



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA
ESFINGOMIELINASA D RECOMBINANTE DE *Rhipicephalus*
microplus

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

IBT. MIGUEL ANGEL MENDOZA VERA

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. ALEJANDRO ALAGÓN CANO
Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ
Instituto de Biotecnología UNAM
Dra. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA
Instituto de Biotecnología UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice

Resumen

1. Introducción	1
1.1. Generalidades de las garrapatas	1
1.2. Rhipicephalus microplus	2
1.3. Saliva de las garrapatas	7
1.4. Esfingomielinasa D de Loxosceles	8
2. Antecedentes	10
3. Justificación	13
4. Objetivo general	13
4.1. Objetivos particulares	13
Estrategia experimental	14
5. Materiales y Métodos	15
5.1. Materiales	15
5.1.1. Oligonucleótidos	15
5.1.2. Enzimas de restricción y modificación	15
5.1.3. Kits para la purificación de material genético	16
5.1.4. Vectores	16
5.1.5. Cepas bacterianas	17
5.1.6. Líneas celulares de insecto	17
5.1.7. Medios de cultivo	18
5.1.8. Animales vivos	18
5.1.9. Anticuerpos	19
5.2. Metodología	19
5.2.1. Amplificación de la cadena codificante de la esfingomielinasa D	19

5.2.2. Clonación de la cadena codificante de la esfingomielinasa D en el vector pCR2.1-TOPO	20
5.2.3. Sub-clonación de la cadena codificante de la esfingomielinasa D en el vector pQE30 y pMelBacA	21
5.2.4. Análisis de las secuencias	22
5.2.5. Electroforesis	22
5.2.6. Western Blot	22
5.2.7. Obtención de los Baculovirus recombinantes	23
5.2.7.1. Cotransfección en células de insecto	22
5.2.7.2. Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales	25
5.2.7.3. Amplificación de las placas virales	25
5.2.7.4. Aislamiento y análisis del ADN de los baculovirus recombinantes	26
5.2.8. Expresión de la esfingomielinasa D	26
5.2.8.1. Expresión en células de insecto	26
5.2.8.2. Expresión en <i>E. coli</i>	27
5.2.9. Purificación de la esfingomielinasa D recombinante	28
5.2.9.1. Purificación en células de insecto	28
5.2.9.2. Purificación en <i>E. coli</i>	28
5.2.10. Caracterización de la esfingomielinasa D	29
5.2.10.1. Cuantificación de la esfingomielinasa D	29
5.2.10.2. Medición de la actividad enzimática de la esfingomielinasa D	30
5.2.10.3. Valoración de la dosis letal media en ratones	31
5.2.10.4. Dermonecrosis en conejos	32
5.2.10.5. Inmunización de conejos	32
5.2.10.6. Medición de títulos por ELISA (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)	33
6. Resultados y discusión	34
6.1. Expresión de la esfingomielinasa D en células de insecto	34
6.1.1. Clonación de la cadena codificante de la esfingomielinasa D de <i>R. microplus</i> en el vector pMelBacA	35
6.1.2. Generación y análisis de los baculovirus recombinantes	37
6.1.3. Expresión de la SMDtick recombinante	39

6.1.4. Purificación SMDtick recombinante	41
6.2. Expresión de la esfingomielinasa D en <i>E. coli</i>	43
6.2.1. Clonación de la cadena codificante de la esfingomielinasa D de <i>R. microplus</i> en el vector pQE30	44
6.2.2. Expresión de la SMDtick recombinante	46
6.2.3. Purificación de la SMDtick recombinante	47
6.2.4. Caracterización de la SMDtick recombinante	48
6.2.4.1. Actividad enzimática	48
6.2.4.2. Pruebas toxicológicas en animales	50
6.2.4.3. Producción de anticuerpos en conejos	52
6.2.4.4. Inhibición de la actividad enzimática de la SMDtick con suero hiperinmune de conejo	52
6.2.4.5. Determinación de reacciones cruzadas	53
7. Conclusiones 8. perspectivas	55
Bibliografía	56
Apéndice A	64
Apéndice B	68
Apéndice C	69
Apéndice D	70

Índice de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Rhipicephalus microplus</i>	2
Figura 2. Segmentos en los que se divide el cuerpo de <i>R. microplus</i>	2
Figura 3. Características morfológicas del gnatosoma de <i>R. microplus</i>	3
Figura 4. Diferencias del idiosoma de machos y hembras de <i>R. microplus</i>	4

Figura 5. Ciclo de vida de <i>R. microplus</i> en bovinos	5
Figura 6. Estructura general de la esfingomielina	8
Figura 7. Ensayo de actividad SMD en la saliva de <i>R. microplus</i> utilizando el método Amplex-Red	10
Figura 8. Secuencia nucleotídica codificante de la esfingomielinasa D de <i>R. microplus</i>	11
Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la esfingomielinasa D de <i>R. microplus</i>	12
Figura 10. Representación gráfica de la recombinación homóloga del vector pMelBacA-SMDtick y del ADN viral Bac-N-Blue en células de insecto	23
Figura 11. Representación gráfica para la obtención de baculovirus recombinantes	24
Figura 12. Producto amplificado por PCR con sitios de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	35
Figura 13. Secuencia de SMDtick	36
Figura 14. Resultado del ensayo en placa con la infección del sobrenadante de la cotransfección	37
Figura 15. Productos amplificados por PCR a partir del DNA del baculovirus recombinante 17	38
Figura 16. Representación de la densidad y viabilidad celular de los cultivos infectados	40
Figura 17. Western blot. Cinética de expresión de SMDtick recombinante	40
Figura 18. Precipitados después de la diálisis	42
Figura 19. Producto amplificado por PCR con sitios de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	44
Figura 20. Resultado de la secuenciación del vector pQE30-SMDtick	45
Figura 21. Análisis de expresión de la SMDtick de las clonas 1 a 7 de <i>E. coli</i> Origami	46
Figura 22. Expresión de la SMDtick en <i>E. coli</i> Origami	47
Figura 23. Purificación por afinidad a níquel de la SMDtick a partir de cuerpos de inclusión	48
Figura 24. Ensayo de actividad enzimática de la SMD de <i>R. microplus</i> utilizando el método Amplex-Red	49
Figura 25. Actividad de SMD recombinante de <i>R. microplus</i> sobre diferentes esfingomielinas utilizando el método Amplex-Red	50
Figura 26. Fotografía que muestra los efectos en piel de conejo New Zeland White	51
Figura 27. Reconocimiento de SMDtick soluble mediante los sueros hiperinmunes (anti-SMDtick soluble y anti-SMDtick cuerpos de inclusión)	52

Figura 28. Inhibición de la actividad enzimática de rSMDtick soluble por inmunoglobulinas anti-SMDtick soluble y cuerpos de inclusión (CI)	53
Figura 29. Western blot para determinar reactividad cruzada entre SMDs de garrapata y araña <i>Loxosceles</i>	54

Índice de tablas

Tabla 1. Proteínas identificadas en la saliva de garrapatas	7
Tabla 2. Porcentajes de identidad entre secuencias de aminoácidos de la SMD de <i>I. scapularis</i> e isoformas del género <i>Loxosceles</i>	10
Tabla 3. Porcentaje de identidad de la SMDtick (KJ854238) contra SMasas D ya reportadas	12
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados	15
Tabla 5. Componentes y proporciones de la mezcla de reacción	31
Tabla 6. Esquema de inmunización de la proteína recombinante SMDtick en conejos	32
Tabla 7. Titulación del PASE 2 del baculovirus 17	38
Tabla 8. Actividades específicas de las SMDasas D recombinantes de <i>Loxosceles</i> y <i>R. microplus</i>	49
Tabla 9. Dosis letal media (DL50) de las SMDasas D recombinantes de <i>Loxosceles</i> y <i>R. microplus</i>	51

Abreviaturas

°C	Grados Centígrados.
BCIP	Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate
Ca ²⁺	Calcio.
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	Ácido etilén-diaminotetraacético.
g	Gramo.
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
Kb	Kilobases.
K	
kDa	Kilodaltones.
L	Litro.
LB	Luria-Bertani.
mA	Miliamperes.
M	Molar.
mg	Miligramo.
μg	Microgramo.
μL	Microlitro.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
mm	Milímetros.
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
ng	Nanogramo.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
Pb	Pares de bases.
PBS	Buffer de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.

RACE	Amplificación rápida de los extremos de cDNA.
RNA	Ácido ribonucleico.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT-PCR	Retrotranscripción de PCR.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

Resumen

Rhipicephalus microplus es una garrapata y se caracteriza por utilizar un solo huésped para completar su desarrollo, afectando principalmente al ganado vacuno. La infestación de *R. microplus* sobre los bovinos ocasiona grandes pérdidas económicas, además de ser un vector que transmite enfermedades como Babesiosis y Anaplasmosis.

Por tal motivo, la estrategia más utilizada para el control de este ectoparásito es con el uso de sustancias químicas, sin embargo, el uso excesivo de estas sustancias ha ocasionado la aparición de resistencia en las garrapatas. Una de las alternativas más prometedoras para controlar las infestaciones de garrapatas, es el uso del control inmunológico mediante antígenos ocultos (proteínas del intestino de la garrapata) y antígenos expuestos (proteínas de saliva de la garrapata).

La saliva de garrapata es una mezcla muy compleja de proteínas, lo que pudiera ocasionar que esta mezcla enmascare el reconocimiento del sistema inmune por las proteínas importantes en el ciclo de vida de estos ectoparásitos. Por tal motivo, es necesario determinar la actividad biológica de la SMD de *R. microplus* (SMDtick), para conocer si juega un papel importante en el ciclo de vida de esta garrapata. Por lo que este trabajo tuvo como objetivo generar la SMDtick recombinante para utilizarla como inmunógeno.

Para esto se utilizó la secuencia codificante de la SMDtick, y se clonó en vectores de expresión para células de insecto-baculovirus y *E. coli*. Se determinaron las condiciones óptimas de expresión para la obtención de proteínas solubles. Estas proteínas tuvieron un peso molecular entre 30 kDa y solamente se pudo determinar actividad enzimática de la SMDtick producida en *E. coli*. La SMDtick recombinante se comparó con la SMDtick de *Loxosceles boneti*; encontrando diferencias biológicas importantes aunque pertenecen a la misma familia de proteínas.

1. Introducción.

1.1. Generalidades de las garrapatas.

Los artrópodos son animales que comprenden a las garrapatas, arañas, escorpiones, ácaros, crustáceos, milpiés y ciempiés, entre otros (Hickman, 1991). Las garrapatas se alimentan de sangre para completar su ciclo de vida, afectando a reptiles, aves y mamíferos, además son los principales vectores que transmiten distintos microorganismos patógenos (virus, espiroquetas, protozoos y nemátodos).

Estos ectoparásitos tienen una variedad de especies hospederas, otras son más selectivas y se alimentan de una sola especie de hospedero (Guglielmone, 2003). De las 870 especies de garrapatas descritas, se sabe que alrededor del 10% están establecidas en México. Además el número de especies de garrapatas existentes en nuestro país, representa el 45% de América Latina, lo que refleja la gran variedad de ambientes para su desarrollo (Parra, 1999).

Las garrapatas pertenecen al Phylum Artropoda, Subphylum Chelicerata, Clase Arachnida, Subclase Acari, Orden Parasitiformes, Suborden Ixodida, Superfamilia Ixodoidea, en la cual se ubican 2 Familias: *Ixodidae* y *Argasidae* (Márquez, 2005). La familia *Argasidae* o garrapatas blandas (carecen de escudo dorsal), posee cuatro géneros que son: *Argas* con 58 especies, *Ornithodoros* con 101 especies, *Antricola* con 10 especies y *Otobius* con 2 especies. En el caso de la familia *Ixodidae* o garrapatas duras (poseen escudo dorsal) se dividen en 5 géneros que son *Amblyomma* con 102 especies, *Dermacentor* con 30 especies, *Haemaphysalis* con 155 especies, *Ixodes* con 235 especies y *Rhipicephalus* con 80 especies.

1.2. *Rhipicephalus microplus*.

Rhipicephalus microplus, es una garrapata originaria del sureste de Asia, pero actualmente también se localiza en regiones tropicales y subtropicales como la India, Australia, Madagascar, sudeste de África, Sur y Centro América, y México (Figura 1) (Estrada, 2006).

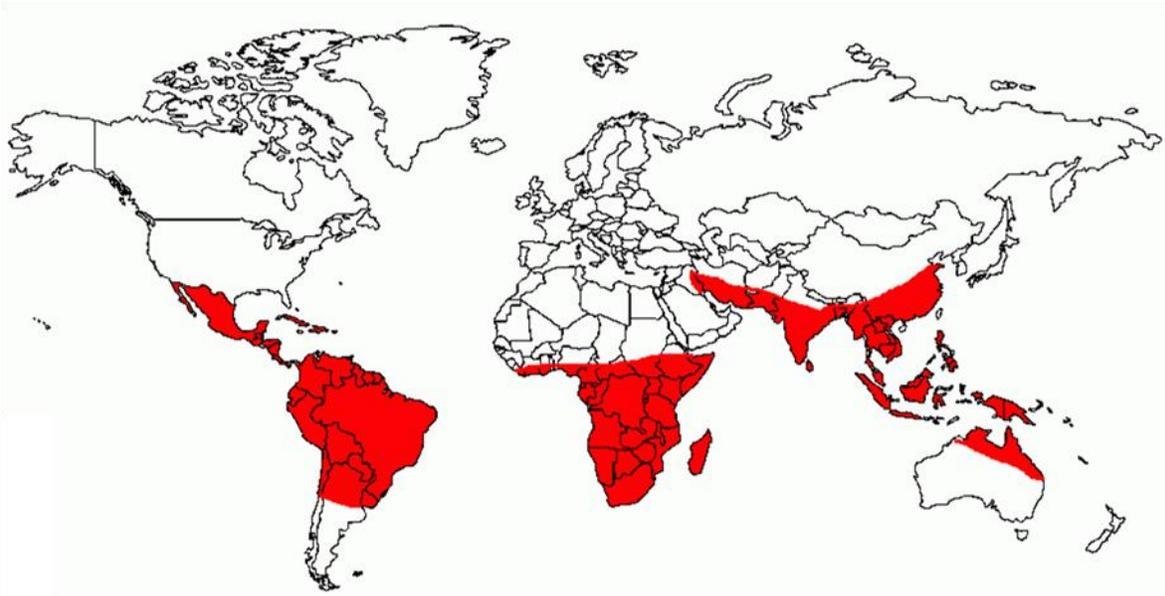


Figura 1. Distribución geográfica de *Rhipicephalus microplus*.

El cuerpo de *R. microplus* es de forma oval, y está compuesto por dos segmentos un gnatosoma e idiosoma (Figura 2).

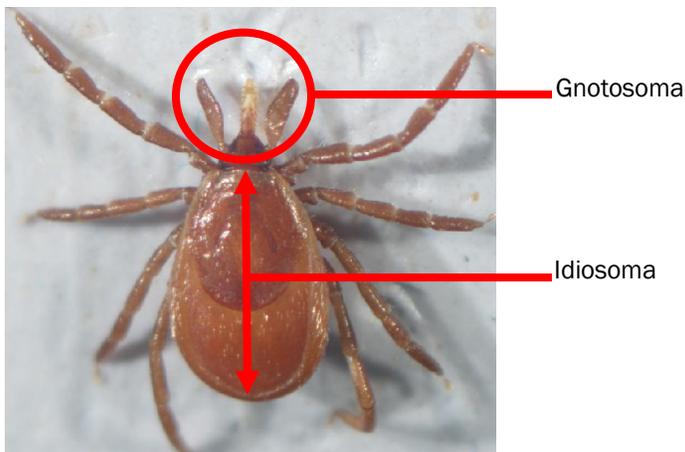


Figura 2. Segmentos en los que se divide el cuerpo de *R. microplus*.

El gnatosoma (partes bucales) contiene los siguientes elementos (Figura 3): *Palpos* (un par), que tienen la función de presionar la piel lateral y horizontalmente durante la alimentación; *Quelíceros* (un par), éstos son de forma tubular, están esclerotizados y bisegmentados; *Hipostoma*, el cual posee pequeños dientes dirigidos hacia atrás, con los cuales la garrapata es capaz de atravesar la piel de su hospedador y adherirse. La *Base del gnatosoma*, es de forma hexagonal y se une al idiosoma a través de una membrana flexible (Anderson et al, 2008).

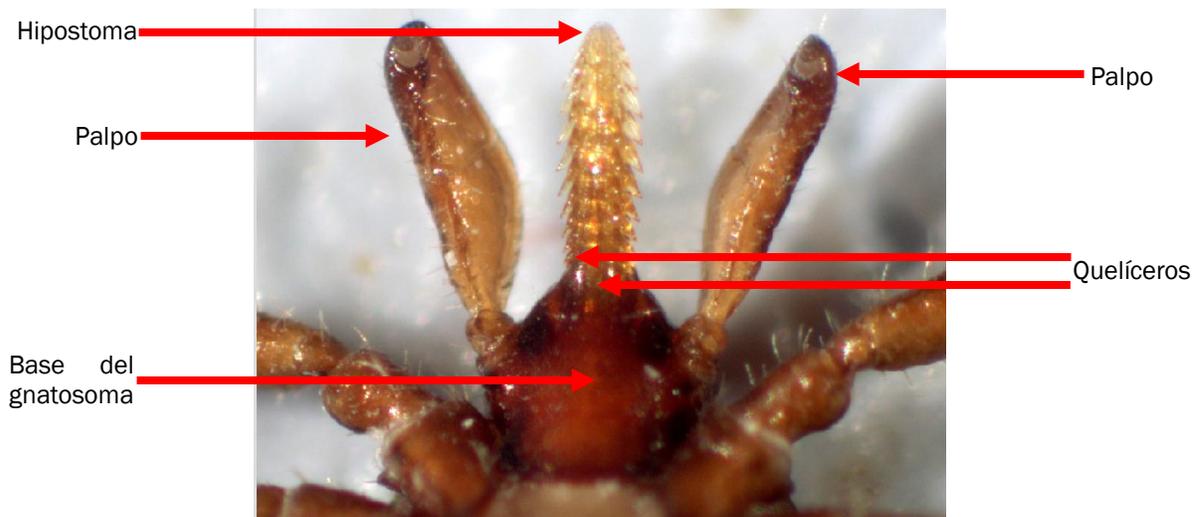


Figura 3. Características morfológicas del gnatosoma de *R. microplus*.

El idiosoma (Figura 4) es posterior al gnatosoma, es de forma oval y presenta un escudo dorsal en forma de lengüeta de color café, el cual es corto en las hembras (holodorsal) y en los machos es largo (propodosomal), por lo que cubre casi todo el cuerpo (Quiroz, 1996).

Las patas son lo único que sobresalen del cuerpo de la garrapata, y están divididas en seis artejos: coxa, trocánter, fémur, tibia, pretarso, tarso. El tarso termina en una garra y una estructura semejante a una ventosa llamada ambulacro o apotela, que detecta temperatura, corrientes de aire, olores y químicos (Anderson et al, 2008).

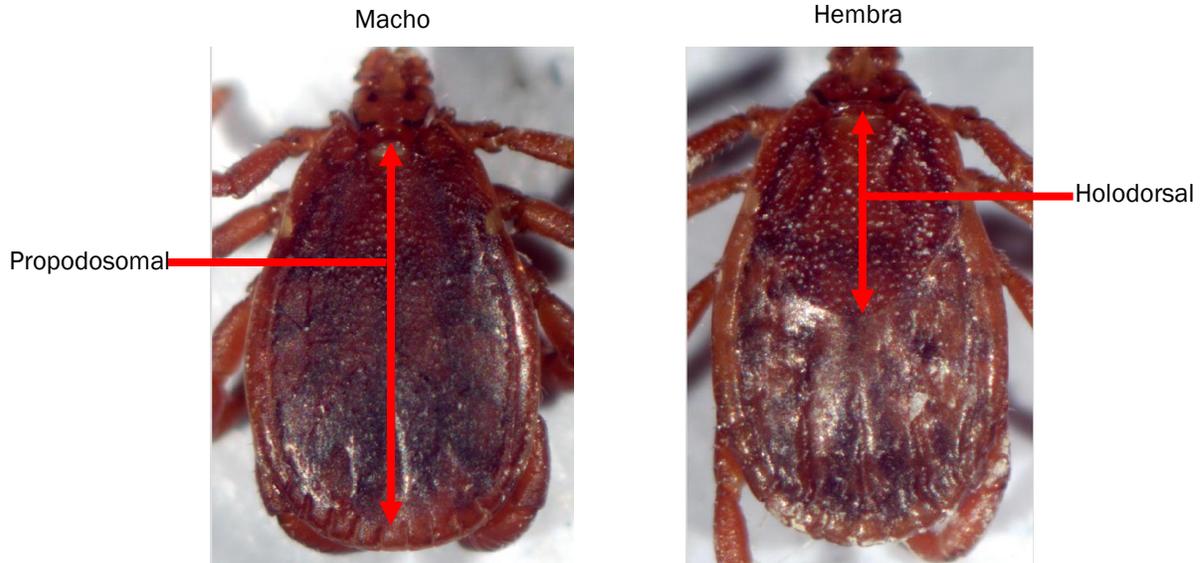


Figura 4. Diferencias del idiosoma de machos y hembras de *R. microplus*.

Rhipicephalus microplus se caracteriza por utilizar un solo huésped para completar su desarrollo y requiere de 4 a 10 meses (Figura 5) para hacerlo, dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura y humedad). Afecta principalmente al ganado vacuno, pero en ocasiones puede infestar a los equinos, caprinos, ovinos y caninos (CFSPH, 2007).

El ciclo biológico de *R. microplus* se compone de dos fases: no parasitaria y parasitaria. En el caso de la fase no parasitaria inicia cuando la hembra alimentada y fecundada se desprende de su huésped para iniciar su búsqueda de refugios para ovopositar, todo este proceso tiene un periodo de 4 a 44 días. Después de la oviposición sigue el período de incubación el cual tiene una duración de 14 a 146 días (Soulsby, 1988). Después los huevos eclosionan y las larvas buscan a su huésped, mediante estímulos como la vibración, calor, olor y bióxido de carbono, este periodo tiene una duración de 4-6 días. La fase parásita tiene una duración aproximada de 21 días (Anderson *et al*, 2008), inicia cuando la larva encuentra y se adhiere a su huésped en donde se alimenta intermitentemente. Durante la alimentación se lleva a cabo la muda de larva a ninfa (6 días), de ninfas a adultos (6-8 días) y la fecundación. Posteriormente el macho muere y la hembra cae al suelo, para buscar refugio para ovopositar, y después muere (Pratt, 1972).

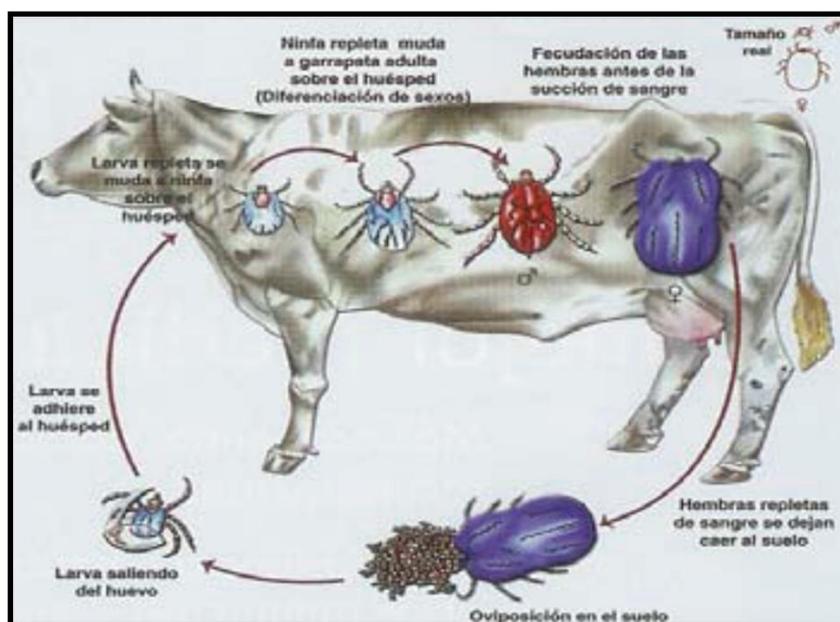


Figura 5. Ciclo de vida de *R. microplus* en bovinos.

La infestación de *Rhipicephalus microplus* sobre los bovinos ocasiona grandes pérdidas económicas, ya que disminuye la producción de la carne y leche, además de una disminución en las defensas inmunológicas, y con el paso del tiempo provoca anemia e incluso la muerte. Por otro lado, es un vector que transmite enfermedades como Babesiosis (*Babesia bigémina* y *Babesia bovis*) y Anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) (INTA, 2003).

Por lo anterior, la estrategia más utilizada para el control *R. microplus*, es la aplicación de sustancias químicas sobre el cuerpo de los bovinos parasitados que a continuación se mencionan:

Organofosforados: Es el pesticida más tóxico para los vertebrados, son derivados del ácido fosfórico y se caracterizan por inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, produciendo un aumento de los estímulos nerviosos en los artrópodos (Rodríguez et al, 2006). **Piretroides:** Provocan un bloqueo de la actividad motriz, incoordinación de movimientos, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte del artrópodo (Rodríguez et al, 2006). **Amidinas:** Son antagonistas de los receptores de la octopamina en el cerebro de

estos parásitos, provocando hiperexcitabilidad seguido de parálisis y muerte (George *et al*, 2004). *Lactonas macrocíclicas*: Incrementan la liberación del ácido gamma-aminobutírico en el sistema nervioso de los artrópodos. El mecanismo de acción está relacionado con la apertura de los canales de cloro en la conexión postsináptica y permite el flujo de iones, produciendo un estado irreversible de letargia, parálisis y muerte del parásito (Rodríguez *et al*, 2006). *Benzofenilureas*: Se caracteriza por interferir principalmente en la formación de quitina, impidiendo la formación de la cutícula del ectoparásito (Rodríguez *et al*, 2006).

Sin embargo, el uso excesivo de las sustancias antes mencionadas, ha ocasionado la aparición de resistencia en las garrapatas, y es la limitante para la utilización de estos químicos, además de causar daños al ambiente y a la salud pública.

El control inmunológico de garrapatas, es una alternativa prometedora, ya que el objetivo es inducir una respuesta en los animales inmunizados que permite mantener bajo control a estos ectoparásitos. Se han identificado varias proteínas de interés, sin embargo, a la fecha existe un número reducido de proteínas que se han probado en ensayos controlados para probar su eficacia (de la Fuente y Kocan, 2003).

Para el desarrollo de vacunas contra garrapatas se utilizan dos estrategias, el uso de antígenos expuestos y antígenos ocultos. Los antígenos ocultos son aquéllos no expuestos al sistema inmune del hospedero, los cuales se localizan en la pared del intestino de garrapatas. Los antígenos expuestos son aquellos que se muestran naturalmente al sistema inmune del hospedero durante la infestación. Estos antígenos son secretados en la saliva durante la alimentación de las garrapatas (Labuda *et al*, 2006).

1.3. Saliva de las garrapatas.

El proceso de alimentación de estos ectoparásitos implica la liberación de saliva la cual posee moléculas con propiedades farmacológicas que inhiben la respuesta inmunitaria del hospedero, así mismo contienen moléculas que impiden la coagulación local de la sangre, permitiendo una fijación prolongada en el hospedero (Sauer, 2000).

Se tienen reportes de 50 proteínas en la saliva de garrapata que modifican la hemostasis, las rutas inflamatorias y la respuesta inmune del hospedero. A continuación se mencionan algunas de las proteínas identificadas en las salivas de *Ixodes scapularis* y *Rhipicephalus microplus* (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas identificadas en la saliva de garrapatas.

Especie	Nombre de la proteína	Actividad de la proteína
<i>Ixodes scapularis</i>	Apyrasa	Inhibe la agregación plaquetaria (Ribeiro et al., 1985).
<i>Ixodes scapularis</i>	SG metaloproteasa	Reduce la respuesta inflamatoria (Ribeiro and Mather 1998).
<i>Ixodes scapularis</i>	Glutación peroxidasa	Modulador de la respuesta inmune (Das et al., 2001)
<i>Rhipicephalus microplus</i> / <i>Ixodes scapularis</i>	BmTI / Ixolaris	Inhibición de serina proteasa (Tripsina) (Tanaka et al., 1999. Francischetti et al., 2002).
<i>Ammbyoma americanum</i>	MIF	Inhibición de macrófagos (Jaworski et al., 2001).
<i>Ixodes ricinus</i>	BIP	Inhibe la proliferación de células B (Hannier et al.,

		2004).
<i>Ixodes scapularis</i>	IsSMase	Esfingomielinasa D (Alarcon et al., 2009).

1.4. Esfingomielinasa D (SMD) de *Loxosceles*.

La esfingomielina (SM), está compuesta por una unidad de colina y una molécula de ceramida unida a un grupo fosfato (Fig. 6). La SM es un componente estructural en las membranas biológicas y se localiza principalmente en la monocapa externa de la bicapa fosfolipídica, la cual está compuesta por diferentes especies moleculares de SM y varían entre diferentes especies de animales y órganos (Ramstedt *et al*, 1999; Ramstedt y Slotte, 2002).



Figura 6. Estructura general de la esfingomielina. En azul representa la fosfoceramida. En negro aparece la colina. En rojo representa el acilo sustituyente variable.

Diferentes grupos de investigación han realizado ensayos *in vitro* e *in vivo* que aportan información sobre la actividad de la esfingomielinasa D de *Loxosceles*. Y se ha demostrado que la SMD de las *Loxosceles* tiene actividad enzimática *in vitro* sobre la esfingomielina generando dos subproductos la fosfoceramida y colina, además de inducir la agregación de plaquetas en ensayos *in vitro* (Kurpiewski et al., 1981).

Otras de las actividades de la esfingomielinasa D de *Loxosceles* es que provoca una acción necrótica. En el 2005, ensayos *in vitro* mostraron que la esfingomielinasa

recombinante de *L. reclusa* presenta actividad enzimática en diferentes sustratos (Lee and Lynch, 2005). En el 2009, Chávez y colaboradores encontraron un efecto hemolítico de la SMD en eritrocitos de conejo, humano, oveja y caballo.

En el 2005, Murakami y colaboradores, reportaron la estructura tridimensional de la SMD de *L. laeta*. En dicha estructura se muestra que los residuos de aminoácidos E32, D34 y D91 participan de manera importante en la unión a magnesio (catión divalente indispensable para la actividad de la enzima) mientras que las histidinas 12 y 47 funcionan como nucleófilos que inician el ataque en el enlace fosfoéster del sustrato.

2. Antecedentes.

En el laboratorio del Dr. Alagón del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se realizó una búsqueda de secuencias de SMasas D depositadas en la base de datos NCBI, y recuperaron una secuencia de SMD de la saliva de *Ixodes scapularis*. Si bien el porcentaje de identidad entre esta secuencia y las SMasas D de *Loxosceles* no es muy alto, supera los límites usuales (30% de identidad a nivel de aminoácidos) para aceptar homología entre proteínas (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la SMD de *I. scapularis* e isoformas del género *Loxosceles*. Ll1=*L. laeta*, Lr1=*L. reclusa*, Lb1=*L. boneti*, La=*L. arizonica*, Li1=*L. intermedia*.

	Ll1	Lr1	Lb1	Lb3	La	Li1
<i>I. scapularis</i>	33	38	39	38	37	39

Como se mencionó, *Rhipicephalus microplus* es de importancia veterinaria a nivel mundial, por tal motivo se colectaron garrapatas de esta especie, y se encontró que la saliva de esta garrapata tiene actividad esfingomielinasa D utilizando el método Amplex-Red, con una actividad específica de 0.010 U/mg (Figura 7).

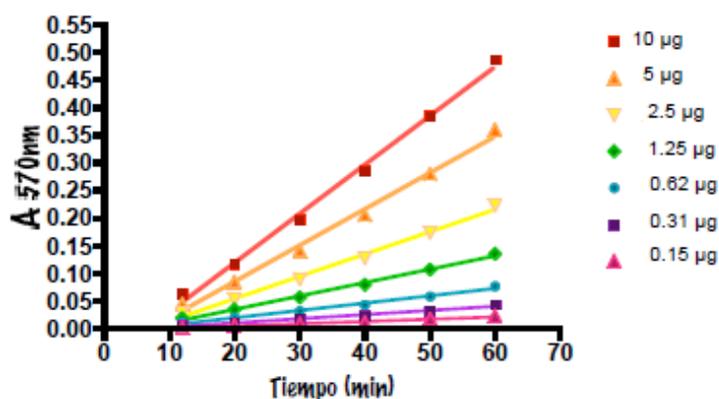


Figura 7. Ensayo de actividad SMD en saliva de *R. microplus* utilizando el método Amplex-Red. Iniciando con 10 µg de saliva. Se incubó a 37 °C, y se midió absorbancia a 570 nm cada diez minutos por una hora.

Posteriormente se clonó la secuencia codificante de la esfingomielinasa D de *R. microplus*, a partir del ARNm de las glándulas salivales. Para obtener la secuencia codificante de la esfingomielinasa D, se diseñaron oligonucleótidos degenerados, a partir de secuencias de nucleótidos de esfingomielinasas D ya reportadas (Anexo B).

Después de que se obtuvo un producto de PCR con los oligonucleótidos degenerados, se diseñaron oligonucleótidos específicos para obtener la secuencia completa utilizando la técnica de 5´ y 3´ RACE, a esta secuencia se le dio el nombre de SMDtick (Figura 8).

```

GGTTG CAGCCTG ACCGTGTGTCCAAGAGG TACTGTTGCTGGAACATCACCTCCAGGTCACGGT
ACAGACTAAGGCCAGGTGCGACCGCGACAAAGGGAAGTCTGCACGATGTTTCTTGAAGTTACAT
GCCTCTTCATCTTTGCCAGCTTTGGCAGAACATTTGTCATGCCTCTGCTTCCACTGGGCTGCG
TCCTTTCTACGTGTTCCGGTCCCATGGTGAACAGTTTGGAAAGACGTGGACAACCTTCATGGGCCTT
GGCGTGAATGCTATAGAGGCTGACCTCAATTTTGCCCTCAGATGGAACGCCACAAAAGTTCTATC
ATGGATGGCCGTGTGGCTGCCACCGCGACTGCGAAAAGTCCGCGGGAGTGGATTACCTACCTCTC
CTATTTAAGAGATGCCGTGAGTCAAAGTGGCAAGTTTGCTGGTAAGCTGCAGCTGCTTTACGTC
GACACCAAACCTGGAAGCCTTTCTTCTGGCAGAAATACCAGGCCGGCATCAACCTCGCCAAACA
GCTTGATCAACACTCTTTGGAAACAATGGCACAATAACCATCCGAGAACATGCTGAACGTCATCCT
GTCGGTGTCTCTACGCTGGACAAGGAAATCCTCTCGGGAGCATTCGACACAATCAAGCGAGCC
GGGAATTCATCATTATTTCTCGACCAGTGGGTTTTGACATCAGTGGATAACCAATTGCTAAGTG
TGATCGCTGATATATACGAAGAGCTGGGTATCCGGCAACATCGCTGGCAGGGTGACGGCACGAA
TAACTGCTTGATTGACATTTACTCGGATGTACGTACTAAAGCTGCGATATCACGACGAACTGCG
GCCAACACGACGAATGATTACGTGGACAAGGTGTACGTCTGGACTGTGACAATGCGTCGACCA
TGCGTCCGTTCCCTCAGGTTGAAGATAGATGGTATGTTTACGAACCAGCCAGCAACTCTTCTGAG
TGTCCTCCAAGAAACAGAGTTCTCGACGATGTACCAGCTTGCCACTGCGCAGGATAGCGCATGG
AAGCGTATTGTTTGACTAAAAGCTTTTTGTTGACGTAAAACAAATTACATGTGAGCTCAAGCC
ACATGATTATAAACAACTTGCCAACCTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 8. Secuencia nucleotídica codificante de la Esfingomielinasa D de *R. microplus*. Letras negras=5´ y 3´ UTRs. Letras verdes=Secuencia que codifica a péptido señal. Letras rojas=Secuencia que codifica a péptido maduro. Letras moradas=Ubicación de hibridación del oligonucleótido degenerado “forward”. Letras grises= Ubicación de hibridación del oligonucleótido degenerado “reverse”. Letras azules= Ubicación de hibridación del oligonucleótido específico “forward”. Letras amarillas= Ubicación de hibridación del oligonucleótido específico “reverse”.

Se alineó la secuencia de aminoácidos del péptido maduro (SMDtick; Figura 10) con otras SMAsas D ya reportadas (Anexo C) con el programa ClustalX 2.1, encontrando un 41% de identidad con la esfingomielinasa D de *Ixodes scapularis* y un 35% de identidad con la de *Loxosceles boneti* (Tabla 3).

MFLEVTCLFIFASFGTNICHASASTGLRPFYVFGPMVNSLEDVDNFMGLGVNAIEADLNFA SDGTPQKFYHGWPCG
 CHRDC EKSAGVITYLSYLRDAVSQSGKFAGKLQLLYVDTKTGSLSSGTYQAGINLANSLINTLWNNGTIPSENMLNV
 ILSVSSTLDKEILSGAFDTIKRAGNSSFLDHVGFDISGYQLLSVIADIYEELGIRQHRWQGDGTNNCLIDIYSDVRTKAA
 ISRRTAANTNDYVDKVVVWTVDNASTMRRFLRLKIDGMFTNQPATLLSVLQETEFSTMYQLATAQDSAWKRIV•

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de la Esfingomielinasa D de *R. microplus* (SMDtick). En rojo péptido líder. En negro péptido maduro. Punto codón de paro.

Tabla 3. Porcentaje de identidad de la SMDtick (KJ854238) contra SMasas D ya reportadas. *L. boneti* 1 (AY559844), *L. reclusa* (AY559846), *L. intermedia* (P83046), *L. laeta* 1 (DQ369999), *L. laeta* 2 (DQ370000), *L. boneti* 3 (AY559845), *I. scapularis* (Q202J4).

<i>Ixodes scapularis</i>	<i>Loxosceles reclusa</i>	<i>Loxosceles intermedia</i>	<i>Loxosceles boneti</i> 1	<i>Loxosceles boneti</i> 3	<i>Loxosceles laeta</i> 1	<i>Loxosceles laeta</i> 2
41 %	34 %	35 %	35 %	35 %	34 %	30 %

3. Justificación.

La saliva de garrapata es una mezcla compleja de proteínas, lo que pudiera ocasionar que esta mezcla enmascare el reconocimiento del sistema inmune por las proteínas importantes en el ciclo de vida de estos ectoparásitos. Por tal motivo, es necesario determinar la actividad biológica de la SMD de *R. microplus* (SMDtick), para conocer si juega un papel importante en el ciclo de vida de esta garrapata. Sin embargo, la obtención de saliva de la garrapata es complicado; por la cantidad de saliva que se obtiene por garrapata (0.4 μ L = 2 mg). Por los puntos antes mencionados, una alternativa para poder resolver este problema, es mediante la producción de la SMDtick recombinante, esto permitirá conocer su importancia biológica dentro de *R. microplus*, y utilizarse como inmunógeno para generar anticuerpos policlonales y observar el comportamiento de *R. microplus*. Por otro lado, el obtener la SMDtick activa y en cantidad suficiente permitirá conocer las diferencias bioquímicas con la esfingomielinasa D de la araña *Loxosceles*.

4. Objetivo general.

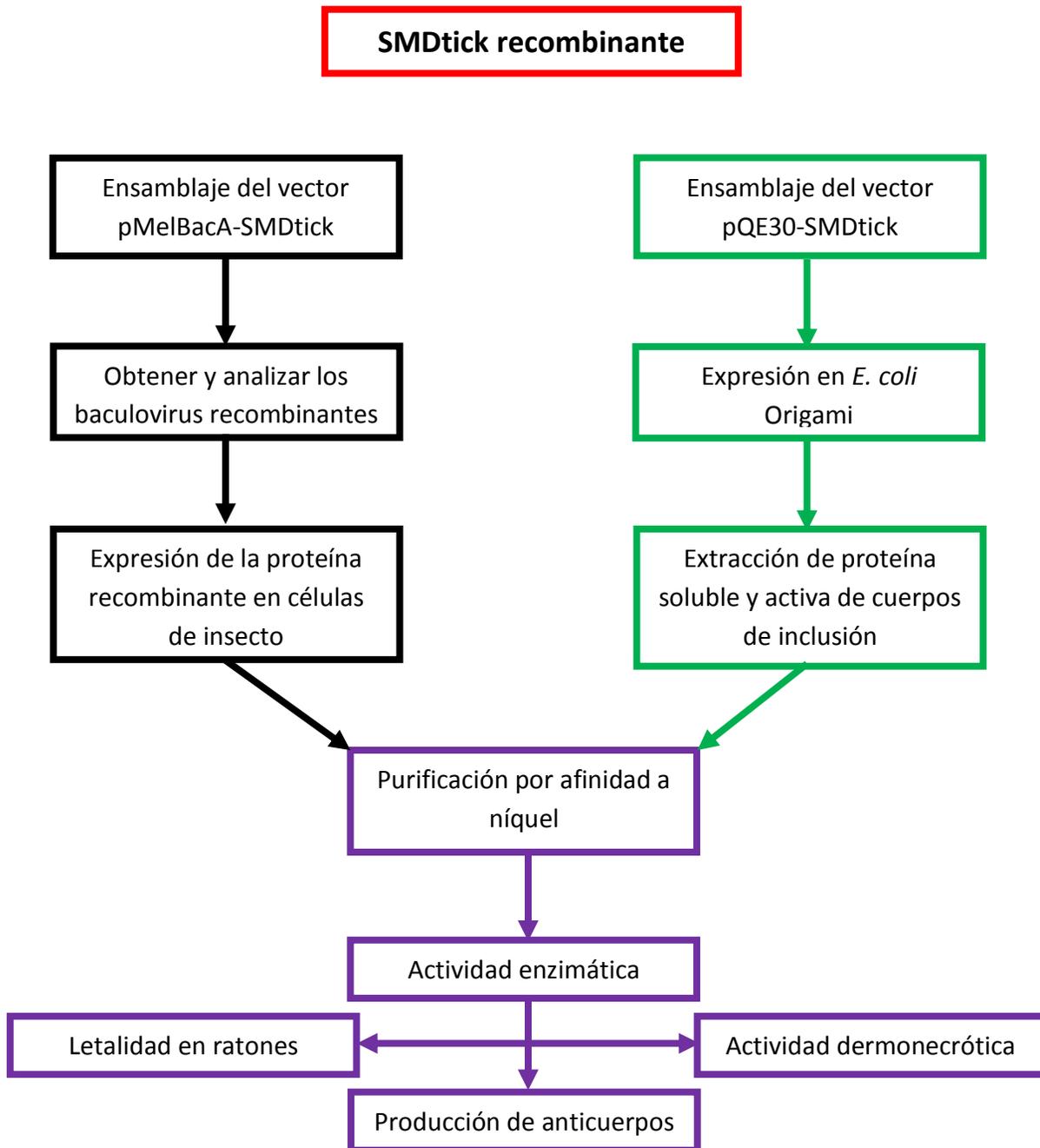
Producir la esfingomielinasa D recombinante de *Rhipicephalus microplus* y caracterizar su actividad enzimática para su posible uso como inmunógeno.

4.1. Objetivos particulares.

- Encontrar las condiciones óptimas para la expresión y purificación de la proteína recombinante.
- Evaluar la actividad enzimática de la esfingomielinasa D recombinante.
- Evaluar las diferencias bioquímicas de la esfingomielinasa D recombinante de *Rhipicephalus microplus* con la esfingomielinasa D *Loxosceles*.
- Generar suero anti-esfingomielinasa D recombinante de *Rhipicephalus microplus* en conejos para utilizarlo en ensayos de reactividad cruzada.

Estrategia experimental.

En el diagrama de flujo que a continuación se muestra, indica la estrategia usada a lo largo de este trabajo.



5. Materiales y Métodos.

5.1. Materiales.

5.1.1. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se sintetizaron en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. A continuación se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante este trabajo.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia
FwdPolh	5´ TTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTG 3´
RevPolh	5´ CAACAACGCACAGAATCTAGC 3´
<i>Bam</i> HI Fw	5´ GGATCC GCTTCCACTGGGCTGCG 3´
<i>Hind</i> III + His Rv	5´ AAGCTT TTCAGTGATGGTGGTGGTGGTGAACAATACGCTTCCATG 3´
<i>Hind</i> III Rv	5´ AAGCTT TTCAAACAATACGCTTCCATG 3´

Las letras en negro indican los sitios de restricción.

5.1.2. Enzimas de restricción y modificación.

Enzimas de restricción que se utilizaron fueron *Bam*HI y *Hind*III (ROCHE). Y las enzimas de modificación que se emplearon fueron T4 DNA Ligasa (Boehringer) y Fosfatasa Alcalina (ROCHE).

5.1.3. Kits para la purificación de material genético.

High Pure Plasmid Purification (ROCHE), para purificar plásmidos en pequeña escala (mini-prep). *High Pure PCR Product Purification* (ROCHE), para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. *Plasmid Midiprep Kit* (Biorad), para purificar plásmidos en mediana escala (midi-prep).

5.1.4. Vectores.

Vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) (Apéndice D). Es un vector de clonación de productos de PCR. Este vector viene linearizado, además presenta en sus extremos una timidina sobresaliente, la cual está unida covalentemente a la topoisomerasa I, esto ayuda al producto de PCR que se pueda ligar fácilmente, debido a que los productos de PCR contienen una adenina sobresaliente en el extremo 3´ cuando se utiliza la Taq DNA Polimerasa. Además el sitio múltiple de clonación se encuentra la secuencia que codifica para la β -galactosidasa lo que permite seleccionar células que contienen plásmidos recombinantes al tornarse azules en presencia de X-Gal. Además contiene el promotor *lac*, orígenes de replicación en *E. coli* pUC, genes de resistencia *nptII* y *bla* (Kanamicina y Ampicilina respectivamente).

Vector pQE30 (Qiagen) (Apéndice D). Vector de expresión de 3.4 Kb. Presenta un origen de replicación en *E. coli* ColE1, un gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina. Posee un promotor del fago T5, dos secuencias del operador *lac* para lograr una eficiente represión del promotor, un sitio de unión a ribosomas para obtener una alta tasa de traducción de los transcritos, y la secuencia que codifica para una etiqueta de histidinas en la región 5´ del sitio de clonación.

Vector pMelBacA (Invitrogen) (Apéndice D). Vector de 4.8 Kb, utilizado para la generación de baculovirus recombinantes en células de insecto, mediante recombinación homóloga. Contiene un promotor fuerte de la polihedrina que aumenta la producción de transcritos y

favorece a una alta producción de proteína recombinante, el péptido señal de la melitina para secretar la proteína recombinante, las secuencias de recombinación para restaurar genes esenciales del baculovirus (ORF1629) y para seleccionar baculovirus recombinantes mediante coloración azul (*lacZ*), un origen de replicación en *E. coli* (pUC) y un gen de resistencia a ampicilina bla.

5.1.5. Cepas bacterianas.

XL1-Blue (Stratagene), con genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [ϕ *proAB lacIqZ Δ M15 Tn10* (Tetr)]. Las células XL1-Blue son resistentes a tetraciclina, deficientes en endonucleasa A y proteína recA, lo que mejora la estabilidad de los insertos. La mutación *hsdR* previene la ruptura del ADN clonado por acción de la endonucleasa *EcoK*. Además se encuentra mutado el gen *lacIqZ Δ M15* en el episoma ϕ , lo que permite detectar plásmidos recombinantes mediante color blanco-azul.

Origami DE3 (Novagen), con genotipo Δ (*ara-leu*)7697 Δ *lacX74* Δ *phoA* *PvuII* *phoR* *araD139* *ahpC* *galE* *galK* *rpsLF* [*lac*⁺ *lacI*^q *pro*] (DE3)*gor522::Tn10* *trxB* (Kan^R, Tet^R). Las células Origami son resistentes a kanamicina y tetraciclina, tiene mutaciones en los genes de tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), lo que favorece a la formación de puentes disulfuro en el citoplasma.

5.1.6. Líneas celulares de insecto.

Línea Sf9, proviene del ovario de pupa del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, y esta línea celular es recomendada para realizar los ensayos de transfección, purificación en placa, y generar stocks virales.

Línea BTI-Tn-5B1-4 (Invitrogen), conocida comercialmente como High Five™ (H5). Esta línea proviene del ovario del lepidóptero *Trichoplusia ni*, y se recomienda para obtener altos rendimientos de proteína recombinante.

5.1.7. Medios de cultivo.

Grace´s Insect Medium (GIBCO), se utilizó para cotransfectar células de insecto Sf9 y así obtener baculovirus recombinantes.

TNM-FH, *Grace´s Insect Medium* suplementado con hidrolizado de lactalbúmina, extracto de levadura, 10% de suero fetal de ternera y 0.5% de pluronic F-68. Se utilizó para la titulación de los baculovirus recombinantes.

Sf-900 II SFM (GIBCO), se utilizó para la clonación y amplificación de las placas virales en células de insecto Sf9. También para producir la proteína recombinante utilizando células de insecto H5.

Express Five SFM (GIBCO), medio optimizado para expresar proteínas recombinantes en células de insecto H5.

LB (Luria Bertani), medio para crecer y mantener cepas bacterianas, y para expresar proteínas recombinantes.

SOC, se utilizó para la recuperación de células *E. coli* Ca²⁺ competentes después del choque térmico.

5.1.8. Animales vivos.

Conejos, de la cepa New Zeland White, proporcionados por el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para realizar los ensayos de dermonecrosis y generación de anticuerpos policlonales.

Ratones, de la cepa CD-1 entre 18-20 g de peso, comprados a la compañía Harlan. Para realizar los ensayos de letalidad.

5.1.9. Anticuerpos.

Anticuerpos anti-6xhistidinas-HRP (ROCHE), anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a peroxidasa, para detectar etiqueta de histidinas fusionada a la proteína recombinante mediante western-blot.

Anticuerpos anti IgG de conejo-AP (Invitrogen), anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a fosfatasa alcalina, para detectar anticuerpos IgG de conejo mediante western-blot.

5.2. Metodología.

5.2.1. Amplificación de la cadena codificante de la esfingomielinasa D.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en volúmenes de 50 μ L, en tubos eppendorf de 0.2 ml de capacidad. Las mezclas de reacción consistieron en buffer 1X para PCR (Boehringer-Mannheim), 2.5 mM de dNTP's (ROCHE), 20 picomoles de oligonucleótido forward, 20 picomoles de oligonucleótido reverse, 10 ng de vector pCR2.1TOPO-SMDtick, 37.5 μ L de agua y 2.5 U de Taq DNA Polimerasa (Applied Biosystems).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

94 °C	3 minutos	1 ciclo
94 °C	1 minuto	} 30 ciclos
56 °C	1 minuto	
72 °C	1 minuto	
72 °C	10 minutos	1 ciclo
4 °C	∞	

Inserto para pQE30: Antes de subclonar la cadena codificante de la esfingomielinasa D en este vector, fue necesario agregarle en el extremo 5' un sitio de restricción *Bam* HI, y

en el extremo 3´ uno de *Hind* III. Los oligonucleótidos que se usaron fueron *Bam* HI Fw y *Hind* III Rv. Posteriormente se purificó el producto de PCR con el kit *High Pure PCR Product* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inserto para pMelBacA: Antes de subclonar la cadena codificante de la esfingomielinasa D en este vector, fue necesario agregar en el extremo 3´ una secuencia que codifica para una etiqueta de histidinas, un codón de paro y después el sitio de restricción *Hind* III, por otro lado, en el extremo 5´ se agregó el sitio *Bam* HI. Los oligonucleótidos que se usaron fueron *Bam* HI Fw y *Hind* III + His Rv. Posteriormente se purificó el producto de PCR con el kit *High Pure PCR Product* (ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2.2. Clonación de la cadena codificante de la esfingomielinasa D en el vector pCR2.1-TOPO.

Los productos obtenidos mediante PCR se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO y se transformaron células *E. coli* XL1-blue competentes siguiendo las instrucciones del proveedor. Las colonias se seleccionaron y se cultivaron en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina (80 µg/mL) a 37 °C y con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Para la purificación del plásmido de las colonias seleccionadas se utilizó el *Kit High Pure Plasmid*.

Para determinar que clones contenían el inserto de interés, los plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III a 37 °C por una hora. Los plásmidos que liberaron un fragmento del tamaño esperado se enviaron a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuencia que se obtuvo se comparó *in silico* con la secuencia de SMDtick que se había obtenido anteriormente. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

5.2.3. Sub-clonación de la cadena codificante de la esfingomielinasa D en el vector pQE30 y pMelBacA.

Los productos obtenidos con la secuencia correcta se sub-clonaron en los vectores pQE30 y pMelBacA de la siguiente manera.

Digestión: Los plásmidos (pQE30 y pMelBacA) se digirieron con enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III por una hora a 37 °C, posteriormente se purificaron con el Kit *High Pure PCR Product* (ROCHE). Los vectores fueron desfosforilados utilizando fosfatasa alcalina e incubaron por 90 minutos a 37 °C, por último se inactivó la enzima a 65 °C por 15 minutos.

Ligación: A estos vectores desfosforilados se les agregó el fragmento de ADN correspondiente en una relación molar de 1:9 (plásmido: inserto), se mezcló con el buffer 10X de la ligasa y la ligasa T4 de Roche y se incubó a 16 °C por 16 horas.

Transformación: Transcurrido el tiempo se agregaron 100 µL de células competentes (*E.coli* XL1-blue), y la mezcla se colocó en hielo por 30 minutos. Posteriormente se dio un choque térmico a 42 °C durante 30 segundos, inmediatamente se agregaron 200 µL de medio SOC y se incubó a 37 °C por una hora. Posteriormente, las células transformadas se sembraron en cajas Petri con medio LB con agar y 100 µL/mL de ampicilina y se incubó toda la noche a 37 °C.

Análisis de clonas: Se seleccionaron clonas al azar e inocularon en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina (80 µg/mL) a 37 °C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Se aisló el plásmido utilizando el *Kit* comercial *High Pure Plasmid* (ROCHE). Una vez purificados los plásmidos se les analizó con enzimas de restricción, y los plásmidos (que liberaron un fragmento del tamaño esperado) se mandaron a secuenciar en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología.

De las clonas de XL1-blue con el plásmido recombinante (pQE30-SMDtick o pMelBacA-SMDtick) se almacenaron en medio LB y glicerol al 50% a -80 °C.

5.2.4. Análisis de las secuencias.

Las secuencias nucleotídicas de todas las construcciones fueron analizadas utilizando el programa 4Peaks® 1.7. Para la traducción de las secuencias se usó el programa Gene Construction Kit, y las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalX 2.1.

5.2.5. Electroforesis.

DNA: Se utilizaron geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 g/mL). El buffer de corrida fue TAE 1X (Apéndice A). Las cámaras usadas fueron Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad). El buffer de carga para las muestras fue el loading buffer 10x. Los marcadores de peso molecular fueron 2- Log DNA Ladder de BioLabs. La corrida se llevó a un voltaje constante de 100 volts constante.

Proteínas (SDS-PAGE): El equipo utilizado para este método fue el Mini-Protean III (Bio-Rad). La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol a una concentración final de 2.5%). Los marcadores de peso molecular fueron de Biolabs, Inc. Todas las muestras, incluyendo al marcador de peso molecular, se desnaturalizaron en baño maría con agua hirviendo durante 5 minutos. La corrida se llevó a cabo a voltaje constante (80 mV para el gel concentrador y 120 mV para el gel espaciador). La tinción para cada gel fue con azul Brillante de Coomassie R-250 durante una hora y se destiñó durante una hora con solución de distinción; agitación constante.

5.2.6. Western Blot.

Las proteínas que se separaron por medio de un SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µM HATF, Millipore) utilizando una cámara semi-húmeda HEP-1 (OWL) con corriente constante 400 mA, por una hora con buffer de transferencia. La membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche (Svelty) en TBST

1X, por 2 horas en agitación constante, posteriormente se lavó 3 veces con TBST 1X (10 minutos cada lavado). Después, se incubó con el anticuerpo primario durante una hora, transcurriendo el tiempo se realizaron 3 lavados como anteriormente se describió. Se incubó el anticuerpo secundario durante 1 hora, y nuevamente se realizaron 3 lavados con TBST 1X. Para revelar se utilizaron los reactivos comerciales BCIP/NBT o TMB (para fosfatasa alcalina o peroxidasa respectivamente).

5.2.7. Obtención de los Baculovirus recombinantes.

5.2.7.1. Cotransfección en células de insecto.

Para producir baculovirus recombinantes, fue necesario clonar la cadena codificante de la SMDtick en el vector de transferencia pMelBacA. El vector de transferencia recombinante (pMelBacA-SMDtick) junto con el ADN viral *Bac-N-Blue*, se cotransfectan en células de insecto, y la recombinación homóloga restaura el ADN viral, además de integrar la secuencia de interés (SMDtick) en los baculovirus recombinantes. Otra de las ventajas de este sistema es que posee un gen reportero lacZ, lo que facilita la selección de virus recombinantes mediante color azul (Figura 10).

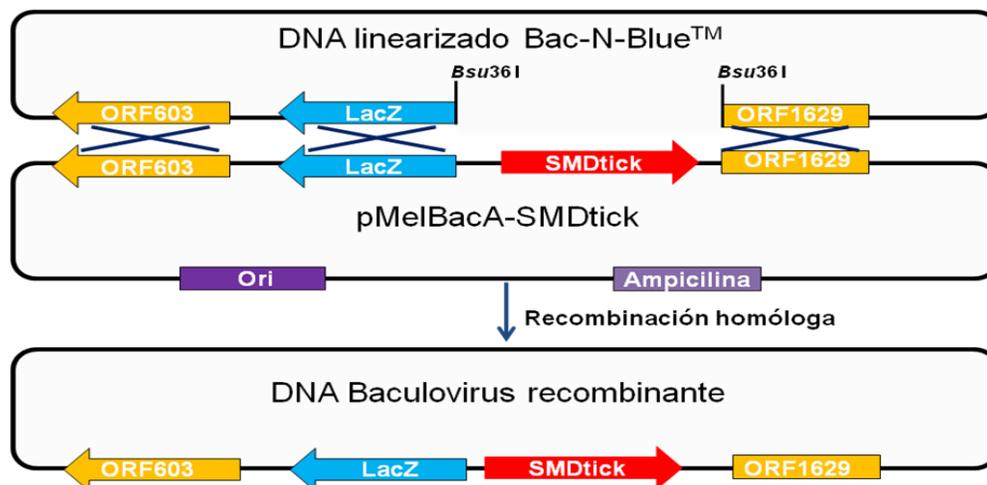


Figura 10. Representación gráfica de la recombinación homóloga del vector pMelBacA-SMDtick y del ADN viral Bac-N-Blue, en células de insecto.

Para todo el proceso de cotransfección (Figura 11), se sembraron microplacas multipozo (6 pozos de 35 mm, Nunc) con células Sf9 en crecimiento exponencial con una viabilidad mayor al 95%, a una concentración de 2×10^6 células/pozo en medio TNMFH. La microplaca se incubó durante 1 hora a 27 °C para permitir que las células formaran una monocapa. Antes de que terminara la hora, se realizaron las siguientes mezclas:

Mezcla de DNA: En el tubo donde se encontraba el DNA viral se le agregó 1 mL de medio *Grace's Insect Cell Culture*, y 4 μ g del vector pMelBacA-SMDtick.

Mezcla de Cellfectin®: Se mezcló 30 μ L de Cellfectin y 250 μ L de medio *Grace's Insect Cell Culture*, y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se unieron las mezclas anteriores (Mezcla de infección), mientras tanto se removió el medio de las microplacas, y se lavaron dos veces con 2 mL de medio *Grace's Insect Cell Culture*. Tras la eliminación del medio, se le agregaron a las células la mezcla de infección, se incubó a 27 °C por 4 horas. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 2 mL de medio TNMFH a cada pozo, y la incubación continuó durante 3 días a 27 °C. Después de la incubación, se recuperaron los sobrenadantes, los que se designaron como 1^{er} stock viral y se almacenaron a 4 °C.

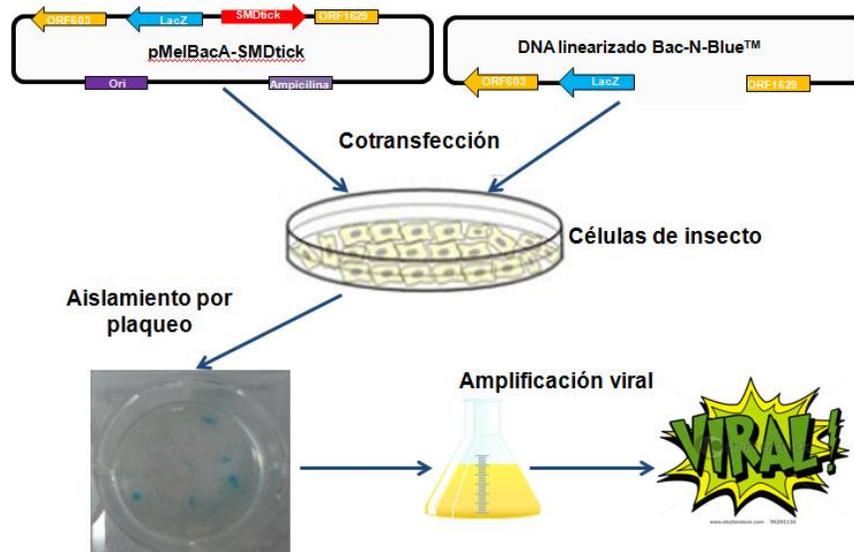


Figura 11. Representación gráfica para la obtención de baculovirus recombinantes.

5.2.7.2. Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales.

Se cultivaron células Sf9 en medio TNM-FH al 10% de SFT y 0.5% pluronic F-68 y una vez que llegaron a una viabilidad mayor del 97% fueron re- sembradas en placas de cultivo de 6 pozos de fondo plano a una densidad celular de 2×10^6 células/pozo en 3 mL totales. Se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir su correcta adhesión al fondo del pozo, posteriormente el medio de cultivo fue eliminado por aspiración, enseguida se agregaron 800 μ L de diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) del 1^{er} stock viral, las cuales se realizaron con medio de cultivo TNM-FH al 10% SFT. Las placas de cultivo se sellaron e incubaron durante 3 h a temperatura ambiente y en la oscuridad. Nuevamente se eliminó el medio de cultivo por aspiración y se adicionaron 3 mL/pozo de agarosa de bajo punto de fusión (un volumen de agarosa de bajo punto de fusión al 3% + 0.8 volúmenes de TNM-FH 2X + 0.2 volúmenes de 20% SFT + 300 μ g/mL de X-gal). Luego las placas fueron incubadas durante 9 días a 27 °C, y las placas virales recombinantes se contaron a simple vista en un transiluminador.

Para aislar y preservar las placas virales obtenidas como resultado de los ensayos en placa, se extrajeron las placas azules del medio con agarosa con ayuda de una pipeta Pasteur. El tapón de agarosa fue dispersado en 200 μ L de medio de cultivo Sf900-II al 0.5% de SFT y fue almacenado a 4 °C hasta su uso.

5.2.7.3. Amplificación de las placas virales.

Para la primera amplificación de las placas virales se utilizaron células Sf9, cultivadas en medio Sf900-II sin suero y con una viabilidad superior al 97%. Se incubaron placas de cultivo de 6 pozos con una concentración de 1×10^6 células/pozo en 2 mL totales, a 27 °C por una hora. Se eliminó el medio de cultivo, y los pozos fueron infectados con 100 μ L de las placas virales clonadas y se incubó 1 hora en agitación, transcurrido el tiempo se añadió 1.9 mL de medio Sf900-II por pozo y se dejaron incubando 4 días a 27 °C. El sobrenadante de este cultivo fue recolectado y guardado a 4 °C con 0.5% SFT para garantizar una mayor integridad de los virus (Pase 1).

Para producir abastos virales, se inocularon matraces de 250 mL con células Sf9 (0.5×10^6 células/mL) en 60 mL de medio Sf900-II, con 100 μ L del Pase 1. La infección se mantuvo por 4 días a 27 °C en agitación constante (90 rpm). Transcurrido el tiempo, el cultivo se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue almacenado a 4 °C con 0.5% SFT (Pase 2).

5.2.7.4. Aislamiento y análisis del ADN de los baculovirus recombinantes

Del Pase 2, se recolectó 1 mL y se añadió 1 mL de 20% de polietilenglicol en NaCl 1 M, se incubó toda la noche a 4 °C. Transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, y el pellet fue resuspendido en 100 μ L de agua tetradestilada, después se le añadió 10 μ L de proteinasa K (5 mg/mL) y se incubó a 50 °C por 1 hora. Posteriormente, a la muestra se le agregó un volumen de fenol-cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. Se recuperó la fase acuosa, y se agregó un décimo del volumen de la solución para precipitar el ADN (acetato de sodio 3 M + 5 μ L de glucógeno + 2 volúmenes de etanol frío al 70%), la mezcla se incubó a -20 °C por 2 horas, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El pellet se lavó tres veces con etanol al 70%, y para finalizar el DNA se resuspendió en 20 μ L de agua tetradestilada y se guardó a -20 °C para su análisis.

Utilizando la técnica de PCR, se amplificó la secuencia que codifica para la SMDtick a partir del ADN de los baculovirus recombinantes. Se utilizaron los *primers* FwdPolh y RevPolh, que hibridan en los extremos del gen de la poliedrina.

5.2.8. Expresión de la esfingomielinasa D.

5.2.8.1. Expresión en células de insecto.

Los abastos virales que se almacenaron a 4 °C (apartado 5.2.6.3.) se evaluaron mediante un western blot para elegir el mejor baculovirus recombinante productor de SMDtick. Para

esto fue necesario recolectar una alícuota de cada abasto viral y fue tratada para ser separada en un gel SDS-PAGE, y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

Una vez que se obtuvo la mejor clona sobreproductora, se infectaron células de insecto H5 variando los parámetros de multiplicidad de infección. Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección.

Todos los ensayos de infección se realizaron en 60 mL de medio SF900-II o de Express Five, a una densidad de 1×10^6 células/mL a 27 °C y agitación de 90 rpm. Para determinar la viabilidad y la densidad celular fue necesario tomar alícuotas de los cultivos infectados, y las células fueron contadas mediante un hematocitómetro, utilizando una solución de Azul de Tripano al 0.04% que tiñe las células no viables.

Para observar la expresión de la proteína recombinante en el medio de cultivo se realizó una separación electroforética SDS-PAGE, posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar el inmuno-reconocimiento.

5.2.8.2. Expresión en *E. coli*.

De las clonas que se almacenaron a -80 °C (apartado 5.2.3), se utilizaron para obtener la clona sobreproductora de SMDtick. Las condiciones de expresión fueron las siguientes, 3 mL de medio LB con ampicilina (80 µg/mL), inducidos con 1 mM de IPTG durante toda la noche a 30 °C con agitación de 200 rpm. Para evaluar la expresión de SMDtick se realizó una electroforesis SDS-PAGE. Posteriormente se extrajo plásmido de la clona sobreproductora, y se utilizó para transformar células *E. coli* Origami DE3. Se utilizaron los mismos criterios antes mencionados para obtener una clona sobreproductora en *E. coli* Origami DE3. Una vez seleccionada la clona sobreproductora en *E. coli* Origami DE3 con el vector pQE30-SMDtick, se colocó un pre-inóculo en un matraz con 50 mL de medio LB con ampicilina (80 µg/mL) a 37 °C con agitación 200 rpm por toda la noche. Se inoculó,

con 10 mL del pre-inóculo un matraz con 500 mL de medio LB y ampicilina (80 µg/mL), y se dejó crecer a 37 °C con agitación 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6. Posteriormente se indujo la expresión de la proteína SMDtick con 0.1 mM IPTG a 16 °C con 200 rpm durante 16 horas. Para observar la expresión de la proteína recombinante se utilizó SDS-PAGE.

5.2.9. Purificación de la esfingomielinasa D recombinante.

5.2.9.1. Purificación en células de insecto.

De los ensayos de infección que se mencionaron anteriormente, se aisló el sobrenadante a las 72 h por centrifugación a 3,500 rpm durante 20 min. Posteriormente el sobrenadante fue dializado con diferentes soluciones *buffer*, terminada la diálisis se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, y muestras del pellet como el sobrenadante fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de Western blot.

5.2.9.2. Purificación en *E. coli*.

Lisis celular: El cultivo de 500 mL, se centrifugó a 8000 rpm por 20 min a 4 °C. El pellet se resuspendió en 4 mL de BugBuster (Novagen), se adicionaron 4 µL de Benzonaza 25 KU/µl (Novagen), y se adicionaron 13 µL de lisozima 30 KU/µL (Novagen); la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave. Posteriormente se centrifugó por 25 min a 13,000 rpm a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y el pellet.

Purificación de los cuerpos de inclusión: El pellet que contiene los cuerpos de inclusión, se resuspendió en 4 mL de BugBuster más 26 µL de lisozima (concentración final 1 KU/µL), se incubó por 10 minutos en agitación suave en un Nutator. Posteriormente, a los cuerpos de inclusión se les agregó 6 volúmenes de BugBuster diluido 1:10, se centrifugó a 5,000 g por 15 minutos a 4 °C. Los cuerpos de inclusión se recuperaron,

posteriormente se adicionó un volumen del BugBuster diluido 1:10 y se centrifugó a 5000 g por 15 minutos a 4 °C (este paso se repitió tres veces).

Obtención de proteína soluble a partir de cuerpos de inclusión: Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en el siguiente buffer (40 mM de Tris-HCl con 0.2% de N-Laurilsarcosina pH 8) en una proporción de 1:40, se incubó por 24 horas a 20 °C con agitación suave. Después se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C, posteriormente se colectó el sobrenadante y se mantuvo a temperatura ambiente para su purificación.

Purificación de SMDtick por Ni-NTA: La purificación se realizó con 2 mL de resina Níquel-nitriloacético (Ni-NTA Novagen) empacada en una columna. Se equilibró con 20 mL de PBS 1X. El sobrenadante se pasó a través de la columna y se recirculó a flujo muy lento. Posteriormente la columna se lavó con PBS 1X, hasta que se dejó de detectar proteínas en el eluyente. Se realizó un segundo lavado con PBS 1X con 25 mM de Imidazol para eliminar proteínas que se hubieran pegado a la columna inespecíficamente, y se eluyó con PBS 1X con 250 mM de Imidazol, y se colectaron fracciones de 1 mL hasta que no se detectaron proteínas en el eluyente.

Las fracciones eluidas con 250 mM que contenían proteína se dializaron contra 10 volúmenes de buffer PBS 1X, utilizando una membrana de diálisis de celulosa con un corte de 10,000 Da (Spectra-Por); se hicieron tres cambios de buffer cada 2 horas. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

5.2.10. Caracterización de la esfingomielinasa D.

5.2.10.1. Cuantificación de la esfingomielinasa D.

Para determinar la concentración de la proteína recombinante se utilizó el kit Micro BCA Protein Assay Reagent (PIERCE). Este método consiste en que el ácido bicinconínico (BCA)

en su forma sal de sodio es un reactivo estable, sensible y muy específico que reacciona con el ion cuproso (Cu^{+1}). La presencia de enlaces peptídicos y la contribución de las cadenas laterales de algunos aminoácidos (como cisteína, triptofano y tirosina) son responsables de la reacción colorimétrica, es decir, la proteína reacciona con el ion cúprico (Cu^{+2}) en un medio alcalino produciendo iones cuprosos (Cu^{+1}) lo cual se manifiesta con la aparición de color púrpura. (Smith, et al.,1985).

Se realizó una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones de 20, 40, 80, 160 y 320 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de la proteína a evaluar debe de quedar dentro de las utilizadas en la curva estándar. Como control negativo se usó el buffer de carga (PBS 1X). Todas las cuantificaciones se hicieron por triplicado y se leyeron a 570 nm en un lector de ELISA (Modelo Bio-Rad 550).

5.2.10.2. Medición de la actividad enzimática de la esfingomielinasa D.

El método Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay kit (Molecular Probes) permite medir la actividad de la Esfingomielinasa D, mediante una cascada de tres reacciones (Apéndice D). La primera consiste en la hidrólisis de la esfingomielina en colina y fosfoceramida; posteriormente, la colina oxidasa (ChOx) oxida a la colina, generando betaína y peróxido de hidrógeno. Finalmente, el peróxido reacciona con el reactivo de Amplex red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) en presencia de la peroxidasa (HRP) y genera un compuesto colorido conocido como resorufina.

La preparación de los reactivos se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (Molecular Probes). El ensayo se llevó a cabo en placas (Falcon) de 96 pozos. La actividad enzimática de la SMDtick se determinó haciendo 7 diluciones seriadas partiendo de 40 ng de la SMDtick en un volumen de 100 μL /pozo. Como diluyente se empleó el buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5 + 4 mg/mL de BSA + 0.5 mM MgCl_2) y la incubación fue de 30 minutos a 37 °C.

Posteriormente, se agregaron 100 μL /pozo del sustrato (Tabla 5) y la placa se incubó durante una hora a 37 °C; se determinó la absorbancia a 570 nm en el lector de placas cada 10 minutos. Como control negativo se usó el buffer de reacción, mientras que el control positivo se utilizó la SMD de *L. boneti*. Todas las gráficas se hicieron con el programa (GraphPad Prism) y los cálculos con el programa Excel (Microsoft office 2013). En este ensayo se define Unidad (U), como la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto.

Tabla 5. Componentes y proporciones de la mezcla de reacción.

Reactivos	Cantidad en 100 μL (proporción)
Agua destilada	60 μL (3/5)
Buffer Tris-HCl 5X	20 μL (1/5)
SM (5 mM)	10 μL (1/10)
ChOx (20 U/mL)	8 μL (1/12.5)
HRP (200 U/mL)	1 μL (1/100)
ADHP (10 mM)	1 μL (1/100)

5.2.10.3. Valoración de la dosis letal media en ratones.

La DL_{50} está definida como la cantidad de toxina que es capaz de matar a la mitad de una población. Para determinarla, se utilizaron grupos de cuatro ratones CD1 (18-20g) y se les administraron, por vía intraperitoneal, distintas cantidades de proteína SMDtick recombinante. Después de 72 horas post-inoculación se tomaron las lecturas de mortalidad. Las DL_{50} se calcularon de la gráfica sigmoïdal resultante de graficar el logaritmo de la dosis contra el porcentaje de mortalidad, mediante el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). El punto de inflexión (LD_{50}) se calculó ajustando los datos experimentales para cada muestra por regresión no-lineal de las curvas sigmoïdes.

5.2.10.4. Dermonecrosis en conejos.

La actividad dermonecrótica se evaluó en conejos y se determinó como la describió Furlanetto (Furlanetto et al., 1962). En el lomo de un conejo New Zeland White previamente rasurado, se le inyectó de manera subcutánea 100 µg de SMDtick recombinante. Como control negativo se usó PBS 1X, y como control positivo se usó 2 µg de rSMD de *L. boneti*. El área mínima necrótica se definió como el área de necrosis que cubra 1 cm². La necrosis de la piel se registró a las 72 horas post-inyección.

5.2.10.5. Inmunización de conejos.

Se inmunizó un conejo con la proteína recombinante SMDtick que se obtuvo en *E. coli*. El esquema de inmunización se muestra a continuación:

Tabla 6. Esquema de inmunización de la proteína recombinante SMDtick en conejos. CF=Completo de Freud. IF=Incompleto de Freud. Alum=Alúmina.

Inmunización	Dosis (µg)	Adyuvante
1	20	CF
2	40	IF
3	80	Alum
4	100	IF
5	200	Alum
6	300	IF
7	300	Alum
8	300	IF

Cada inmunización fue espaciada por 10 días. A la quinta inmunización se extrajo 1 mL de sangre, para monitorear títulos de anticuerpos por ELISA. A partir de esa inmunización hasta la octava se procedió de la misma manera. Diez días después de la octava

inmunización, los conejos se sangraron a blanco y se extrajo el suero crudo y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

5.2.10.6. Medición de títulos por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

La titulación de los anticuerpos del suero se llevó a cabo por ELISAS. La técnica se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. La interacción es detectada por un conjugado, compuesto de un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que genera una señal colorida (Roitt, 2001). Los títulos se definieron como el inverso de la dilución del suero hiperinmune del punto medio de la curva sigmoide generada al graficar el logaritmo de la dilución versus los valores de absorbancia.

Se sensibilizaron placas de 96 pozos para ELISA (NUNC™ Brand products) con $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ de SMDtick, el diluyente fue con 100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5. A cada pozo se colocaron $100\text{ }\mu\text{L}$ hasta la columna 11, en el carril 12 fue el control negativo. La placa se incubó toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. La placa se lavó tres veces con $200\text{ }\mu\text{L}$ de solución de lavado. Este proceso se repitió entre cada paso a lo largo de todo el protocolo. Posteriormente se colocaron $200\text{ }\mu\text{L}$ de la solución de bloqueo, durante dos horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se hicieron diluciones seriadas de los sueros, comenzando con 1:30 en buffer de reacción. En cada pozo se adicionaron $100\text{ }\mu\text{L}$ de la solución de reacción y se mezclaron con $50\text{ }\mu\text{L/pozo}$ de la dilución del suero en la columna 1, para proceder a las diluciones seriadas hasta la columna 10 dejando la 11 y 12 como controles. Se incubó por una hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después se incubó el segundo anticuerpo anti-conejo conjugado a la enzima peroxidasa diluido 1:1000 en buffer de reacción, colocando $100\text{ }\mu\text{L/pozo}$. Se incubó una hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La reacción se reveló con $100\text{ }\mu\text{L/pozo}$ de sustrato ABTS (Boehringer), incubándose por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, se detuvo con $20\text{ }\mu\text{L}$ de SDS 10% y se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (modelo BIO-RAD 550) a 405 nm . Para determinar los títulos de las lecturas obtenidas, las curvas sigmoideas se generaron con el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

6. Resultados y discusión.

6.1. Expresión de la Esfingomielinasa D en células de insecto.

A partir del año 1983, el sistema de células de insecto-baculovirus se ha convertido en uno de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes más versátiles y usados (Smith et al., 1983). Mediante el uso de este sistema se han expresado miles de proteínas recombinantes, entre las que se encuentran la proteína cinasa C y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Patel et al., 1988), así como las proteínas de cápside de rotavirus humano (Mena et al., 2006), entre otras.

El uso de este sistema de expresión tiene numerosas ventajas: no son patogénicos para plantas ni mamíferos (Ignoffo, 1975) y la manipulación de células de insecto no requiere cuidados especiales ya que no son transformadas por virus patogénicos o infecciosos y crecen fácilmente en cultivos en suspensión, facilitando así la producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes, ya que existen reportes de proteínas con rendimientos de hasta 1 g de proteína por 10^9 células infectadas (Gruenwald y Heitz, 1993).

Tomando en consideración lo antes mencionado, y que Alarcon y colaboradores (2009) reportaron la expresión de la esfingomielinasa D recombinante de *Ixodes scapularis* utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus, decidimos utilizar este mismo sistema para expresar la esfingomielinasa D recombinante de *Rhipicephalus microplus*.

Para la expresión de la proteína SMDtick, se empleó el sistema basado en la cotransfección de un ADN viral linealizado y un vector de transferencia conteniendo la secuencia de interés (Kitts y Possee, 1993). Este tipo de plataforma nos permite obtener una alta proporción de baculovirus recombinantes mediante recombinación homóloga.

6.1.1. Clonación de la cadena codificante de la Esfingomielinasa D de *R. microplus* en el vector pMelBacA.

El vector de transferencia que se utilizó fue el pMelBacA ya que tiene una secuencia que codifica para el péptido señal de la melitina, que permite secretar la proteína recombinante. La estrategia para subclonar la cadena codificante de la SMDtick en el vector pMelBac A, consistió en utilizar los oligonucleótidos *Bam* HI Fw y *Hind* III + H Rv; este último oligonucleótido agrega una secuencia que codifican para 6 histidinas, para la recuperación de la proteína recombinante por afinidad a níquel. En la Figura 12, se muestra el producto amplificado por PCR a partir del plásmido pCR2.1-TOPO-SMDtick.

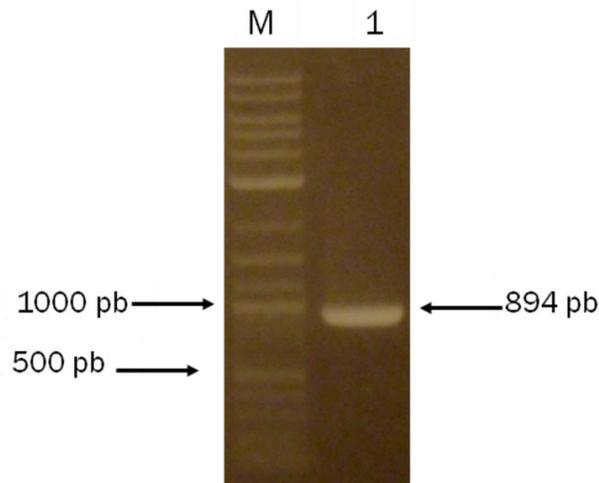


Figura 12. Gel de agarosa al 1%. Producto Amplificado por PCR con sitios de restricción *Bam* HI y *Hind* III. Pb= Pares de bases. M=Marcadores de peso molecular. 1= Producto que contiene el gen SMDtick + sitios de restricción + secuencia que codifica para etiqueta de Histidinas (894 pb).

El producto amplificado por PCR se clonó en el vector pCR2.1-TOPO como se menciona en Materiales y Métodos. De las clonas, se obtuvo plásmido y se digirió con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III, y de los que liberaron insertos de 894 pb; se mandaron a secuenciar para verificar si se agregaron correctamente los sitios de restricción y la secuencia que codifica para la etiqueta de histidinas, además de verificar que no existiera alguna modificación en el marco de lectura de la secuencia.

Una vez que se obtuvieron los resultados de la secuenciación, se prosiguió a purificar más plásmido de la clona que mostró una secuencia correcta. Posteriormente se liberó el fragmento de interés, y se clonó en el vector pMelBacA. Se secuenciaron los plásmidos de varias clonas que pudieran contener intacto el plásmido pMelBacA-SMDtick. A continuación se muestra el resultado de la secuenciación de uno de los plásmidos que se obtuvieron; el análisis de su secuencia permitió constatar que la secuencia SMDtick se encuentra en el marco de lectura correcto y en fase con el péptido señal de la melitina, por lo que, a nivel de secuencia, no existe ningún impedimento para una correcta expresión de la proteína recombinante.

```

ATG AAG TTC TGA CTT AAG GGT GGC CTT CTT CTT CTT ATC CTT CTA TAC ATT TCT TAC ATT
M K F L V N V A L V F M V V Y I S Y I
BamHI
GAT GCG GAT CGA TGG GGA TCC GCT TCC ACT GGG CTG CGT CCT TTC TAC GTG TTC GGT
Y A D R W G S A S T G L R P F Y V F G
CCC ATG GTG AAC AGT TTG GAA GAC GTG GAC AAC TTC ACG GGC CTT GGC GTG AAT GCT
P M V N S L E D V D N F T G L G V N A
ATA GAG GCT GAC CTA AAT TTT GCC TCA GAT GGA ACG CCA CAA ATG TTC TAT CAT GGA
I E A D L N F A S D G T P Q M F Y H G
TGG CCG TGT GGC TGC CAC CGC GAC TGC GAG AGG TCC GCG GGA GTG ATT ACC TAC CTC
W P C G C H R D C E R S A G V I T Y L
TCC TAT TTA AGA GAT GCC GTC AGT CAA AGT GGC AAG TTT GCT GGT AAG CTG CAG CTG
S Y L R D A V S Q S G K F A G K L Q L
CTT TAC GTC GAC ACC AAA ACT GGA AGC CTT TCT TCT GGC ACG AAA TAC CAG GCC GGC
L Y V D T K T G S L S S G T K Y Q A G
ATC AAC CTC GCC AAC AGC TTG ATC AAC ACT CTT TGG AAC AAT GGC ACA ATA CCA TCC
I N L A N S L I N T L W N N G T I P S
GAG AAC ATG CTG AAC GTC ATC CTG TCG GTG TCC TCT ACG CTG GAC AAG GAA ATC CTC
E N M L N V I L S V S S T L D K E I L
TCG GGA GCA TTC GAC ACA ATC AAG CGA GCC GGG AAT TCA TCA TTA TTT CTC GAC CGC
S G A F D T I K R A G N S S L F L D R
GTG GGT TTT GAC ATC AGT GGA TAC CAA TTG CTA AGT GTG ATC GCT GAT ATA TAC GAA
V G F D I S G Y Q L L S V I A D I Y E
GAG CTG GGT ATC CGG CAA CAT CGC TGG CAA GGT GAC GGC ACG AAT AAC TGC TTG ATT
E L G I R Q H R W Q G D G T N N C L I
GAC ATT TAC TCG GAT GTA CGT ACT AAA GCT GCG ATA TCA CGA CGA ACT GCG GCC AAC
D I Y S D V R T K A A I S R R T A A N
ACG ACG AAT GAT TAC GTG GAC GAG GTG TAC GTC TGG ACT GTC GAC AAT GCG TCG ACC
T T N D Y V D E V Y V W T V D N A S T
ATG CGT CGG TTC CTC AGG TTG AAG ATA GAT GGT ATG TTT ACG AAC CAG CCA GCA ACT
M R R F L R L K I D G M F T N Q P A T
CTT TCT GAG TGT CCT CCA AGA AAC AGA GTT CTC GAC GAT GTA CCA GCT TGC CCA CTG
L S E C P P R N R V L D D V P A C P L
HindIII
CGC AGG ATA GCG CAT GGA AAG CGT ATT GTT CAC CAC CAC CAC CAC TGA AAA GCT T
R R I A H G K R I V H H H H H H H •

```

Figura 13. Secuencia de SMDtick. En letras amarillas indica el péptido señal de la melitina. En letras negras los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III. En letras rojas indica la secuencia codificante de SMDtick. En letras azules la etiqueta de histidinas.

6.1.2. Generación y análisis de los baculovirus recombinantes.

El plásmido pMelBacA-SMDtick se utilizó para cotransfectar células de insecto Sf9, con el ADN viral linealizado Bac-N-Blue. Una vez que se realizó la cotransfección, fue necesario detectar los baculovirus recombinantes, mediante un ensayo en placa. Las células Sf9 fueron infectadas con los sobrenadantes de las cotransfecciones con las siguientes diluciones 10^{-1} y 10^{-2} . A partir de este experimento se aislaron 17 placas virales. Las células infectadas dieron de color azul debido a la hidrólisis del sustrato X-gal por la enzima β -galactosidasa, la cual se expresa en células infectadas por los baculovirus recombinantes; además poseen un diámetro mayor y superficie irregular, cuando se compara con las células no infectadas (Figura 14).

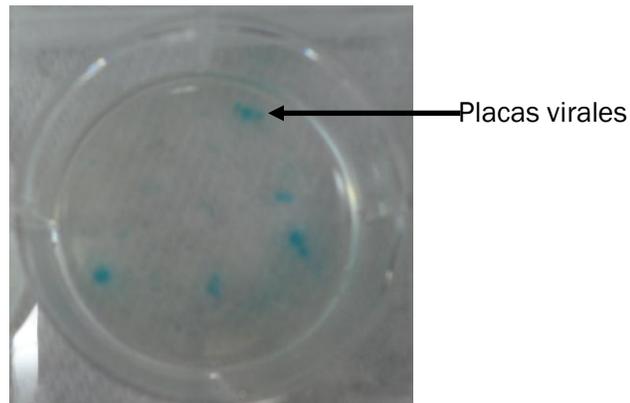


Figura 14. Resultado del ensayo en placa con la infección del sobrenadante de la cotransfección.

A las 17 placas virales se les realizó una amplificación (Pase 1), para poder elegir el virus sobreproductor de la SMDtick. Sin embargo, los resultados fueron negativos por Western blot, ya que no se encontró expresión de la SMDtick (ni en medio de cultivo, ni en células infectadas), por lo que se decidió realizar una segunda amplificación (Pase 2); nuevamente se realizó un Western blot, y pudo constatar que la infección con el baculovirus recombinante 17 mostró producción de la SMDtick. Se procedió a su titulación en un ensayo en placa con el resultado siguiente (Tabla7):

Tabla 7. Titulación del PASE 2 del baculovirus 17.

SN 2da Amplificación	Pfu/mL
Virus 17	7.6×10^6

Pfu (Unidad formadora de placa) = Número de partículas capaces de formar placas por unidad de volumen.

El título obtenido del Pase 2 del baculovirus 17, se encuentra muy cercano al rango esperado y reportado por otros grupos de trabajo ($>10^7$ pfu/mL) (Rodríguez, 2008). Para detectar la presencia de la cadena codificante de la Esfingomielinasa D de *R. microplus* en el genoma del baculovirus recombinante 17, se realizaron PCRs utilizando los oligonucleótidos FwdPolh y RevPolh, que hibridan en los extremos del gen de la poliedrina. Como control positivo se utilizaron los oligonucleótidos que hibridan en la secuencia codificante SMDtick (datos no mostrados). Como resultado de ambos PCRs, se pudo detectar que la placa viral 17 posee la secuencia de interés, ya que en el primer PCR, se observó una banda de 1200 pb (Figura 15), que corresponde a la secuencia SMDtick fusionada con el péptido señal de la melitina. Además este producto de PCR fue clonado en el vector de secuenciación pCR2.1-TOPO, y el análisis de su secuencia permitió constatar que la secuencia SMDtick se encuentra en el marco de lectura correcto en el genoma viral.

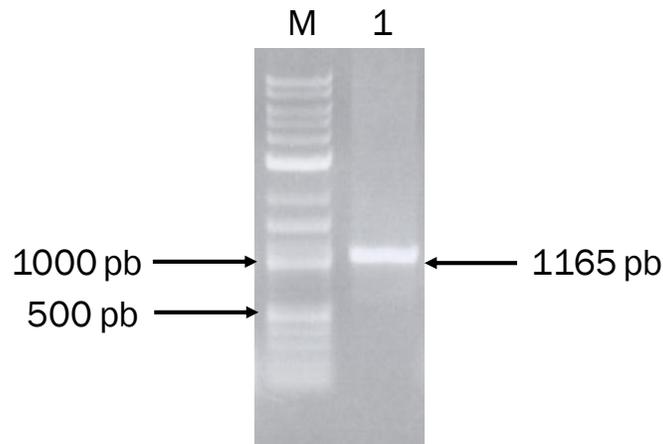


Figura 15. Gel de agarosa al 1%. Productos Amplificados por PCR a partir del DNA del baculovirus recombinante 17. Pb= Pares de bases. M=Marcadores de peso molecular. 1= Producto que corresponde el péptido señal de la melitina fusionado con SMDtick (cerca de 1200 pb).

Tomando en cuenta estos resultados, decidimos estudiar la expresión de la SMDtick a partir de la infección de células de insecto H5 con la placa viral 17.

6.1.3. Expresión de la SMDtick recombinante.

Para optimizar la expresión de la proteína recombinante utilizamos la línea celular H5, ya que se ha reportado que expresa veinte veces más proteína recombinante que las líneas celulares Sf9 o Sf21 (Davis et al., 1993; Rhiel et al., 1997). Otro de los parámetros que se tomó en cuenta fue las multiplicidades de infección (MOI), ya que la infección de los virus en un cultivo celular es un evento probabilístico que sigue la distribución de Poisson (Palomares, 1999). Además, las infecciones se realizaron en cultivos que se encontraban en fase exponencial de crecimiento, ya que se ha demostrado que cuando las células se infectan en esta fase, la producción de virus y de proteína recombinante es mayor (Kioukia et al., 1995, Philipps et al., 2005).

Se realizó un estudio de la expresión de la SMDtick; para ello sembramos 2 matraces con células de insecto H5 en medio de cultivo SF900-II y se infectaron con el PASE 2 del baculovirus recombinante 17, a una multiplicidad de infección de 0.1 y 1 virus por célula. Se tomaron alícuotas a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección y se les determinó la densidad y viabilidad celular (Figura 16). Se vio la expresión de SMDtick recombinante mediante Western Blot en los sobrenadantes centrifugados. Se utilizó como control positivo la SMDtick proveniente de cuerpos de inclusión expresados en *E. coli* y como control negativo sobrenadante de células H5 sin infectar.

Como se observa en ambas condiciones (Figura 17), a las 72 horas se alcanzó la máxima expresión de la SMDtick recombinante. Este resultado concuerda con lo reportado cuando se expresan proteínas recombinantes en células de insecto bajo el promotor de la poliedrina en los que la máxima expresión ocurre entre las 48-72 horas post-infección (O'Reilly et al., 1994).

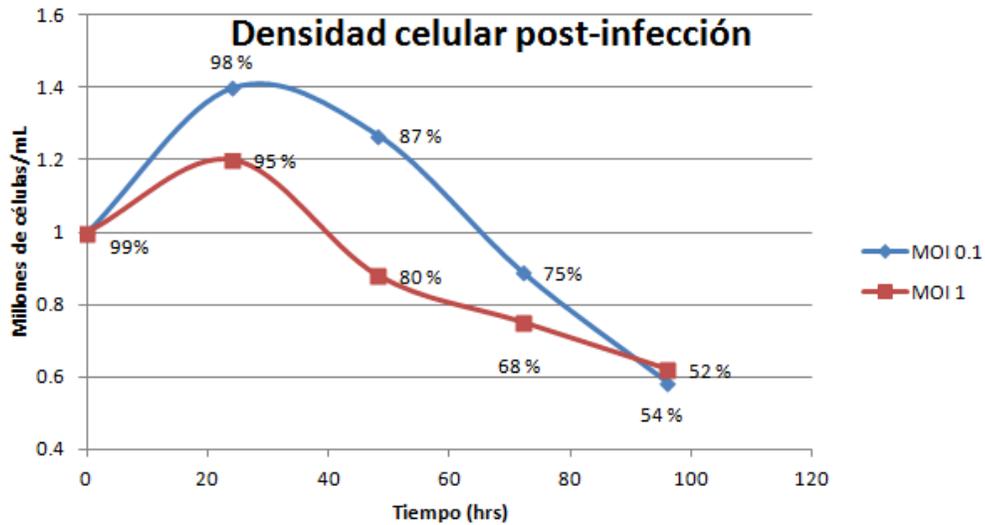


Figura 16. Representación de la densidad y viabilidad celular de los cultivos infectados. En azul se muestran las células de insecto H5 infectadas a una MOI de 0.1 y en rojo, las células infectadas a una MOI de 1. Los porcentajes representan la viabilidad de las células infectadas.

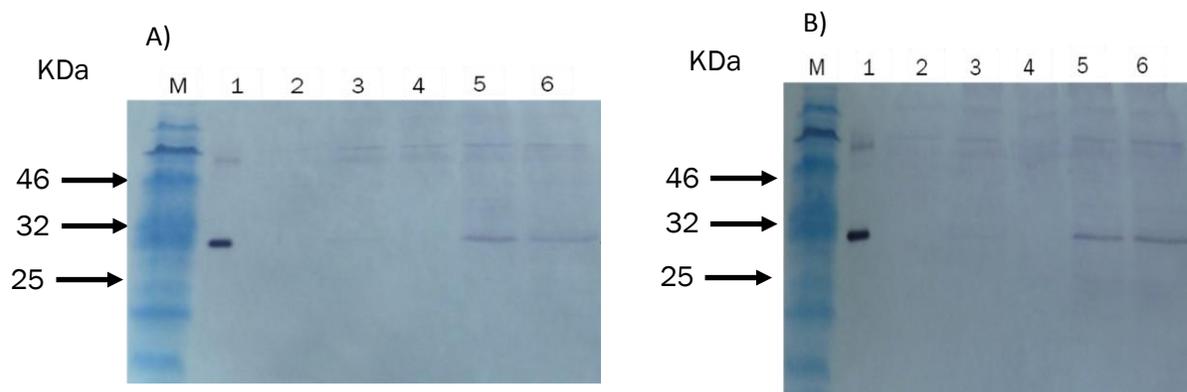


Figura 17. Western blot que muestra la cinética de expresión de SMDtick recombinante. A) Expresión de la SMDtick recombinante con una MOI de 1. B) Expresión de la SMDtick recombinante con una MOI de 0.1. M= Marcadores de peso molecular. 1= Control positivo SMDtick de cuerpos de inclusión bacterianos. 2= Sobrenadante de células no infectadas. 3= Sobrenadante de células infectadas a 24 h. 4= Sobrenadante de células infectadas a 48 h. 5= Sobrenadante de células infectadas a 72 h. 6= Sobrenadante de células infectadas a 96 h. Primer anticuerpo: policlonales de conejo anti-SMDtick (1:1000); segundo anticuerpo: anti-IgG de conejo de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (1:2000).

6.1.4. Purificación SMDtick recombinante.

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas para la expresión de la proteína SMDtick (células H5 a una densidad celular de 1×10^6 células/mL e infectarlas con la placa viral 17 a una la MOI de 0.1 pfu/célula), se procedió a su purificación.

Los sobrenadantes de cultivo, se colectaron 72 h postinfección. Un primer intento de purificación, consistió en pasar directamente el sobrenadante de cultivo a la columna de afinidad a níquel, sin embargo, los resultados fueron negativos, ya que la SMDtick no se unió al níquel (no se muestran los resultados). Una de las explicaciones de este comportamiento pudiera ser la estructura tridimensional de la proteína recombinante que oculte la etiqueta de histidinas que se encuentra en el carboxilo terminal. Otra de las explicaciones pudiera ser la posible competencia por la unión al níquel, por uno o varios componentes encontrados en el medio de cultivo. Se sabe que uno de los componentes fundamentales de medio de cultivo SF900-II SFM, el extracto de levadura, es una mezcla no definida de aminoácidos, péptidos, vitaminas, minerales y carbohidratos (Sommer, 1996). Esta mezcla pudiera interferir con la purificación de SMDtick. Por lo anterior, fue necesario dializar el sobrenadante de cultivo para eliminar las posibles interferencias antes de purificar por afinidad a níquel (Alarcon et al., 2009, Peguero 2014).

Para ello se dializó el sobrenadante de cultivo contra PBS 1X. Sin embargo, se presentó otro inconveniente: la proteína recombinante (SMDtick) se precipitaba al cambiar el buffer. Por tal motivo, nos dimos a la tarea de utilizar diferentes soluciones buffer para determinar en qué solución la SMDtick recombinante se mantenía soluble. El sobrenadante y el precipitado que se originó después de la diálisis fueron analizadas por ensayos de Western Blot (Figura 18). Como resultado de la diálisis, se determinó que la SMDtick recombinante se precipitaba sin importar la solución buffer que se utilizará.

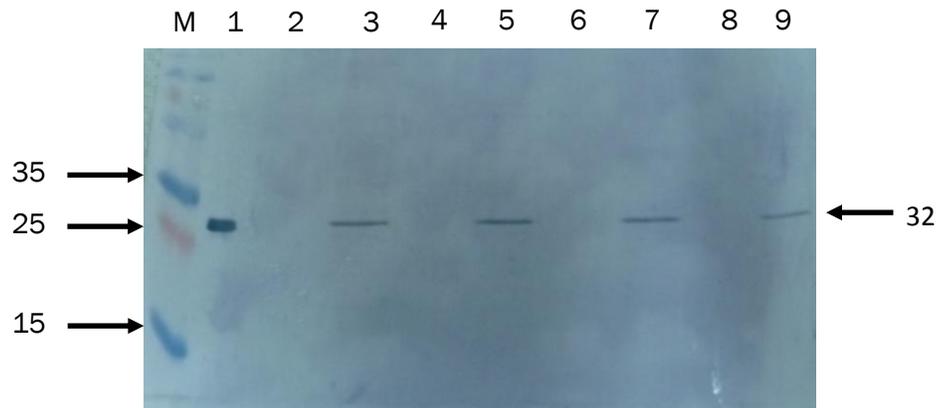


Figura 18. Precipitados después de la diálisis. M = Marcadores de peso molecular. 1= Control positivo SMDtick de cuerpos de inclusión. 2= Sobrenadante dializado con buffer PBS 1X pH 7.5. 3= Precipitado obtenido con PBS 1X pH 7.5. 4= Sobrenadante dializado con buffer 100 mM Tris-HCl con 200 mM NaCl pH 7.5. 5= Precipitado obtenido con buffer 100 mM Tris-HCl con 200 mM NaCl pH 7.5. 6= Sobrenadante dializado con buffer 100 mM fosfatos con 300 mM NaCl pH 8. 7= Precipitado obtenido con buffer 100 mM fosfatos con 300 mM NaCl pH 8. 8= Sobrenadante dializado con buffer PBS 1X pH 7.5 con 0.05% Tween-20. 9= Precipitado obtenido con buffer PBS 1X pH 7.5 con 0.05% Tween-20. Primer anticuerpo: policlonales de conejo anti-SMDtick (1:1000); segundo anticuerpo: anti-IgG de conejo de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (1:2000).

Los baculovirus son virus líticos, por tanto producen y liberan proteasas durante el proceso de infección. Las proteasas también pueden producirse por las células de insecto luego de la infección con los baculovirus como una respuesta al estrés celular y pueden liberarse al medio de cultivo luego de la lisis celular (Ikonomou et al., 2002). La proteólisis es un fenómeno que afecta la calidad de la proteína recombinante, por lo que decidimos adicionar un coctel de inhibidores de proteasas (Complete® de Roche) a los sobrenadantes de cultivo colectados. La SMDtick continuó precipitándose después de la diálisis.

En conclusión, pudimos expresar la esfingomielinasa D de garrapata en el sistema de baculovirus; su concentración en el sobrenadante del cultivo fue baja y no pudo purificarse pasándola por la columna de níquel. Cuando se dializa el sobrenadante se forma un precipitado que contiene a la proteína recombinante. Dado estos dos

problemas, decidimos continuar con la expresión de la enzima en *E. coli* que para ese momento teníamos mayor rendimiento.

6.2. Expresión de la Esfingomielinasa D en *E. coli*.

Escherichia coli fue el primer huésped utilizado para producir la primer proteína recombinante. A partir de ese momento se ha convertido en uno de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes más usado (Terpe 2006). Mediante el uso de este sistema se han expresado miles de proteínas recombinantes, entre las que se encuentran inmunoglobulinas, la hormona de crecimiento, citocromo P450 (Better et al., 1993, Becker and Hsiung, 1986, Kaderbhai et al., 2001), entre otras.

El uso de este sistema de expresión tiene ventajas como la facilidad de manipulación del ADN, por la variedad de vectores de clonación y cepas, el amplio conocimiento en la fisiología de la bacteria y porque permite alcanzar densidades celulares elevadas con medios de cultivo económicos, facilitando la producción de proteínas recombinantes (de Marco, 2009).

Tomando en consideración, lo mencionado y que en el laboratorio del Dr. Alagón (Olvera et al., 2006) reportaron la expresión de la esfingomielinasa D recombinante de varias especies de arañas del género *Loxosceles* utilizando el sistema de *E. coli*, se decidió utilizar este mismo sistema para expresar la esfingomielinasa D recombinante de *Rhipicephalus microplus*.

6.2.1. Clonación de la cadena codificante de la Esfingomielinasa D de *R. microplus* en el vector pQE30.

El vector de expresión que se utilizó fue el pQE30, ya que solamente agrega 12 aminoácidos extras a la proteína recombinante que corresponden a la etiqueta de 6 histidinas (en el extremo N-terminal), la metionina como inicio de la traducción, 3 residuos propios del vector y dos residuos que agrega los sitios de restricción. La estrategia para subclonar la cadena codificante de la SMDtick en el vector pQE30, consistió en utilizar los oligonucleótidos *Bam* HI Fw y *Hind* III Rv. En la Figura 19, se muestra el producto amplificado por PCR utilizando como templado el plásmido pCR2.1-TOPO-SMDtick.

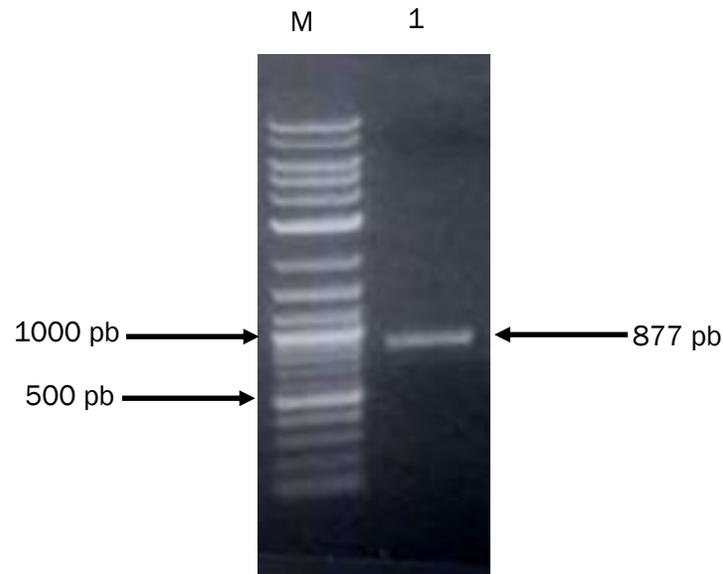


Figura 19. Gel de agarosa al 1%. Producto amplificado por PCR con sitios de restricción *Bam* HI y *Hind* III. Pb= Pares de bases. M=Marcadores de peso molecular. 1= Producto que contiene el gen SMDtick + sitios de restricción (877 pb).

El producto amplificado por PCR se clonó en el vector pCR2.1-TOPO. De las clonas se obtuvieron los plásmidos y digirieron con las enzimas *Bam* HI y *Hind* III. Los que liberaron el inserto del tamaño esperado (877 pb) se secuenciaron para verificar si se agregaron correctamente los sitios de restricción, además para comprobar que no existiera alguna modificación en el marco de lectura de la secuencia.

Se seleccionó una clona que mostró una secuencia correcta y se obtuvo más plásmido de la misma. Se liberó el fragmento de interés y clonó en el vector pQE30. De las clonas que se obtuvieron, se extrajo y se mandó a secuenciar el plásmido pQE30-SMDtick. A continuación se muestra el resultado de la secuenciación de uno de los plásmidos; el análisis de su secuencia permitió constatar que la secuencia SMDtick se encuentra en el marco de lectura correcto, por lo que, a nivel de secuencia, no existe ningún impedimento para una correcta expresión de la proteína recombinante en *E. coli*.

BamHI																					
CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	GGA	TCC	GCT	TCC	ACT	GGG	CTG	CGT	CCT	TTC	TAC	GTG	TTC	GGT	CCC	ATG
H	H	H	H	H	H	G	S	A	S	T	G	L	R	P	F	Y	V	F	G	P	M
GTG	AAC	AGT	TTG	GAA	GAC	GTG	GAC	AAC	TTC	ATG	GGC	CTT	GGC	GTG	AAT	GCT	ATA	GAG	GCT	GAC	CTC
V	N	S	L	E	D	V	D	N	F	M	G	L	G	V	N	A	I	E	A	D	L
AAT	TTT	GCC	TCA	GAT	GGA	ACG	CCA	CAA	AAG	TTC	TAT	CAT	GGA	TGG	CCG	TGT	GGC	TGC	CAC	CGC	GAC
N	F	A	S	D	G	T	P	Q	K	F	Y	H	G	W	P	C	G	C	H	R	D
TGC	GAA	AAG	TCC	GCG	GGG	GTG	ATT	ACC	TAC	CTC	TCC	TAT	TTA	AGA	GAT	GCC	GTC	AGT	CAA	AGT	GGC
C	E	K	S	A	G	V	I	T	Y	L	S	Y	L	R	D	A	V	S	Q	S	G
AAG	TTT	GCT	GGT	AAG	CTG	CAG	CTG	CTT	TAC	CTC	GAC	ACC	AAA	ACT	GGA	AGC	CTT	TCT	TCT	GGC	ACG
K	F	A	G	K	L	Q	L	L	Y	V	D	T	K	T	G	S	L	S	S	G	T
AAA	TAC	CAG	GCC	GGC	ATC	AAC	CTC	GCC	AAC	AGC	TTG	ATC	AAC	ACT	CTT	TGG	AAC	AAT	GGC	ACA	ATA
K	Y	Q	A	G	I	N	L	A	N	S	L	I	N	T	L	W	N	N	G	T	I
CCA	TCC	GAG	AAC	ATG	CTG	AAC	GTC	ATC	CTG	TCG	GTG	TCC	TCT	ACG	CTG	GAC	AAG	GAA	ATC	CTC	TCG
P	S	E	N	M	L	N	V	I	L	S	V	S	S	T	L	D	K	E	I	L	S
GGG	GCA	TTC	GAC	ACA	ATC	AAG	CGA	GCC	GGG	AAT	TCA	TCA	TTA	TTT	CTC	GAC	CAC	GTG	GGT	TTT	GAC
G	A	F	D	T	I	K	R	A	G	N	S	S	L	F	L	D	H	V	G	F	D
ATC	AGT	GGA	TAC	CAA	TTG	CTA	AGT	GTG	ATC	GCT	GAT	ATA	TAC	GAA	GAG	CTG	GGT	ATC	CGG	CAA	CAT
I	S	G	Y	Q	L	L	S	V	I	A	D	I	Y	E	E	L	G	I	R	Q	H
CGC	TGG	CAG	GGT	GAC	GGC	ACG	AAT	AAC	TGC	TTG	ATT	GAC	ATT	TAC	TCG	GAT	GTA	CGT	ACT	AAA	GCT
R	W	Q	G	D	G	T	N	N	C	L	I	D	I	Y	S	D	V	R	T	K	A
GCG	ATA	TCA	CGA	CGA	ACT	GCG	GCC	AAC	ACG	ACG	AAT	GAT	TAC	GTG	GAC	AAG	GTG	TAC	GTC	TGG	ACT
A	I	S	R	R	T	A	A	N	T	T	N	D	Y	V	D	K	V	Y	V	W	T
GTC	GAC	AAT	GCG	TCG	ACC	ATG	CGT	CGG	TTC	CTC	AGG	TTG	AAG	ATA	GAT	GGT	ATG	TTT	ACG	AAC	CAG
V	D	N	A	S	T	M	R	R	F	L	R	L	K	I	D	G	M	F	T	N	Q
CCA	GCA	ACT	CTT	CTG	AGT	GTC	CTC	CAA	GAA	ACA	GAG	TTC	TCG	ACG	ATG	TAC	CAG	CTT	GCC	ACT	GCG
P	A	T	L	L	S	V	L	Q	E	T	E	F	S	T	M	Y	Q	L	A	T	A
HindIII																					
CAG	GAT	AGC	GCA	TGG	AAG	CGT	ATT	GTT	TGA	AAG	CTT										
Q	D	S	A	W	K	R	I	V	•	K	L										

Figura 20. Resultado de la secuenciación del vector pQE30-SMDtick. En letras verdes indica etiqueta de histidinas. En letras negras el sitio de corte de las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III. En letras rojas indica la secuencia codificante de SMDtick.

6.2.2. Expresión de la SMDtick recombinante.

Luego de realizar la transformación del vector pQE30-SMDtick en células *E. coli* XL1BLUE, se escogieron colonias al azar y se indujeron para elegir la clona que expresará la proteína de interés (condiciones mencionadas en la sección de Materiales y Métodos). Se encontró que todas las clonas seleccionadas producían la proteína de interés, por lo que se decidió extraer plásmido super enrollado de la clona que presentó mayor producción de SMDtick y transformar células *E. coli* de la cepa Origami DE3 (cepa recomendada para la obtención de proteína soluble). Posteriormente se utilizaron los mismos criterios mencionados anteriormente, para detectar la clona sobreproductora de la proteína de interés. Se observó que la proteína recombinante se produce en esta cepa (Figura 21).

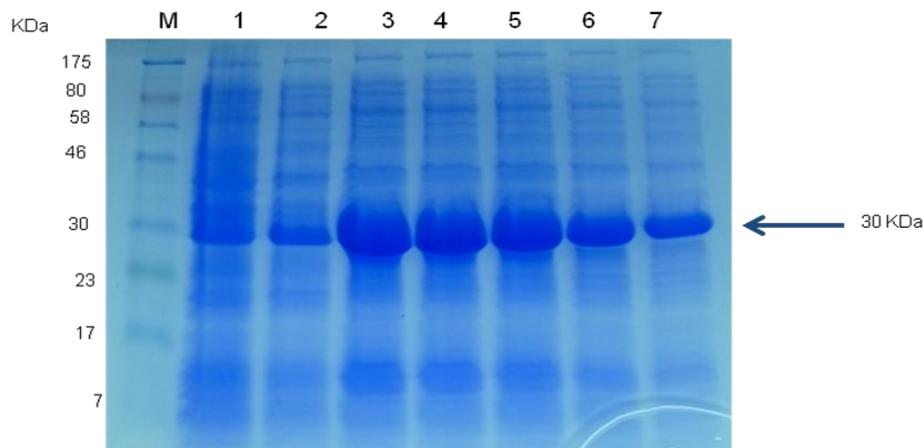


Figura 21. Gel SDS-PAGE al 12%. Análisis de expresión de la SMDtick de las clonas 1 a 7 de *E. coli* Origami. M= Marcador de peso molecular.

Se encontró que la SMDtick se localizaba en los cuerpos de inclusión. Se intentó producir SMDtick soluble, cambiando varios parámetros de temperatura, tiempo de inducción, concentración del inductor (Peter et al., 2005). Sin embargo, en todas las condiciones la proteína recombinante se encontró en los cuerpos de inclusión (resultados no mostrados). Por tal motivo, se decidió utilizar la metodología descrita por Peternel y colaboradores en el 2008, la cual consiste en expresar la proteína en células cultivadas a bajas temperaturas (16 °C) para favorecer el correcto plegamiento de las proteínas

recombinantes, a diferencia de lo que ocurre a temperaturas mayores. Los cuerpos de inclusión que se forman en esas condiciones contienen proteína recombinante bien plegada; la proteína se puede liberar tratando los cuerpos de inclusión con 0.2% del detergente N-Lauroylsarcosine.

Las condiciones para obtener SMDtick solubilizada a partir de los cuerpos de inclusión fueron las siguientes: inducción con 0.1 mM IPTG, a 16 °C durante 16 horas, partiendo de una OD₆₀₀ de 0.6 (Figura 22). El rendimiento de cuerpos de inclusión fue de 61 mg por litro de cultivo.

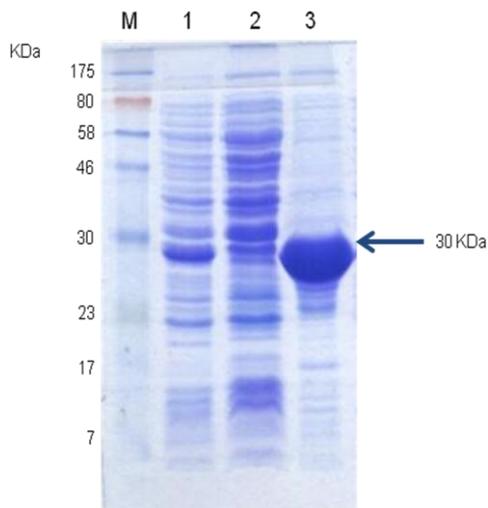


Figura 22. Gel SDS-PAGE al 12%. Expresión de la SMDtick en *E. coli* Origami. M= Marcador de peso molecular. 1= Expresión total. 2= Fracción soluble. 3= Cuerpos de inclusión.

6.2.3. Purificación de la SMDtick recombinante.

A fin de obtener la proteína recombinante en forma soluble, los cuerpos de inclusión fueron sometidos a tratamiento con 0.2% de N-Lauroylsarcosine como se menciona en Materiales y Métodos. Posteriormente se purificó la SMDtick mediante una columna de afinidad a níquel. La proteína recombinante se dializó y se cuantificó por el método del BCA con un rendimiento de 3.5 mg/L de cultivo. El análisis por un gel SDS-PAGE al 12% mostró que la proteína recombinante tenía un alto grado de pureza (Figura 23).

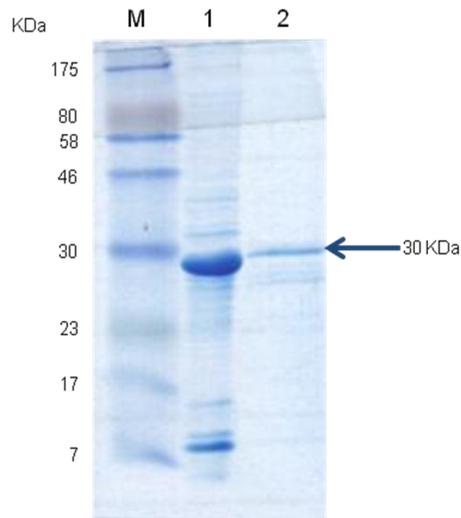
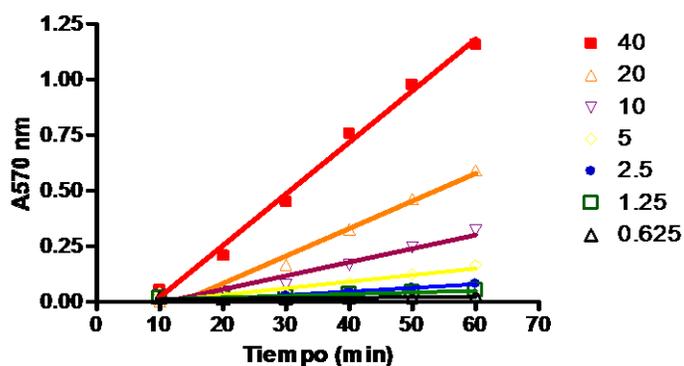


Figura 23. Gel SDS-PAGE al 12%. Purificación por afinidad a níquel de la SMDtick a partir de cuerpos de inclusión. M= Marcador de peso molecular. 1= Cuerpos de inclusión lavados. 2= SMDtick purificada.

6.2.4. Caracterización de la SMDtick recombinante.

6.2.4.1. Actividad enzimática.

A la proteína recombinante SMDtick se le determinó actividad enzimática mediante el método Amplex Red utilizando como sustrato la esfingomielina de huevo, como se describió en materiales y métodos. La SMDtick resultó ser activa (Figura 24).



ng/pozo	mg/pozo	ΔA_{570nm}	LP	M	moles/ensayo	U	U/mg
40	0.00004	0.02597	41634	6.23769E-07	1.24754E-10	0.000124754	3.12
20	0.00002	0.01453	41634	3.48994E-07	6.97987E-11	6.97987E-05	3.49
10	0.00001	0.008112	41634	1.94841E-07	3.89682E-11	3.89682E-05	3.90
5	0.000005	0.004741	41634	1.13873E-07	2.27747E-11	2.27747E-05	4.55
2.5	0.0000025	0.00186	41634	4.4675E-08	8.93501E-12	8.93501E-06	3.57
1.25	0.00000125	0.0008949	41634	2.14945E-08	4.29889E-12	4.29889E-06	3.44
0.625	0.000000625	0.0004179	41634	1.00375E-08	2.00749E-12	2.00749E-06	3.21
							3.69

Figura 24. Ensayo de actividad enzimática de la SMD de *R. microplus* utilizando el método Amplex-Red. Iniciando con 40 ng de SMDtick purificada. Se incubó a 37 °C, y se midió absorbancia a 570 nm cada diez minutos por una hora.

La actividad específica de SMDtick es mucho menor comparada con las actividades específicas reportadas (Olvera et al, 2006) para las SMAs D de *Loxosceles* (Tabla 8).

Tabla 8. Actividades específicas de las SMAs D recombinantes de *Loxosceles* y *R. microplus*.

Proteína	Actividad específica (U/mg)
Lb1C	20.0
Lr1N	18.3
LI1N	56.8
LI2C	228.2
SMDtick	3.69

La menor actividad de la SMDtick contra la esfingomielina de huevo utilizada en el método de Amplex Red convencional pudiera estar sesgada. Para explotar dicha posibilidad, se probaron otras esfingomielinas como sustratos (entre paréntesis se indica el componente acílico mayoritario y el grado de saturación del mismo): con palmitoilo (16:0), de eritrocitos (tamaños largos con saturación variable) y con hexanoil (6:0). En la

Figura 25 se puede apreciar que sólo con la esfingomielina 6:0 la SMDtick mostró una mayor actividad, pero también fue el caso para la SMD recombinante de *L. boneti* que se usó como control. Los experimentos se realizaron por triplicado.

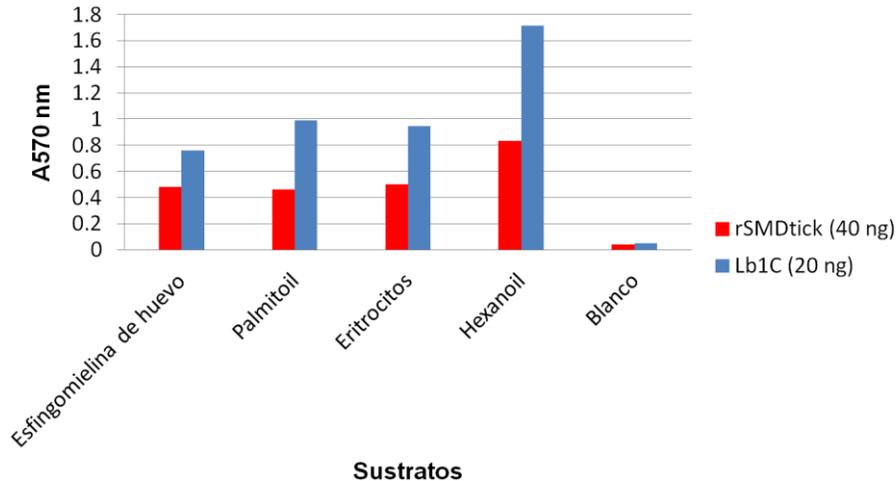


Figura 25. Actividad de SMD recombinante de *R. microplus* sobre diferentes esfingomielinas utilizando el método Amplex-Red. Se utilizaron 40 ng de SMDtick, y 20 ng de la SMD de *L. boneti*. Se incubó a 37 °C, y se midió absorbancia a 570 nm a los 30 minutos.

6.2.4.2. Pruebas toxicológicas en animales.

La SMDtick recombinante no fue tóxica a ratones, inclusive con 166 µg/ratón (Tabla 9). La prueba de dermonecrosis en conejos también mostró que la SMDtick no produjo necrosis en la piel del conejo, a pesar de que se inyectó 50 veces más a comparación del control positivo (rSMD de *L. boneti*). Sin embargo, causó más inflamación local en comparación del control negativo (PBS) (Figura 26).

Tabla 9. Dosis letal media (DL₅₀) de las SMasas D recombinantes de *Loxosceles* y *R. microplus*.

Proteína	DL ₅₀ (µg/ratón)
Lb1C	4.0
Lr1N	3.5
LI1N	11.3
LI2C	2.37
SMDtick	166 (No letal)

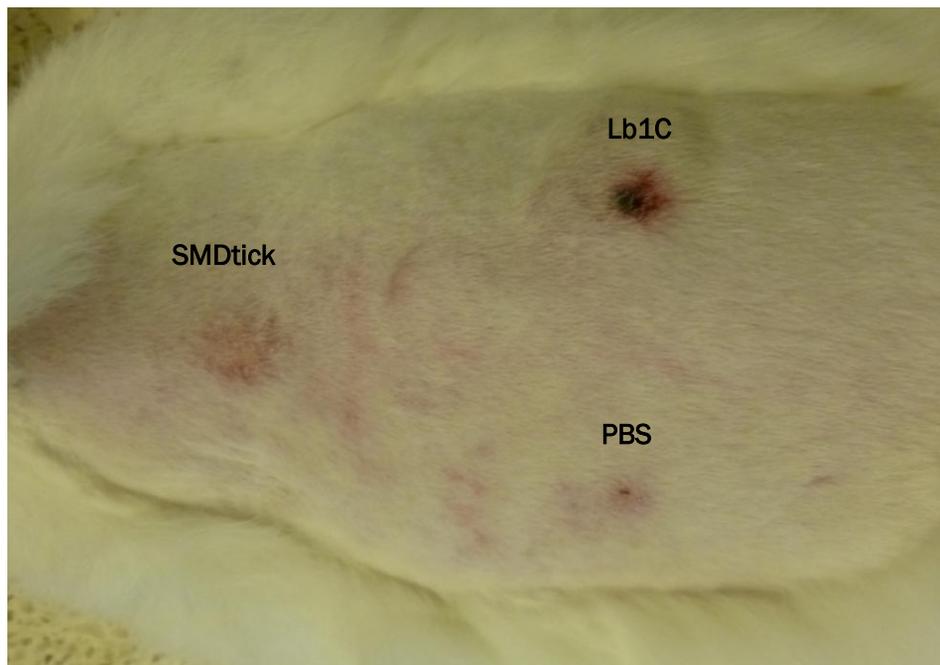


Figura 26. Fotografía que muestra los efectos en piel de conejo *New Zealand White*. Las dosis administradas fueron 100 µg de SMDtick, 2 µg de Lb1C y como control negativo PBS. La fotografía fue tomada 72 horas post-inyección.

No tenemos explicación alguna sobre la falta de toxicidad de la SMDtick. Pareciera que la actividad enzimática no es suficiente para causarla como se había concluido para la SMD de la araña *Loxosceles*. Es muy posible que la SMDtick tenga otro sustrato como blanco en el organismo, aún no identificado lo que ocasiona la inflamación.

6.2.4.3. Producción de anticuerpos en conejos.

Se inmunizaron dos conejos, uno con proteína soluble y el otro con cuerpos de inclusión de SMDtick, siguiendo el esquema de inmunización descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los títulos de anticuerpos, contra la proteína soluble absorbida a la placa de ELISA fueron de 15,960 cuando se usó la forma soluble como inmunógeno y de 4782 cuando se usaron los cuerpos de inclusión (Figura 27).

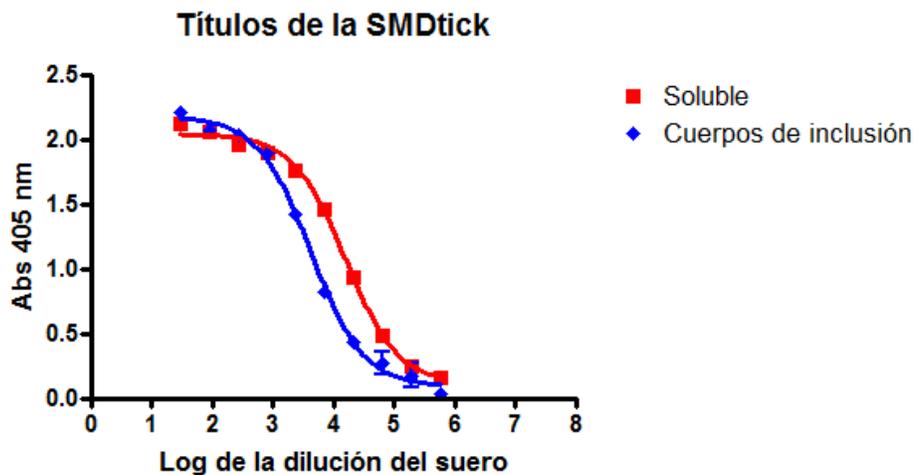


Figura 27. Reconocimiento de SMDtick soluble mediante los sueros hiperinmunes (anti-SMDtick soluble y anti-SMDtick cuerpos de inclusión).

6.2.4.4. Inhibición de la actividad enzimática de la SMDtick con suero hiperinmune de conejo.

Exploramos la capacidad de los anticuerpos producidos para inhibir la actividad enzimática de la SMDtick soluble. Para esto se incubaron, a 30 minutos y 37 °C, 200 μg de inmunoglobulinas anti-SMDtick purificadas de los sueros producidos con SMD soluble y cuerpos de inclusión (método de precipitación con ácido caprílico), contra la proteína recombinante soluble (1 μg) y se midió la actividad enzimática. Como control se usó SMDtick sin inmunoglobulinas (Figura 28).

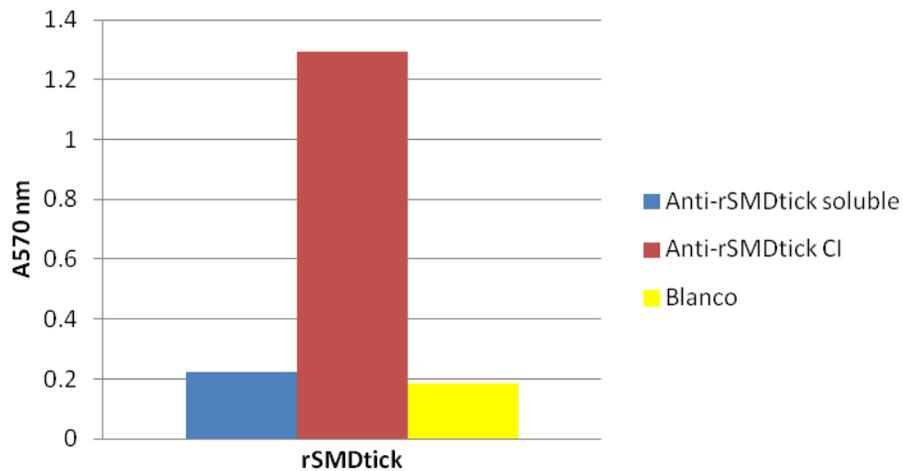


Figura 28. Inhibición de la actividad enzimática de rSMDtick soluble por inmunoglobulinas anti-SMDtick soluble y cuerpos de inclusión (CI).

Los resultados indican que utilizando la SMDtick soluble es mejor inmunógeno, ya que se encuentran anticuerpos neutralizantes, caso contrario cuando se utilizaron los cuerpos de inclusión como inmunógeno. Y esto se podría explicar porque los cuerpos de inclusión son aglomerados de proteína recombinante (mezcla de proteína bien plegada y otra que no lo está), lo que indica que los anticuerpos están dirigidos a epítopes que se forman de esa aglomeración, lo que impide que se generen anticuerpos que bloqueen el sitio activo de la proteína recombinante, caso contrario, al usar la SMDtick soluble, ya que sí se generaron anticuerpos neutralizantes.

6.2.4.5. Determinación de reacciones cruzadas.

Para determinar si el suero hiperinmune generado a partir de la SMDtick soluble, podía reconocer a la SMD de *L. boneti*, se realizaron pruebas de Western blot (Figura 29a). El resultado de este experimento indicó que el suero policlonal es capaz de reconocer la SMD de *L. boneti* pero utilizando 3.7 μg de la proteína heteróloga. Utilizando un anticuerpo monoclonal anti-SMD de *L. boneti* se encontró un reconocimiento muy bajo contra la SMDtick soluble (Figura 29b), ya que se necesitó una alta concentración de SMDtick soluble (3.8 μg) para que el anticuerpo monoclonal la revelara de manera muy

tenue. Es importante mencionar que el anticuerpo monoclonal 5C10 inhibe la actividad enzimática de la SMD de *Loxosceles*. Por lo que se puede concluir que el sitio activo de la SMDtick es, inmunológicamente hablando, diferente al de la SMD de la araña.

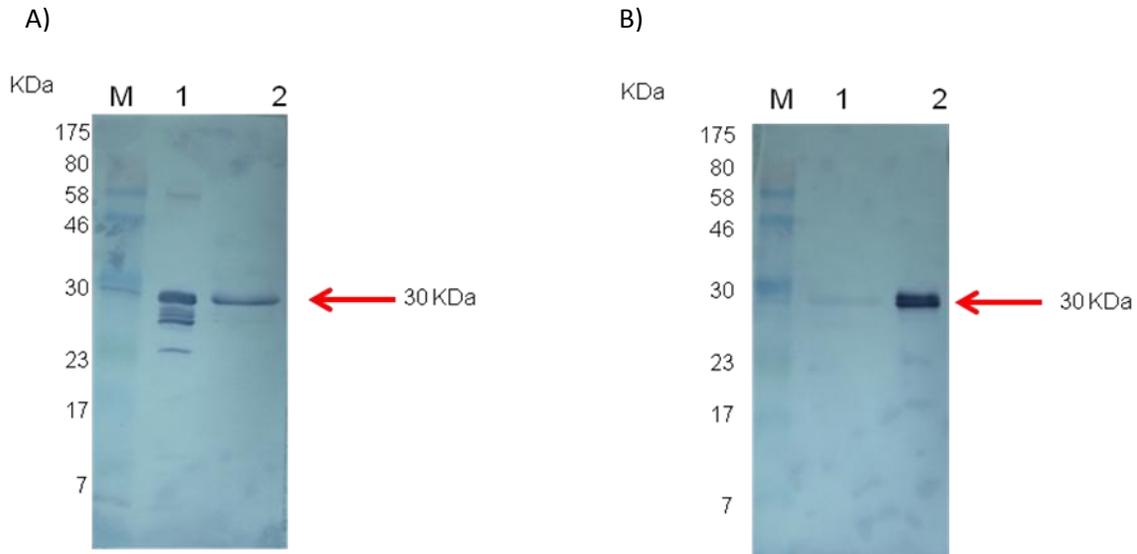


Figura 29. Western blot para determinar reactividad cruzada entre SMDs de garrapata y araña *Loxosceles*. A) Reacción cruzada de los anticuerpos generados a partir de la SMDtick. M= Marcador de peso molecular. 1= SMDtick soluble (500 ng). 2= SMD de *L. boneti* (3.7 µg). Primer anticuerpo: Policlonales anti-SMDtick soluble (10 µg). Segundo anticuerpo (1 mg/mL): anti conejo de ratón 1:2,000 acoplado a fosfatasa alcalina. B) Reacción cruzada del anticuerpo monoclonal 5C10 anti-SMD de *L. boneti*. M= Marcador de peso molecular. 1= SMDtick soluble (3.8 µg). 2= SMD de *L. boneti* (500 ng). Primer anticuerpo: Monoclonal 5C10 anti-SMD *L. boneti* (10 µg). Segundo anticuerpo (1 mg/mL): anti ratón de cabra 1:2,000 acoplado a fosfatasa alcalina.

En este trabajo no sólo generamos una proteína recombinante activa, sino también un buen inmunógeno para generar anticuerpos neutralizantes. Por otra parte, la proteína recombinante podrá ser utilizada para inmunizar bovinos y determinar si la SMDtick juega un papel importante en el ciclo de vida de estos ectoparásitos. Por último, damos un paso importante en la comprensión de la función biológica de la Esfingomielinasa D de *R. microplus*.

7. Conclusiones.

Con el sistema de expresión células de insecto-baculovirus se puede concluir lo siguiente: Se expresó por primera vez la SMD de *R. microplus* ($\approx 50 \mu\text{g/L}$) en un sistema eucariota, sin embargo, en el proceso de purificación la SMDtick se precipitaba sin importar los aditivos que se utilizara.

Con el sistema de expresión en *E. coli*; se expresó la SMDtick. Se determinó que a temperaturas bajas ($16 \text{ }^\circ\text{C}$) se puede obtener la SMDtick soluble (3.5 mg/L) y con actividad enzimática a partir de los cuerpos de inclusión, utilizando un detergente N-Lauroylsarcosine. La SMDtick, tiene actividad enzimática sobre varias esfingomielinas, pero con menor actividad específica a comparación de la SMD de *L. boneti*. En cuanto a los estudios biológicos se pudo concluir que la SMDtick no tiene efectos tóxicos sobre ratones, ni efectos dermonecróticos sobre conejos, pero mostrando una inflamación en el sitio de inoculación (conejos). Además, se determinó que la SMDtick soluble es un buen inmunógeno, ya que el suero generado en conejos, inhibe la actividad enzimática de la proteína recombinante.

8. Perspectivas.

Iniciar un estudio piloto de inmunización en bovinos con la SMDtick recombinante y comprobar si los anticuerpos producidos son capaces de detener el ciclo biológico de *R. microplus*.

Determinar la estructura tridimensional de la SMDtick mediante cristalografía; para establecer modelos de interacción con el sustrato así como los cofactores.

Bibliografía

Alarcon C. F. J., Boppana V. D., Hagymasi A. T., Adler A. J., Wikel S. K. A novel sphingomyelinase-like enzyme in *Ixodes scapularis* tick saliva drives host CD4 T cells to express IL-4. *Parasite Immunol.* 2009; Vol. 31:4 p. 210-219.

Anderson J., Magnarelli L. Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America.* Vol. 22. 2008; p. 195-215.

Becker G. W., Hsiung H. M. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli* Purification and characterization. *FEBS Lett.* 1986; Vol. 204: p. 145–150.

Betancourt A., Patino F., Torres O., Eugenio B. Prueba de establo para evaluar la efectividad de la vacuna Tick-Vac Mk® contra la garrapata *Boophilus microplus*. *ACOVEZ.* 2005; Vol. 34:3, p. 18-25.

Better M., Bernhard S. L., Lei S.P., Fishwild D. M., Lane J. A., Carroll S. F. Potent anti-CD5 ricin A chain immunoconjugates from bacterially produced FabV and F(abV)₂. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; Vol. 90: p. 457–461.

Das S., Banerjee G., DePonte K., Marcantonio N., Kantor F.S., Fikrig E. Salp25D, an ixodes scapularis antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *The Journal of Infectious Diseases.* 2001; Vol. 184 p. 1056–1064.

Davis T. R., Wickham T. J., McKenna K. A., Granados R. R., Shuler M. L., Wood H. A. Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993; p. 388-390.

de la Fuente J, Kocan K. M. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev Vaccines.* 2003; p. 83–93.

de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2009; Vol. 14: p. 8-26.

Estrada P. A., Bouattour A., Camicas J. L., Guglielmone A., Horak I., Jongejan F., Latif A., Pegram R., Walker A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp Appl Acarol.* 2006; Vol. 38 p. 219-235.

Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. *Insect Viruses-Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia New York. 1995; Chapter 18. p. 535-544.

Francischetti I. M. B., Valenzuela J. G., Andersen J. F., Mather T. N., and Ribeiro J. M. C. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/Tissue factor complex. *Hemost.Thromb.Vasc.* 2002; Vol. 99 p. 3602-3612.

Furlanetto R. S., Bucherl W., Rosa R. R., Saliba F., Navas J. Observacao dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliacao de sua atividade. *Ciencia e Cultura.* 1962; vol. 14: p. 254.

George J., Pound J., Davey R. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of this parasites to acaricides. *Parasitol.* 2004; Vol. 129 p. 353-366.

Gruenwald S., Heitz J. *Baculovirus expression vector system: Procedures and methods manual*. Second edition. Pharmingen. San Diego, California. 1993.

Guglielmone A., Estrada P. A., Keirans J., Robbins R. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. Special publication of the International Consortium on Ticks and Tick Borne Diseases. 2003; p. 173.

Hannier S., Liversidge J., Sternberg J. M., Bowman A. S. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdoferi* transmission. *Immunology* 2004; Vol. 113 p. 401–408.

Hendrix C. Diagnóstico parasitológico veterinario. Segunda edición. Mosby. Madrid, España. 1999; p. 226-233.

Hickman R. Zoología General. Editorial Interamericana, México. 1991; p. 352-369.

Ignoffo C. M. Baculoviruses for insect pest control: safety considerations. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1975; p. 52.

Ikonomou L., Peeters-Joris C., Schneider Y. J., Agathos S. N. Supernatant proteolytic activities of High-five insect cells grown in serum-free culture. *Biotechnol Lett.* 2002; Vol. 24: p. 965–969.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA]. Garrapata Común de los Bovinos. Anuario 2003; p. 132-136.

Jaworski D. C., Jasinskas A., Metz C. N., Bucala R., and Barbour A. G. Identification and characterization of a homologue of the pro inflammatory cytokine, macrophage migration inhibitory factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *InsectMol.Biol.* 2001; Vol. 10 p. 323–331.

Kaderbhai M. A., Ugochukwu C. C., Kelly S. L., Lamb D. C. Export of cytochrome P450 105D1 to the periplasmic space of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2001; Vol. 67: p. 2136–2138.

Kioukia N., Nienow A. W., Emery A. N., Al-Rubeai M. Physiological and environmental factors affecting the growth of insect cells and infection with baculovirus. *J. Biotechnol.* 1995; Vol. 38 p. 243-253

Kitts P. A., Possee R. D. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques*. 1993; Vol. 14 p. 810-817.

Kurpiewski G., Forrester L. J., Barrett J. T., Campbell B. J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusae*. *Biochim. Biophys. Acta* 678:3. 1981; p. 467-476.

Labuda M., Trimnell A. R., Lickova M., Kazimirova M., Davies G. M., Lissina O., Hails R. S., Nuttall P. A. An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog.* 2006; p. 251-259.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227. 1970; p. 680-685.

López G. Control de garrapatas. Instituto Colombiano Agropecuario Regional número 4. Compendio número 39. Antioquia, Colombia. 1980; p. 33-41.

Márquez J. F. J., Hidalgo P. A., Contreras C. F., Rodríguez L. J. J., Muniain E. M. A. "Las garrapatas (Ararina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2005; Vol.23-2 p. 94-102.

Mathews C., Holde K. *Bioquímica segunda edición*, Editorial Mc-GrawHill Interamericana, España. 1998. p. 1238.

Mena J. A., Ramírez O. T., Palomares L. A. Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol.* 2006; Vol. 122: p. 443-452.

Olvera A. R., Ramos B. C., Estévez J., Clement H., de Roodt A., Paniagua J. S., Vázquez H., Zavaleta A., Salas M. A., Pablo R. S., Alagón A. C. North and South American *Loxosceles*

spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon*. 2006; Vol. 48: p. 64-74.

O'Reilly D. R., Miller L. K., Luckow V. A. *Baculovirus expression vectors. A laboratory manual*. New York. Oxford University Press. 1994.

Palomares L. A. Estudio del proceso de producción y ensamblaje de proteínas multiméricas a través del sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de Dr. en Ciencias, UNAM. 1999.

Parra M., Segura F., Arcos J., Londoño J., Díaz E., Vanegas M. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. *Corpoica Regional número 6*. Tolima, Colombia. 1999; p. 10-18.

Patel G., Greenfield C., Stabel S., Waterfield M. D., Parker P. J., Jones N. C. The overproduction of biologically active E1a, EGF receptor, and protein kinase C proteins in the baculovirus expression system. *Curr Comm Mol Biol: Viral Vectors*. 1988. p 98-103.

Peguero E. S. Fusión de la proteína VP7 con una oligohistidina, su expresión en el sistema de células de insecto baculovirus y su purificación mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Tesis de M. en Ciencias, UNAM. 2014.

Peter H. S., Kusk K. M. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*. 2005; Vol. 4: p.

Philipps B., Rotmann D., Wicki M., Mayr L. M., Forstner M. Time reduction and process optimization of the baculovirus expression system for more efficient recombinant protein production in insect cells. *Protein Expres. Purif.* 2005; Vol. 42: p. 211-218.

Pratt H., Litting K. Garrapatas que afectan la salud pública y como combatirlas. Centro Regional de ayuda técnica. México. 1972; p. 1-15.

Quiroz H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Edit. Uthea, Noriega editores, México. 1996; p. 757-802.

Ramstedt B., Leppimaki P., Axberg M., Slotte J.P. Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high performance thin layer chromatography. European Journal of Biochemistry. 1999; Vol. 266: p. 997-1002.

Rhiel M., Mitchell-Logean C. M., Murhammer D. W. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. John Wiley and Sons Inc. 1997.

Ribeiro J. M. C., Makoul G.T., Robinson D. R., Spielman A. Antithrombotic, anti-inflammatory and immuno-suppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. J. Exp.Med. 1985; Vol. 161 p. 332-344.

Ribeiro J. M. C., Mather T. N. *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. Experimental Parasitology. 1998; Vol. 89 p. 213-221.

Rodríguez M. Respuesta inmunológica contra garrapatas. Biotecnología aplicada. 2000; Vol. 17 p. 215-220.

Rodríguez G. M. Expresión de α -latrotoxina recombinante activa de *Latrodectus mactans* utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de M. en Ciencias, UNAM. 2008.

Rodríguez-Vivas R., Rosado A., Basto G., Sotero Z., Rosario R., Fragoso H. Manual Técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Publicación Técnica No. 4 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. 2006.

Roitt, I., Brostoff J., Male D. Inmunología. Harcourt. 2001. p. 423.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 54:63-7.

Sauer J. R., Essenberg R. C., Bowman A. S. Salivary glands of Ixodid ticks: mechanisms of secretion. J. Insect Physiol. 2000; Vol.46: p. 1069-1078.

Smith P., Krohn R., Hermanson G., Garter F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B., Klenk D. Measurement of protein using Bincinchonnic Acid. Analytical Biochemical 1985; Vol. 150: p. 76-85.

Smith G. E., Summers M. D., Fraser M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol Cell Biol 1983; Vol. 3: p. 2156-2165.

Sommer R. Yeast extracts: production, properties and components. In: 9th International Symposium on Yeasts, Sydney, August 1996.

Soulsby E. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. México: Interamericana. Vol. 7,823. 1988.

Suárez P. M., Méndez M. L., Valdez M., de Moura S. R., dos Reis C. A. J., Constanza V. N., Ascanio E. E. Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería Cubana y en regiones de Latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac dentro de un programa de lucha integral. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe, RedEctopar. 2007; Sexta Conferencia Electrónica.

Tanaka A. S., Andreotti R., Gomes A., Torquato R. J. S., Sampaio M. U., Sampaio C. A. M. A Double-Headed serine protease inhibitor—human plasma kallikrein and elastase Inhibitor—from *Boophilus microplus* larvae. Immunopharmacology. 1999; Vol. 45 p. 171–177.

Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006; Vol. 72: p. 211-222.

The Center for Food Security and Public Health [CFSPH]. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [online]. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus_microplus.pdf. 2007.

Urquhart G., Amour J., Duncan J., Dunna Jennings F. *Parasitología veterinaria*. Acribia S.A. Zaragoza, España. 2001; p. 206-215.

Apéndice A

Buffer TAE 50X

Trizma base (2 M)	242 g
Na ₂ EDTA (50 mM)	18.6 g
Bromuro de etidio (25mg/mL)	2.5 mL (10 mg/mL)
Ácido acético glacial para ajustar a pH 7	
Aforar a 1 L con agua desionizada	

SDS-PAGE (geles de poliacrilamida al 15%)

Solución de acrilamida: (30% de acrilamida + 0.8 bis-acrilamida). Disolver 50 g de acrilamida y 1.2 g bis-acrilamida en un volumen final de 165 mL de agua desionizada.

Solución espaciadora: (1.5 M tris + 0.4 % SDS). Disolver 18.17 g de tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de 20% SDS. Ajustar a pH 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.

Solución concentradora: (0.5 M tris + 0.4% SDS). Disolver 6 g de tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de 20% SDS. Ajustar a pH 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.

Solución de corrida: (0.25 M tris + 0.19 M glicina + 0.1% SDS). Para una solución 10X, disolver 15.2 g de tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada y adicionar 25 mL de 20% SDS. Ajustar a pH 8.6 con 10 M NaOH. Aforar a 500 mL.

Buffer 2X de la muestra: (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM tris-HCl, pH 6.8 + 5% de 2-mercaptoetanol + 0.002% azul de bromofenol). En un tubo de 15 mL mezclar los siguientes volúmenes: 1 mL de glicerol, 1.25 mL de 20% SDS, 0.5 mL de 1 M tris-HCl pH 6.8, 0.5 mL de 2-mercaptoetanol, 0.2 mL de 1% azul de bromofenol. Aforar a 10 mL con agua desionizada.

10% persulfato de amonio: Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua desionizada.

Solución de tinción con azul brillante de Coomasie: (50% metanol + 10% ácido acético + 0.2% azul de Coomasie R250). Disolver 1 g de azul de Coomasie R250 en 250 mL de etanol, 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con agua desionizada.

Solución de destinción: (10% metanol + 10% ácido acético). Mezclar 400 mL de agua desionizada + 50 mL de metanol + 50 mL de ácido acético.

Para la preparación de geles de poliacrilamida es necesario un gel separador y un gel concentrador, a continuación se muestra la composición de cada uno:

Gel separador al 15 %

Solución separadora	1.5 mL
Solución de acrilamida	3 mL
Agua desionizada	1.5 mL
TEMED	5 µL
Persulfato de amonio al 10%	20 µL

Gel concentrador al 4%

Solución concentradora	630 µL
Solución de acrilamida	330 µL
Agua desionizada	1.54 mL
TEMED	2.5 µL
Persulfato de amonio al 10%	12.5 µL

Medio SOC

Triptona o peptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	0.58 g

Disolver en agua destilada y adicionar 10 mL de cloruro de potasio 250 mM (1.86 g de KCl en 100 mL de agua) ajustar el pH a 7 con hidróxido de sodio 5 N. Aforar a 1 L con agua desionizada. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos.

Agregar 10 mL de cloruro de magnesio 1 M (8 g de $MgCl_2$ en 90 mL de agua) y 10 mL de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 1 M estéril. Posteriormente agregar 20 mM de glucosa filtrada con membranas de 0.22 micras.

Medio LB

A 950 mL de agua destilada, adicionar:

Extracto de levadura	5 g
Bacto triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g

Mezclar. Ajustar el pH a 7 con 5 N de hidróxido de sodio, aforar a 1 L con agua desionizada. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos.

PBS 10X

En 800 mL de agua destilada, disolver:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na_2HPO_4	14.4 g
KH_2PO_4	2.4 g

Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 10 N. Aforar a 1 L con agua desionizada. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos.

Loading buffer 10x

0.25% Azul de bromofenol	250 mg
0.25% Xilen CíaoI FF	250 mg
30% Glicerol	28 mL
TAE 50X	2 mL

Aforar con 70 mL de agua.

Western-blotTBST 10X

Tris-HCl 1 M pH 7.5	50 mL
NaCl 5 M	150 mL
Tween 20	2.5 mL
Aforar a 500 mL.	

Cloruro de sodio 5 M

NaCl	146.1 g
Aforar a 500 mL con agua.	

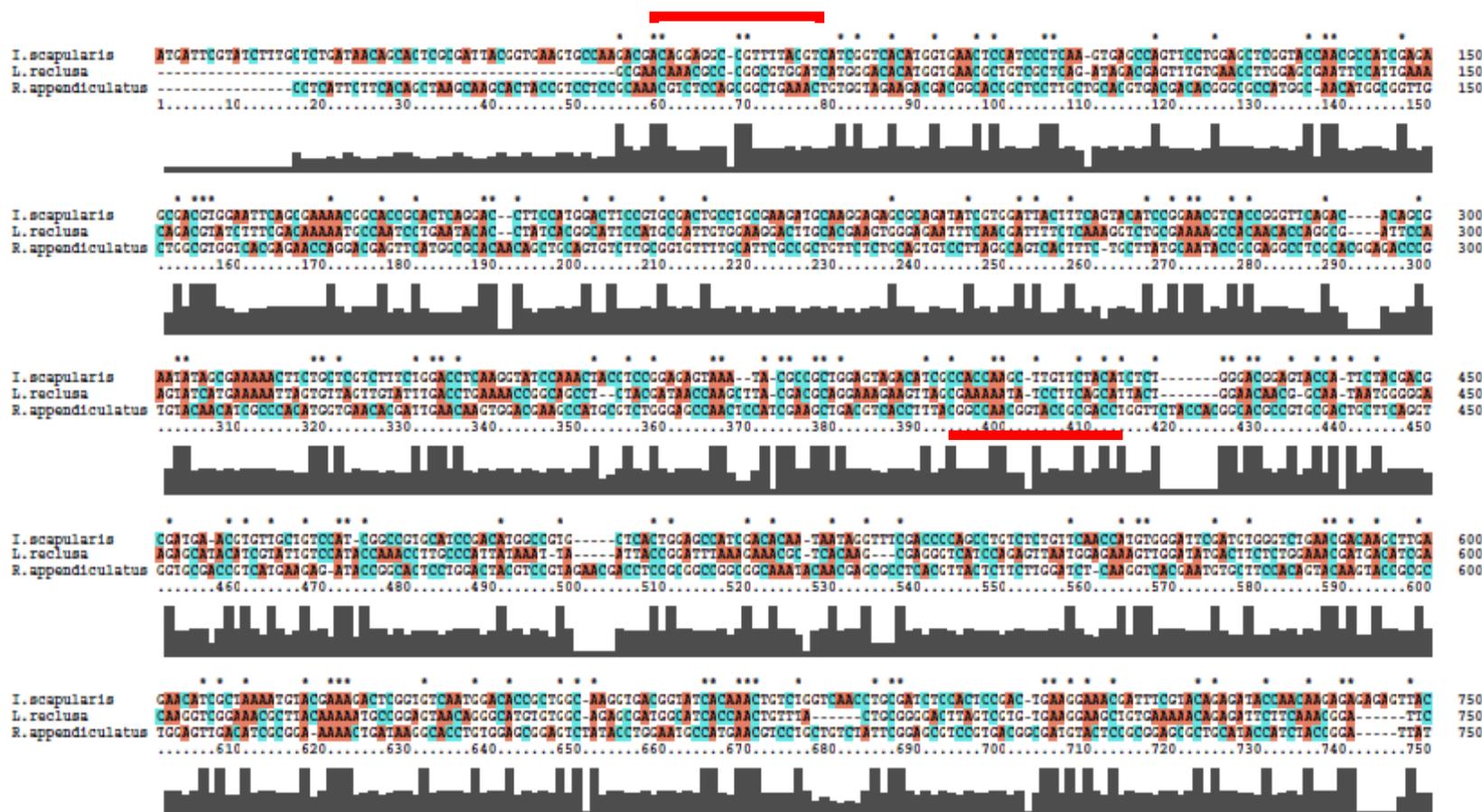
Solución de bloqueo

Leche en polvo	5 g
TBST 1X	100 mL
Azida de sodio al 0.02%	1 mL

Solución de transferencia

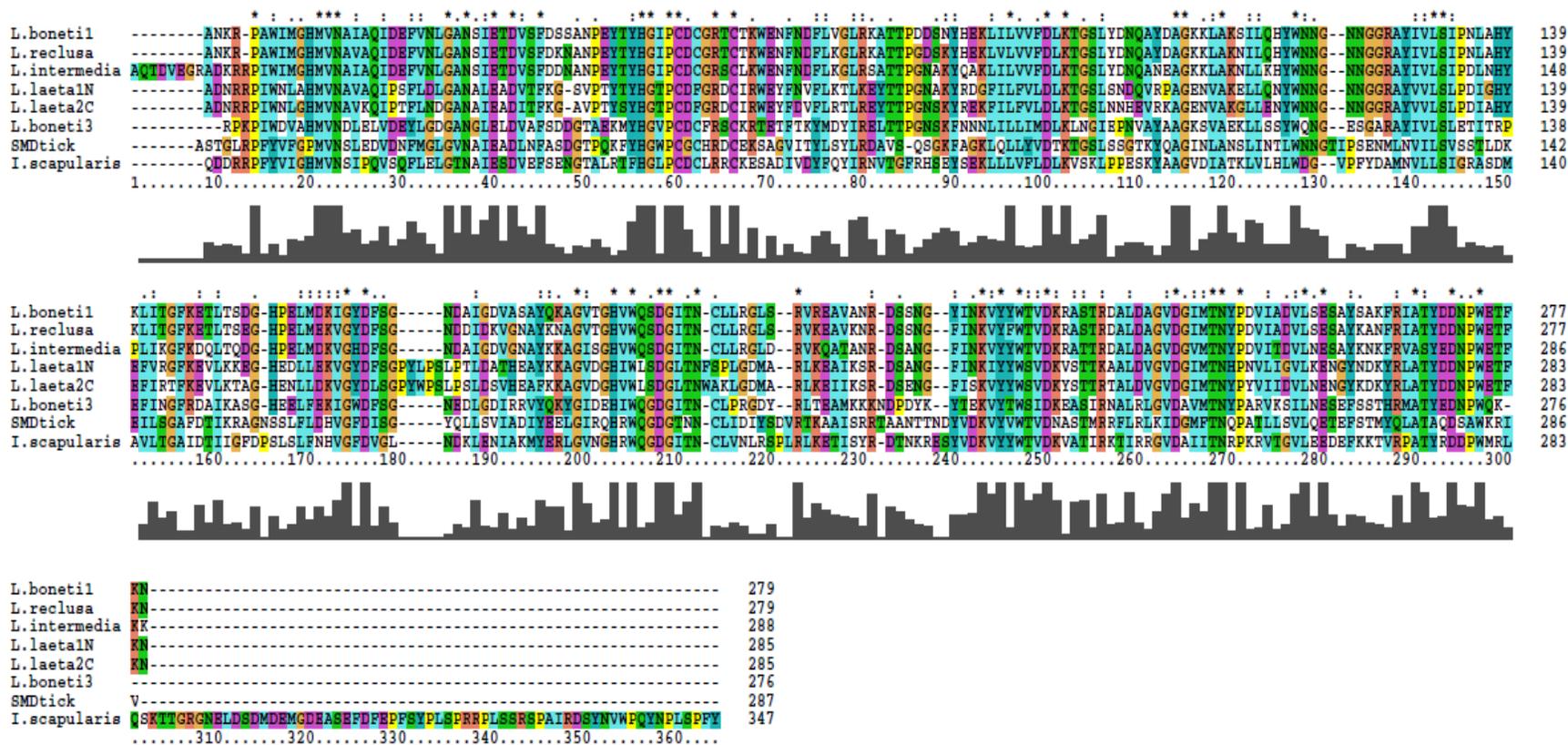
Glicina 39 mM	1.45 g
Tris-base 48 mM	2.9 g
SDS al 0.037%	0.185 g
Metanol al 20%	100 mL
Aforar a 500 mL con agua.	

Apéndice B



Alineamiento de *I. scapularis* (89512120), *R. appendiculatus* (CD788621.1) y *L. reclusa* (AY559846.1). Las líneas rojas indica la posición donde se diseñaron los oligonucleótidos degenerados para amplificar parte de la secuencia codificante de la esfingomielinasa D de *Rhipicephalus microplus*.

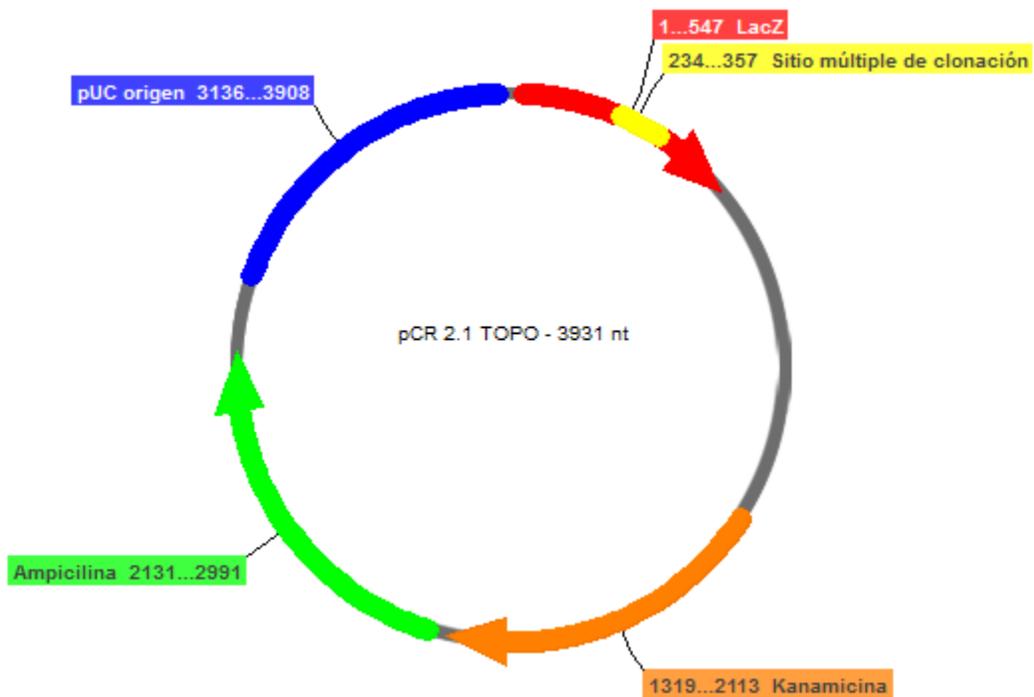
Apéndice C



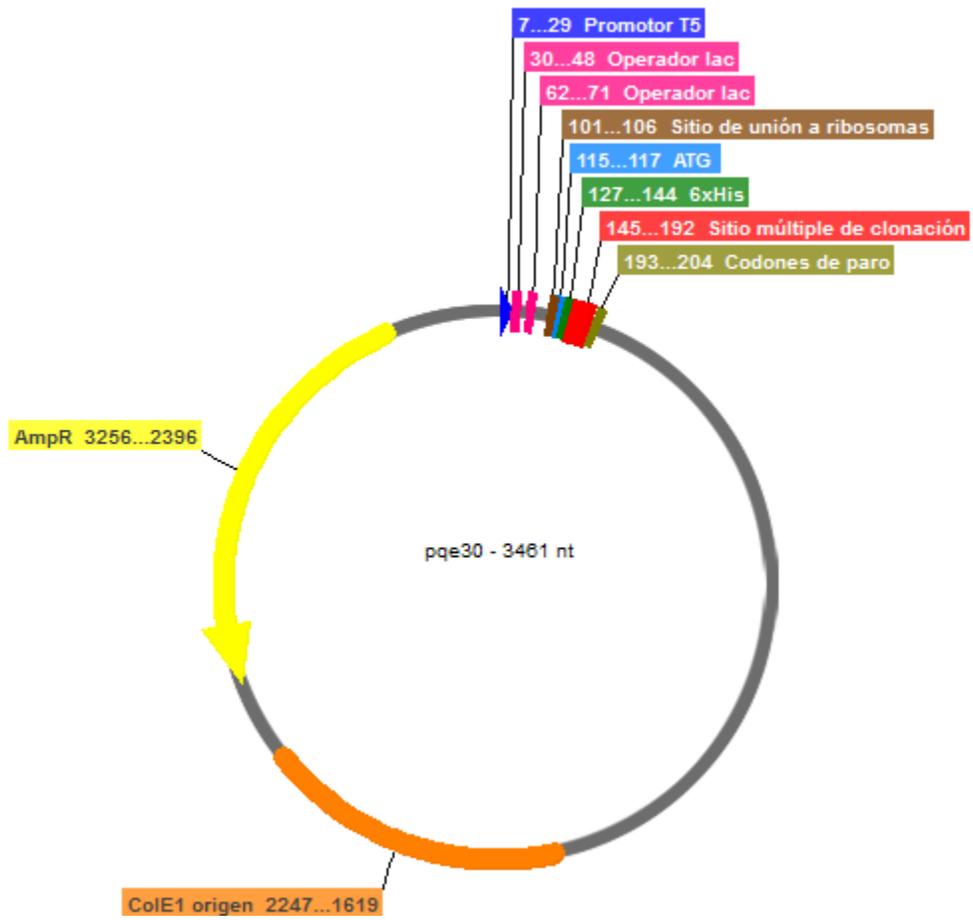
Alineamiento de SMDtick de *L. boneti* 1 (AY559844), *L. reclusa* (AY559846), *L. intermedia* (P83046), *L. laeta*1N (DQ369999), *L. laeta*2C (DQ370000), *L. boneti* 3 (AY559845), *I. scapularis* (Q202J4), SMDtick (secuencia de interés en este trabajo de *R. microplus*).

Apéndice D

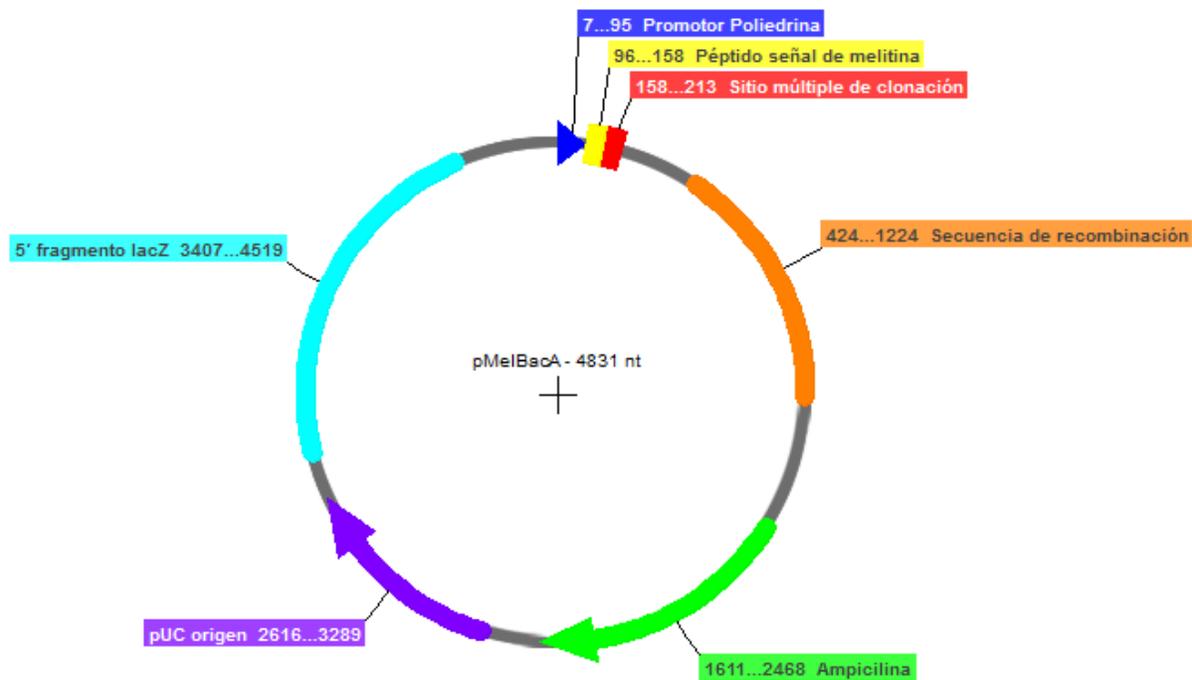
Dibujo esquemático del vector pCR 2.1-TOPO.



Dibujo esquemático del vector pQE30.



Dibujo esquemático del vector pMelBacA.



Reacciones que ocurren con el método del Kit Amplex Red para medir actividad de Esfingomielinasa D.

