo que refleja

probablemente que la distribución geográfica de *B. microplus* esta implicada en la variación poblacional de las cepas en estudio (García-García *et al.*, 1999).

Los bovinos inmunizados previamente con la vacuna GAVAC, tuvieron una protección baja al desafío con garrapatas, los resultados fueron atribuidos a la divergencia en la secuencia de aminoácidos. Esta conclusión fue sustentada por el hecho que Bm86 argentina (renombrada Bm95) fue protectora contra ambas cepas (Argentina y cubana). Estudios posteriores al secuenciar la proteína Bm86 proveniente de una cepa de *B. microplus* mexicana y de otra venezolana, se encontraron las mismas sustituciones que en la cepa Argentina (García- García *et al.*,1999). Al evaluar la vacuna GAVAC en Brasil, bajo condiciones de campo con diferentes cepas de *B. microplus* se obtuvo una eficacia entre el 51-91% (Revisado por Pruett, 1999).

García-García *et al.*, (1999) reportó, que al inmunizar bovinos con antígenos de intestinos fueron protegidos al desafío contra diez aislados de garrapatas *B. microplus* australianos, estos Ag's fueron reconocidos en el suero de los bovinos y por un Ac monoclonal. Sin embargo, el antisuero de bovino contra la proteína Bm86 de la cepa Yeerongpilly, presentó una reacción cruzada al ser probado con la cepa Argentina, pero el Ag no indujo protección cruzada. Estos resultados muestran claramente una parcial conservación antigénica, por lo tanto no hay un criterio sólido para concluir que hay protección cruzada entre cepas de diferente origen. Por otro lado, ganado vacunado con Ag's recombinantes de Bm86 australiana y sudamericana, seguido por el desafío con cepas homólogas y heterólogas de *B. microplus*, sugieren que la variación en la secuencia afecta la protección inmune. Para confirmar este resultado es necesario el análisis de más cepas de *B. microplus*, comparado con la diversidad de la secuencia en el gen de Bm86 (García-García *et al.*, 1999).

Las diferencias en la secuencia de la Bm86 en cepas argentinas sugieren que las mutaciones en este gen pueden ser el resultado de la adaptación de las garrapatas a nuevas condiciones ambientales y probablemente reflejen diferencias no identificadas tales como factores fisiológicos. Los resultados tan variables sugieren que la inclusión de

formulaciones de vacunas más regionales o bien universales, pero con menor variación de la secuencia, deberán ser considerados en la elaboración de nuevos inmunógenos para el éxito de la protección de ganado infestado con garrapatas (García-García *et al.*, 1999).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colonias de garrapatas *B. microplus*. Se utilizó la colonia de garrapatas de referencia denominada Media Joya (susceptible a ixodicidas), proveniente del Estado de Jalisco, México, aislada en el año 2001, la cual se mantiene en condiciones de laboratorio, por pases sucesivos en bovinos en la Unidad de Artropodología de CENID-PAVET-INIFAP, en el municipio de Jiutepec, Morelos.

Reproducción y mantenimiento de garrapatas *Boophilus microplus*

La colonia de garrapatas *B. microplus*, fue reproducida por infestaciones artificiales con 1 g de larvas de 15 días de edad, colocadas con un pincel en la región de la cruz de un becerro Holstein de una edad aproximada de 12 meses y un peso promedio de 200 kg, mantenido en estabulación en forma individual. 21 días posteriores a la infestación, las hembras repletas (> 8mm) se colectaron manualmente y se lavaron con agua y después con una solución de nistatina al 1%, para prevenir el crecimiento de hongos (ver apéndice, protocolo 1) (Hernández, 1985).

Obtención de ovarios e intestinos

Las garrapatas adultas ingurgitadas se inmovilizaron en forma ventral en bloques de parafina contenidos en cajas de Petri en forma ventral en un bloque de parafina para inmovilizarlas. Con un bisturí se realizó una incisión en la porción caudal y se expusieron los órganos de la garrapata. Se identificaron los ovarios y los intestinos y se colocaron en viales de poliestireno conteniendo Solución Amortiguadora de Fosfatos (SAF) pH 7.2. Los intestinos se lavaron varias veces con SAF para eliminar totalmente el contenido de sangre. Los órganos se mantuvieron en congelación a -70°C hasta su uso.

Extracción de RNA y síntesis de DNAc: Ovarios e intestinos de 50 garrapatas hembras repletas fueron aislados en frío, lavados con solución

amortiguadora de fosfatos (SAF) 1X pH 7.2 y sometidos a extracción de RNA total con la solución de Trizol (GIBCO) como lo recomienda el fabricante (ver apéndice protocolo 2). El material obtenido (RNA) fue usado en reacciones de PCR con una transcriptasa reversa y oligonucleótidos específicos (5' ATG CAC TAC AAG CCC GCC AC 3' y 5' GAA CCT CCA GCG CGA GGT 3'), (Tellam *et al.*, 2002) se utilizó el kit SuperScript (Invitrogen) para síntesis de DNAc (ver apéndice, protocolo 3). La mezcla de reacción de PCR para obtener los fragmentos específicos de 1800 pb consistió en DNAc 40 ng, solución amortiguadora de PCR 1X, los cuatro desoxirribonucleótidos (2 μ M), iniciadores específicos (0.2 μ M), MgCl₂ (4.5 μ M) y Taq polimerasa 1 u, en un volumen final de 20 μ l.

Las condiciones para la amplificación por PCR de las muestras (Apéndice, protocolo 4) RNA proveniente de intestinos y ovarios de la colonia Media Joya, fueron las siguientes: Desnaturalización inicial 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos que consistieron de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, acoplamiento a 50°C por 30 segundos, extensión 72°C por 2 min, con una extensión final a 72°C por 5 min.

Clonación y secuenciación de fragmentos de DNAc amplificados

Los productos de DNAc del gen de vitelogenina derivada de ovarios e intestinos amplificados por RT-PCR fueron cortados y extraídos del gel agarosa al 0.8% para su purificación con el Kit Wizard SV and PCR Clean-Up System (PROMEGA) (ver apéndice, protocolo 5), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La elusión se realizó en 30 μ l de agua libre de nucleasas y RNAsas. El fragmento se insertó en el vector 2.1 TOPO TA Cloning Kit 3.9 kb (Invitrogen) de acuerdo a los pasos sugeridos por el fabricante y se transformaron células competentes de *E. coli* TOP 10 crecidas en placas con medio sólido LB conteniendo 50 μ g/ml de ampicilina y 0.04 g/ml de X gal (ver anexo en el apéndice, protocolo 6).

Las clonas seleccionadas por su color blanco, fueron multiplicadas en medio líquido LB – BROTH (LB) con 50 µg/ml de ampicilina en agitación a 37°C durante 14 hrs. Los plásmidos con los insertos fueron extraídos usando el kit de purificación de plásmidos Wizard plus SV minipreps (PROMEGA) de acuerdo a lo sugerido por el fabricante, la elución fue en 70 µl de agua libre de nucleasas y RNAsas (ver apéndice, protocolo 8). Posteriormente, los plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción *Eco RI* (10 u/µl) y los fragmentos de DNA identificados por PCR. Se verificaron 7 muestras de intestino y una de ovarios, seleccionando las que cumplieron con el tamaño del fragmento esperado de 1800 pb, de las clonas número 6 y 7 derivadas de intestino y la clona derivada de ovarios, las cuales fueron identificadas como IMJ6, IMJ7 y una clona de ovarios (OMJ) fueron enviados 760 ng de DNA para ser secuenciadas en forma comercial, al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT), en Cuernavaca, Morelos, utilizando electroforesis capilar con dideoxinucleótidos fluoro-marcados. Se utilizaron los iniciadores –20 del vector en dirección sentido -(5´CTG GCC GTC GTT TTA C3´) y antisentido (5´CAG GAA ACA GCT ATG AC3´), con los que se obtuvo una secuencia de 700 pb por cada iniciador. Para obtener la secuencia de la porción central del fragmento de 1800 pb, se diseñaron los iniciadores internos sentido (5´CGC GCT CAA GTT CCT CTC3´) y antisentido (5´AAG GTC TTG AGC GAG TTG3´) que reconocen un fragmento de 650 pb el cual una vez secuenciado permitió tener completa la secuencia de 1800 pb.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa de computación Vector NTI mediante el cual se hizo un alineamiento de las secuencias IMJ6, IM7 y OMJ, y fueron comparadas con la secuencia reportada en el banco de genes con número de acceso U49934 (Tellam *et al.*, 2002) .

Adición de la secuencia de Kozac al fragmento de Vg de 1800 pb e inserción en el vector de transporte

Una vez conocida la secuencia de los insertos de (DNA plasmídico) DNA derivados de ovario e intestinos se procedió a insertar el fragmento de 1800 pb de Vg de ambas clonas de Vg (IMJ6 e IMJ7), amplificados por PCR bajo las condiciones previamente estandarizadas y utilizando en dirección sentido un iniciador con la secuencia de Kozac, (esta secuencia es necesaria para la mejor traducción de la proteína) (GAG ACT CCT ACC ATG GGC ATG CAC) que incluye la inserción de un ATG adicional al que tiene la secuencia para asegurar la recombinación por el baculovirus Bac-N-Blue, en dirección antisentido fue utilizado el iniciador de la secuencia del fragmento de Vg de 1800 pb: ACC TTC GCG CTG GAG GTT C, de acuerdo al siguiente protocolo. Desnaturalización inicial 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos que consistieron de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, acoplamiento a 60°C 30 segundos, extensión 72° C por 2 min, con una extensión final a 72°C por 5 min.

Posteriormente la construcción (obtenida por PCR) fue ligada al vector de transporte pBlueBac4.5/V-5His-TOPO TA Expression Kit (Invitrogen), utilizando el protocolo de clonación ya descrito, las colonias transformadas fueron verificadas visualmente por su coloración azul, ya que la B-galactosidasa queda insertada en un extremo del fragmento. Posteriormente clonas positivas fueron verificadas por la técnica de PCR anidado utilizando los iniciadores específicos del vector de transporte recomendados por el fabricante (5' TTT ACT GTT TTC GTA ACG A 3', y 5' CGA TCT AAG ACA CGC AAC AAC TAA 3'), y los iniciadores que amplifican el fragmento de 1800 pb.

Las condiciones de amplificación fueron las mismas empleadas para la inserción de la secuencia de Kozac.

Las colonias transformadas fueron crecidas en medio líquido LB y posteriormente purificadas, (ver anexo protocolo de transformación del apéndice N 9). Se enviaron 760 ng de DNA plasmídico de dos colonias transformadas, provenientes de ovario e intestino al IBT, para ser secuenciados. Verificada la secuencia en el correcto marco abierto de lectura para la transfección, se procedió a realizar un alineamiento, con la secuencia reportada, en el banco de genes, con número de acceso U49934 (Tellam *et al.*, 2002).

Expresión recombinante de Vg 1800 en células de insecto

Posteriormente, la construcción fue subclonada con el vector Bac-N-Blue (Invitrogen) (Sambrook *et al.*, 1989) para obtener un baculovirus recombinante (Ver apéndice de protocolo de transfección N 11) (Newcomb *et al.*, 1997), a lo anterior prosiguió la co-transfección en células eucariontes de *Spodoptera frugiperda* (Sf9), para la expresión de la proteína recombinante utilizando el siguiente protocolo:

Baculovirus Bac-N-Blue	5µl
DNA derivado de ovarios o intestinos insertado en el vector de transporte	4µg/µl
Medio de cultivo Sf 900 II SFM	500 µl
Celfectina	5 µl

La mezcla fue adicionada al cultivo de células eucariontes Sf9, 1×10^6 células/ml, e incubada por 4 hrs a 27°C en agitación lenta, al terminar la incubación se adicionó 1 ml de medio y se dejó incubando por 72 hrs a 27 °C. El cultivo fue expandido en 30 ml de medio con una concentración celular de 0.6×10^6

células/ml. Para determinar la expresión del fragmento de Vg se verificó mediante el ensayo de Western Blot (ver el anexo, protocolo Western blot N 15).

Al finalizar este periodo, el cultivo fue cosechado, se vertió en tubos de 15 ml, y fueron centrifugados a 3 000 g durante 5 min, posteriormente, fue separada la fracción soluble de las pastillas celulares. La fracción soluble, la cual contiene los baculovirus con el DNA de Vg recombinante, fue vertida en tubos de 15 ml cubiertos con papel aluminio y mantenidos a 4° C. Los tubos con los paquetes celulares donde se verificó por SDS-PAGE la presencia de la proteína recombinante de Vg de intestino y ovarios fueron colocados en hielo y posteriormente se confirmó su expresión por la técnica de Western blot (ver anexo, protocolo 15).

Las paquetes celulares que contienen Vg recombinante derivada de intestinos se analizaron mediante SDS-PAGE, cada paquete celular fue lisado por adición de 200 µl de SAF 1X y 20 µl de inhibidor de proteasas (UPSTATE, Protease Inhibitor Cocktail I, 1mg/ml), los paquetes celulares fueron sonicados (60% de la potencia), en tres periodos de 20 segundos cada uno, con descansos de incubación en hielo de 20 segundos cada uno, al terminar los tres periodos las muestras fueron incubadas por 1min en hielo y posteriormente se volvió a sonicar cada muestra, al término de la sonicación se adicionaron 500 µl de solución amortiguadora de lisis a la muestra (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 400 mM, imidazole 20 mM, 2βmercaptoetanol 5 mM, glicerol 5%, Tritón X100 1%) y fueron homogeneizados con micropipeta y transferidos a tubos de 15 ml e incubados durante 40 min a 4 °C en agitación, al término de la incubación fueron centrifugados a 11 000 g, durante 5 min. Al finalizar la centrifugación cada muestra fue vertida en tubos nuevos previamente identificados, fue medida la concentración de proteínas de las muestras mediante la técnica de Bradford. Posteriormente, fueron tomados 20 µg de proteína y se les adicionó 6 µl de solución amortiguadora para condiciones reductoras 6X y se mantuvieron por 5

min en agua hirviendo, al finalizar este periodo, los tubos fueron centrifugados a 11 000 g, durante 5 min y posteriormente fueron colocados 25 µl de cada muestra en un gel de acrilamida al 8%, (ver apéndice). Se utilizó como control negativo, 20 µg de muestra del sobrenadante del lisado de células Sf9 y como control positivo, 20 µg la proteína STAT que consiste de una proteína de señalización de *Anopheles gambiae* etiquetada con histidinas, y el baculovirus Bac-N-Blue nativo.

Inmunoelectrotransferencia (Western blot). Posterior a la electroforesis se realizó una transferencia en una membrana (Nylon, SIGMA BIOLOGY) por 1 hora a 100 Volts. Acto seguido, la membrana fue teñida con Ponceau 10X, en agitación manual por 3 min. La membrana fue lavada con agua y a continuación con SAF 1X pH 7.2, se procedió hacer un bloqueo con leche descremada con SAF 1X pH 7.2, Tween 20 al 0.5% y leche descremada al 5% durante una hora a temperatura ambiente a 70 revoluciones y posteriormente se dejó incubando con el anticuerpo primario anti- etiqueta de histidinas diluido 1:2500 (Invitrogen, Anti-HisG-HRP, 1.0 mg/ml,), durante toda la noche en agitación a 4°C a 60 rpm, al día siguiente se procedió a hacer tres lavados por 10 min en agitación a temperatura ambiente (SAF 1X pH 7.2, Tween-20 al 0.5%), y un lavado integrado por tres cambios, con SAF 1X pH 7.2, posterior a los lavados se hizo la incubación con el anticuerpo secundario (de cabra anti-ratón, etiquetado con peroxidasa) por una hora a temperatura ambiente, al finalizar se hicieron los lavados con la solución SAF 1X Tween-20 al 0.5% y SAF 1X como ya se ha mencionado a temperatura ambiente (ver apéndice, protocolo N 15).

La membrana se puso en contacto con reactivos de quimioluminiscencia, (ECL Western blotting Detection Reagents, Amersham Biociences) y posteriormente se expuso a una película radiográfica durante 25 min y posterior revelado.

Para verificar la presencia de DNA de vitelogenina dentro del baculovirus, utilizando la fracción soluble que contiene los baculovirus se llevó a cabo la purificación de DNA viral, se utilizó el protocolo de purificación recomendado en el manual del baculovirus Bac-N-Blue (ver el apéndice, Anexo purificación de DNA viral protocolos N 12, 13). Con el DNA producto de la purificación se realizó un ensayo de PCR utilizando los iniciadores del vector y los iniciadores del fragmento Vg de 1800 pb, obteniendo los fragmentos de DNA que corresponden a los tamaños esperados con el iniciador sentido del vector y antisentido del fragmento de amplificación de 1800pb con un tamaño de 1944pb, iniciador sentido del fragmento de 1800 pb y el antisentido del vector (2208 pb), los iniciadores sentido y antisentido del vector (2235pb), al mismo tiempo se utilizó como control el DNA viral del baculovirus nativo.

Identidad de la proteína recombinante (pBlue Vg 1800):

Se migraron en gel de acrilamida al 8%, lisados de las células que contienen la proteína recombinante, la banda que corresponde a la Vg fue cortada y enviada a espectrometría de masas, para el análisis de péptidos tripsinizados y determinar la identidad de la proteína Vg.

Verificada la identidad del fragmento de Vg, el baculovirus recombinante fue replicado en varias ocasiones previo a la purificación de la proteína recombinante, bajo las siguientes condiciones; matraces de vidrio de 250 ml en agitación a 80 rpm, 27 °C de incubación durante cuatro días. Usando este baculovirus recombinante se infectaron 1×10^6 células/ml en 70 ml de medio Sf900 II SFM (GIBCO). Se utiliza medio sin suero debido el suero no permite la replicación adecuada de las células.

Purificación de la proteína recombinante:

Una vez expresada la Vg recombinante en células de insecto Sf9, se procedió a su purificación. La membrana de diálisis (Dyalisis tubing; Séanles tubing, 50 feet D-0405 Lot 39 FO 35g, SIGMA Chemical CO), fue colocada en agua a 100° C por 5 cinco minutos y posteriormente fue colocada en agua estéril fría. Previamente las pastillas celulares fueron lisadas como ya se ha descrito, la fracción soluble fue vertida en la membrana y la muestra fue dializada durante 24 hrs con la solución de unión (Fosfato de sodio monobásico 20mM, NaCl 0.5M, imidazole 20 mM). La muestra fue recuperada y mantenida a -20° C hasta la purificación, la cual se llevó a cabo mediante HPLC (AKTA prime plus Amersham Biosences), con una columna de níquel (His Trap HP, GE Health care).

Se obtuvieron 25 muestras de 1 ml producto de la elusión de la proteína. Con las muestras se procedió hacer un SDS-PAGE, al 8%. Se tomaron 25 µl de cada muestra y se les adicionaron 5 µl de solución amortiguadora de corrimiento 6X, las muestras en las cuales se observó el incremento de la proteína, mediante una grafica obtenida durante el proceso de elusión en los viales 6-17, fueron colocadas en agua a 100° C por 5 min y migrados en el gel de acrilamida al 8%, utilizando como controles lisado de células Sf9, lisado de células con la proteína del baculovirus nativo y lisado de células con Vg recombinante sin purificar. Los geles fueron migrados durante 90 min a 90 volts, posteriormente fueron incubados con solución fijadora (metanol 45%, agua 45%, ácido glacial acético 10%) por 15 min, 70 rpm en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente fueron teñidos con tinción de Coomassie durante 60 min a 70 rpm en agitación a temperatura ambiente, al finalizar se recuperó la tinción y fue lavado con solución desteñidora (metanol 40%, agua 53%, ácido glacial acético 7%). Se observaron bandas en las muestras de las elusiones 7-16.

Las muestras con bandas positivas, se utilizaron para realizar la técnica de Western blot, como ya se ha mencionado, se utilizaron como control negativo,

lisado de células Sf9 30 μ l, lisado de células con la proteína del baculovirus nativo Bac-N-Blue 17 μ l, como control positivo lisado de célula conteniendo baculovirus recombinante expresando la proteína STAT, etiquetada con histidinas, 1 μ l, y lisado de células con Vg recombinante sin purificar 20 μ l. Se tomaron 25 μ l de las muestras de los viales 7-16 y se les adicionó 5 μ l de solución amortiguadora de corrimiento 6X.

Evaluación inmunogénica de Vg recombinante en bovinos

Se evaluó la capacidad inmunogénica de la Vg recombinante derivada del RNA de intestinos. Seis terneras criollas provenientes de una zona libre de garrapatas *Boophilus* spp, y libres de anticuerpos contra tuberculosis, babesiosis, anaplasmosis y brucelosis, de aproximadamente 200 Kg de peso fueron mantenidos en estabulación con agua y alimento a libre acceso. Se dividieron en dos grupos al azar de tres bovinos cada uno. Previamente el día -1 se tomó muestra de suero de cada animal y fue mantenido a -20°C , hasta su uso. Cada animal del grupo testigo fue inoculado con 4 ml de una mezcla del adyuvante Montanide 50 (SEPPIC) más SAF 1X pH 7.2 estéril en proporción 1:1, mientras que aquellos del grupo tratado fueron inoculados con la proteína recombinante de Vg a una dosis de 20 μ g (en un volumen de 200 μ l) por bovino, se le adicionaron 1.8 ml de SAF 1X pH 7.2 estéril y 2 ml del adyuvante Montanide 50. Las mezclas tanto la del grupo control como el grupo tratado fueron sonicadas durante 30 segundos a 50 % de la potencia (Fisher Sonic dismembrator model 300). La mezcla fue aplicada en cuatro dosis de 1 ml cada una distribuidas en la cercanía de los ganglios preescapulares y precurales de ambos lados del animal, por vía subcutánea, los días 0, 14 y 28, haciendo un total de tres inoculaciones para cada bovino con intervalos de 14 días.

Se tomaron muestras de suero de los bovinos los días 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27, 30, 34, 37, 41, 43. Los sueros pre y postinoculación de Vg recombinante,

fueron utilizados en el ensayo de Western Blot, para la detección de anticuerpos, con la finalidad de evaluar la respuesta inmune en bovinos hacia la proteína.

Se realizó el ensayo de Western blot, para evaluar los sueros obtenidos, de las terneras inmunizadas con la Vg recombinante, para lo cual se realizaron geles de acrilamida bajo condiciones no reductoras (PAGE). Las muestras (20µg) fueron mantenidas en frío y disueltas en solución muestra no reductora, no desnaturizante (0.5M Tris-HCl, pH 6.8), 10% de glicerol y azul de bromofenol para el PAGE. Los geles fueron migrados a voltaje constante (90 V) por 90 min con buffer 0.01M Tris Glicina (pH 8.3). Se hizo un SDS-PAGE como ya ha sido descrito para condiciones reductoras. Para la electroforesis del PAGE y SDS-PAGE, se utilizaron 20 µg de cada muestra, lisado de células Sf9 como control negativo, lisado de células con la proteína STAT como control positivo, lisado de células con el baculovirus nativo, el lisado de células con baculovirus Vg recombinante sin purificar y Vg purificada, muestra de ovario y intestino. Para ambas condiciones se elaboró un gel de agarosa al 8 % como ya ha sido descrito.

Posteriormente se hizo la transferencia a membranas de nylon, a continuación las membranas fueron bloqueadas como se ha descrito y posteriormente fueron incubadas con el suero del día -1 y otra con el suero de bovino obtenido el día 43 pos-inoculación posterior a la tercera inoculación de la proteína recombinante, diluidos 1:1000, se siguió el procedimiento de lavados ya mencionados, como anticuerpo secundario se utilizó, anticuerpo de conejo anti-bovino etiquetado con fosfatasa alcalina (conjugado Jackson). La membrana se puso en contacto con reactivos para el revelado con fosfatasa (Tropix the leader in luminiscence, Western Starn, Protein Detection kit) y posteriormente se expuso a una película radiográfica durante 7 min y fue revelada.

Evaluación del suero anti-vitelogenina producido en bovinos sobre el índice reproductivo de garrapatas *B. microplus*

Se colectaron 20 hembras dos días antes de completar el ciclo de vida parásito, y fueron pesadas previo al ensayo; fueron colocadas en posición dorsal inmovilizada con plástilina y fueron alimentadas con suero anti- vitelogenina del grupo tratado, el grupo fue alimentado con tubos capilares con una mezcla al 70% de suero y 30 % de eritrocitos, y el otro grupo fue alimentado con la mezcla de suero- eritrocitos del grupo testigo, la alimentación fue durante 48 horas. Al finalizar la alimentación fueron incubadas a 28 ° C, para el inicio de la oviposición.

RESULTADOS

Amplificación del fragmento del gen de Vitelogenina.

Del RNA total extraído de intestino y ovario de garrapatas hembras adultas, de las cepas CEPICH y Media Joya, fue sintetizado el DNAc; con iniciadores específicos, bajo condiciones ya mencionadas, en las muestras de ovario e intestino, se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 1800 pb, obtenido de muestras de DNAc de intestino (carril 5 IMJ) y de ovarios (carril 6 OMJ), de garrapatas hembras adultas de la cepa Media Joya. (Figura 1).

Los productos de PCR fueron clonados utilizando el paquete comercial TOPO TA (Invitrogen). Se obtuvieron 7 clonas positivas con el plásmido recombinante conteniendo DNAc obtenido de intestino y una clona transformada con DNAc derivado de ovarios. Se comprobó la inserción del fragmento mediante PCR y análisis de amplicones en geles de agarosa (Información no presentada). Fueron seleccionadas dos clonas blancas de bacterias transformadas con la muestra DNAc de intestinos, de los carriles 6 y 7 y una de ovarios. Al mismo tiempo la digestión con la enzima de restricción *Eco RI*, de las clonas transformadas se identificó la presencia del fragmento de 1800 pb, dentro del vector TOPO TA, fueron seleccionadas las clonas de los carriles 1 de ovario, 6 y 7 de intestino. Posteriormente los plásmidos conteniendo insertos con 1800 pb fueron confirmados por su secuencia (Figura 2).

Las secuencias de nucleótidos de las clonas mexicanas presentan un 99% de homología con la de *B. microplus* de la cepa australiana con número de acceso U49934 (datos no mostrados). El alineamiento de las secuencias de proteína predicha, muestra que el 99% de los aminoácidos se encuentran conservados entre las cepas australiana y secuencias de ovario e intestino de la cepa mexicana (Figura 3). Se identificaron catorce mutaciones, ocho de las cuales resultaron mutaciones silenciosas al no modificar la secuencia de aminoácidos. Se observan seis mutaciones estructurales; E141Q, T278N, S493Y, K524E, H529R y R576H, donde el primer aminoácido es sustituido por

el segundo considerando como referencia la cepa australiana. Se identificaron además dos diferencias en las secuencias mexicanas; la inserción de un residuo específico de ácido aspártico, en la posición número 26, la segunda diferencia es una delección (de una repetición de 6 residuos) de los aminoácidos 554 a 559, comparado con la secuencia previamente reportada (Figura 3).

Se adicionó al fragmento de Vg de 1800 pb la secuencia de Kozac de 18 pares de bases, al insertarla en dirección sentido por la técnica de PCR, en dirección antisentido se utilizó el iniciador que amplifica el fragmento de 1800pb, lo anterior generó un amplicón de Vg de 1818 pb. Las muestras fueron migradas en un gel de agarosa al 0.8%, produciendo la amplificación en tres clonas transformadas de Vg sintetizada en intestino (Figura 4).

El fragmento de Vg conteniendo la secuencia de Kozac de 18 pares de bases, y posteriormente se amplificó por la técnica de PCR, e insertado en el vector de transporte pBlueBac 4.5 His/V5-TOPO. Los amplicones de estos fragmentos corresponden a un tamaño aproximado de 2241 pb cuando son amplificados con los iniciadores del vector. Muestras del producto de PCR de las clonas transformadas y migradas en los carriles 4 y 5 muestran los fragmentos del tamaño esperado (Figura 5).

Mediante la técnica de PCR fueron amplificadas las clonas positivas a Vg proveniente de ovario e intestino. La amplificación con los iniciadores sentido del vector y antisentido del fragmento de Vg. Dió lugar a un fragmento de 1944 pb. La amplificación demuestra la orientación del fragmento insertado en el correcto marco abierto de lectura de la secuencia dentro del vector de transporte y la adición de la secuencia de Kozac (Figura 6).

Se eligieron dos clonas positivas de DNAC provenientes de intestino y ovario con la secuencia de Kozac e insertadas en el vector de transporte y fueron secuenciadas, en dirección sentido, de las se obtuvieron 700 pb de lectura. Con la traducción de esta secuencia se procedió a hacer un alineamiento de aminoácidos de Vg proveniente de ovario e intestino, con la secuencia reportada en el Gen Bank. Lo anterior permitió verificar el correcto

marco abierto de lectura de ambas secuencias, en la cual se observó la inserción del ácido aspártico, que en esta secuencia se localiza en el sitio 20. En la posición 88 se observa la pérdida del sitio de glicosilación sustitución (D por N). En ambas secuencias derivadas de ovarios. Los demás sitios de glicosilación coinciden entre las secuencias de ovarios e intestinos, y se encuentran localizadas en las posiciones 29, 35, 67, 110 y 129 (Figura 7).

Previo a la expresión de la proteína recombinante, en el sistema baculovirus, se obtuvo la secuencia completa de dos clonas positivas con Vg proveniente de intestino. Éstas, fueron elegidas por ser el sitio donde se sintetiza la vitelogenina en forma endógena. El alineamiento de las secuencias obtenidas, incluyen la adición de la secuencia de Kozac al fragmento de DNA de Vg de intestino, con las cuales se verificó el correcto marco abierto de lectura de la secuencia para proseguir con el experimento. Se puede observar la inserción del ácido aspártico en la posición 62 y la delección en la posición 572 (repeticiones de 6 aminoácidos), además de los sitios para fosforilaciones en el carboxiterminal como ya se había comentado. Los sitios de glicosilación son observados en esta secuencia en las posiciones 72, 80, 107, 130, 156, 170, 207, 278, 347, 416 y 421. Las posiciones fueron movidas por la inserción en el vector de transporte. Verificada la orientación del inserto de Vg en el vector de transporte mediante el alineamiento, se prosiguió con el segundo objetivo de la investigación, que fue la expresión en células eucariontes para obtener un fragmento de la proteína recombinante, glicosilada y plegada para ser reconocida por el sistema inmune bovino (Figura 8).

Se utilizaron células eucariontes de *Spodoptera frugiperda* (Sf9), para la expresión de la proteína recombinante. En la Figura 9 observan células sin infectar en la figura 9b. En las primeras la forma, es regular casi esférica y en las segundas la forma es irregular y puede observarse la vacuolización dentro del citoplasma originados por la infección del baculovirus recombinante (Figura 9)

La Figura 10 muestra los productos esperados de la amplificación por la técnica de PCR del DNA viral (DNA_v), obtenido de la fracción soluble de la

expresión de Vg recombinante en células eucariontes; se muestran en la Figura 10. Fueron incluidas muestras de DNA viral provenientes de intestino y ovario en el ensayo. Para la amplificación por la técnica de PCR fueron utilizados los iniciadores del vector y los iniciadores que amplifican el fragmento de Vg 1800pb. En los carriles 1 y 2 se utilizaron los iniciadores que alinean con el vector de transporte y se obtuvo un fragmento esperado de aproximadamente 2241 pb. En los carriles 3 y 4 se utilizó el iniciador sentido del vector de transporte y el antisentido del fragmento de amplificación de Vg y se observó un fragmento aproximado de 1944 pb. Por último en los carriles 5 y 6 se utilizaron los iniciadores sentido del fragmento de Vg y el antisentido del vector y se amplificó un fragmento de 2208 pb. Se utilizaron los iniciadores del vector y los del fragmento, para verificar la presencia del DNA dentro del baculovirus (Figura 10).

Los amplicones producidos por la técnica de PCR, a partir de DNA viral (DNA_v) purificado de la fracción soluble del cultivo de baculovirus en células eucariontes Sf9 conteniendo la Vg recombinante proveniente de intestino. En el primer carril se colocó el testigo de DNA negativo. Para la amplificación fueron utilizados los iniciadores sentido del vector de transporte y el antisentido del fragmento de Vg. En el carril 2 como control fue utilizado el producto de PCR del DNA_v del baculovirus nativo, con un tamaño aproximado de 839 pb. En los carriles 3-6 fueron colocadas las muestras producto de PCR anidado de la amplificación de DNA_v proveniente de la expresión de la proteína recombinante. En el ensayo fueron utilizados los iniciadores que alinean secuencias del vector de transporte, y los iniciadores que amplifican el fragmento de 1800 pb. Se obtuvieron fragmentos con el tamaño esperado de aproximadamente 2241 pares de bases, 1800pb, respectivamente. Se obtuvo un fragmento de 1944 pb con el iniciador sentido del vector, y el antisentido del fragmento de 1800pb (Figura 11, carril 4). Con el iniciador sentido del fragmento y el antisentido del vector, se obtuvo un amplicón de 2208 pb (carril N.5), se observó la amplificación del baculovirus nativo del tamaño esperado y la presencia de DNA dentro del baculovirus recombinante (Figura 11).

Se verificó la expresión de la proteína recombinante mediante la técnica de Western blot. Se utilizaron muestras de cosechas de diferentes lotes de cultivo celular (3) a partir de pastillas celulares infectadas con baculovirus transfectado con vitelogenina recombinante. Como control negativo se utilizaron células Sf9 no transfectadas; Como control positivo se usó el lisado de células con baculovirus portador de STAT, una proteína de señalización de *Anopheles gambiae*. Los carriles 3, 4 y 5 de la figura 12 muestran que el lisado de células que contenían la proteína vitelogenina recombinante, puede observarse la banda en la muestra 2 con una mayor intensidad. Esta muestra fue utilizada como control para la purificación y obtener la proteína recombinante. El revelado fue por quimioluminiscencia, durante una exposición de 25 min, se obtuvo la señal de una proteína del tamaño esperado de 80 kDa (Figura 12).

Se procedió a la purificación de la proteína Vg recombinante, por columna de afinidad a níquel, mediante cromatografía tipo HPLC. De la elución cromatográfica se obtuvieron 35 fracciones de 1 ml cada una, alicuotadas en tubos de 1.5 ml. Las muestras correspondientes a las fracciones 6 a 17, se migraron en un gel de acrilamida al 8% por ser las muestras donde por medio de una gráfica se observó el aumento de la concentración de la proteína. Como control negativo se utilizaron lisados de células Sf9. En el carril 2 de la figura 13 muestra un lisado de células con baculovirus nativo Bac-N-Blue, mientras que en el carril 3 hay un lisado de células con Vg recombinante. En las fracciones eluidas 6 al (en 11 en los carriles 4-9), se observó la detección de proteínas celulares (datos no mostrados). En un segundo gel por SDS-PAGE fueron migradas las fracciones 12-17, en donde fueron obtenidos el fragmento esperado y un fragmento de un menor tamaño. A partir de la fracción 12 hasta la 17, se observó la disminución de las proteínas celulares. Con estas muestras se procedió a realizar un Western blot para verificar el reconocimiento de la proteína recombinante con el anticuerpo anti-etiqueta de histidinas. Pueden detectarse fragmentos más pequeños que los esperados y fueron detectados por el anticuerpo; estos fragmentos pudieran ser productos de la degradación de la proteína durante la electroforesis pero que pertenecen al fragmento de Vg (Figura 13).

En la figura 14 se muestra el resultado del Western blot conteniendo las fracciones 12-16 del HPLC. Como control negativo se utilizó lisado de células Sf9. Como control positivo un lisado de células con STAT, proteína de señalización de *Anopheles gambiae*, etiquetada con histidinas; El lisado de células transfectadas con baculovirus nativo Bac-N-blue el control positivo y el lisado de VgR. En los carriles 5-9 eluidos de las muestras 12 a 16, la señal fue obtenida por quimioluminiscencia a los 25 min de exposición. En estas fracciones se observaron bandas que corresponden al tamaño esperado de vitelogenina de aproximadamente 80 kDa, y fracciones pequeñas que también fueron reconocidas por el anticuerpo anti-etiqueta de histidinas. En este ensayo se verificó el reconocimiento de la proteína purificada en las diferentes fracciones obtenidas por el anticuerpo anti-etiqueta de histidinas. Posteriormente fue medida la concentración de proteína, se encontró una mayor concentración en los eluidos 12 y 13 (Figura 14).

El Western blot de los sueros bovinos producto de la inoculación, se puede observar en la figura 15, se hizo un ensayo en condiciones reductoras, con el suero pre-inmune no hubo señal de ninguna de las muestras. Con el suero inmune del día 43, en las muestras de lisado de células con la Vg R no purificada y la Vg purificada, fueron detectados fragmentos menores a 72 kDa, uno mayor a 95 kDa y otro de aproximadamente 170 kDa. En la muestra de intestino macerado son detectadas estas 3 bandas (Figura 15).

En el Western blot en condiciones nativas con el suero pre-inmune, no fueron detectadas señales de las muestras.

En condiciones nativas no reductoras con el suero posinmune, es detectada la señal de una banda mayor de 170 kDa, en la muestra de lisado de Vg sin purificar, Vg purificada, intestino y hemolinfa fue detectada señal, en el resto de las muestras no se obtuvo señal (Figura 16).

Fue colectada la masa ovígera de las garrapatas alimentadas con suero anti-vitelogenina, el peso del huevo del grupo testigo fue de 0.538g, el huevo

del grupo tratado fue de 0.3344 g, en el grupo tratado una hembra no oviposito, otra garrapata murió y fue la menor producción 0.004 g

DISCUSIÓN

En la presente investigación fue obtenida la secuencia de nucleótidos de un fragmento del gen de Vg y la traducción deducida de la misma a partir de RNAm, del cual fue obtenido DNAc de ovario e intestinos de *Boophilus microplus*, de la Cepa Media Joya. Durante la vitelogenesis, el epitelio folicular del intestino transporta proteínas glicosiladas hacia la hemolinfa, las cuales son liberadas en la matriz para ayudar en la formación y mantenimiento de los espacios intracelulares formados. Al final de la vitelogenesis, el epitelio folicular comienza a secretar la cubierta del huevo como el endocorion y la vitelina (Fausto *et al.*, 1998). La vitelogenina es la proteína principal de la yema del huevo en animales vertebrados e invertebrados. En trabajos anteriores se ha reportado que la proteína es sintetizada en los insectos y la Vg es transportada a los ovarios dentro de la hemolinfa. Los cuerpos grasos en insectos han sido reportados como el sitio primario de síntesis de Vg, los ovarios como un productor secundario de RNA de Vg en coleópteros, mientras que en algunos crustáceos es el hepatopáncreas y en otros es el ovario (Rosell y Coons 1991, Sankhon *et al.*, 1999). En muestras de RNAm de *Apis mellifera* se demostró que los niveles de Vg disminuyen con la edad (Piulachs *et al.*, 2003). En *B. microplus* se observó la disminución de Vg después del desprendimiento a los cuatro días, con el propósito de la embriogenesis, lo que sugiere que los aminoácidos derivados de la proteína, son necesarios para la formación del blastodermo. Otra disminución fue reportada a los 6 y 18 días, donde el 40% de la Vg es consumida durante la embriogénesis por los oocitos (Campos *et al.*, 2006). La Vg y las Vts experimentan modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, lipidación, fosforilación y división proteolítica, después se incorporan a los oocitos donde las Vts son almacenadas como reserva nutricional del embrión (Hirai *et al.*, 1998). El proceso de la vitelogenesis esta regulado hormonalmente en hembras adultas, durante el cual están implicados altos niveles de la hormona juvenil en la estimulación de la vitelogenesis y la producción de huevo (Rafaeli *et al.*, 2003). En ensayos con garrapatas *D. variabilis* se encontraron niveles de RNA de vitelogenina similares en el intestino y en los cuerpos grasos, lo que sugiere que la proteína Vg es sintetizada y secretada en estos órganos y posteriormente son transportados

por la hemolinfa, en este ixódido no ha sido determinada la síntesis en el ovario (Thompson *et al.*, 2007). En *Rhodnius prolixus* fue demostrado que las células epiteliales de los folículos tienen la capacidad de sintetizar Vg en los ovarios (Salerno *et al.*, 2002; Silva-Neto *et al.*, 2002). En el mosquito *Aedes aegypti*, participan además enzimas como carboxilpeptidasa y catepsina B (Raikhel *et al.*, 2002), y en *B. microplus* participa la enzima catepsina L (Seixas *et al.*, 2002). Niveles elevados de 20-hidroxiecdisona (20-E) están asociados al proceso de expresión del mensajero de la vitelogenina, aunque se ignora si la 20-E actúa sobre el ovario o si otro agente hormonal es responsable (Mitchell *et al.*, 2007). La Vg de esta investigación fue obtenida a partir de intestinos de garrapatas adultas que completaron su ciclo de vida parásito, cuando comienzan a metabolizar la sangre ingerida para obtener nutrientes de la misma, también los ovarios fueron de hembras cuando inician el proceso de síntesis de Vg.

La muestra de RNA de la cepa “Media Joya” fue obtenida de hembras repletas que cumplieron su ciclo de vida parásita e inmediatamente fueron procesadas como ya se ha descrito. Utilizando la técnica de Northern blot (Thompson *et al.*, 2007), se demostró que el RNA mensajero de *D. variabilis* se encuentra en el ovario de hembras repletas, previas a la oviposición de 2-4 días después del desprendimiento del hospedero, y estuvo ausente en el intestino y glándulas salivales de hembras pre-vitelogénicas. En el presente estudio los resultados demostraron que la síntesis de RNA se incrementa en hembras adultas alimentadas y previas a la oviposición, lo cual concuerda con los hallazgos de Mitchell *et al.*, (2007).

En el presente trabajo se amplificó un fragmento del gen de vitelogenina (Vg) de 1800pb, utilizando iniciadores específicos con base en la secuencia reportada en el banco de genes (número de acceso U49934), de muestras a partir de DNAc de intestino y ovarios, lo anterior confirmó que estos órganos son responsables de la síntesis de esta proteína en garrapatas *B. microplus*. Otros autores en trabajos previos purificaron un fragmento de 620 aminoácidos de vitelogenina a partir de DNAc de larvas y huevo de garrapata *B. microplus*, de la cepa australiana Indooroopilly (Tellam *et al.*, 2002). Lo cual puede indicar

que la síntesis de proteína se mantiene aún activa en fases tempranas de desarrollo. El DNAc de la vitelogenina de *A. rosea*, un himenóptero inferior fue clonado y demostraron que la proteína de esta especie, tiene homología con las vitelogeninas de otras especies de insectos (Nose *et al.*, 1997). El gen que codifica para la vitelogenina del mosquito *Aedes aegypti*, un precursor de la proteína de la yema, fue clonado y caracterizado a partir de DNAc (Raikhel *et al.*, 2002). La Vg de la cepa “Media Joya”, presenta una homología del 99% comparada con la secuencia de *Boophilus microplus* australiana (U49934), con *D. variabilis* (Número de acceso AY885250) tiene una homología del 32.9%, la homología disminuye pero consideramos que sea debido a que es sólo un fragmento de la Vg y no el gen completo.

Han sido demostrados sitios conservados en la secuencia de Vg de insectos reportados anteriormente en *Leucophaea maderae* (Tufail y Takeda, 2002) y en *Apis mellifera* (Piulachs *et al.*, 2003), los motivos conservados son GLLG. La secuencia parcial de *B. microplus* (número de acceso AAA92143) y *D. variabilis*, contienen una variación en la secuencia, GLCS (Thompson *et al.*, 2007), la secuencia de *B. microplus* cepa mexicana “Media Joya” de este estudio, presenta la misma secuencia en la posición de aminoácidos 449. La importancia de esta diferencia entre insectos y garrapatas no es conocida, sin embargo, es evidente su conservación en garrapatas.

La secuencia de Vg amplificada en este estudio es un fragmento que contiene 11 sitios potenciales de glicosilación los cuales son necesarios para ser reconocidos por el sistema inmune del hospedero bovino, pudiendo ser observadas N-glicosilaciones y O-glicosilaciones. La glicosilación es esencial para la maduración y secreción de Vg hacia la hemolinfa, los azúcares asociados con proteínas están relacionadas con el reconocimiento por los oocitos. Análisis previos de la secuencia de *Leucophaea maderae* demuestran 13 sitios putativos de glicosilación, y la putativa fosforilación de residuos de treonina, serina y tirosina (Tufail y Takeda 2002).

La secuencia de vitelogenina de *B. microplus* de la Cepa Media Joya utilizada presenta la inserción de un ácido aspártico, una delección (de una repetición conformada por seis aminoácidos); y 14 mutaciones de las cuales ocho son silenciosas y seis cambian el aminoácido. Se identifican 37 potenciales sitios de fosforilación, las cuales se incrementan al final de la secuencia. La secuencia de Vitelogenina de la Cepa Media Joya, de esta investigación, mostró una repetición de aminoácidos (RHEYPT) en la posición 554-559, que no es observada en la cepa australiana reportada en el Gen bank, con número de acceso U49934 (Tellam *et al.*, 2002).

En la secuencia de proteínas de superficie de *A. marginale*, se han localizado repeticiones que representan la porción más variable de la proteína (De la Fuente *et al.*, 2003). Investigaciones recientes, reportaron sitios repetidos en la secuencia de *D. variabilis* en el extremo carboxi-terminal de EPSVSTLPVHYLEELKK, misma que se presenta en *B. microplus* GP80 y en la secuencia de Vg de *B. microplus* “Media Joya” de esta investigación. A la altura del aminoácido 490, hay un cambio de la primera serina por una leucina en la secuencia reportada. La secuencia es similar pero no idéntica a la reportada y obtenida de huevo de *D. variabilis*, lo que sugiere la participación de más de un gen de Vg (Thompson *et al.*, 2007).

El contenido de serina y treonina es particularmente alto en las repeticiones de péptidos, sugiriendo que las O glicosilaciones son modificaciones para anclaje de carbohidratos en la cepa “Media Joya”, como potenciales sitios de glicosilación. La caracterización del dominio funcional de MSP 1 α presenta tandems de péptidos repetidos que son necesarios y suficientes para mediar la adhesión de MPS 1 α a células de garrapata y eritrocitos de bovino en *Anaplasma. marginale* (García- Garcia *et al.*, 2004 b). En la secuencia reportada de *D. variabilis*, se representa un sitio de glicosilación, en el dominio que es rico en serina y treonina (Mitchell *et al.*, 2007). En insectos, las vitelogeninas son secretadas como fosfolipoglicoproteínas después de las modificaciones postraduccionales. En el insecto del frijol, *Riptortis clavatus*, la Vg tiene 11 sitios putativos de

glicosilación unidos a la asparagina. Una notable característica de la composición de aminoácidos es el alto contenido de serina, (11.6%), debido a dos sitios de regiones de poliserina en las regiones 336-361 y 406-434 (Hirai *et al.*, 1998). Las mucinas son glicoproteínas, que se encuentran en las secreciones del tracto gastrointestinal, reproductivo y respiratorio, con un alto contenido de O-glicanos y la presencia de secuencias repetidas de aminoácidos (tandems de repeticiones), localizados en el centro de la estructura del péptido y ricas en treoninas, serinas y prolinas (Murray *et al.*, 2000).

El fragmento de Vg de 1800 pb proveniente de intestino y ovarios, fue insertado en el vector de transporte pBlue-Bac 4.5/V5His TOPO, por medio del cual fue adicionada una etiqueta de histidinas. Posteriormente, fue transformado en el baculovirus Bac-N-Blue para su expresión recombinante y co-transfección en células eucariontes Sf9, para el adecuado plegamiento de la Vg y los sitios de glicosilación proporcionados por el sistema eucarionte. La purificación fue por cromatografía de afinidad con columnas de níquel. En otros trabajos el DNAC de Vg derivado de RNAm de larvas de la cepa australiana Indooroopilly fue insertado en un vector de expresión que adiciona una etiqueta de histidinas a la secuencia, posteriormente fue expresada como cuerpos de inclusión bacterial y purificado por cromatografía de afinidad por Ni-NTA. Sin embargo, se menciona que la falta de plegamiento y glicosilaciones conferidas por células de insecto fueron determinantes para que la proteína expresada en procariontes no fuera reconocida por el sistema inmune del hospedero ovino (Tellan *et al.*, 2002). La secuencia de BMA7 derivada de un extracto en glándulas salivales, fue expresado en células eucariontes por transformación de un baculovirus e indujo una inmunidad parcial contra infestaciones con *B. microplus* (McKenna *et al.*, 1988). En Vg de la cepa Media Joya, las glicosilaciones y el adecuado plegamiento de la proteína por ser expresada en un sistema eucarionte la hacen un candidato potencial para ser utilizado como inmunógeno, ya que es donde se encuentran los determinantes antigénicos a ser reconocidos por el sistema inmune del hospedero.

La proteína Bm86 obtenida de la superficie del intestino de la garrapata *B. microplus*, está extensamente glicosilada, e induce una fuerte respuesta de anticuerpos. La proteína recombinante expresada en *E. coli*, al ser evaluada mostró un efecto protector muy cercano o idéntico a la proteína nativa (Willadsen *et al.*, 2004). Un incremento en la eficacia fue observada cuando la proteína fue expresada en células de insecto, también fue expresada en tres levaduras: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Pichia pastoris* (Willadsen, 2004). La evaluación de la proteína recombinante, realizada en Egipto en ganado nativo, proporcionó una reducción del 78% de garrapatas repletas y una reducción en el peso de sobrevivencia del 30.5%. Lo que sugiere una eficacia alta debida a la expresión recombinante de la proteína (Willadsen, *et al.*, 2004). Los resultados de un experimento de vacunación con esta proteína, en un hato lechero en Australia contra *B. microplus* condujo a una reducción en el número de garrapatas del 56% (Willadsen *et al.*, 2006).

La Vg R de este experimento fue purificada por columna de níquel, los eluidos obtenidos fueron evaluados y se observaron bandas en los eluidos 12-16. Se observaron dos bandas una de 80 kDa y otra de aproximadamente 20 kDa; Las mismas fracciones fueron transferidas a una membrana de nylon para Western blot y utilizando anticuerpos anti-etiqueta de histidinas se reconocieron varias bandas de menor peso que la banda de 80 kDa. La proteína recombinante Bm91, fue purificada por HPLC, fueron obtenidas las fracciones eluidas entre los 21.75 y 21.81 min, la proteína fue homogeneizada y determinada por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Riding *et al.*, 1994). La fracción de dos proteínas fueron separadas por la fase reversa de HPLC. Esas fracciones fueron migradas por SDS-PAGE y teñidos con Coomassie, se observaron varias bandas de diferentes pesos. Las bandas reconocidas por el suero pre-inmune, son bandas de menor peso, las bandas reconocidas con el suero post-inmune, son bandas de mayor peso (Pruett *et al.*, 2006). La Vg de este experimento quedo fraccionada, como se pudo observar en los geles de acrilamida y en el Western blot posterior, muy probablemente, fue debido al método de purificación o al proceso durante la migración por electroforesis en el gel (James y Oliver, 1997).

Los bovinos de este experimento fueron inoculados en tres ocasiones con Vg recombinante, un antígeno oculto de *B. microplus* vía subcutánea en los ganglios preescapulares y precraurales de cada lado. Proporcionando una mejor exposición a los ganglios que producen las células presentadoras de antígenos necesarias para desencadenar la respuesta inmune celular y humoral.

La investigación sobre antígenos condujo a la búsqueda de sitios blanco fisiológicos internos, definidos como antígenos ocultos, los cuales normalmente no son "vistos", por el sistema inmune del hospedero y pueden ser más inmunogénicos que los antígenos convencionales, de esta manera los ectoparásitos hematófagos se alimentan con sangre que contiene anticuerpos del hospedero (Pruett, 1999). La Vg es considerada un antígeno oculto, los antígenos ocultos son aquellos que no parten de la interacción normal hospedero-parásito, y bajo condiciones normales no estimulan una respuesta inmune. Es necesario elevar una respuesta por vacunación para que esas moléculas inmunogénicas induzcan un daño a la garrapata. Ejemplos típicos de esos inmunógenos, son las proteínas inmunogénicas localizadas en la superficie del intestino de la garrapata. Anticuerpos contra esta proteína producidos por vacunación, generan la entrada de inmunoglobulinas específicas durante la alimentación y conducen al daño del ectoparásito (Willadsen, 2004). Los antígenos ocultos han sido descritos como aquellos que naturalmente no son expuestos al sistema inmune del hospedero durante la infestación con garrapatas y son requeridas repetidas inmunizaciones para mantener elevados los títulos de anticuerpos. La ventaja de usar los antígenos ocultos resulta de la poca probabilidad de las garrapatas para contrarrestar efectivamente el efecto del sistema inmune del hospedero, lo que no ocurre con los antígenos expuestos (De la Fuente *et al.*, 2006). Antígenos ocultos de intestino, de la mosca *Lucilia cuprina*, H11 de *Haemonchus contortus* y Bm86 de la garrapata *B. microplus* y la glicoproteína Bm91, han sido evaluadas por procesos de vacunación y desafío con parásitos, obteniendo resultados de protección variables (Riding *et al.*, 1994).

Los métodos inmunológicos ofrecen muchas ventajas, pero no se han desarrollado vacunas exitosas contra ectoparásitos, debido en parte a la naturaleza de la interacción hospedero-parásito (Willadsen *et al.*, 1989). Las vacunas proporcionan inmunidad al hato, con requerimientos sostenibles satisfactorios, en términos de especificidad de sitios blanco por especie, ausencia de residuos y larga inmunidad (Pruett, 1999). La ventaja principal de las vacunas es la reducción del uso de los acaricidas, lo cual es deseable debido a la reducción en la selección de resistencia en las garrapatas y una menor contaminación ambiental y residuos en el animal (Dalton *et al.*, 2001). Las ventajas de las vacunas con péptidos sintéticos incluyen: un alto grado de pureza, caracterización química, carencia de contaminantes, comodidad de almacenaje debido a su estabilidad como resultado de ausencia de enzimas proteolíticas, y un bajo costo de producción en escalas industriales (Patarroyo *et al.*, 2002).

La vacuna expresada en *E. coli* Bm86 TickGard™, desarrollada por los Australianos, es dirigida contra *B. microplus*. Una vacuna recombinante similar es la vacuna GAVAC, la cual fue expresada en la levadura *Pichia pastoris*. La vacuna induce anticuerpos que reconocen a la molécula de Bm86 en las células intestinales causando lisis y así interfiere con la actividad alimenticia de la garrapata. Sin embargo, la vacuna no tiene un efecto inmediato en la reducción en el número de garrapatas (la infestación se puede reducir de un 20 a un 30%), no reduce la capacidad reproductiva de las hembras, al pasar el tiempo las vacunas pueden reducir el número de garrapatas que sobreviven de un 70 a 90% (Dalton *et al.*, 2001).

La vacuna Bm86, fue clonada y expresada en *E. coli* y usada para vacunar ganado resultando en un 77% de protección. Esta molécula proporcionó un 88% de protección cuando fue expresada en células de insecto infectadas con baculovirus, y se obtuvieron distintos niveles de eficacia cuando fueron expresados en levaduras (Patarroyo *et al.*, 2002).

La glicoproteína Bm86, anclada a la membrana, se localiza en la superficie del intestino. Se ha descrito que ocurre una respuesta inmune

primaria contra Bm86 como la que ya ha sido mencionada, que continua con una respuesta inmune secundaria que origina la lisis del intestino de la garrapata como resultado de la unión de los anticuerpos anti-Bm86 (Pruett, 1999). La respuesta inmunológica humoral contra Bm86 actúa directamente en el intestino de la garrapata reduciendo el número de hembras repletas, el peso de las hembras sobrevivientes, y su fecundidad (Ruíz *et al.*, 2006). La participación del complemento, por la vía clásica, provoca una serie de orificios a las células del intestino, originando una descompensación en el intestino por la entrada de agua a las células y la salida de calcio hacia el hemocele, lo que induce una serie de signos en la garrapata o la muerte de las hembras repletas por choque osmótico (Pruett, 1999). Actualmente se conoce que el sistema del complemento desempeña un papel importante en la respuesta inmune que se genera contra el antígeno, es parte de la causa de los daños que se producen en el intestino de las garrapatas. Las células digestivas del intestino cuya función es ingerir el alimento mediante un proceso de endocitosis y digerir la sangre intracelularmente como alimento fundamental del parásito se ven afectadas esencialmente por la vacunación (Rodríguez, 1999).

La Vg recombinante utilizada en este experimento fue inoculada vía subcutánea a los bovinos, por lo cual en ellos se espera una respuesta inmune primaria durante este proceso y posteriormente una respuesta inmune secundaria. La respuesta inmune primaria se inició con la inoculación de los bovinos la cual se desarrollo alrededor de los 7 primeros días. Durante la respuesta inmune primaria se manifestó la participación de células propias de procesos inflamatorios como neutrófilos, eosinófilos, y basofilos, estas células atraen la participación de células presentadoras de antígenos (CPA) como macrófagos, y células dendríticas provenientes estas últimas de los ganglios linfáticos, la cuales son estimuladas por INF γ ; las células dendríticas desencadenan la participación de la IL2, y presentan a la proteína recombinante al Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase II (MHCII). Se inicia la respuesta inmune secundaria con la participación de las células TCD4, estimulan a IL2, IL4, IFN γ , y la IL5. Las células TCD4 desencadenan la participación de los LTCD8 por un lado, y por otro el INF γ , con la

participación de linfocitos B (LB), los cuales son diferenciados por la participación del IL2, TGF β , IL4, IL5, INF γ en células plasmáticas y células de memoria, las células plasmáticas secretan anticuerpos y en ellas se da un cambio de isotipo. Se propone la participación de la IgG, la cual está presente en el suero de los bovinos y será ingerida por las garrapatas al alimentarse. Con la participación de las inmunoglobulinas G, puede ser activado el Complemento por la vía clásica (Tizard, 1995).

Debido a que la Vg, dentro de la garrapata, no es una proteína anclada a la membrana y una vez, secretada viaja por la hemolinfa, es probable que quede anclada a la membrana de algún órgano como el intestino antes de que ingrese al ovario, teniendo contacto con las IgG ingeridas con la sangre del bovino. Los daños sobre las garrapatas que produce la inmunización con antígenos de intestino, parece estar mediada fundamentalmente por la inmunidad de tipo humoral, en ensayos de alimentación *in vitro*, con el suero de animales protegidos se demostró que la IgG más que la IgM produjo daño en los intestinos de las garrapatas y que la IgG1 más que la IgG2 fue responsable de esos resultados, las inmunoglobulinas penetran a las células mediante procesos de endocitosis en fase fluida (Mendiola *et al.*, 1997). En garrapatas adultas hay un mayor consumo de inmunoglobulinas y pueden haber cambios en la permeabilidad celular del intestino, después del tiempo de consumo, el contenido intestinal cambia o puede ocurrir un incremento en la deshidratación, son encontradas en la hemolinfa altas cantidades de IgG donde hay un indicio de daño al intestino, las garrapatas manifiestan evidencia de debilidad, y reducción en la movilidad (Jasinskas *et al.*, 2000).

Las inmunoglobulinas unidas a membranas participan en la eliminación de las garrapatas, son moléculas que atraviesan el intestino de la garrapata, y son el principal componente del suero del hospedero y reaccionan contra sus tejidos en el hemocele (Brossard y Wikel, 2004), las inmunoglobulinas fueron cuantificadas en la hemolinfa. Aproximadamente el 2% de las inmunoglobulinas fueron encontradas en *B. microplus* (Itabajara *et al.*, 1996). Las inmunoglobulinas bovinas están presentes en la hemolinfa de las garrapatas

hasta 48 horas después de que completan su ciclo de vida parásito. Las investigaciones anteriores sugieren que los anticuerpos contra órganos internos y otros tejidos pueden ser usados para el control de infestación por garrapatas por interferencia en funciones fisiológicas no relacionadas al sistema digestivo (Itabajara *et al.*, 1996, Wang y Nuttall, 1995). En investigaciones donde fue analizada la hemolinfa de garrapatas se demostró el pasaje de proteínas de suero de bovino incluyendo inmunoglobulinas del intestino dentro del hemocele de la garrapata. Moléculas de IgG intactas fueron encontradas en *B. microplus*, *Ixodes ricinus*, *Ornithodoros moubata*, como también en *Hyalomma excavatum* y *Rhipicephalus sanguineus* (Itabajara *et al.*, 1996, Wang y Nuttall, 1995). Durante el desarrollo ninfal de *D. variabilis* e *I. scapularis*, fueron monitoreados los contenidos de IgG. En *Dermacentor*, fue detectada en la hemolinfa, en *Ixodes*, estuvo ausente en la hemolinfa. En ambas especies la IgG fue detectada de un estadio a otro, concentraciones de IgG atraviesan el intestino dentro del hemocele al final de la fase de ninfa a adulto. En *Ixodes* la concentración declina y en *Dermacentor*, la concentración de la inmunoglobulina persiste (Vaughan *et al.*, 2002).

En *Boophilus microplus* cepa "Media Joya", fueron obtenidos péptidos de 72, 95 y 170 kDa, en condiciones reductoras no desnaturalizantes, en muestras de intestino de garrapatas que completaron su ciclo de vida parásito.

Extractos de proteína de huevo, larvas e intestino, de *B. microplus*, fueron evaluados por Western blot. El péptido de Vt fue reconocido en todos los extractos por el suero de conejo anti-vitelina generado por inmunización con extractos de huevo cinco días después de la oviposición (Canal *et al.*, 1995). El suero de bovinos vacunados con la proteína recombinante expresada en baculovirus Bm91 en pequeñas cantidades reaccionó fuertemente contra garrapatas en condiciones naturales (Riding *et al.*, 1994). El suero de bovinos del día 37 pos-inoculación, con la técnica de Western blot detectó la señal, de la Vg en macerado de intestino de garrapatas que completaron su ciclo de vida parásito. Por lo anterior consideramos que el suero de bovinos inoculados reconoce la Vg sintetizada en el intestino e indujo una respuesta en su sistema inmune.

La carencia de reacción de suero expuesto a garrapatas con Bm91 en Western blot fue causada por la desnaturalización del Ag durante el procedimiento (Riding *et al.*, 1994). En nuestro experimento, sí hubo reacción al exponer el suero de los bovinos con macerado de intestino, la Vg no fue desnaturalizada durante el proceso, ya que durante la extracción del órgano se utilizó un inhibidor de proteasas.

Fueron elaborados tres péptidos sintéticos llamados SBm4912, SBm7462, y SBm19733 y se evaluó su comportamiento inmunológico en bovinos. Después de la tercera dosis, los niveles de anticuerpos se incrementaron con un pico máximo a los 15 días después de la segunda inoculación. En Western blot, el suero de animales inmunizados reconocieron una banda simple con el peso correspondiente a cada inmunógeno. No se observó reacción con el suero del grupo control (Patarroyo *et al.*, 2002). En el experimento con Vg recombinante las muestras de Vg sin purificar, purificada y macerado de intestino de garrapata fueron utilizados en la técnica de Western blot y expuestos con suero pre-inmune, no se observó reacción

En conejos fueron producidos anticuerpos contra dos Vg putativas: Vg211 y Vg148 de *Amblyomma hebraeum*. Los anticuerpos fueron expuestos con muestras de hemolinfa de garrapata del día 10 de alimentación mediante la técnica de Western blot y en ovarios, Vg148 se unió a péptidos de 148 y 66 kDa, indicando un grado significativo en el procesamiento ocurrido durante la síntesis de Vg (Friesen y Kaufman, 2002). Resultados similares fueron observados en *Ornithodoros parkeri* y *Ornithodoros moubata* por SDS-PAGE. En *D. variabilis* e *I. scapularis*, los péptidos de Vg también se unen a anticuerpos contra Vg (demostrado por Western blot). Los dos polipéptidos fueron más abundantes en la hemolinfa de garrapatas adultas, incluyendo hembras de 10 días pos-repleción. Tellam *et al.*, (2002), utilizaron suero de ovinos preinmune e inmune, vacunados con un péptido recombinante de Vt (HexahisGP80), el suero preinmune no reaccionó con las muestras de hemolinfa, mientras que se obtuvo la señal con el suero inmune diluido 1:500. En nuestro estudio se utilizó la técnica de western blot, y se utilizó el suero

adsorbido de los bovinos inoculados, inicialmente se utilizó la dilución 1:500, el suero reconoció las señales en macerado de intestino, la Vg recombinante, y el lisado celular con Vg sin purificar. En el suero pre-inmune no se detectó la señal.

En garrapatas blandas, *O. moubata* y *O. parkeri*, obtuvieron vitellina (Vt) (600 kDa) y Vg (Vg1 600 kDa y Vg-II, 300 kDa) son proteínas de alto peso molecular con 6 a 7 subunidades. Similarmente, en las garrapatas duras *D. variabilis*, la Vt A tiene un peso molecular de 480 kDa y Vt B de 370 kDa, mientras que en *Ixodes scapularis*, la Vt es de 480 kDa. En general los carbohidratos, lípidos y composición de aminoácidos de Vt es similar en insectos y garrapatas, pero las proteínas de garrapatas (Vt y Vg) son hemogliproteínas. Las proteínas del grupo Heme, como Vg, derivan del grupo Heme de la digestión de la hemoglobina del hospedero. Las hemoglicoproteínas Vg de garrapatas *D. andersoni*, *O. moubata*, *D. variabilis* e *I. scapularis* fueron separadas en 6-9 polipéptidos y los pesos moleculares oscilan entre 370 kDa y 8700 kDa (Gudderra *et al.*, 2002). En nuestra investigación fueron obtenidas las señales de péptidos mayores a 170 kDa, lo que nos hace considerar que el suero de los bovinos puede reconocer puede reconocer péptidos de mayor peso molecular de Vg.

En *Amblyomma hebraeum*, fueron identificados dos polipéptidos en hembras vitelogénicas (Vg211 y 148). Los que están presentes en los ovarios el día 10, pos-repleción y aparecen como pares de bandas en geles de SDS-PAGE. Las proteínas fueron detectadas como polipéptidos simples en la hemolinfa, el procesamiento posiblemente comience tan pronto como la Vg es tomada por los oocitos, las dobles bandas que aparecen en el ovario pueden ser el reflejo de este procesamiento temprano. Dos polipéptidos (de aproximadamente 95 y 105 kDa) de la hemolinfa de la garrapata fueron los más abundantes en todas las etapas adultas, incluyendo hembras adultas 10 días posteriores a la repleción (Fiesen y Kaufman, 2002). En la muestra de macerado de intestino se obtuvo la reacción en tres fragmentos de 50, 95, y uno mayor a 170 kDa, pudiera ser que la Vg fue fraccionada durante el procesamiento de la electroforesis.

En *Boophilus microplus* de la cepa "Media Joya", del estudio, con la técnica de Western blot, donde se utilizó el suero de bovinos inoculados con Vg recombinante, fueron detectadas las señales de una proteína nativa de aproximadamente 170 kDa, en muestras de macerado de intestino. En condiciones nativas, no fue obtenida la señal de la Vg, en ovarios, las muestras fueron obtenidas de hembras repletas que completaron su ciclo de vida parásito en el hospedero bovino, la falta de señal esta relacionada a que la Vg se sintetiza durante la alimentación o la oviposición, esta última tres días después del desprendimiento de las hembras y las hembras a las cuales se les extrajo los órganos no estaban en ninguna de las dos fases. Se obtuvo la señal, probablemente debido a que el intestino estaba metabolizando el alimento obtenido del bovino y sintetizando Vg para posteriormente enviarla al ovario.

La Vg de *D. variabilis* consiste en dos proteínas nativas, Vg (330kDa) y Vg B (320 kDa), y esta compuesta de 7 unidades de 22 a 215 kDa, en condiciones nativas (Gudderra *et al.*, 2002). El peso molecular de la Vg de *D. variabilis* fue de 463 kDa. La Vg de *I. scapularis* contiene 8 subunidades con pesos moleculares de 48 a 145 kDa. El punto isoelectrico (pI) de 6.55 para Vg-A y 6.65 para Vg-B, en *D. variabilis* es similar el pI de Vg en garrapatas suaves, *O. moubata* (Gudderra, *et al.*, 2002)

La masa molecular de Vg nativa fue de 480 kDa, un anticuerpo policlonal reconoció 6 subunidades en vitelina purificada y huevo en condiciones nativas. Como control negativo, la sustitución de suero pre-inmune de conejo, no produjo reacción contra Vg. El anticuerpo anti-Vg también reconoció bandas en muestras de cuerpos grasos y hemolinfa de hembras reproductivas, el anticuerpo-anti-Vg reconoció extractos solubles de huevo de *Ixodes pacificus* e *Ixodes ricinus*. La masa molecular nativa de la Vg aislada de los huevos de garrapatas *D. variabilis* y *R. appendiculatus*, por ejemplo, las masas moleculares de 480 y 370 kDa para vitelinas de *D. variabilis* y 480 kDa para vitelinas de huevo de *R. appendiculatus*. Sin embargo, la Vg de *I. scapularis* difiere en el número de polipéptidos y componentes nativos

asociados con cada Vg con aquellos de *D. variabilis* y *R. appendiculatus* (James y Oliver 1997).

Respecto al ensayo de alimentación *in vitro* de garrapatas, de la cepa “Media Joya” fue utilizado suero de los bovinos inoculados, dos días antes de que cumplieran su ciclo de vida parásito, se obtuvo una reducción en la cantidad de masa ovígera en el grupo tratado. Tellam *et al.*, (2002), reportan una reducción en la cantidad de huevo ovipositado por hembras alimentadas en ovinos vacunados con GP80 y Vit87 dos Vg nativas, reportan además cambio en la coloración en el cuerpo de la garrapata y severos daños en el intestino.

CONCLUSIONES

En el presente estudio ha sido demostrado que la vitelogenina es una proteína altamente conservada, como fue demostrado al comparar su secuencia con la reportada en el Gen bank. Se observó el 99% de homología con la secuencia reportada, el 1% hace la diferencia. Podemos considerar, por los datos preliminares obtenidos en el ensayo de alimentación, con suero de bovino anti-Vg recombinante, a la Vg como un potencial candidato a vacuna, para evaluar su capacidad como inmunógeno, en pruebas de desafío con larvas garrapatas *B. microplus* en los bovinos inoculados con la proteína recombinante.

Para el control de *B. microplus*, pueden considerarse inmunógenos protectores (antígenos ocultos) contra garrapatas, esto puede ser posible si éstos inmunógenos son conservados en lo posible para evitar la variación en la secuencia que pueda ocasionar que no sean reconocidos por los hospederos a inmunizar. La combinación de los antígenos recombinantes, también pueden ser sugeridos para incrementar la eficacia de las vacunas, ya se ha reportado el incremento de la eficacia al utilizar dos inmunógenos recombinantes.

LITERATURA CITADA

- 1.- Alvarez MJA, Cantó AGJ. Epidemiología de la Babesiosis. En: Parasitología. Soc. Mex. Parasitol. Mexico1985;1: 55-72.
- 2.- Betancourt EA. Experiencias colombianas de uso de una vacuna contra la garrapata *Boophilus microplus* basada en un antígeno poliproteico de larvas de garrapata. Red Electrónica de garrapatas y enfermedades transmitidas por garrapatas para América latina y el Caribe. RedEctopar. 2007.1-8.
- 3.- Boué O, Redondo M, Montero C, Rodriguez M, De la Fuente J. Reproductive and safety assessment of vaccination with GAVAC™ against the cattle tick (*Boophilus microplus*). Theriogenology. 1999; 51: 1547-1554.
- 4.- Brossard M, Wikel SK. Tick immunobiology. Parasitol. 2004;129:S161-S176.
- 5.- Campos E, Moraes J, Facanha AR, Moreira E, Valle D, Abreu L, Manso P PA, Nascimento A, Pelajo-Machado M, Lenzi H, Masuda A, Vaz Junior I S, Logullo C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestreni, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. Vet.Parasitol.2006; 138:349-357.
- 6.- Canal CW, Maia HM, Vaz Junior IS, Chies JM, Farias NAR, Masuda A, Gonzales JC, Ozaki LS, Dewes H. Changing patterns off vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. Exp. App.Acarol. 1995; 19:325-336.
- 7.- Dalton JP, Mulcahy G. Parasite vaccines a reality? Vet. Parasitol. 2001; 98: 149-167.

8.- De la Fuente J, García-García JC, Blouin EF, Kocan KM. Characterization of the functional domain of major surface protein 1^a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet. Microbiol.* 2003; 91: 265-283.

9.- De la Fuente J, Kocan K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasitol. Immun.* 2006; 28: 275-283.

10.- Fausto AM, Fava E, Manzini M, Cechettini A, Giorgi F. Confocal scanning laser microscopy of the follicular epithelium in ovarioles of the stick insect *Carausius morosus*. *Cell.Tissue. Res.* 1998; 293:551-561.

11.- Foil, L.D., Coleman, P., Eisler, M., Fragoso-Sanchez, H., Garcia-Vazquez, Z., Guerrero, F.D., Jonson, N.N., Langstaff, I.G., Li, Y.A., Machila, N., Miller, J.R., Morton, J., Pret, H.J., Torr, S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet. Parasitol.* 2004;125: 163-181.

12.- Friesen KJ, Kaufman WR. Quantification of vitellogenesis and its control by 20-hydroxyecdysone in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *J.Ins. Physiol.* 2002; 48: 773-782.

13.- García-García JC, González IL, González DM, Valdés M, Méndez L, Lamberti J, D' Agostino B, Citroni D, Fragoso H, Ortiz M, Rodríguez M, De la Fuente J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp. Appl. Acarol.* 1999; 23:883-895.

14.- García-García JC, De la Fuente J, Bell-Eunice G, Blouin EF, Kocan KM. Glycosilation of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its putative role in adhesion to ticks cells. *Infec.Imm.* 2004; 72: 3022-3030(a)

15.- García-García JC, De la Fuente J, Blouin EF, Jonson TJ, Albur T, Onet VC, Saliki JT, Kocan KM. Diferencial expresión of the *msp1 α* gene of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and tick cells. Vet. Micro. 2004; 98: 261-272.(b)

16.- Guderra NP, Sonenshine DE, Apperson CJ, Roe RM. Hemolymph proteins in the ticks. J. Insec. Phy. 2002; 48:269-278.

17.- Hernández OR. Efecto de la ivermectina sobre diferentes estadios de garrapatas *Boophilus microplus* (Canestreni 1887) en bovinos infestados artificialmente. (Tesis de licenciatura). Distrito Federal (Distrito Federal) México. Universidad Nacional Autónoma de México. 1985.

18.- Hirai M, Watanabe A, Kiyota A, Chinzei Y. nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug, *Riptortus clavatus*: analysis of processing in the fat body and ovary. Ins.Biochem. Molec. Biol. 1998; 28:537-547.

19.-Itabajara Da Silva VJ, Moraes MRH, Oliveira A, Heck A, Logullo C, Gonzales JC, Dewes H, Masuda A. Funcional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph.Vet. Parasitol. 1996; 62: 155-160.

20.- Jasinskas A, Jaworski D, Barbour AG. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. Exp. Parasitol. 2000; 96: 213-221.

21.- James AM, Zhu XX, Oliver JH Jr. Vitellogenin and ecdysteroid titres in *Ixodes scapularis* during vitellogenesis. J.Parasitol. 1997; 83:559-563.

22.- James AM, Oliver JH Jr. Vitellogenin concentrations in the haemolymph and ovaries of *Ixodes scapularis* ticks during vitellogenesis. Exp. Appl. Acarol. 1996; 20: 639-647.

23.- Jonsson NN, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Albrecht MS, Hungerford J, Ansell J. Evaluation of tickGARD plus, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein –Friesian cows. Vet. Parasitol. 2000; 88:275-285

24.- Kemp Dh, Agbede RIS, Johnston LAY, Gough JM. Immunization of the cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. Int. J. Parasitol. 1985; 16: 115-120.

25.- Lodos J, Boué O, De la Fuente J.. A model to simulate the effect of vaccination against *Boophilus microplus* tick on cattle. Vet. Parasitol. 2000;87:315-326

26.- Llanderal CC. Introducción a la fisiología de insectos. Ed. Colegio de Postgraduados. México. 2000.

27.- Malkin EM, Durban AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Yimin, Kazutoyo M, Long CA, Lambert L, Miles AP, Wang Jin, Stowers A, Miller LH, Saul A. Phase I vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. Vaccine. 2005; 23: 3131-3138.

28.- Mckenna RV, Riding GA, Jarmey JM, Pearson RD, Willadsen P. Vaccination of the cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. Parasite Immun. 1998; 20:325-336.

29.- Mendiola J, Casanova P, Hernández H. Fernández CA, García I. Efecto de la ingestión en la concentración de inmunoglobulina G en la ingesta de hembras de *Boophilus microplus* repletas. Rev.Cub. Med Trop. 1997; 49:161-166.

30.- Merlin CJ, Mahillon J, Nesvera J, Toussaint A. Gene recruiters and transporters: the modular structure of bacterial mobile elements. En: CM, Thomas (ed). The horizontal gene pool, bacterial plasmids and gene spread. Holanda, Harwood. Academic Publishers. 2000. pp.363-409.

31.- Mitchell RD, Ross E, Osgood Ch, Sonenshine D E, Donohue KV, Khalil SM, Thompson D M, Roe RM. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. *Insect.biochem.Biol.* 2007; 37: 375-388.

32.- Mulenga A, Sugino M, Nakajima M, Sugimoto Ch, Onuma M.. Tick-Encoded serine proteinase inhibitors (serpins); Potential target antigens for ticks vaccine development. *J. Vet. Med. Sci.* 2001; 63: 1063-1069.

33.- Murray RK, Granner DK, Mayer PA, Rodwell VW. Harper's Illustrated Biochemistry, 26^a ed. McGraw-Hill. New York. P. 519. 2000.

34.- Newcomb RD, Campbell PM, Russell RJ, Oakeshott JG. cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 1997; 27: 15-25.

35.- Nolan J, Schnitzerling HJ. Drug resistance in arthropod parasites. In W.V. Campell and RS. Rew. (Eds), Chemoterapy of parasitic diseases. Plenum, New York.1986; Pp. 603-620.

36.- Nose Y, Lee JM, Ueno T, Hatakeyama M, Oishi k. Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla nipponica* (Himenoptera: Apocrita:Ichneumonidae): Vitellogenin primary structure and evolutionary. *Insec Biochem. Molec. Biol.* 1997; 12: 10-47- 1056).

37.- Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, CoutoPJ, Guzman F, Patarroyo ME; Vargas MI, Prates AA, Dias MMA. Immunization of cattle with syntethetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). Vet. Immun.Immunipat. 2002; 88: 163-172.

38.- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuck AR, Cruz J, Simoes ZPL, Belles X. The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. Insec. Biochem. Molec. Biol. 2003; 33: 459-465

39.-Preston PM, Jongejan F. Protective Immune Mechanism to ticks and tick- borne diseases of ruminants. Parasitol. Today. 1999; 15: 255-258.

40.- Pruetz JH. Immunological control of arthropod ectoparasites a review. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 25-32.

41.- Pruetz JH, Untalan PM, Davey RB. Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. Vet. Parasitol. 2006. 140: 14-157.

42.- Pruetz JH, Untalan PM, Davey RB. Identification and partial purification of serologically defined *Boophilus microplus* larval antigens by natural ectoparasite exposure. Vet. Parasitol. 2006; 140: 14-157.

43.- Quiroz RH. Situación actual de la problemática de las garrapatas. Segundo Seminario internacional de Parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. 1991. octubre 9,10 y 11. Oaxtepec (Morelos) México, México (D.F.). Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos. 1991; 3-18.

44.- Rafaeli A, Zakharova T, Lapsker Z, Jurenka RA. The identification of a age- and female-specific putative PBAN membrane-receptor protein in pheromone

glands of *Helicoverpa armigera*: possible up-regulation by Juvenile Hormone. Insec. Biochem. Molec. Biol. 2003; 33:371-380.

45.- Raikhel AS, Kokoza V, Zhu J, Martin D, Wang F, Li Ch, Sun G, Ahmed A, Dittmer N, Attardo G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. Insect. Biochem. Molec Biol. 2002; 32:1275-1286.

46.- Riding, GA, Jarmey J, Mckenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen P. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, possible function. J. Immun. 1994; 135:5159-5166

47.- Rodríguez VM. Respuesta inmunológica contra garrapatas Bistec. Aplic. 2000; 17:215-220.

48.- Rosell R, Coons LB. determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina: Ixodida) using an indirect enzyme-linked Immunosorbent assay. J. Med. Entomol. 1991; 28: 41-44

49.- Rosell R, Coons LB. The role of the fat body midgut and ovary in vitellogenin production and vitellogenesis in the female tick. *Dermacentor variabilis*. Int. J.Parasitol. 1992;22:341-349.

50.- Ruiz LM, Armengol G, Habeych E, Orduz S. A theoretical analysis of codon adaptation index of the *Boophilus microplus* bm86 gene directed to optimization of a DNA vaccine. J.Theor. Biol. 2006; 239: 445-449.

51.- Salerno AP, Dansa-Petreski M, Silva-Neto MAC, Coelho HS, Masuda H. *Rhodnius prolixus* vitellin is composed of three different populations: comparasion with vitellogenin. Insect.Biochem. Mol.Biol. 2002; 32: 709-717.

52.- Sambrook J, Fritsch, E F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

53.- Sankhon N, Lockey T, Rosell RC, Rothshild M, Coons L. Effect of methoprene and 20-hydroxyecdysone on vitellogenin production in culture fat body and backless explants from unfed female *Dermacentor variabilis*. J. Insect Physiol.1999; 45:755-761.

54.- Seixas A, Dos Santos PC, Velloso FF, Da Silva Vaz Jr. Masuda A, Horn F, Termignoni C. a *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. Parasitol. 2003; 126:155-163.

55.- Silva-Neto MAC, Fialho E, Paes MC, Oliveira PL, Masuda H. Cyclic nucleotide –independent phosphorylation of vitellin by casein kinase II purified from *Rhodnius prolixus* oocytes. Ins. Biochem Molec. Biol. 2002; 32: 847-857.

56.- Sorgine MHF, Logullo L, Zingalli RB, Paiva-Silva GO, Juliano I, Oliveira PL. A Heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. J. Biol. Chem. 2000; 275: 28659-28665.

57.- Soulsby E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Interamericana. México. 1987.

58.- Tellam RL, Kemp D, Riding G, Briscoe S, Smith D, Sharp P, Irving D, Willadsen P. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. Vet. Parasitol. 2002; 103:141-156.

59.- Tizard IR. Immunology veterinary. Sauder College publishing. United States. 4a. ed. 1995; 57, 58, 193, 194, 234, 235.

60.- Thompson DM, Khalil SMS, Jeffers LA, Sonenshine DE, Mitchell RD, Osgood CHJ, Roe RM. Sequence and developmental and tissue-specific regulation of the first complete vitellogenin Messenger RNA from ticks for heme sequestration. *Insect. Biochem. Molec.* 2007; 37: 363-374.

61.- Toro BM. Anaplasmosis: aspectos epizootiológicos y métodos de control. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Instituto de Investigaciones Veterinarias, Venezuela. 1994; 19-28.

62.- Toro-Ortiz RD, Itabajara da Silva VJ, Gonzáles JC, Masuda A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. *Vet. Parasitol.* 1997; 69: 297-306.

63.- Trager W. Acquired immunity to ticks *J. Parasitol.* 1939; 25:51-81.

64.- Tufail M, Takeda M. Vitellogenin of the cockroach *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 2002; 32: 1469-1476.

65.- Vaughan JA, Sonenshine DE, Azad AF. Kinetics of ingested host immunoglobulin G in hemolymph and whole body homogenates during nymphal development of *Dermacentor variabilis* and *Ixodes scapularis* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. acarol.* 2002; 27:329-40.

66.- Vega y Murguía CA. Actualidad e importancia de las enfermedades del ganado causadas por parásitos. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal: Garrapatas y enfermedades que transmiten. 1991. octubre 9, 10 y 11. Oaxtepec (Morelos). México, México(D.F.) Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos.: 1991; 144-150.

67.- Wang H, Nuttall PA. Immunoglobulin G binding in the ixodid ticks, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes hexagonus*. Parasitol. 1995; 111:161-165.

68.- Wang H, Nuttall PA. Immunoglobulin-binding proteins in tick: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. CMLS. Cell Mol Life Sci. 1999; 56:286-295.

69.- Wikel SK. Immunological control of Hematophagous Arthropod vectors: utilization of novel antigens. Vet. Parasitol. 1988; 29:235-264.

70.- Willadsen P, McKenna RV, Riding GA. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. Int. J. Parasitol. 1988; 18:183-189.

71.- Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, Lahnstein J, Cobon GS, Gough JM. Immunologic control of a parasitic arthropod identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. J. Immunol. 1989; 143: 1346-1351.

72.- Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. Vet. Parasitol. 1997; 71: 209-22.

73.- Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host infection and the control of tick-borne diseases. Parasitol. Today. 1999;15: 258-62.

74.- Willadsen P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. Vet. Parasitol. 2001; 101:353-367.

75.- Willadsen P. Anti-tick vaccines. Parasitol. 2004; 129:S367-387

76.- Willadsen P. Tick control on a research agenda. Vet. Parasitol. 2006; 138: 161-168.

77.- Woodham CB, Gonzalez OA, López L, Guereña MR.. Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus* en México 1960-1980. Rev. Mun. Zoot. 1983; 48:18-24.

APÉNDICE

Preparación de material biológico (1).

Reproducción y mantenimiento de la cepa de garrapatas *Boophilus microplus*.

Se realizó la reproducción de la cepa de *Boophilus microplus* en un bovino Holstein de 6 meses de edad y 200 Kg de peso, el cual se infesto con un gramo de larvas de 28 días de edad; 21 días posteriores se obtuvieron hembras adultas (10-12 mm de longitud), a las cuales les fue eliminado toda materia orgánica externa, proveniente del bovino, (costras y pelo), y fueron colocadas en cajas de Petri en número de 25 para llevar a acabo la oviposición.

Se colectó y se colocó en frascos ampúla de 10 ml el huevo ovipositado cada 24 hrs, fue identificado y congelado inmediatamente a -70° hasta su uso. Se congeló huevo a distintas fechas para desarrollo embrionario y se dejó una porción de masa ovígera para el desarrollo de larvas de diferentes edades. Otra fracción de huevos se utilizó para continuar con el mantenimiento de la colonia para seguir la investigación.

Obtención de RNA total (2).

Se obtuvo RNA de las muestras de 50 hembras adultas de *Boophilus microplus*, de la colonia Media Joya, del día en que termina su fase de vida parásita. Las garrapatas fueron desprendidas del bovino, al completar el ciclo parásito tres semanas posteriores a la infestación, y homogéneas con una medida de 10-12 mm de longitud. Se tomó a la garrapata de la parte anterior y se procedió a hacer una incisión en la porción caudal con un bisturí, exponiendo el total de los órganos internos, y colocándolos en cajas de petri conteniendo SAF-EDTA pH 7.2, se cambió en varias ocasiones la solución, para visualizar mejor los órganos extraídos.

Se procedió a separar los ovarios del material, y fueron lavados en varias ocasiones para eliminar residuos de sangre totalmente, se continuó con la

verificación de estos órganos con la ayuda del microscopio estereoscópico, finalmente fueron depositados en tubos eppendorff de 1.5 ml.

Posteriormente a los intestinos se les hicieron lavados en varias ocasiones, (lavados mecánicos: subir, bajar y sacudir con cuidado), se eliminó la solución de fosfatos que contenía residuos de sangre, para finalizar, los intestinos fueron absorbidos con una micropipeta de 1000 μ l y colocados en una solución con SAF-EDTA pH 7.2, en tubos eppendorff de 1.5 ml debidamente etiquetados y colocados en hielo hasta su uso. Los órganos fueron almacenados en tubos diferentes.

Las muestras de ovarios e intestinos fueron maceradas, se utilizaron morteros y pistilos previamente lavados, esterilizados y congelados a -70°C . La muestra fue vertida en el mortero recientemente extraído del congelador y pulverizadas con el pistilo, se les adicionó 1 ml del reactivo de TRIzol (Gibco).

Posteriormente se le agregaron a cada muestra 4 ml de reactivo de TRIzol. 1ml/100mg de muestra.

De la muestra se prepararon alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml, previa identificación y fue incubada a temperatura ambiente por 10 min.

Al terminar la incubación, a la muestra se le adicionaron 100 μ l de cloroformo, para la separación de DNA, RNA y proteínas, y el RNA que se encuentra en la fase acuosa. Todos los viales de las muestras fueron agitados vigorosamente en forma manual. Las muestras fueron centrifugadas a 11000 g por 15 min.

Se obtuvo de cada vial la fase acuosa, evitando tocar la interfase para no contaminar la muestra con las proteínas. La fase acuosa fue colocada en viales eppendorf de 1.5 ml previamente identificados.

Posteriormente se adicionaron 500 μ l de isopropanol, los viales se agitaron manualmente y se procedió a una incubación de 10 min a temperatura ambiente se centrifugó nuevamente a 10000g por 10 min. Se observó la posición de la pastilla y se extrajo con cuidado la solución.

Los viales fueron extraídos de la microcentrífuga y colocados con precaución en una gradilla, posterior a ello se visualizó la pastilla formada y el sobrenadante fue decantado.

Se adicionó 1.5 ml de etanol al 75%, para lavar la muestra. Fueron preparados 20 ml (20 ml de etanol y 5 de agua destilada). La pastilla fue desprendida del tubo.

Posteriormente las muestras con etanol al 75% fueron centrifugadas a 8500 g por min durante 10 min.

Se decantó el sobrenadante.

Los viales con las muestras fueron incubados en la campana de flujo laminar (COOPER FILT) por 5 min.

La pastilla de DNA fue disuelta en agua DEPC (Bio 101 inc) y se le adicionaron 50 μ l por vial. Los viales se colocaron en baño María por una hora a 45°C.

Al terminar la incubación, se midieron las DO de las muestras a 260 y 280 nm. Se obtuvieron los siguientes resultados que se observan en el Cuadro I.

La muestra original de RNA fue diluida: 19 µl de agua destilada y 1µl de la muestra.

Las muestras y reactivos fueron manejados en hielo en la campana de flujo laminar.

Este protocolo incluye la síntesis de DNAC y posteriormente continua PCR.

Condiciones del termociclador (4):

Condiciones del RTPCR (5)

Cuadro 6. Condiciones del termociclador para el RTPCR.

CDNA síntesis y pre-Denaturalización	PCR amplificación	Extensión final
50: 00 20 min	94: 00 0.15 seg	72:00 2:00 min
94: 00 2 min	55:00 0.30 seg	72:00 10: min

Kit Sistema de Purificación de gel o producto de PCR Wizard SV y sistema de limpieza para PCR (6)

La muestra con el vial peso 1.37 g, restado el peso del fragmento menos el del tubo, el peso fue de 0.260 mg del fragmento, se agregaron 260 µl de solución de unión a la membrana. Para la extracción del gen del gel fue utilizado el kit Sistema de Purificación de gel o producto de PCR de Wizard SV and PCR Clean-Up System, con el siguiente protocolo.

Obtención de DNA del producto de PCR o del fragmento del gel.

A) Disolver el fragmento del gel.

- 1 Seguido de la electroforesis, se extrajo la banda de DNA del gel y se colocó el fragmento del gel en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
- 2 Se adicionaron 10 μ l de Solución de unión de Membrana por cada 10 mg de fragmento del gel y se incubaron a 50-60°C hasta que el fragmento del gel se disolvió completamente.

B) Procesamiento de reacción de PCR.

Se adicionó un volumen igual a la Solución de Unión de la membrana a la reacción de PCR o DNA.

- 1.- La microcolumna SV fue reinsertada dentro del tubo colector.
- 2.- La mezcla del gel disuelto fue transferida o producto de PCR a la microcolumna ensamblada y fue incubada a temperatura ambiente por un min.
- 3.- Las muestras se centrifugaron a 11000g por un min. El sobrenadante fue desechado y se reinserto la microcolumna dentro del tubo colector.

Lavado.

- 4.- Se adicionaron a la columna 700 μ l de Solución de lavado de Membrana (previa adición de etanol). Las muestras fueron centrifugadas a 11000g por un min. La fracción soluble se desecho y se reinserto la columna dentro del tubo colector.
- 5.- El paso 4 fue repetido con 500 μ l de Solución de Lavado de la membrana, los tubos fueron centrifugados a 11000g por 5 min.

Elusión:

- 6.- La microcolumna fue transferida a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.

7.- Se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas a la microcolumna, fueron incubadas a temperatura ambiente por un min y centrifugadas a 11000g por un min.

8.- La microcolumna fue desechada y el DNA almacenado a -20°C.

Siembra en medio líquido de colonias transformadas (7).

Objetivo:

Recuperar el DNA plasmídico de las colonias transformadas.

Para recuperar el DNA plasmídico las colonias transformadas que contienen el inserto, fueron sembradas en tubos falcón de 15 ml conteniendo 5 ml de medio de cultivo liquido LB con ampicilina (50 µg/ml) durante 24 hrs a 37°C en agitación constante.

Terminadas las 24 hrs de incubación, las cajas con las colonias transformadas, fueron retiradas de la incubadora y mantenidas a 4°C. Posteriormente, se llevo a cabo una extracción de DNA plasmídico utilizándose el kit, Sistema de Purificación de DNA Wizard Plus SV Minipreps.

Protocolo de Purificación de DNA plasmídico. Kit Sistema de Purificación de DNA Wizard Plus SV Minipreps (8).

1.- El cultivo de 1-10 ml de cada colonia transformada fueron incubadas durante de toda la noche en agitación a 37 °C, los tubos con cada muestra fueron centrifugados por 5 min a 11000g.

2.- La muestra fue resuspendida en 250 µl de solución de resuspensión de células.

Se adicionaron 250 µl de solución de lisis de células a cada muestra, los tubos se invirtieron en cuatro ocasiones para mezclar.

3.-Se adicionaron 10 μ l de solución de proteasa alcalina. Los tubos fueron mezclados manualmente por cuatro ocasiones e incubados por 5 min a temperatura ambiente.

4.- Se adicionaron 350 μ l de solución de neutralización y se mezclaron los tubos en cuatro ocasiones.

Los tubos fueron centrifugados a 11000g por 10 min a temperatura ambiente.

Aislamiento del DNA plasmídico (9).

5.- Se inserto la columna dentro del tubo colector.

La fracción soluble fue decantada y el tubo colector fue colocado dentro de la columna.

6.- La muestra fue centrifugada 11000g por 1 min a temperatura ambiente. La fracción soluble del tubo fue decantado, y la columna fue reinsertada en el tubo colector.

Lavado.

8.-Se adicionaron 750 μ l de solución de lavado (etanol adicionado) las muestras fueron centrifugadas a 11000g por 1 min, la fracción soluble fue decantada y la columna colocada en el tubo colector.

9.-Se hizo otro lavado con 250 μ l de solución de lavado.

La muestra fue centrifugada a 11000g por 2 min a temperatura ambiente.

Elusión.

10.-La columna fue transferida a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

11.-Se adicionaron 70 μl de agua libre de nucleasas a la columna, las muestras fueron centrifugadas a 11000g por 1 min a temperatura ambiente. La microlumna fue desechada y la muestra DNA fue almacenada a -20°C .

Para visualizar el DNA plasmídico se elaboro un gel de agarosa al 1% y 1.5 μl de bromuro de etidio, se adicionó 1 μl de DNA plasmídico y 1.8 μl de solución de corrimiento.

Transformación (10).

Una vez amplificado el fragmento de Vg de 1800 pb, con la finalidad de replicarlo, el producto de PCR se inserto en un vector de clonación utilizando el Kit TOPO 2.1, vector 46. 0801 Invitrogen. Para la transformación fue necesario producto de PCR fresco, por lo cual se llevo a cabo un PCR, bajo las condiciones de estandarización de Vg.

Posteriormente se llevo a cabo la transformación química en las siguientes proporciones:

Producto de PCR	4 μl
Vector	1 μl
Solución salina	1 μl
Volumen final	6 μl

Se mezcló en agitación lenta, incubar por 30 minutos.

Se tomó un tubo con células *E. coli* competentes, Competente prealiquote, al cual se le adicionaron 2 μl de la mezcla PCR-TOPO-solución salina. Manteniéndose en hielo por 30 min.

Posteriormente se les aplicó un choque térmico en baño María 42° C durante 30 segundos, que permitió que se abriera la membrana celular de *E. coli* y la entrada del plásmido con el inserto.

Inmediatamente se introdujo el vial en hielo durante 30 min . El vial fue conducido a la campana de flujo laminar para trabajar bajo condiciones de esterilidad. Fueron adicionados 250 µl de medio de cultivo SOC Invitrogen 46 0700 a la muestra y se incubó por una hr a 37° C, dejando el vial en agitación en forma horizontal.

Las cajas de petri con medio de cultivo L broth agar (BIO 101 Inc.)(sólido), previamente preparadas y con antibiótico (ampicilina 50 µg/ml).

Las cajas de Petri con medio sólido fueron extraídas del refrigerador a 4°C y mantenidas por 1 hora a 37 °C, previamente identificadas.

Las cajas fueron esparcidas con 40 µl de Xgal (40mg/ml), hasta que se adsorbió.

Finalizada la incubación se colocaron 40 µl, 80 y el resto de la mezcla en las cajas de Petri, la cual fue colocada en una incubadora a 37°C, durante 17 hrs.

Las clonas transformadas fueron verificadas mediante su coloración, colonias blancas y azules en las cajas de Petri con medio sólido. Fueron seleccionadas 10 colonias blancas, y sembradas en otra caja con medio sólido con ampicilina.

Se procedió a hacer PCR para determinar la presencia del fragmento de interés. Fueron utilizados los iniciadores de la amplificación.

Las clonas transformadas con el fragmento de DNA de Vg de *Boophilus microplus*, fueron sembradas en tubos falcón de 15 ml con 5 ml de medio de cultivo líquido LB con ampicilina (50 µg/ml) durante 24 hrs a 37°C con agitación constante.

Este protocolo de transformación fue repetido con el vector de transporte pBlue-Bac4.5/V5-His-TOPO. En esta ocasión particular fueron seleccionadas colonias azules.

Protocolo de transfección (11)

Baculovirus Bac-N-Blue 0.5µg	Baculovirus Bac-N-Blue 0.5µg
DNA Vg ovario 1 µg/ µl	DNA Vg de intestino 1 µg/ µl
Medio de cultivo 1 ml	Medio de cultivo 1 ml
Celfectina 20 µl	Celfectina 20 µl

1.- Se preparó cada mezcla de la transfección en un tubo de 1.5 ml, el cual contenía la mezcla anterior.

2.- La muestra de transfección fue mezclada fuertemente por 10 seg.

3.- La mezcla de transfección fue incubada a temperatura ambiente por 15 min. Mientras la mezcla de transfección se incubaba, se procedió al paso 4.

4.- Cuidadosamente se removió el medio de las células sin alterar la monocapa y lavar las células cuidadosamente y adicionar 2 ml de medio fresco Sf900 II, sin suplemento o FBS (Esto puede disminuir la eficiencia de transfección por los liposomas).

5.- Otra vez, se removió cuidadosamente todo el medio de la monocapa y se adicionó la mezcla de transfección total a la placa. Se repitió los pasos para todas las transfecciones (distribuir las gotas sobre la monocapa. Este método reduce las oportunidades de alterar la monocapa).

6.- Incubar las placas a temperatura ambiente por 4 hrs en un agitador de lado a lado 2 movimientos por minuto.

7.- Terminadas las 4 hrs del período de incubación se adicionó 1ml de medio Sf 900 II a las platos. Se incubaron los platos a 27 ° grados por 72 hrs.

Procedimiento post-transfección.

Alrededor de las 72 hrs, los botones virales deben ser liberados al medio. El sobrenadante de esta transfección, puede ser cultivado en este momento y se puede ensayar para placas recombinantes.

Si las células pueden no presentar signos de infección hasta el día 4 ó 5 y se pueden incubar las células e inspeccionar diariamente para confirmar el éxito de la transfección.

1.- 2 ml de cultivo de cada plato de células es transfectado por pipeteo del final del medio y transferir a un tubo de 15 ml estéril.

(Este es el stock viral de transfección y puede ser almacenado a 4°C hasta que sea requerido. Se puede usar este stock para identificar el virus reco

Purificación de DNA viral sugerido en el protocolo del baculovirus Bac-N-Blue, se utilizó el siguiente protocolo (12):

Soluciones necesarias:

Proteinasa K (5-10 mg/ml)

Fenol –cloroformo (1:1).

Acetato de sodio: 3 M

Glicógeno (2mg/ml)

Etanol al 100%

Etanol al 70%

100ml de polietilenglicol (PEG) 20% NaCl 1M

1.- Se tomó la muestra generada en el crecimiento del virus recombinante, para análisis por PCR y el stock viral P-1, el sobrenadante fue centrifugado a 3000 g por 3 min a temperatura ambiente.

- 2.- Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionaron 750µl de polietilenglicol (polímero que arrastra el virus al fondo del tubo) al 20% (PEG) en NaCl 1M. Se invirtieron los tubos dos veces para mezclar y se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 min.
- 3.- Los tubos fueron centrifugados a 11000g por 10 min a temperatura ambiente. La fracción soluble fue decantada.
- 4.- Se adicionaron 100 µl de agua estéril al pelet. Cuidadosamente se lavaron las paredes de los tubos para asegurar que todas las partículas virales fueran resuspendidas.
- 5.- Los virus fueron lisados por adición de 10mg/ml de proteinasa K, los tubos se incubaron a 50° C por una hora, en baño María.
- 6.- Se adicionó 100µl de fenol-cloroformo (1:1) a la mezcla. Los tubos fueron centrifugados a 11000g por 5 min a temperatura ambiente, se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril limpio.
- 7.- El DNA se precipitó por adición de 10 µl de acetato de sodio, 5µl de glicógeno y se adicionaron 2 volúmenes de etanol al 100%, respecto al volumen anterior, se incubaron a -20° C por 20 min.
- 8.- Posterior a la incubación los tubos con la pastilla de DNA se centrifugaron a 11000g por 15 min. La fracción soluble fue eliminada.
- 9.- Se lavó la pastilla por adición de 1 ml de etanol al 70%, y fue centrifugado a 11000g por 15 min a temperatura ambiente, los restos de etanol se eliminaron.
- 10.- La pastilla de DNA fue resuspendida en 10 µl de agua estéril y se procedió al ensayo de PCR.

Protocolo para PCR con DNA_v (13)

MASTER MIX	12.5µl
AGUA	6.5 µl
DNA _v	2 µl
INICIADOR SENTIDO	2 µl
INICIADOR ANTISENTIDO	2 µl

Cultivo de Proteína recombinante(14):

Se utilizaron matraces de 250 ml.

Se vertió 40 ml de cultivo con células Sf9.

20 ml de medio SF900 II FSM.

15 ml de sobrenadante conteniendo el baculovirus.

Los matraces fueron tapados y colocados en la estufa de incubación a 27°C, en agitación lenta 20 rpm, durante cuatro días.

Western blot (15)

Gel separador de acrilamida al 8% Gel concentrador

Acrilamida 2 ml	Acrilamida 325 µl
Tris Ph 8.8 1.5M 1.875 µl	Tris pH 6.8 0.5M 625 µl
Agua 3.625 µl	Agua 1.5 µl
Persulfato de amonio (APS) 25µl	Persulfato de Amonio (APS) 12.5 µl
Temed 10µl	Temed 5 µl

Procesamiento de muestras (16)

1.- Se tomaron y 20 µl de lisado de células y se les adicionó 6 µl de amortiguador muestra para condiciones reductoras 6X.

2.- Las muestras fueron hervidas por 5 min

3.- Posteriormente fueron centrifugadas. Por tres min 11000g.

Al gel se le adicionaron 25 µl de muestra.

4.- El gel de acrilamida fue migrado por electroforesis a 90 volts, durante 90 min.

5.- Terminada la migración se incubo el gel en solución fijadora por 15 min.

6.- El gel fue posteriormente teñido con azul de Coomasie.

7.- Otro gel fue puesto en la cámara de transferencia

Se cortaron cuatro hojas de papel filtro del tamaño del gel.

Se acomodo de la siguiente forma polo negativo: las esponjas, 2 hojas de papel filtro, el gel de acrilamida, polo positivo: membrana de nitrocelulosa cubierta por dos hojas de papel filtro y dos esponjas.

Se eliminaron las burbujas, se hizo la transferencia por 60 min a 100 volts.

Terminada la transferencia, se hizo una tinción de la membrana de nitrocelulosa con el colorante de Ponceau 10X, para teñir las proteínas transferidas, por tres min a temperatura ambiente, se retiro el colorante y se lavo la membrana de nitrocelulosa, primeramente con agua destilada y posteriormente con SAF1X, para desprender el colorante.

Bloqueo (17)

Se prepararon 50 ml de SAF 1X tween 20 al 5% de leche descremada al 0.5%.

Se pesaron 2.5 gr de leche descremada y se le adicionaron al SAF 1X Tween-20 al 5%.

Se le adicionaron a la membrana de nitrocelulosa y se dejo incubando por una hora, en agitación lenta a temperatura ambiente.

El gel fue teñido con Coomasie, el periodo de incubación fue por 2 hrs en agitación a temperatura ambiente, al retirar el colorante se le adicionó una tinción desteñidora por 10 min, finalizada la incubación se colocó el gel en agua destilada.

Se preparó el anticuerpo anti-etiqueta de histidinas, 1:2500, para detectar la proteína recombinante. La membrana fue incubada a 4 ° C en agitación lenta por toda la noche.

Terminada la incubación el anticuerpo fue retirado y almacenado a -20°C, a la membrana se le hicieron tres lavados de 10 min cada uno con SAF 1X-Tween-20 al 5% a 4°C. Se hizo un cuarto lavado integrado por tres lavados con SAF 1X de 10 min cada uno.

Terminados los lavados se incubó la membrana con el segundo anticuerpo, (de cabra anti-ratón etiquetada con peroxidasa) a una dilución de 1:5000, se adicionaron 4µl de anticuerpo en 20 ml de SAF 1X-Tween-20 al 5%-leche al 0.5% y se dejó incubando a temperatura ambiente por una hora a 70 rpm.

Terminada la incubación se repitieron los lavados como ya se mencionó

Al finalizar los lavados se hizo el revelado por quimioluminiscencia, se utilizó el kit: ++

Acetatos

Se colocaron los reactivos de quimioluminiscencia, y se mezclaron perfectamente, se tomó la membrana de nitrocelulosa y se escurrió en una toalla absorbente, la membrana fue puesta en contacto con los reactivos por dos minutos, posteriormente se eliminó la mezcla de reactivos y se escurrió nuevamente la membrana, fue colocada en dos acetatos y pegada en el cassette de revelado, se apagó la luz, y fue cortado un film del tamaño aproximado de la membrana, se colocó sobre los acetatos que contienen la membrana y se dejó incubando por 25 min.

Finalizado el tiempo de incubación, se sumergió en la solución reveladora, por 30 segundos, posteriormente se sumergió en agua, a continuación en solución reveladora y finalmente en agua, se dejó secar el film y fue observada a luz. Fue obtenida la señal en la proteína recombinante a los 25 min de exposición.

Solución amortiguadora de transferencia (18):

Tris 3.03 g

Glicina 11g aforar las dos soluciones en 800 ml posteriormente adicionar 200 ml de metanol

Solución fijadora (19).

45% de agua

45% de metanol

10% de ácido glacial acético .

Solución desteñidora I (20).

53% de agua

40% de metanol

7% de ácido acético glacial

Conteo de células en el hematocitometro (21):

El cultivo celular fue extraído de la incubadora y se observó la monoplaca celular en el microscopio.

El medio de cultivo fue decantado, posteriormente se adicionaron 10 ml de medio Sf900 II SFM, y la monoplaca fue desprendida con golpes en la palma de la mano.

Posteriormente se tomaron 100µl del cultivo, se homogenizó el medio con las células y se hizo una dilución 1: 3 con SAF1X y azul tripán al 0.4%

- 1.- Limpiar la cámara de Neubauer con agua y posteriormente con etanol, secarla perfectamente, y colocar el cubreobjetos en la posición correcta.
- 2.-Cultivo celular: se adicionaron 10 µl de las células en el hematocitómetro.
- 3.-Se colocó la cámara en el microscopio invertido bajo el objetivo 10X. Se uso la fase de contraste para distinguir las células.

4.-Fueron contadas las células de 5 campos, el número de células fue multiplicado por el factor de dilución 3 y dividido entre 5 y multiplicado finalmente por 10000 para estimar el número de células por mililitro.

Solución amortiguadora buferada de fosfatos (SAF) 1X –Tween 20 al 5% con leche descremada (22):

500 ml de solución amortiguadora buferada de fosfatos.

250µl de Tween 20.

2.5g de leche descremada, agitar manualmente.

Acrilamida al 30% 125 ml (23):

Acrilamida.

30g – 100ml

? - 50 ml = 15 g

Bis-acrilamida

0.8g – 100ml

? - 50ml= 0.4g

Diluirlo en 20ml de agua destilada tapar el recipiente con papel aluminio, y posteriormente filtrar en la campana de extracción y finalmente desgasificar en la misma campana.

Solución amortiguadora de lisis (24)

50mM Tris pH 7.5

400mM NaCl

20 mM Imidazole

5mM 2βmercaptoetanol

5% de glicerol

1% de Tritón X100

Solución amortiguadora de corrimiento 5X (25)

1 litro : Tris base 16.5 g. Glicina: 72.1g SDS: 5g.

SAF 10X, pH 7.2, un litro (26):

0.58 M Na₂HPO₄ 82.3 g

0.17 M NaH₂PO₄H₂O 23.5 g

0.68 M NaCl 40 g

Disolver en 600 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2

Aforar a 1 litro y esterilizar, enfriar para su uso.

Purificación de la Vitelogenina recombinante (27) .

Las pastillas celulares producto de 150ml de cultivo celular infectado con baculovirus recombinante, se les adicionó 1mg/ ml de inhibidor de proteasas y 200 µl de SAF 1X fueron sonicadas durante 20 segundos en tres ocasiones con intervalos de 20 segundo de descanso entre cada sonicada, con una incubación durante un min. A finalizar la sonicación se adicionó Buffer de lisis, DNAsas y RNAsas, y fueron incubadas durante 60 min a 4°C, posteriormente fue centrifugado por 3000g durante 5 min, al finalizar se obtuvo la fracción soluble y los desechos celulares fueron eliminados.

La fracción soluble fue vertida en una membrana de diálisis Numero del poro ** . y fue dializada durante 24 hrs, con solución amortiguadora 20 mM de imidazole, se le hicieron 5 lavados, terminada la diálisis se recupero la muestra y fue vertida en un tubo de 15 ml e incubada a -20°C hasta su uso.

Fue utilizado el aparato para purificación AKTA primeplus de (Amersham, Biosences) si inició con lavados con agua destilada, posteriormente se hicieron lavados con solución 20mM de imidazole, posteriormente se hizo la elusión con solución amortiguadora 500 mM de imidazole, fueron recuperadas 35 muestras y fueron graficadas las elusiones detectándose el incremento de la concentración de imidazole y la presencia de la proteína en los eluidos 6-17, con estas muestras

se procedió a hacer un SDS-PAGE, en los cuales se detectó la proteína purificada, siendo en los eluidos 12-17.

Se procedió a realizar el Western blot, se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo anti-His, como anticuerpo secundario diluido 1:2500, y el anticuerpo de cabra anti-ratón diluido 1:5000, se procedió a realizarlo como ya se ha mencionado.

Protocolo de inmunización de bovinos con VgR (28).

Los bovinos fueron conformados en dos grupos, grupo 1 control y grupo 2 tratado. El día -1 se tomó muestra de suero, el día 0 fueron inoculados en los ganglios subescapulares y precrurales.

Curva obtenida durante la purificación de la Vg recombinante (29).

Anexo carta de aceptación del artículo “ **Characterization of a vitellogenin gene fragment in *Boophilus microplus* ticks**”, en la revista **Society for Tropical Veterinary Medicine**.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resolución en gel de agarosa al 0.8%, de productos de amplificación de DNAC de intestino y ovario de las Cepas de referencia *Boophilus microplus* CEPICH y Media Joya amplificados mediante la técnica de PCR

Figura 2. Migración en gel de agarosa al 0.8% de plásmidos recombinantes con insertos de DNAC proveniente de ovario e intestino de *Boophilus microplus* de la Cepa Media Joya, digeridos con la enzima de restricción *Eco RI* durante 1 hora a 37°

Figura 3. Alineamiento de un fragmento del gen de vitelogenina de garrapatas *Boophilus microplus* cepa Media Joya mexicana (IMJ3Vg.7) con la cepa australiana de referencia (GenBank, BmVgU49934)

Figura. 4 Migración en gel de agarosa al 0.8% del producto de amplificación por PCR, de 1818 pb del DNA de Vg proveniente de intestino con la adición de la secuencia de Kozac en dirección sentido en el fragmento de 1800pb

Figura 5. Migración en gel de agarosa al 0.8% de DNA de Vg producto de PCR proveniente de ovarios con la adición de la secuencia de Kozac en dirección sentido, e insertado en el vector de transporte, la amplificación fue con los iniciadores del vector

Figura 6. Migración en gel de agarosa al 0.8% del producto de amplificación por PCR del DNA proveniente de intestino y ovarios insertados en el vector de transporte. Para la amplificación se utilizaron los iniciadores sentido del vector (TTT ACT GTT TTC GTA ACA GTT TTG) y el antisentido del fragmento de 1800pb de Vg (CAA CAA CGC ACA GAA TCT AGC G), fue amplificado un fragmento de un tamaño aproximado de 1944pb

Figura 7. Alineamiento de la secuencia obtenida en dirección sentido de 210 aminoácidos entre la secuencia reportada en el banco de genes con numero acceso de U49934, y las clonas transformadas de Vg proveniente de ovario clonas nombradas VgO3 y VgO4, y clonas de provenientes de intestino nombradas VgI1 y VgI2, para verificar el correcto marco abierto de lectura dentro del vector de transporte

Figura 8. Alineamiento de la secuencia completa de Vg proveniente de intestino de dos clonas nombradas VgRI.1 y VgRI.2 con la secuencia reportada en el

banco de genes con número de acceso U49934, en la secuencia se observa la secuencia de kozac en dirección sentido

Figura 9. Células eucariontes Sf9, utilizadas para la expresión de la proteína recombinante, en la primera figura se muestran células sin infectar las cuales presentan una forma regular. En las células infectadas, su forma es irregular, agrandadas y vacuolizadas, en algunas se observan infectadas por baculovirus. Magnificación (objetivo 100x).

Figura 10. Migración en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR de la amplificación de DNA obtenido de la expresión de la Vg recombinante proveniente de ovario e intestino de las células Sf9, el DNA fue amplificado con los iniciadores sentido y antisentido del fragmento de 1800 pb y los iniciadores del vector

Figura 11 Migración en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR de DNA de Vg recombinante proveniente de intestino, y producto de PCR de la amplificación del baculovirus Bac-N-Blue nativo, para la amplificación se utilizaron los iniciadores del vector de transporte y los iniciadores que amplifican el fragmento de Vg de 1800 pb

Figura 12. Western blot de lisado de las pastillas celulares de tres cosechas de diferentes fechas para la expresión de la proteína recombinante. Se utilizó como control negativo lisado de células Sf9, control positivo proteína STAT de referencia y los tres lisados de células que contienen Vg recombinante, se utilizó el anticuerpo anti-His como anticuerpo primario. Como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-ratón, etiquetado con peroxidasa. El revelado fue por quimioluminiscencia

Figura 13. SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 8% en condiciones reductoras teñido con Coomassie, con las eluciones obtenidas de la purificación por HPLC, por metales queladores con columna de níquel. Se utilizó un lisado de células Sf9, como control positivo, lisado de células con baculovirus nativo Bac-N-Blue; lisado de la células con la proteína recombinante sin purificar; y las fracciones 12-17 del producto de la purificación con la solución amortiguadora de elusión que contiene 500 mM de imidazole, fosfato monobásico 20mM, y cloruro de sodio 0.5M

Figura 14. Western blot de las muestras de elusión obtenidas de la purificación por HPLC por metales queladores, con columna de níquel. Se utilizó lisado de células Sf9 como control negativo, como control positivo lisado de células que contiene la proteína STAT, lisado de células con el baculovirus nativo Bac-N-Blue, lisado de células con la proteína Vg recombinante. Fracciones 12-16, se utilizó como anticuerpo primario anti etiqueta de histidinas, como anticuerpo secundario

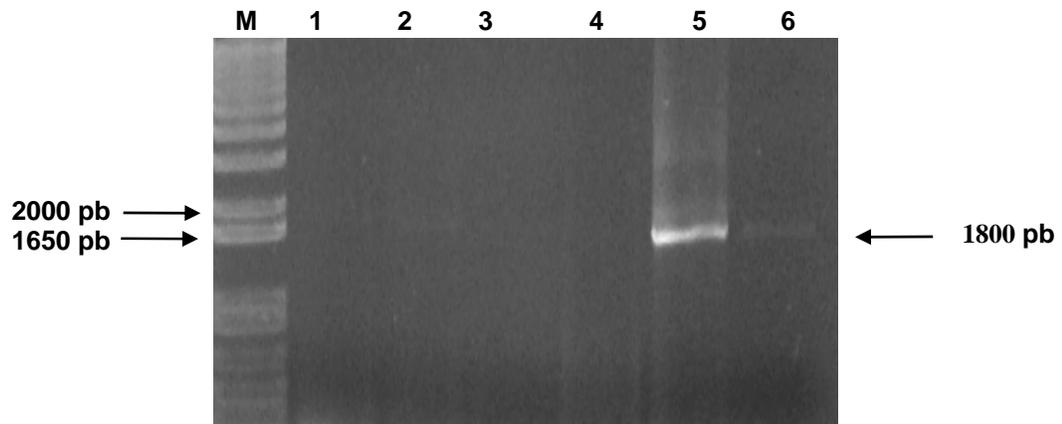
(conjugado), anticuerpo de cabra anti-ratón etiquetado con peroxidasa, el revelado fue por quimioluminiscencia

Figura 15. SDS-PAGE, en condiciones no reductoras con muestras de lisado de células Sf9, lisado de células con baculovirus nativo, lisado de Vg recombinante sin purificar, Vg purificada, macerado de intestino de garrapatas que completaron su ciclo de vida parásito

Figura 16. PAGE en condiciones nativas, con muestras de células Sf9, lisado de células STAT, lisado de baculovirus nativo, lisado de Vg recombinante sin purificar, proteína purificada, macerado de ovarios, macerado de intestino, macerado de huevo y hemolinfa, se utilizó como anticuerpo primario suero de bovino inmunizado con Vg recombinante como anticuerpo secundario, de conejo, antibovino, etiquetado con fosfatasa alcalina

FIGURAS

Figura 1. Resolución en gel de agarosa al 0.8%, de productos de amplificación de DNAc de intestino y ovario de las Cepas de referencia *Boophilus microplus* CEPICH y Media Joya amplificados mediante la técnica de PCR.



M. Marcador

1. Control negativo

2. Muestra de intestino de la Cepa CEPICH 50° de acoplamiento

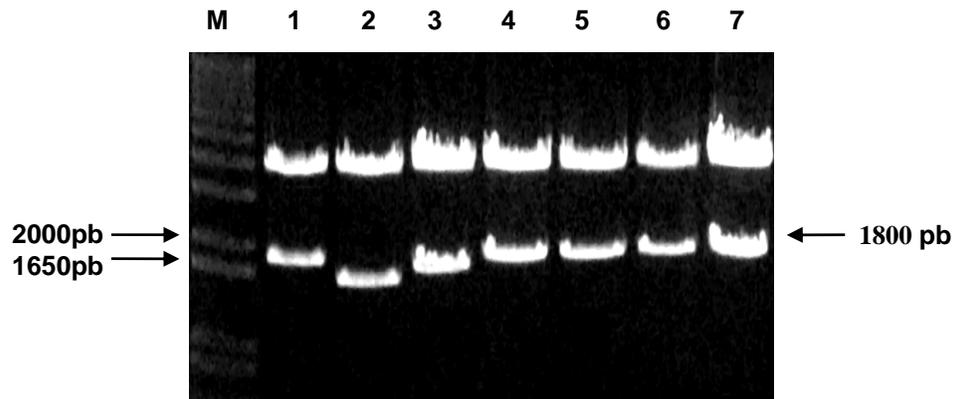
3. Muestra de DNAc de ovario de la Cepa CEPICH, 50° de acoplamiento

4. Muestra de DNAc de ovario de la Cepa CEPICH, 55° de acoplamiento

5. Muestra de DNAc de intestino de *Boophilus microplus* Cepa Media Joya 50° de acoplamiento

6. Muestra de DNAc de ovario de *Boophilus microplus* Cepa Media Joya 50° de acoplamiento

Figura 2. Migración en gel de agarosa al 0.8% de plásmidos recombinantes con insertos de DNAc proveniente de ovario e intestino de *Boophilus microplus* de la Cepa Media Joya, digeridos con la enzima de restricción *Eco RI* durante 1 hora a 37°



M: Marcador

Carril 1: muestra de DNAp proveniente de ovarios

Carriles 2- 7: muestras de DNAp proveniente de intestino

Figura 3. Alineamiento de un fragmento del gen de vitelogenina de garrapatas *Boophilus microplus* cepa Media Joya mexicana (IMJ3Vg.7) con la cepa australiana de referencia (GenBank, BmVgU49934)

		1		*		+		+		55
BmVgU49934	(1)	ETPYERMHYK	PATPGYET	YESEESY	-	YYPEYNQWNK	TLVKHVL	NVTLE	GKHEG	SL
IMJ3Vg.7	(1)	ETPYERMHYK	PATPGYET	YESEESY	D	YYPEYNQWNK	TLVKHVL	NVTLE	GKHEG	SL
Consensus	(1)	ETPYERMHYK	PATPGYET	YESEESY		YYPEYNQWNK	TLVKHVL	NVTLE	GKHEG	SL
		56		+				+		110
BmVgU49934	(55)	KKLTKLD	FAYYHTL	NKTLKH	YVDV	KT	LRPLV	SVFLNL	THPVP	SPFWYQPSFV
IMJ3Vg.7	(56)	KKLTKLD	FAYYHTL	NKTLKH	YVDV	KT	LRPLV	SVFLNL	THPVP	SPFWYQPSFV
Consensus	(56)	KKLTKLD	FAYYHTL	NKTLKH	YVDV	KT	LRPLV	SVFLNL	THPVP	SPFWYQPSFV
		111		+				+	*	165
BmVgU49934	(110)	GKDLVN	NATLYV	TVGNE	PEPFV	LTYN	NATKT	VEQL	KGLHAY	DATPLLHWFV
IMJ3Vg.7	(111)	GKDLVN	NATLYV	TVGNE	PEPFV	LTYN	NATKT	VEQL	KGLHAY	DATPLLHWFV
Consensus	(111)	GKDLVN	NATLYV	TVGNE	PEPFV	LTYN	NATKT	VEQL	KGLHAY	DATPLLHWFV
		166								220
BmVgU49934	(165)	QYAGNT	VSYACR	LATVHD	AHLNK	QVVA	FKVPT	QVSP	PKVKS	SVALKFLSYLKFR
IMJ3Vg.7	(166)	QYAGNT	VSYACR	LATVHD	AHLNK	QVVA	FKVPT	QVSP	PKVKS	SVALKFLSYLKFR
Consensus	(166)	QYAGNT	VSYACR	LATVHD	AHLNK	QVVA	FKVPT	QVSP	PKVKS	SVALKFLSYLKFR
		221			+					275
BmVgU49934	(220)	YATFYA	LPLTE	QEEYY	VVFK	LNKTD	VNPY	VTV	AHGELL	LPGEKV
IMJ3Vg.7	(221)	YATFYA	LPLTE	QEEYY	VVFK	LNKTD	VNPY	VTV	AHGELL	LPGEKV
Consensus	(221)	YATFYA	LPLTE	QEEYY	VVFK	LNKTD	VNPY	VTV	AHGELL	LPGEKV
		276*							+	330
BmVgU49934	(275)	VP	TLVLS	SGLD	RDKHS	VFEG	HPHPP	CS	VGKN	NWVRTY
IMJ3Vg.7	(276)	VP	NLVLS	SGLD	RDKHS	VFEG	HPHPP	CS	VGKN	NWVRTY
Consensus	(276)	VP	LVL	SGLD	RDKHS	VFEG	HPHPP	CS	VGKN	NWVRTY
		331								385
BmVgU49934	(330)	CSAKH	DFAVVA	QPLDL	TVG	TKKL	IVQL	GPTV	VELPP	PDLYKA
IMJ3Vg.7	(331)	CSAKH	DFAVVA	QPLDL	TVG	TKKL	IVQL	GPTV	VELPP	PDLYKA
Consensus	(331)	CSAKH	DFAVVA	QPLDL	TVG	TKKL	IVQL	GPTV	VELPP	PDLYKA
		386+								440
BmVgU49934	(385)	NTTQD	VVLPY	KWDR	KLLV	TVYPT	SGPH	DP	PVVK	L
IMJ3Vg.7	(386)	NTTQD	VVLPY	KWDR	KLLV	TVYPT	SGPH	DP	PVVK	L
Consensus	(386)	NTTQD	VVLPY	KWDR	KLLV	TVYPT	SGPH	DP	PVVK	L
		441							+	*495
BmVgU49934	(440)	PLYQ	GKTC	GLCS	NYD	NEPY	HEF	VTP	ENW	LVS
IMJ3Vg.7	(441)	PLYQ	GKTC	GLCS	NYD	NEPY	HEF	VTP	ENW	LVS
Consensus	(441)	PLYQ	GKTC	GLCS	NYD	NEPY	HEF	VTP	ENW	LVS
		496							*	*550
BmVgU49934	(495)	PVHY	LEEL	KKPL	GYES	SYPT	HREY	PTH	HKYPT	THEY
IMJ3Vg.7	(496)	PVHY	LEEL	KKPL	GYES	SYPT	HREY	PTH	HKYPT	THEY
Consensus	(496)	PVHY	LEEL	KKPL	GYES	SYPT	HREY	PTH	HKYPT	THEY
		551	*				*			605
BmVgU49934	(550)	TRHE	YPT	HHK	YPT	THEY	PT	RHE	YPT	RHE
IMJ3Vg.7	(551)	T		HHK	YPT	THEY	PT	RHE	YPT	RHE
Consensus	(551)	T		HHK	YPT	THEY	PT	HE	YPT	RHE

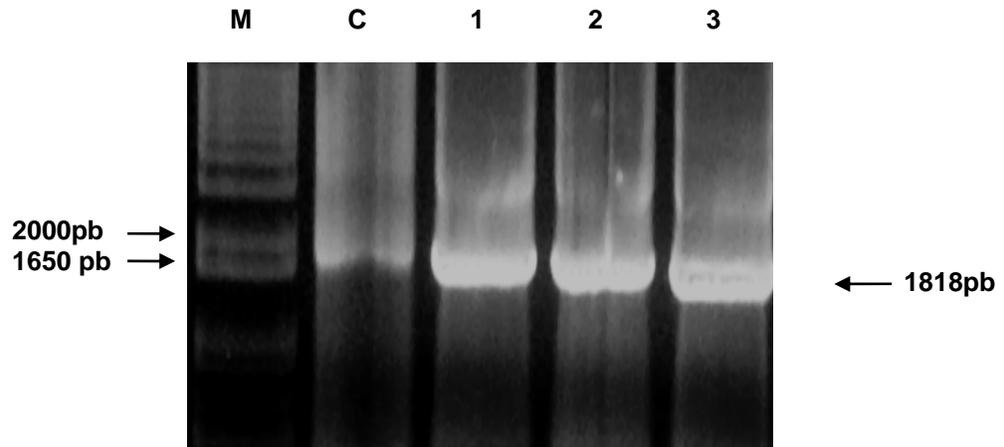
En fondo azul turquesa se identifican 37 posibles sitios de fosforilación: 10 para Serina, 17 para Tirosina y 10 para Treonina.

+ Identifican 11 sitios potenciales N-glicosilación.

* identifican 1 inserción de ácido aspártico (D, fondo gris), una delección de 6 aminoácidos (RHEYPT, fondo azul rey) y 6 mutaciones estructurales.

En la figura fueron identificados (+) 11 sitios potenciales de N-glicosilación, la inserción de un ácido aspártico en fondo gris *, en azul turquesa se identifican 37 posibles sitios de fosforilación, 10 para serina, 17 para tirosina, y 10 para treonina. Una delección de 6 aminoácidos. (RHEYPT, fondo azul rey) y 6 mutaciones estructurales.

Figura. 4 Migración en gel de agarosa al 0.8% del producto de amplificación por PCR, de 1818 pb del DNA de Vg proveniente de intestino con la adición de la secuencia de Kozac en dirección sentido en el fragmento de 1800pb

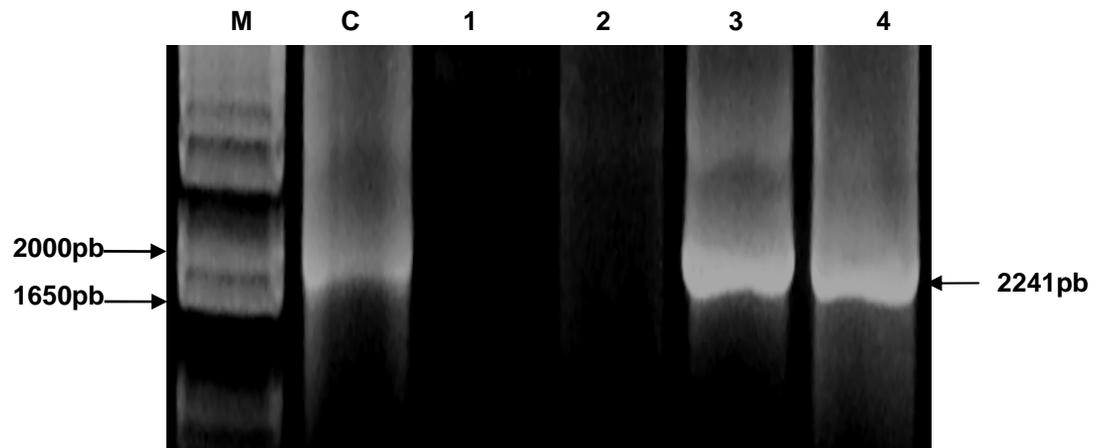


M: Marcador

C: Control positivo producto de amplificación por PCR del DNA del fragmento de Vg de 1800pb

Carriles 1-3 producto de amplificación por PCR del DNA de Vg proveniente de intestino, amplificado en dirección sentido de la secuencia de Kozac y en dirección antisentido con el iniciador del fragmento de Vg de 1800pb

Figura 5. Migración en gel de agarosa al 0.8% de DNA de Vg producto de PCR proveniente de ovarios con la adición de la secuencia de Kozac en dirección sentido, e insertado en el vector de transporte, la amplificación fue con los iniciadores del vector

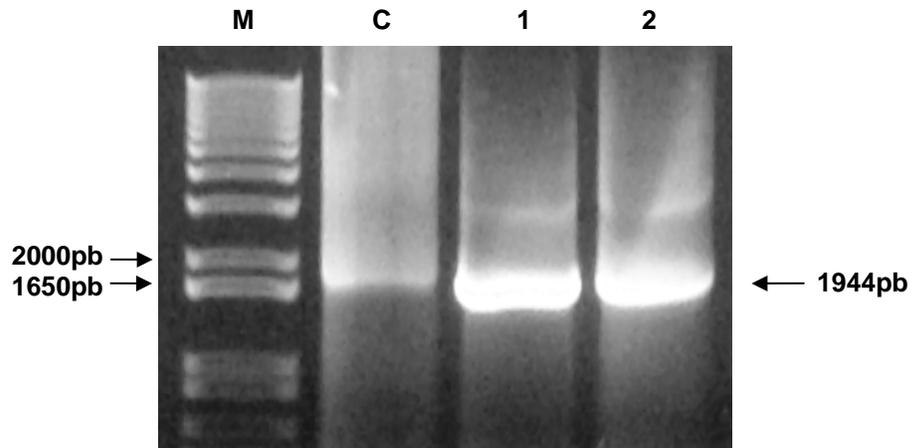


M: Marcador

C: Control producto de PCR de la amplificación del DNA del fragmento de Vg de 1800pb

Carriles :1-4 Producto de PCR del DNA de Vg de ovarios amplificados con los iniciadores del vector de transporte

Figura 6. Migración en gel de agarosa al 0.8% del producto de amplificación por PCR del DNA proveniente de intestino y ovarios insertados en el vector de transporte. Para la amplificación se utilizaron los iniciadores sentido del vector (TTT ACT GTT TTC GTA ACA GTT TTG) y el antisentido del fragmento de 1800pb de Vg (CAA CAA CGC ACA GAA TCT AGC G), fue amplificado un fragmento de un tamaño esperado de 1944pb



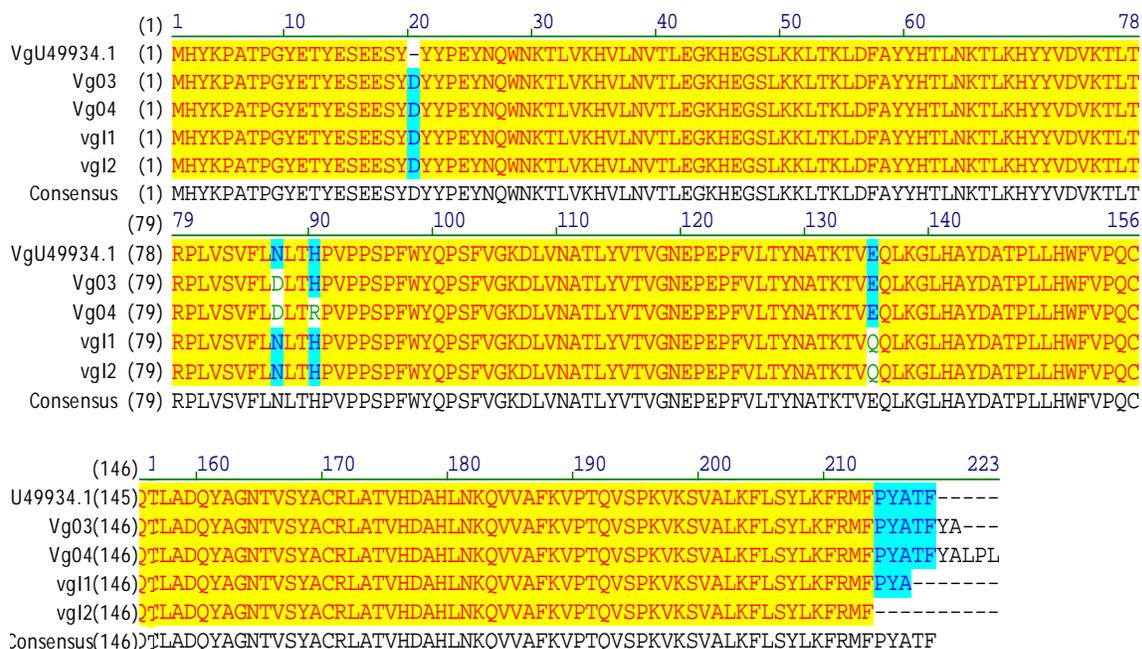
M: Marcador

C: Control producto de amplificación por PCR, del DNA del fragmento de Vg de 1800pb

Carril 1 Producto de amplificación por PCR del DNA del fragmento de Vg proveniente de ovarios

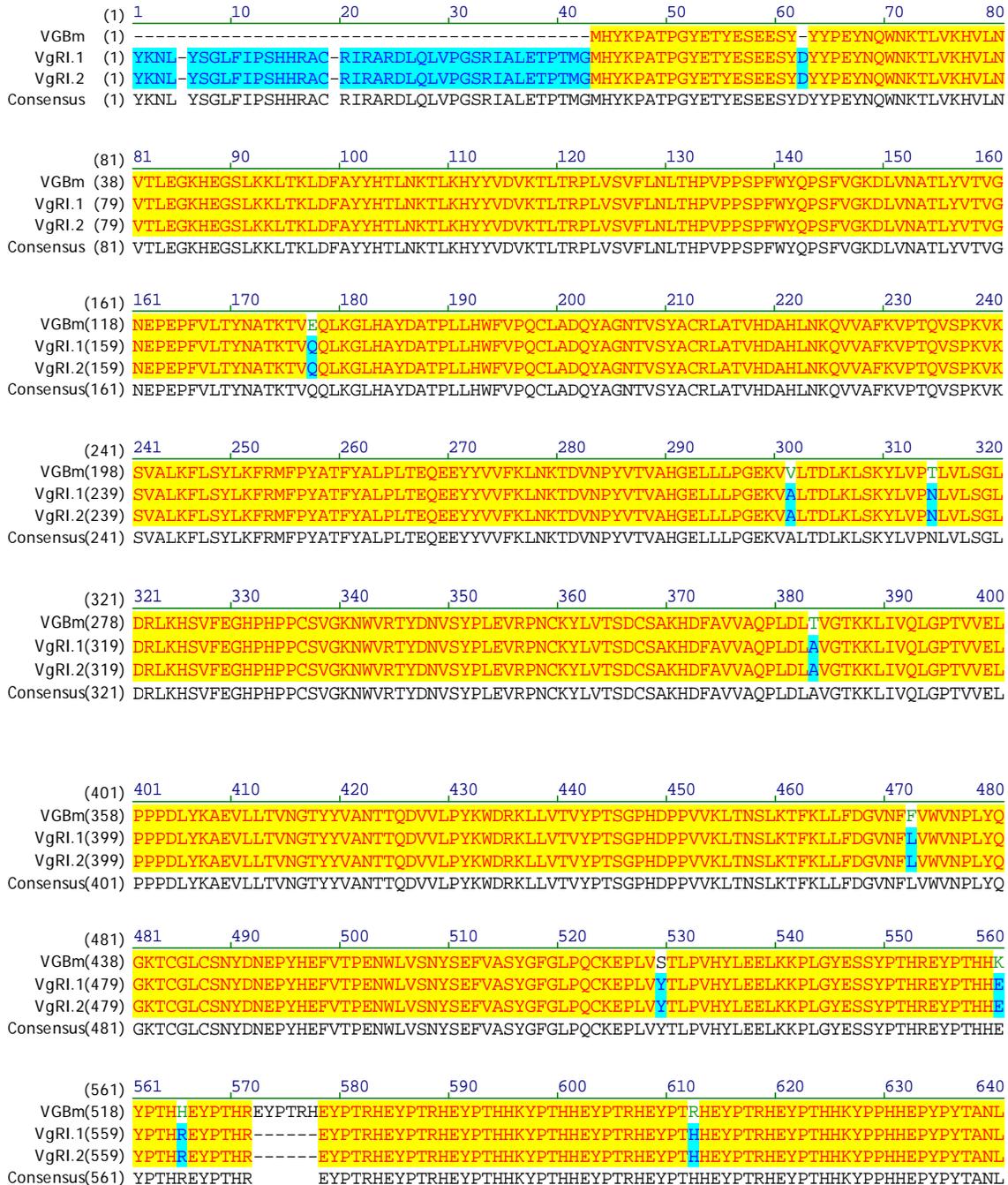
Carril 2 Producto de amplificación por PCR del DNA del fragmento de Vg proveniente de intestino

Figura 7. Alineamiento de la secuencia obtenida en dirección sentido de 210 aminoácidos entre la secuencia reportada en el banco de genes con número de acceso U49934, y las clonas transformadas de Vg proveniente de ovario clonas nombradas Vg03 y Vg04, y clonas de provenientes de intestino nombradas Vgl1 y Vgl2, para verificar el correcto marco abierto de lectura dentro del vector de transporte



En la figura puede observarse la inserción del ácido aspártico en la posición 20, la pérdida de un sitio de glicosilación en la secuencia de ovario en la posición 88, y el cambio de un ácido glutámico por una glutamina en la posición 135 de esta secuencia.

Figura 8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Vg proveniente de intestino de dos clonas nombradas VgRI.1 y VgRI.2 con la secuencia reportada en el banco de genes con número de acceso U49934, en la secuencia se observa la secuencia de kozac en dirección sentido

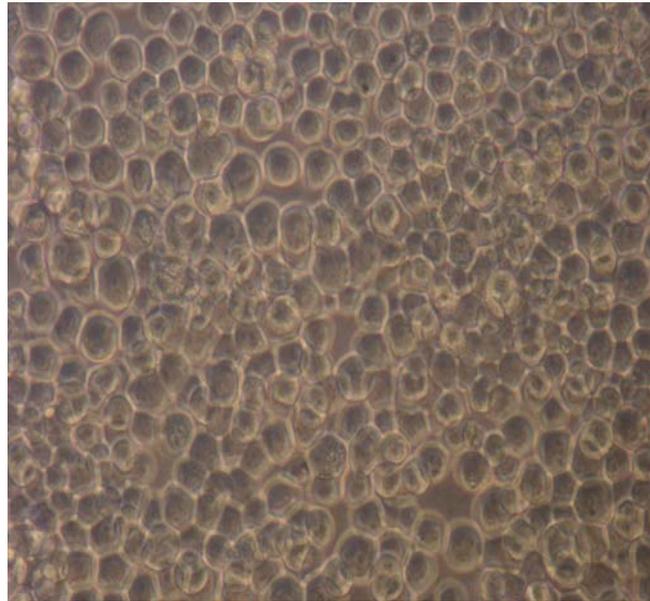


(641)	641	650	660	670	680	690	700	710	720
VGBm(598)	QREG	-----							
VgRI.1(633)	QREG	FPLSKLRPGKPIPNPLLGLDSTR	TGHHHHHH	RI	LGVDNLFIAAYNGYK	SNSITNFTNK	AFFSLHSSCGLSKLI		
VgRI.2(633)	QREG	FPLSKLRPGKPIPNPLLGLDSTR	TGHHHHHH	RI	LGVDNLFIAAYNGYK	SNSITNFTNK	AFFSLHSSCGLSKLI		
Consensus(641)	QREG	FPLSKLRPGKPIPNPLLGLDSTR	TGHHHHHH	RI	LGVDNLFIAAYNGYK	SNSITNFTNK	AFFSLHSSCGLSKLI		
(701)	701	710	720	730	740	750	760	770	780
VGBm(602)	-----								
VgRI.1(690)	NFTNK	AFFSLHSSCGLSKLINVSYHL	STLLKRRK	FSLKFPWCSK	RSLHQ	THLCSLVRR	IKTRYIVISTFIKR	ILCVVD	
VgRI.2(690)	NFTNK	AFFSLHSSCGLSKLINVSYHL	STLLKRRK	FSLKFPWCSK	RSLHQ	THLCSLVRR	IKTRYIVISTFIKR	ILCVVD	
Consensus(701)	NFTNK	AFFSLHSSCGLSKLINVSYHL	STLLKRRK	FSLKFPWCSK	RSLHQ	THLCSLVRR	IKTRYIVISTFIKR	ILCVVD	

En la figura 8 se observa la adición de la secuencia de Kozac (ETPTMG) en la posición 37, la secuencia es de 6 aminoácidos previos a la secuencia de Vg. La inserción del ácido aspártico se localiza en la posición 62, en la posición 177 se observa el cambio de un ácido glutámico por una glutamina. En la posición 300 se cambia una valina por una alanina; en la posición 383 se observa el cambio de una treonina por una alanina en la secuencia de intestino. En la posición 473 se cambia una fenilalanina por una leucina; en la posición 530 se cambia una serina por una tirosina; en el sitio 560 una lisina por un ácido glutámico; La histidina es reemplazada por una arginina en la posición 564; en la posición 612 la arginina por histidina; y la delección de un segmento de repetición (repeticiones de 6 aminoácidos). Son observados los sitios de glicosilación en los sitios 72,81, 107, 130, 153, 172, 279, 349, 410, 423, 509; los sitios de fosforilación en el sitio: 48,51,53,57,60,87, 79, 152, 212, 232, 253, 266, 268, 281, 314, 362, 364, 366, 415, 419, 420, 476, 484, 491, 512, 541, 542, 545, 546, 552, 553, 566, 571, 577, aumentan en el carboxiterminal, como ya había sido comentado.

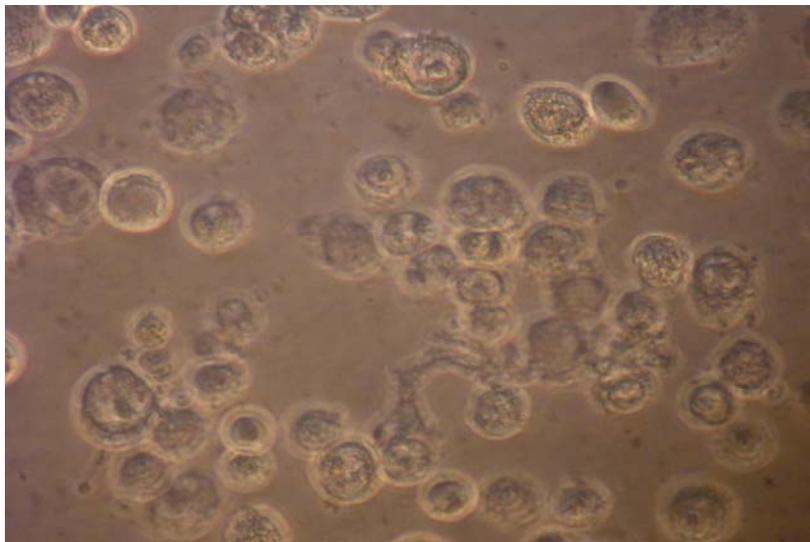
Figura 9.

CÉLULAS Sf9. SIN INFECTAR.



a)

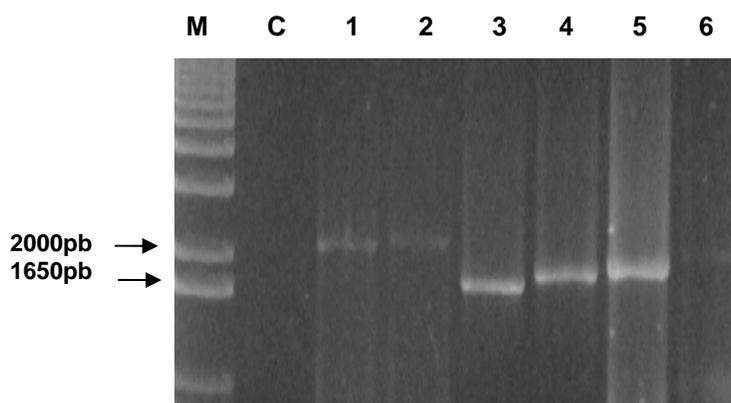
CÉLULAS Sf9 INFECTADAS



b)

Células eucariontes Sf9, utilizadas para la expresión de la proteína recombinante, en la primera figura se muestran células sin infectar las cuales presentan una forma regular. En las células infectadas, su forma es irregular, agrandadas y vacuolizadas, en algunas se observan infectadas por baculovirus. Magnificación (objetivo 100x).

Figura 10. Migración en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR de la amplificación de DNA obtenido de la expresión de la Vg recombinante proveniente de ovario e intestino de las células Sf9, el DNA fue amplificado con los iniciadores sentido y antisentido del fragmento de 1800 pb y los iniciadores del vector



M: Marcador

C: Control negativo, mezcla para PCR sin DNA

Carril 1: Producto de PCR de DNA_v de Vg recombinante proveniente de intestino

Carril 2: Producto de PCR de DNA_v de Vg recombinante proveniente de ovario, amplificado con los iniciadores del vector con un tamaño esperado de 2241 pb

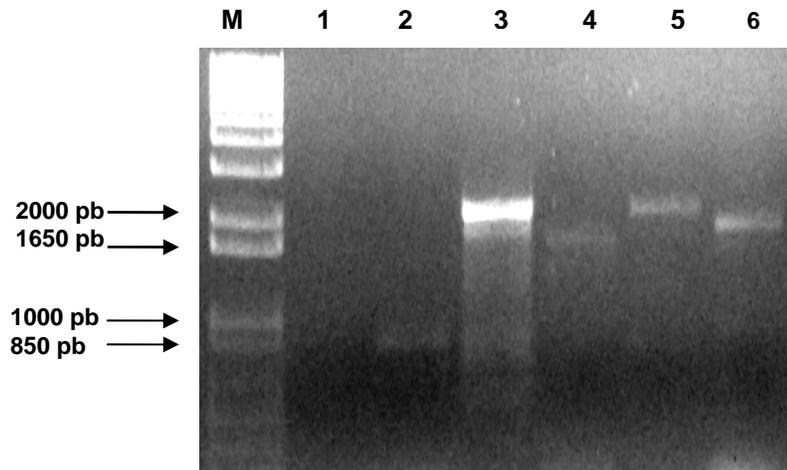
Carril 3, Producto de PCR de DNA_v de Vg recombinante proveniente de intestino y

Carril 4, Producto de PCR de DNA_v de Vg recombinante proveniente de ovarios, tamaño aproximado iniciador sentido del vector y antisentido del fragmento, tamaño esperado :1944 pb

Carril 5, Producto de PCR de DNA_v de Vg recombinante de intestino y

Carril 6, Producto de PCR de DNA_v de Vg recombinante proveniente de ovarios, amplificados con el iniciador sentido del fragmento y antisentido del vector de transporte, tamaño : 2208 pb

Figura 11. Migración en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR de DNAv de Vg recombinante proveniente de intestino, y producto de PCR de la amplificación del baculovirus Bac-N-Blue nativo, para la amplificación se utilizaron los iniciadores del vector de transporte y los iniciadores que amplifican el fragmento de Vg de 1800 pb



M Marcador

1 Control negativo muestra de PCR sin DNA

2 Muestra de la amplificación de DNAv del baculovirus nativo Bac-N-Blue, tamaño 839pb

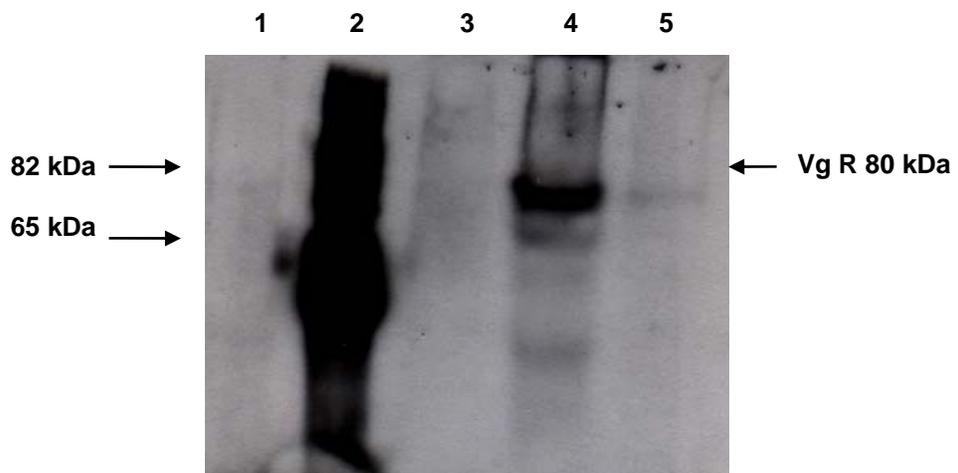
3 Muestra de la amplificación de DNAv de Vg recombinante proveniente de intestino amplificada con los iniciadores del vector de transporte, tamaño esperado del fragmento 2241pb

4 Muestra de la amplificación de DNAv de Vg recombinante amplificada con los iniciadores que amplifican el fragmento de 1800pb

5 Muestra de la amplificación de DNAv de Vg recombinante amplificada con el iniciador sentido del fragmento de 1800pb y el antisentido del vector, tamaño esperado del fragmento de 2208pb

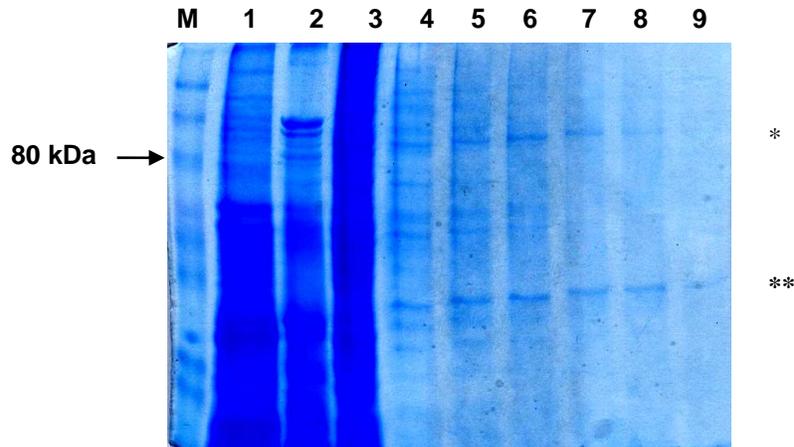
6 Muestra de DNAv de la Vg recombinante amplificada con el iniciador sentido del vector de transporte y antisentido del fragmento de 1800pb, se amplifico un fragmento de un tamaño esperado de 1944 pb.

Figura 12. Western blot de lisado de las pastillas celulares de tres cosechas de diferentes fechas para la expresión de la proteína recombinante. Se utilizó como control negativo lisado de células Sf9, control positivo proteína STAT de referencia y los tres lisados de células que contienen Vg recombinante, se utilizó el anticuerpo anti-His como anticuerpo primario. Como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-ratón, etiquetado con peroxidasa. El revelado fue por quimioluminiscencia



- 1 Control negativo lisado de células Sf9
- 2 Control positivo lisado de células con la proteína STAT etiquetada con histidinas
- 3-5 Lisado de células de tres distintas fechas de cosecha, con la proteína Vg recombinante

Figura 13. SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 8% en condiciones reductoras teñido con Coomassie, con las eluciones obtenidas de la purificación por HPLC, por metales queladores con columna de níquel. Se utilizó un lisado de células Sf9, como control positivo, lisado de células con baculovirus nativo Bac-N-Blue; lisado de la células con la proteína recombinante sin purificar; y las fracciones 12-17 del producto de la purificación con la solución amortiguadora de elución que contiene 500 mM de imidazole, fosfato monobásico 20mM, y cloruro de sodio 0.5M



M : Marcador

1 lisado de células Sf9

2 Lisado de células con baculovirus recombinante Bac-N-Blue nativo

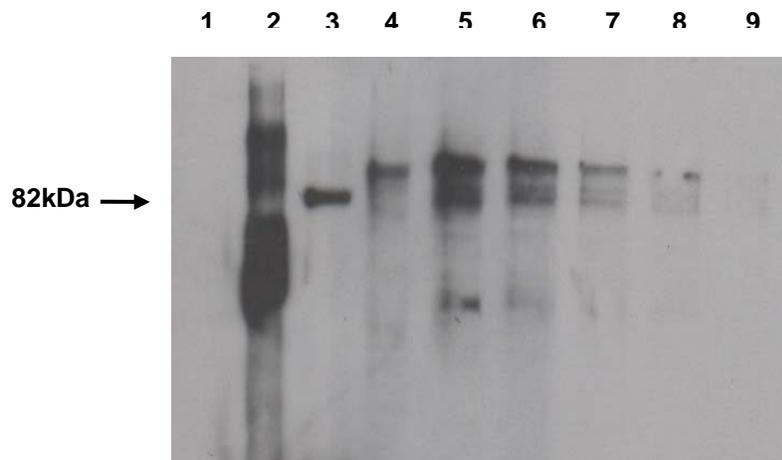
3 Lisado celular con la proteína Vg recombinante sin purificar

4-9 fracciones obtenidas de la purificación por HPLC de la proteína, eluidos 12-17

*** Fracción de proteína que corresponde al tamaño esperado de 80 kDa**

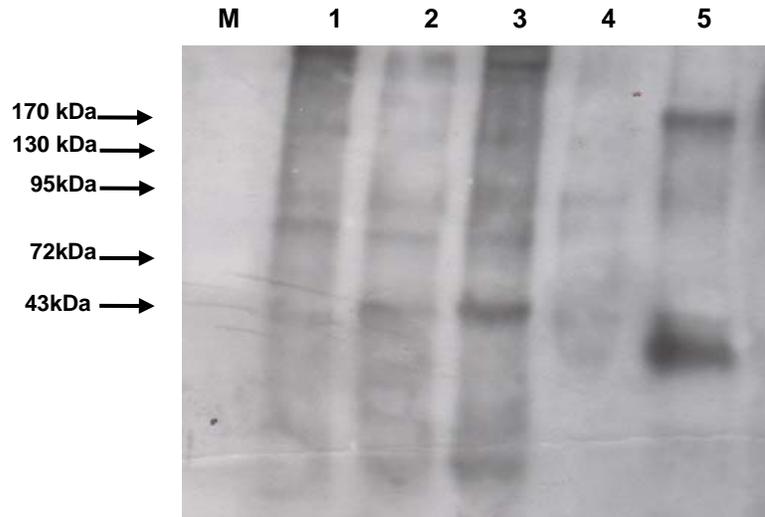
**** Fracción de proteína que corresponde a un tamaño aproximado de 20 kDa**

Figura 14. Western blot de las muestras de elusión obtenidas de la purificación por HPLC por metales queladores, con columna de níquel. Se utilizó lisado de células Sf9 como control negativo, como control positivo lisado de células que contiene la proteína STAT, lisado de células con el baculovirus nativo Bac-N-Blue, lisado de células con la proteína Vg recombinante. Fracciones 12-16, se utilizó como anticuerpo primario anti etiqueta de histidinas, como anticuerpo secundario (conjugado), anticuerpo de cabra anti-ratón etiquetado con peroxidasa, el revelado fue por quimioluminiscencia



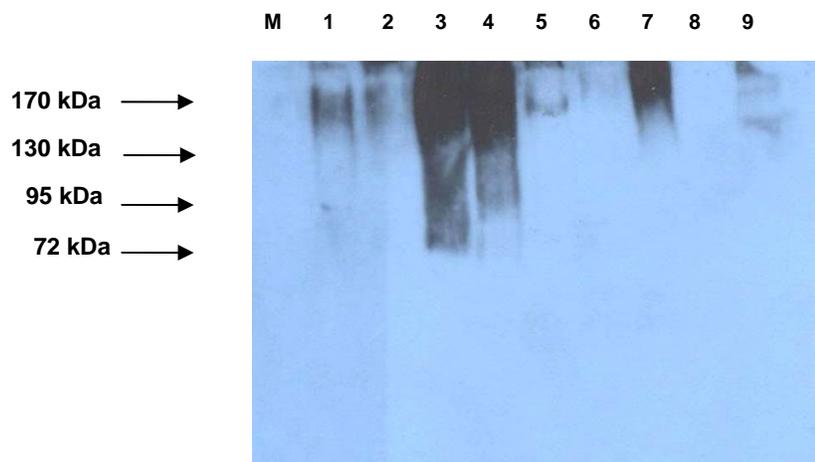
- 1 Lisado de células Sf9 como control negativo**
- 2 Lisado de células con la proteína STAT etiquetada con Histidinas, como control positivo**
- 3 Lisado de células con Baculovirus nativo BAC-N-BLUE**
- 4 Lisado de células con Vg recombinante**
- 5-9 Eluidos 12-16 obtenidos de la purificación de la proteína**

Figura 15. SDS-PAGE, en condiciones no reductoras con muestras de lisado de células Sf9, lisado de células con baculovirus nativo, lisado de Vg recombinante sin purificar, Vg purificada, macerado de intestino de garrapatas que completaron su ciclo de vida parásito



- M: Marcador**
1. Lisado de células Sf9
2. Lisado de baculovirus nativo
3. Vg recombinante sin purificar
4. Vg purificada
5. Macerado de intestino de garrapata adulta

Figura 16. PAGE en condiciones nativas, con muestras de células Sf9, lisado de células STAT, lisado de baculovirus nativo, lisado de Vg recombinante sin purificar, proteína purificada, macerado de ovarios, macerado de intestino, macerado de huevo y hemolinfa, se utilizó como anticuerpo primario suero de bovino inmunizado con Vg recombinante como anticuerpo secundario, de conejo, antibovino, etiquetado con fosfatasa alcalina



1. M Marcador
2. Lisado de células Sf9 Lisado de células con la proteína STAT
3. Lisado de células con el baculovirus nativo
4. Lisado de Vg recombinante sin purificar Vg purificada
5. Macerado de ovarios
6. Macerado de intestino
7. Macerado de huevo del primer día de oviposición
8. Hemolinfa