

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

***“Expresión de la proteína recombinante Bm86uy-r y  
evaluación de su respuesta inmune humoral en bovinos  
inmunizados”***

**Por**

Martín Alcides LUCAS FONSECA

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO**  
**URUGUAY**  
**2015**

## PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

\_\_\_\_\_  
Jacqueline Maisonnave

Segundo miembro (Tutor):

\_\_\_\_\_  
Uruguaysito Benavides

Tercer miembro:

\_\_\_\_\_  
Martín Breijo

Cuarto miembro (Co-tutor)

\_\_\_\_\_  
Carolina Acevedo

Quinto miembro (Co-tutor)

\_\_\_\_\_  
Patricia Berasain

Fecha: 18/12/2015

Autor:

\_\_\_\_\_  
Martín A. Lucas Fonseca

## Agradecimientos

---

- ❖ Al Dr. Uruguaysito Benavides por aceptar la tutoría en este trabajo y hacerlo posible.
- ❖ A la Dra. Carolina Acevedo por todo el apoyo y compromiso brindado en todo momento durante la realización de esta tesis.
- ❖ A la Dra. Patricia Berasain por acompañarnos en la realización de este trabajo y aportar su conocimiento y tiempo.
- ❖ A el área de inmunología de la Facultad de Veterinaria (Departamento de Ciencias Microbiológicas) por permitirme acompañar a su grupo de trabajo durante este período
- ❖ Al Departamento de Parasitología del DILAVE (MGAP) por permitirnos usar sus instalaciones, así como el apoyo del personal que allí trabaja.
- ❖ A todos los que me apoyaron durante la realización de este trabajo.

## Tabla de Contenidos

---

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4 REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	11
4.1 Rhipicephalus microplus: Generalidades.....	11
4.1.1 Clasificación taxonómica del parásito.....	11
4.1.2 Ciclo biológico.....	12
4.1.3 Pérdidas económicas.....	14
4.2 Métodos de control frente <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	15
4.3 Vacunas en la lucha frente al <i>R. microplus</i> .....	17
4.3.1 Clasificación de los antígenos para el desarrollo de vacunas.....	18
4.3.2 Vacunas comerciales.....	19
4.4 Proteína Bm86.....	20
4.5 Resultados previos.....	22

<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>24</b>
6. 1 -Producción de la de BM86uy-r.....	24
6. 2 - Purificación de la BM86uy-r.....	26
6.3 Evaluación de la respuesta inmune mediante ELISA y Western Blot.....	29
6.3.1 Evaluación de la respuesta inmune mediante estudio de la cinética de anticuerpos por ELISA y de la especificidad por Western Blot.....	30
6.3.1a Elisa indirecto para detectar anticuerpos anti Bm86uy-r.....	30
6.3.1b WB para detección de anticuerpos anti Bm86uy-r.....	30
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
7.1 – Producción de la proteína Bm86uy-r.....	31
7.2 – Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante mediante por Elisa y Western Blot.....	36
7.2.1 – Respuesta sistémica de anticuerpos específicos contra Bm86uy-r evaluada mediante Elisa.....	36
7.2.2 – Respuesta sistémica de anticuerpos específicos contra Bm86uy-r evaluada mediante Western Blot.....	37
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>43</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>54</b>

## Lista de tablas y figuras

---

### ❖ Figuras:

Figura 1.....	13
Figura 2 .....	28
Figura 3 .....	32
Figura 4 .....	33
Figura 5 .....	34
Figura 6 .....	35
Figura 7 .....	36
Figura 8 .....	37
Figura 9.....	38

### ❖ Tablas:

Tabla 1.....	29
--------------	----

## 1. Resumen

---

Las garrapatas (ácaros del suborden *Ixodida*) son los ectoparásitos que más pérdidas producen al sector agropecuario a nivel mundial. Particularmente en nuestro país la especie de más impacto económico es el *Rhipicephalus microplus* cuyas pérdidas se estiman en más de 45 millones de dólares anuales. El control de la infestación de estos parásitos ha sido basado en el uso de acaricidas, los cuales hoy ya no son eficaces debido a la existencia de garrapatas multirresistentes. Por esto ha surgido la necesidad de un control integrado, siendo una herramienta fundamental el uso de vacunas frente al *Rhipicephalus microplus*. Las vacunas existentes en el mercado son basadas en el antígeno Bm86, sin embargo no son eficaces en todas las regiones del mundo debido a la variabilidad del locus que codifica dicha proteína en diferentes cepas de garrapatas en el mundo. Para evitar la falla de la eficacia de la vacuna es necesario realizar una vacuna regional clonando el gen Bm86 de las cepas autóctonas para producir la proteína recombinante (antígeno). La protección desarrollada por éste antígeno recombinante cuando se lo usa como vacuna es debido al desarrollo de anticuerpos específicos en los animales vacunados. Este antígeno recombinante (Bm86uy) ha sido clonado y producido partiendo de material génico de cepas autóctonas de nuestro país. El objetivo de éste trabajo fue la expresión de la proteína recombinante Bm86uy y la evaluación de la respuesta de anticuerpos contra ésta, para evaluar si potencialmente podrá ser usada en una futura vacuna. Nuestros resultados indican que se produjo una isoforma recombinante del antígeno Bm86 (Bm86uy-r) con un sistema de expresión basado en *E. coli*. Nuestro grupo de trabajo logró finalmente la expresión de la BM86uy-r en *E.coli* BL21 (DE3) pLysS utilizando el medio Luria Bertain (LB). Los mejores resultados se obtuvieron a 37°C realizando agitación constante de 160 rpm, con adición de IPTG en una concentración final de 1mM y con un tiempo de incubación de 2 horas. La proteína obtenida presento un peso molecular de 70 kda. Posteriormente se realizó un ensayo de vacunación en bovinos con dicho antígeno. La evaluación de la respuesta inmune humoral se determinó mediante el estudio de

la cinética de anticuerpos, utilizando ELISA, y de respuesta específica por medio de Western Blot.

## 2. Summary

---

Ticks (Mites of the suborder Ixodida) are ectoparasites that produce serious losses to the agricultural sector around the world. *Rhipicephalus microplus*, in our country, in particular, is the species, which produces the greatest losses, estimated in more than 45 billion dollars annually, and economic impact.. Control of these parasites infestation has been based on the use of acaricides, which today are no longer effective due to multiresistant ticks. Therefore, vaccines have been a fundamental tool to prevent the *R. microplus* and a need for an integrated a control. Vaccines available on the market are based on the Bm86 antigen; however they are not effective in all regions of the world because of the variability of the locus that encodes the protein in different strains of ticks in the world. To prevent the failure of the efficacy of the vaccine it is necessary to carry out a regional vaccine by cloning the Bm86 gene of the native strains to produce recombinant protein (Antigen). The protection developed by this recombinant antigen when used as a vaccine is due to the development of specific antibodies in vaccinated animals. This recombinant antigen has been cloned and produced on the basis of gene material of autochthonous strains of our country. The aim of this study was the expression of Bm86uy-r recombinant protein and the evaluation of the response of antibodies against this, to assess whether it might be potentially used in a future vaccine. Our results indicate that a recombinant isoform of the Bm86antigen (Bm86uy-r) was produced with an expression system based on *E. coli*. Our working group finally achieved the expression of the BM86uy-r in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS using LB medium. Best results were obtained at 37 ° C with a constant agitation of 160 rpm, adding IPTG in a final concentration of 1mM and a 2 hour incubation time. The protein obtained presented a molecular weight of 70 kda. This was followed by a test of vaccination in cattle with this antigen. The evaluation of the humoral immune

response was determined by the kinetic study of the antibodies using ELISA, and of specific response by means of Western Blot.

### 3. Introducción

---

Las garrapatas (ácaros del suborden *Ixodida*) son los ectoparásitos que más pérdidas producen en el sector agropecuario a nivel mundial. Particularmente en nuestro país la especie de más impacto económico es el *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, (*R. microplus*) cuyas pérdidas se estiman en más de 45 millones de dólares anuales (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-División General de Servicios Ganaderos, 2005). Estas pérdidas son producto tanto del efecto directo del parásito (hematofagia, irritación al picar, etc.) como de sus efectos indirectos (transmisión de babesia y anaplasma, gastos en campañas de lucha, etc.) (Nari y Fiel, 1994).

A través del tiempo la lucha para el control de este parásito se ha realizado principalmente por 2 frentes: manejo del rodeo y uso de acaricidas. Estos métodos no han logrado tener éxito debido, principalmente, a la alta prolificidad del parásito y al desarrollo de resistencia de este frente a los distintos acaricidas. Esto ha llevado a que en la actualidad se busquen alternativas para el control de la garrapata. (Lapage, 1971, de la Fuente, 2007)

La aplicación de un control integrado (CI) usando otras tecnologías basadas en el control inmunológico, genético y biológico es necesario para controlar la infestación del ganado (Willadsen y col., 2006; Nari 1995; Solari y col., 1992; Nari, 1990).

De las diferentes opciones la más prometedora es la inmunización de los bovinos mediante el uso de vacunas recombinantes.

Hoy en día existen variados antígenos recombinantes en estudio para ser incluidos en una vacuna y combatir la infestación por *R. microplus*: el antígeno vacunal Bm86 (Canales y col., 2009), BYC (Nascimento-Silva y col., 2008), BrBm1 (Toro-Oritz y col., 1997) entre otras. Sin embargo, solo se ha logrado producir vacunas comerciales usando el antígeno recombinante Bm86, existiendo hoy día en el mundo 2 vacunas comerciales. Estas vacunas han sido incluidas en los planes de control

integrado de *R. microplus* Cuba (Gavac™), (Rodríguez y col., 1995) y en Australia (TickGARD™) (de la Fuente y col., 2007; Willadsen y col., 1995).

Dichas vacunas, pese a ser muy eficaces en Cuba y Australia, no presentaron niveles aceptables de protección al ser aplicadas en otros lugares del mundo, incluyendo Uruguay, por lo cual no contamos con vacunas para el control de *R. microplus* en nuestro país. La eficacia de estas vacunas varía entre un 51% y 91% (Rodríguez y col., 1995, García-García y col., 2000). Se ha sugerido que estas diferencias observadas en la eficacia son debidas a la variación génica del locus (polimorfismo) del antígenoBm86 a partir de los cuales se desarrollaron las vacunas comerciales, (García-García y col., 1999). Esta variación es la causante de la falla de las vacunas comerciales. Previamente, en un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Itabajara da Silva Vaz, del Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Rio Grande Do Sul, y el grupo del Dr. Uruguaysito Benavides, del área de Inmunología de ésta Facultad, se demostró que no hay polimorfismo entre las garrapatas de diferentes zonas enzoóticas de nuestro país (Benavides y col., 2011 comunicación en las Jornadas Técnicas Veterinarias). Los mencionados investigadores y su grupo de trabajo lograron clonar y expresar la Bm86uy-r. En éste trabajo se repetirá la expresión de la Bm86uy-r clonada de garrapatas de nuestro país y se estudiará la capacidad de inducir anticuerpos en los bovinos.

## 4. Revisión Bibliográfica

---

### ❖ 4.1 *Rhipicephalus microplus*: Generalidades

#### 4.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL PARÁSITO:

El *R. microplus* es un ectoparásito hematófago, de gran impacto económico para la producción pecuaria y con una amplia distribución a nivel mundial. Taxonómicamente se lo puede clasificar dentro del filo Arthropoda, clase Arachnida y orden Acarina, por lo que es un ácaro (Nari y Fiel, 1994). Dentro de este orden, las garrapatas en su conjunto se pueden clasificar en 3 familias:

- **Argasidae:** son las denominadas garrapatas blandas. Se caracterizan por carecer de escudo quitinoso en la adultez y estadios ninfales, presentando un escudo vestigial en etapas larvarias. Otras características a destacar es que presentan dimorfismo sexual poco evidente y la hembra se alimenta varias veces poniendo pocos huevos tras cada período de alimentación. Existen descritas alrededor de 193 especies las cuales parasitan aves y mamíferos. (Gugleimone y col; 2010)
- **Ixodidae:** se las conoce como garrapatas duras y su principal característica es la presencia de un escudo dorsal quitinoso. Presentan dimorfismo sexual marcado, las hembras adultas se alimentan una sola vez en la vida para luego poner una gran cantidad de huevos y morir. A nivel mundial se reconocen 14 géneros y 702 especies, algunas de las cuales tienen gran importancia para la salud animal y humana por su daño directo y por su función clave en la transmisión de enfermedades infecciosas (Gugleimone y col, 2010). En el Uruguay existen descritos 5 géneros: *Amblyomma*, *Boophilus*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y *Rhipicephalus*.

- **Nuttalliellidae:** esta familia de garrapatas está integrada por una sola especie, la *Nuttalliellanamaqua*, la cual no forma parte de las anteriores familias por presentar características compartidas entre estas (Gugliemone y col, 2010).

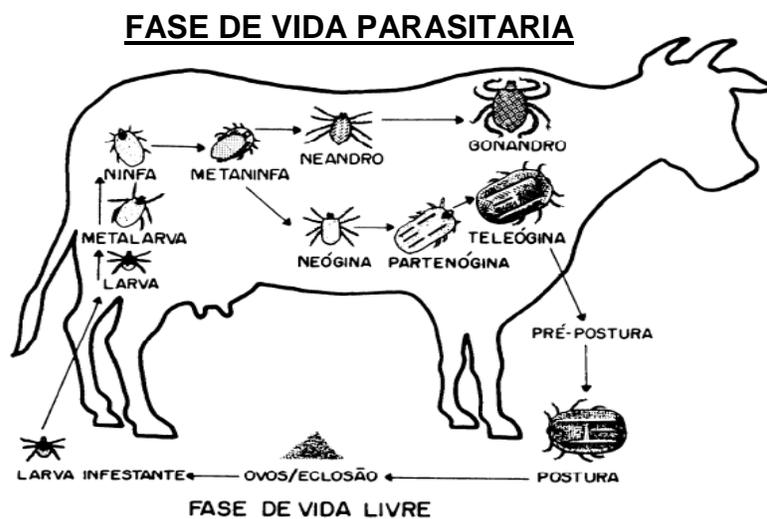
El *R. microplus* se encuentra dentro de las garrapatas duras, es decir la familia Ixodidae (Nari y Fiel, 1994). Su clasificación taxonómica sufrió una variación en el año 2003 basada en análisis moleculares y morfológicos. En la actualidad se la considera perteneciente al género *Rhipicephalus* y subgénero *Boophilus*. Siendo su correcta nomenclatura: *Rhipicephalus microplus*(Murrell yBarker, 2003).

#### 4.1.2 CICLO BIOLÓGICO

*R. microplus* presenta su ciclo dividido en 2 fases: una de vida libre y otra de vida parasitaria. La fase de vida libre se divide en: protoquia, ootoquia (aoeve), incubación, eclosión y larva de vida libre.

La protoquia comienza cuando la teleógina madura se desprende de su huésped, y finaliza con el comienzo del aoeve. Durante esta etapa la hembra deposita los huevos en el suelo, la cantidad de estos oscila entre 2500 y 3000. Luego se da la incubación y finalmente la eclosión de los huevos. Al darse la eclosión surgen larvas con 3 pares de patas. Estas larvas trepan por los pastos protegiéndose del sol y la desecación con el objetivo de encontrar un huésped. Luego de que lo logran finaliza la fase de vida libre; cabe destacar que esta fase es la más variable en su duración (90 a 185 días) debido a que es sumamente influenciada por factores climáticos como la humedad, la temperatura, la exposición a rayos solares y la densidad de huéspedes potenciales (Nari y Fiel, 1994). Cuando la larva sube al huésped comienza la fase de vida parasitaria, esta se encuentra dividida en 3 etapas: etapa de larva, de ninfa y adultez. La larva que posee tres pares de patas, al subir al huésped empieza a alimentarse de la sangre de este hasta que se ingurgita totalmente. En ese momento se queda totalmente inmóvil y recubierta por una

exubia, pasando a denominarse metalarva. De la metalarva emerge una ninfa que posee 4 pares de patas, rápidamente comienza a alimentarse y se da el mismo proceso obteniéndose una metaninfa. De la metaninfa puede emerger un meandro (adulto macho que aún no se ha alimentado) o una neógina (hembra adulta que aún no se ha alimentado). El meandro rápidamente pasa a ser gonandro, es muy movedizo y puede copular varias veces con diferentes hembras. La neógina pasa a denominarse partenógina luego de la cópula y se ingurgita parcialmente, es una etapa intermedia entre la neógina y la teleógina. Al final de esta fase la hembra totalmente ingurgitada (teleógina) crece rápidamente hasta que finalmente cae del huésped finalizando la fase de vida parasitaria. Cabe destacar que esta fase es mucho más constante en su duración (aproximadamente 21 días, 18-25) debido a que no se ve afectada por los factores climáticos externos.



**Figura 1.** Ciclo biológico del *R. microplus* (Gonzales, 1995)

La dinámica poblacional del *R. microplus* en nuestro país se puede resumir en la presencia de 3 generaciones anuales:

- **1era Generación:** se da de julio a noviembre y es producto de las larvas presentes en el campo desde el otoño anterior, de teleóginas que sobrevivieron el invierno y de larvas que nacen en primavera. Es la generación menos numerosa

- **2da generación:** se manifiesta de noviembre a febrero debido a teleóginas que cayeron entre agosto y octubre, produciendo un acumulo de eclosiones en noviembre-diciembre.
- **3era generación:** se observa en el periodo enero-junio y es producto de las teleóginas que caen en octubre-diciembre; es la generación que provoca la mayor relación teleógina/vacuno. (Nari y Fiel, 1994)

En las cercanías de bosques es de esperar que haya una cuarta generación.

### 4.1.3 PÉRDIDAS ECONÓMICAS

Las garrapatas ingresaron a América entre los siglos XVII y XVIII a través de vacunos Británicos importados, y se transformaron rápidamente en los ectoparásitos que mayores pérdidas económicas produjeron en todo el continente en esos siglos (Nari y Fiel, 1994). Hoy en día los efectos nocivos que produce este ectoparásito sobre la producción pecuaria mundial han sido ampliamente estudiados y demostrados (de la Fuente y col, 2008; Jonsson y col, 2007; Jonsson, 2006; Willadsen, 1999; Snelson, 1975).

Las razones por las que este parásito produce pérdidas económicas son variadas. Las directamente atribuibles al *R. microplus* son el daño a la piel por la picadura (afecta el cuero), la sangre que es capaz de ingerir una garrapata durante su vida parasitaria, y la irritación producida por la picadura que provoca molestias en el animal interfiriendo con su alimentación y bajando la ganancia de peso (Nari y Fiel, 1994). Además de las pérdidas directas, el parásito produce pérdidas en forma secundaria como ser: la transmisión de enfermedades al bovino, como babesiosis, anaplamosis y theileriosis, y los costos económicos para su control, como ser el uso de garrapaticidas o los gastos en instalaciones para su aplicación (Nari y Fiel, 1994). Sumado a los costos para el productor en muchos países existe un costo extra por la aplicación de planes sanitarios para su control, debido a los impedimentos que esta parasitosis significa para la exportación. (Cordoves, 1997). Otro costo a considerar es la contaminación producida por el uso de acaricidas. Su uso supone un

riesgo para el ambiente, por la contaminación de suelos y ríos (efluentes), y para la salud pública debido a los prolongados tiempos de espera (retiro) para evitar residuos tóxicos en los productos pecuarios (Graf y col, 2004; Kunz y Kemp, 1994).

Particularmente en nuestro país(Uruguay) las pérdidas económicas anuales debidas a la infestación del ganado por *R. microplus* en 2005 se estimaron en 45 millones de dólares distribuidos en: tratamientos garrapaticidas (44,6%), abortos (31,1%), otros tratamientos(12,8%), cueros dañados (6,3%),acciones del Estado (4,5%) y pérdida de 34 kg de carne por animal (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca-División General de Servicios Ganaderos, 2005).

Controlando la infestación por *R. microplus* podríamos evitar los daños antes mencionados y cuantiosas pérdidas económicas.

#### ❖ **4.2 Métodos de control frente *Rhipicephalusmicroplus*:**

Se pueden clasificar en:

##### **A. Métodos de control químicos:**

Consisten básicamente en el uso de Acaricidas para cortar el ciclo del parásito. Las familias de acaricidas más usadas son: Organofosforados, Piretroides sintéticos, Fipronil, Lactonas Macroclínicas, Amidinas y Fluazurón, entre otros.

Los acaricidas han sido una herramienta fundamental en el control del *R. microplus* y en muchos casos la única utilizada. Sin embargo, y más allá de los costos económicos y ambientales que supone su uso indiscriminado, esta herramienta cuenta hoy con un problema ampliamente demostrado: el desarrollo de resistencia por parte del parásito. (Jonsson y Hope, 2007; Martins y Furlong, 2001; Furlong, 2004).La resistencia según la FAO es el aumento significativo de individuos de la misma especie dentro de una población capaces de tolerar dosis de una droga que son letales para la mayoría de los individuos de su especie (FAO, 2003). La causa de este fenómeno en muchos casos es el mal uso de los acaricidas (Furlong, 2004)y hemos llegado al punto en que la resistencia frente a un nuevo acaricida es

esperable entre 5 y 10 años luego de su aparición en el mercado(Wharton, 1983).

Hoy en día en el Uruguay existen poblaciones de garrapatas resistentes a organofosforados, piretroides sintéticos y sus mezclas, fipronil, amitraz y a lactonas macrocíclicas. El fluazurón es el único principio activo aprobado para uso en el Uruguay al cual, hasta el momento, no ha demostrado pérdida de eficacia. Sumado a esto en el 2009 se diagnosticó la primera población de garrapatas multirresistentes. Esta situación fue catalogada como “incipiente” por los autores, los cuales la consideran un serio riesgo que hace imprescindible la aplicación de estrategias de control integrado sustentables para el mantenimiento de la eficacia de los garrapaticidas.( Cuore y Solari, 2013)

## **B. Métodos Alternativos:**

- **Control biológico:** consiste en el uso de organismos vivos que actúen como predadores del parásito. Su uso es altamente deseable pero su factibilidad en cuanto a aplicación, eficacia y estabilidad representa un serio desafío (Willadsen, 2006). Actualmente se está prestando especial atención al desarrollo de hongos, tales como *Metarhiziumanisopliae* y *Beauveria bassiana*, como agentes de control biológico frente a una gama de garrapatas (Hajek y col, 2012; Pirali-Kheirabadi y col., 2007).
- **Control mediante manejo:** consiste básicamente en manejar los hospederos en relación a sus áreas de pastoreo de tal forma de evitar la coincidencia huésped-fase parasitaria. Esto no es de fácil aplicación, pero se logra mediante, por ejemplo, el uso de correctos tiempos de descanso para las praderas(FAO, 2003).
- **Control genético:** el mismo consiste en buscar hospederos resistentes a la infestación por el parásito. El ejemplo más claro de este control es el uso del *Bos indicus* por ser más resistente a infestaciones graves de garrapatas que las razas *Bos Taurus*(Cardozo y col., 1984).

- **Uso de vacunas:** el uso de vacunas es hoy el área más prometedora para el futuro control del *R. microplus*, sin embargo, como veremos más adelante, aun no se han logrado los resultados ideales.

Como se ha expuesto no existe una solución única y definitiva para el control de las infestaciones por garrapatas. Es por esto que la aplicación de un control integrado (Willadsen y col, 2006; Nari, 1995) usando otras tecnologías diferentes a los acaricidas, basadas en el control inmunológico, genético y biológico son necesarias en Uruguay para controlar la infestación del ganado por garrapatas (Nari, 1990; Nari, 1995, Solari y col, 1992;). Pensando en un Control Integrado de este parásito se destaca que el control inmunológico mediante la aplicación de vacunas es una herramienta imprescindible. (Willadsen, 1999; Willadsen, 2006; De La Fuente y col, 1999; de La Fuente y Kocan, 2006). Una de las ventajas del uso de vacunas como método de control es que es menos probable que se desarrolle resistencia a los acaricidas. (Willadsen, 2004)

#### ❖ 4.3 Vacunas en la lucha frente al *R. microplus*

Este método de control proporciona una herramienta alternativa para el control de garrapatas. Programas de control integrados contra este ectoparásito que incluyen vacunas reducen el uso de acaricidas, el costo de la producción animal y minimizan el impacto de la contaminación ambiental. (Willadsen, 1999)

El paso limitante en el desarrollo de vacunas efectivas frente al *R. microplus* es y ha sido la identificación de antígenos que sean inmunógenos y que desarrollen una respuesta protectora con la infestación por éste parásito, (Mulenga y col., 2000; Willadsen, 2001).

El control inmunológico mediante el uso de vacunas, nos crea una perspectiva promisoriosa en la lucha contra *R. microplus*. Desde hace más de 40 años diversos estudios avalan que la resistencia adquirida en bovinos no es innata sino adquirida durante sucesivas infestaciones por la misma (Roberts, 1968; Wagland y col., 1978)

Se ha observado que animales resistentes llegan a rechazar entre un 80% a un 99% de larvas.

#### **4.3.1 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS:**

Actualmente, 3 grupos de antígenos podrían identificarse como blancos moleculares para el desarrollo de vacunas contra garrapatas: los antígenos “expuestos”, los “ocultos” y un tercer grupo que presenta características mixtas comunes a ambos (Nuttall y col., 2006).

Los antígenos “expuestos” son proteínas o péptidos secretados en la saliva de la garrapata cuando se alimenta del huésped, debido a esto son reconocidos inmediatamente por el sistema inmune, desencadenando una respuesta del mismo.

La interacción huésped parásito involucra la respuesta innata y adquirida del huésped y los mecanismos inmunomoduladores de las garrapatas. En respuesta al huésped las garrapatas desarrollan una serie de medidas de inmunosupresión mediadas por moléculas presentes en la saliva (Wikel y col., 1979)

Los antígenos “ocultos”, por el contrario, no toman contacto con el huésped durante la infección natural por lo que no desarrollan respuesta inmune de ningún tipo. Sin embargo, estos antígenos han demostrado ser protectores y desencadenar una respuesta inmune cuando el huésped es expuesto a ellos en forma “artificial” mediante inoculación de los mismos incluidos en una vacuna. Dentro de este grupo encontramos las moléculas asociadas al endotelio intestinal, componentes relacionados con la embriogénesis y proteínas integrales de los músculos entre otras.

El tercer grupo de antígenos presenta características de “expuestos” y “ocultos”. Tienen la potencialidad de brindar protección contra los estados inmaduros y

adultos de la garrapata, poseen reacción cruzada entre antígenos expuestos y ocultos y son potencialmente universales protegiendo contra diferentes especies (Trimnelly col., 2002; Trimnelly col., 2005)

#### 4.3.2 VACUNAS COMERCIALES

La producción de vacunas eficaces contra el *R. microplus* es un gran desafío. Pese a la gran variedad de antígenos en estudio solo se han logrado producir vacunas comerciales usando el antígeno recombinante oculto Bm86, existiendo hoy en día en el mundo 2 vacunas recombinantes comerciales que tienen como inmunógeno dicho antígeno, y que han sido incluidas en los planes de control integrado en Cuba (Gavac<sup>TM</sup>) (Rodriguez y col., 1995) y en Australia (TickGARD<sup>TM</sup>) (de la Fuente y col., 2007; Willadsen y col., 1995)

Existen múltiples estudios que han evaluado la eficacia de estas vacunas. En pruebas a campo controladas en ganado en pastoreo, en Cuba, Brasil, Argentina y México, Gavac<sup>TM</sup> ha demostrado una eficacia de 55-100% en el control de las infestaciones. Estas variaciones en la eficacia podrían atribuirse según los autores a diferencias en las cepas de garrapatas, las condiciones experimentales y el estado fisiológico de los animales. Se demostró que la aplicación de Gavac<sup>TM</sup> aumentó el tiempo entre tratamientos acaricidas en un promedio de 32 +/- 21 días (P = 0,0005), lo cual significa ahorros importantes para la industria ganadera. En Cuba, se realizó un análisis de costo-efectividad en más de 260.000 animales el cual demostró una reducción del 60% en el número de tratamientos acaricidas, junto con el control de infestaciones por garrapatas y la transmisión de babesiosis. Estos resultados demuestran claramente la ventaja de la vacunación (De la Fuente y col., 1999). Los mismos autores determinaron que se puede evaluar la eficacia de la vacuna a través de la medición de los títulos de anticuerpos anti-Bm86 en los animales vacunados. Resaltan también el hecho de que el estado fisiológico de los animales afecta la respuesta primaria a la vacunación, pero no los títulos de anticuerpos post revacunación

Como ya se ha señalado estas vacunas comerciales no son eficaces en todas partes del mundo debido al polimorfismo del locus de Bm86, por lo cual otros grupos de investigadores buscan obtener inmunógenos regionales que garanticen la efectividad de la vacuna producida. Cunha y col. produjeron en *Pichia pastoris* la cepa Bm86 Campo Grande (rBm86-CG) de *R. microplus* testearon su capacidad inmunoprotectora en el ganado frente a la infestación por garrapatas. En estos experimentos se estudió por la técnica de ELISA la respuesta inmune humoral específica en los sueros de bovinos vacunados. Se realizó inmunoblot demostrándose que anticuerpos del ganado vacunado reconocieron una proteína en los extractos de larvas con un peso molecular correspondiente a Bm86. La vacunación con el antígeno rBm86 CG mostró una eficacia del 31% frente al desafío con *R. Microplus*de Campo Grande utilizado para infectar a los animales vacunados. (Cunha y col., 2012)

En Uruguay, se realizaron ensayos de vacunación con las dos vacunas comerciales, no obteniéndose niveles aceptables de protección, por lo cual no contamos con vacunas aplicables al control de *R. microplus*.

Las fallas en la eficacia de éstas se deben a la variación génica del locus que codifica al antígeno en las diferentes poblaciones de garrapatas a nivel mundial. (De la Fuente y col., 2000;García-García y col., 2000).

Por otra parte, no existen otras vacunas comerciales que estén disponibles a nivel mundial, aunque sí hay algunas en etapa de experimentación inicial ( búsqueda de antígenos que desarrollen una buena inmunidad protectora).

#### ❖ 4.4 Proteína Bm86

Es una proteína localizada en la membrana de las células del intestino de las garrapatas. Su peso molecular en su forma nativa es 89kda y en su forma recombinante no glicosilada es de 71,7kda, su punto isoeléctrico es 5.1 – 5.6. La estructura del antígeno es compleja, con múltiples repeticiones similares a factores de crecimiento epidérmicos y una extensa glicosilación (Rand y col., 1989)

La Bm86 nativa fue descrita por primera vez en 1989 por Willadsen y colaboradores, previamente los antígenos del intestino de *R. microplus* fueron descritos como antígenos protectores por el grupo de Opdebeeck y col. (1988)

La expresión de la Bm86 se ha logrado en *E. coli*(Tellamet y col.,1992), *Pichia pastoris* (Rodriguez y col., 1994).

Su componente antigénico son sus glicoproteínas, por lo tanto, son las responsables de la protección brindada al huésped. Se ha demostrado su inmunogenicidad y eficacia tanto como proteína nativa (Willadsen y col., 1989) como en su forma recombinante (Tellamet y col., 1992)

En 1989 Willadsen y col. demostraron que los anticuerpos producidos frente a antígenos de hembras parcialmente ingurgitadas lisaban las células intestinales de garrapatas adultas. Posteriormente se purifica, caracteriza y describe por primera vez una glicoproteína de membrana del intestino de garrapatas con un peso molecular de 89.000 KD, que se denominó Bm86 (Willadsen y col., 1989). Este grupo identificó a esta misma proteína como la responsable de la respuesta inmune que afectaba a la digestión de la sangre por el parásito. Determinaron que las células de la pared del intestino de la garrapata perdían su actividad endocítica al reaccionar con el anticuerpo anti Bm86, un paso crítico para la digestión de la sangre ingerida por la garrapata, la cual esta se ve imposibilitada de alimentarse. Lograron además asociar la respuesta de anticuerpos frente a Bm86 a la protección contra un desafío de *R. microplus*. La ubicación de la Bm86 nativa fue determinada posteriormente por el grupo de Gough y col. en 1993 mediante microscopía electrónica usando suero anti Bm86-r producida en un sistema de expresión en *E. coli*. Se localizó a la Bm86 nativa en las microvellosidades de las células digestivas.

Cuando las garrapatas ingieren sangre de un animal inmunizado con Bm86, los anticuerpos que ingresan al intestino de las garrapatas durante la alimentación desarrollan dos mecanismos efectores protectores principales: a) Interfieren en la endocitosis de los alimentos e inhiben rápidamente la digestión, y b) activan el complemento sobre la membrana de las células epiteliales produciendo la lisis de la

misma. Una vez dañada la pared intestinal los anticuerpos así como los neutrófilos y otras moléculas efectoras del sistema inmune invaden el hemocele, atacando músculos y túbulos de Malpighi, produciendo la muerte del parásito. (García-García y col., 1993).

#### ❖ 4.5 Resultados previos

El grupo del Dr. Benavides del laboratorio de Inmunología de Facultad de Veterinaria realizó el clonado de la región hipervariable de la Bm86 de diferentes poblaciones de garrapatas del norte de Uruguay, más la cepa Mozo (cepa de referencia en Uruguay) y la comparó a la Yeerongpilly (ATCC 6745) (cepa australiana con la cual se elabora la vacuna comercial). Cabe destacar que la zona hipervariable es considerada inmunógena por lo que reviste gran importancia.

A partir de estos alineamientos pudieron observar que las secuencias de nuestras poblaciones comparadas con la cepa australiana presentan una diferencia de alrededor del 5%. Estas diferencias nos indican el polimorfismo marcado del locus Bm86 entre nuestras poblaciones y la población Yeerongpilly (ATCC6745).

Diversos estudios han demostrado que diferencias entre las secuencias del gen de más de un 3% se traducen en diferencias importantes en los porcentajes de protección (Patarroyo y col., 2005). Estas diferencias al estar ubicadas en la zona hipervariable podrían explicar la falla de las vacunas comerciales en nuestro país.

Estos datos reafirman la necesidad de clonar el gen de Bm86 de garrapatas de nuestro país, para así poder desarrollar una vacuna recombinante protectora que eventualmente pueda ser aplicada en Uruguay y la región.

En un paso previo a este trabajo se obtuvo la región codificadora de la Bm86 de garrapatas nativas del Uruguay, cepa proveniente del Departamento de Artigas, la cual fue clonada por nuestro grupo de trabajo en el vector de expresión pET-43 (Invitrogen). El plásmido utilizado se caracteriza por fusionar 6 histidinas en el extremo c terminal de la proteína así como por conferir resistencia a la ampicilina como forma de selección. La cola de histidina permite la identificación de la proteína recombinante en los procesos de estandarización de la expresión y purificación por

cromatografía de afinidad (ver punto 6.1 de materiales y métodos). La clonación se confirmó posteriormente por secuenciación confirmando así que el vector contenía la región codificadora de la Bm86uy. Las muestras fueron analizadas en el Sector de Secuenciamiento de DNA del Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

La secuenciación del plásmido pET43-Bm86uy permitió obtener un fragmento de ADN de 2000 pb con un marco abierto de lectura que codifica una proteína de 666 aminoácidos, que, según trabajos previos, debería poseer una masa molecular de 70 Kda. (Cunha y col., 2012)

## **5. Objetivos:**

---

### **OBJETIVO GENERAL:**

Producción del antígeno recombinante Bm86uy de la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y evaluación de su capacidad inmunogénica en bovinos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1) Producción de la proteína recombinante (Bm86uy-r)
- 2) Evaluación de la respuesta inmune mediante ELISA y Western Blot.

## 6.METODOLOGÍA

---

### 6.1. Producción de la proteína recombinante (Bm86uy-r).

Con el objetivo de lograr la expresión de la proteína recombinante Bm86uy-r se utilizó el plásmido pET-43a (Invitrogen) clonado con el gen que codifica esta proteína. El clonaje fue realizado previamente por los integrantes del grupo por lo que partimos del plásmido PET-43a + inserto gen Bm86uy obtenidos de garrapatas nativas de Uruguay.

Este vector de expresión se caracteriza por presentar una región promotora reconocida por la T7RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5 de manera que tras la adición de IPTG, la T7RNA polimerasa se expresa desde el cromosoma bacteriano e induce la expresión de la proteína a partir del vector. En el vector está incluida una secuencia que codifica un segmento de seis histidinas, las cuales quedan unidas a la región C-terminal de la proteína recombinante luego de la traducción, facilitando su localización por Western Blot y purificación por cromatografía de afinidad usando resinas de Níquel. Adicionalmente contiene el gen de  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina.

Como forma de confirmar el clonaje de la región codificadora de Bm86uy-r se realizó secuenciación en el Sector de Secuenciamiento de DNA del Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Se utilizó un sistema de secuenciación capilar, en el secuenciador ABI3130xl (Life Technologies).

El análisis de las secuencias de nucleótidos y su traducción a aminoácidos se llevaron a cabo utilizando el programa Bio\_Edit\_Sequence\_Alignement\_Editor. De acceso gratuito on-line (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)

Para realizar la expresión de la Bm86uy-r contábamos con diferentes linajes de *E.coli*.

Se procedió a realizar shock térmico (Ver anexo 1) con el vector de expresión pET43-Bm86-uy, utilizando distintas líneas celulares competentes (Ver anexo 2), las cuales se prepararon de acuerdo a la metodología descrita por Sambrock (2001). Para comprobar la eficiencia del procedimiento se le realizó análisis de competencia transformándolas con el plásmido PAE (Ramos y col, 2004), proporcionado por el Dr. Luis Parizi del Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Rio Grande Do Sul. (Ver anexo 3). El shock térmico consiste en incubar bacterias y plásmido a 0°C realizando luego un incremento brusco de temperatura a 42 °C que causa que el ADN ingrese en la célula. Posteriormente las colonias transformadas fueron sembradas en placas de agar LB + Ampicilina (50 mg placa). Se utilizó el protocolo descrito por Sambrock (Sambrock, 2001)

A partir de las colonias transformadas presentes en las placas de agar LB+ampicilina se realizaron los test de expresión para Bm86uy en diferentes linajes de *E.coli*.

El test de expresión consiste en lograr la expresión de la proteína recombinante mediante inducción con IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) del laboratorio Invitrogen. El IPTG induce la expresión debido a que las colonias bacterianas fueron transformadas con el vector Pet43 el cual se caracteriza por presentar una región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5. Por lo tanto luego de la adición del IPTG la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la expresión de la proteína a partir del vector

El test de expresión se realizó en las siguientes condiciones:

- 37° C temperatura
- 1mM concentración de IPTG
- 2 hs tiempo de incubación.

Se partió de una colonia de la cepa transformada la que fue sembrada (2.5 ml) en medio líquido Luria Bertain (LB) con ampicilina (50 mg/ml) e incubada a 37°C /180 rpm durante toda la noche (pre-inóculo). Adicionalmente se realizaron controles

negativos de expresión, los que fueron bacterias transformadas no inducidas. Posteriormente ese pre-inóculo se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se re suspendió en 1 ml de LB sin ampicilina, posteriormente se inoculó en 100 ml de LB sin ampicilina. Luego se incubó a 37° C de temperatura de acuerdo a lo ya descrito, a 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6, correspondiente a la fase exponencial del crecimiento bacteriano, adicionándose IPTG como inductor de expresión y tomando las muestras a las 2 horas de incubación como se describió. Luego de tomadas las muestras se centrifugaron 3 veces a 15000g durante 5 -10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante, el sedimento fuere suspendido en PBS 1X. Las muestras obtenidas fueron sonicadas con una amplitud de 40, con pulsos de 5 segundos y descansos de 5 segundos, durante 15 minutos. Posteriormente separamos la fracción soluble e insoluble por centrifugación a 2200g, 4°C, 1 hora.

Posteriormente se realizó un Western Blot (Ver anexo 4) usando un anticuerpo monoclonal anti-histidina conjugado a fosfatasa alcalina Anti-His (C-term)/AP-Ab-Invitrogen) diluido 1/100 y 1/1000 en PBS 1x. Este anticuerpo nos permitió evidenciar la proteína mediante una reacción catalizada por la enzima, agregando el sustrato adecuado para esa enzima. Se utilizó como sustrato NBT/BCIP (Amresco) lo que da una coloración rojiza frente a una reacción específica. Esta solución se vertió sobre la membrana de nitrocelulosa que presentaban las proteínas bacterianas, de manera que quedara cubierta completamente, y cubriéndola además con papel de aluminio para no permitir la entrada de luz. Se incubó en agitación hasta la aparición de bandas, en ese momento se paró la reacción descartando la solución y lavando con PBS 1X en abundancia.

## **6.2 Purificación de la Bm86uy-r**

Luego de lograr la expresión de la proteína Bm86uy-r se procedió a producir mayores volúmenes de cultivo (0.5 y 2 litros) con el objetivo de purificar la misma. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad de la fracción soluble en columnas HisTrap™ (GE-Healthcare)de tamaño de 1 ml, puesto que la proteína

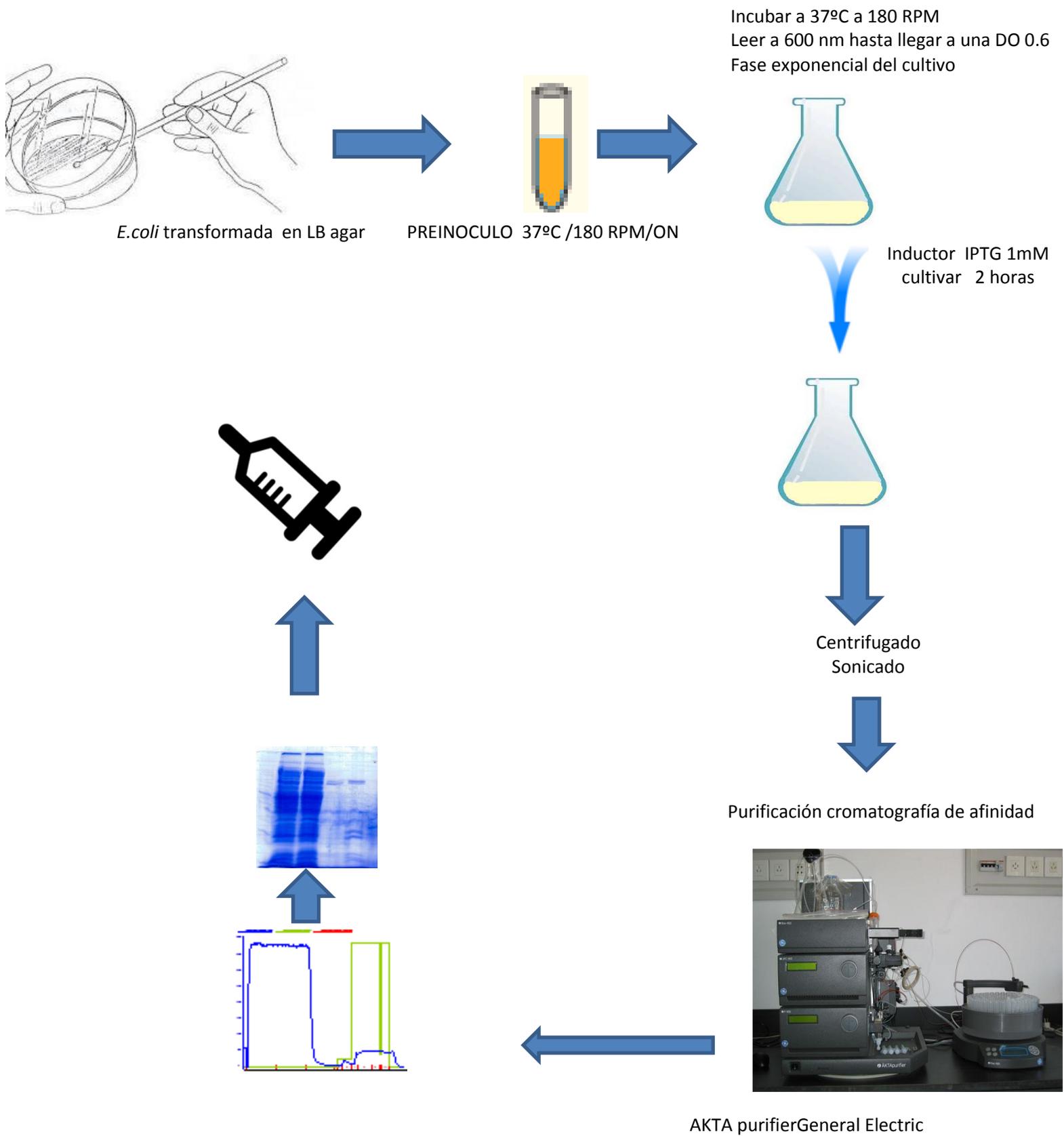
recombinante presentan en su extremo C- terminal, una cola de seis histidinas que interaccionan con el Níquel(Ni) cargado en la resina.

Para ello se utilizó el sistema de purificación AKTApurifier (GeneralElectric) del Instituto de Higiene-Facultad de Medicina. Luego de obtenido el volumen de cultivo deseado (0.5 o 2 L) siguiendo la metodología arriba descrita se procedió a la purificación de la proteína Bm86uy recombinante. Se centrifugó el cultivo y se lavó en PBS 1X 3 veces en volúmenes decrecientes como lo indica el punto 6.1.1 hasta obtener en un tubo todos los sedimentos. Posteriormente el mismo fue homogenizado en buffer de ligación (fosfato de sodio 20 mM, 0.5 M NaCl, 20 Mm de Imidazole pH 7.4). Luego el sedimento (pellets) fue sonicado en hielo durante 30 minutos con ciclos de 15 segundos de sonicación con descansos de 15 segundos con una potencia de 80. El material sonicado fue centrifugado a 31150g por aproximadamente 1 hora a 4°C. Este paso es muy importante para que no obstruya la columna al pasaje del material a purificar. Luego de esta centrifugación el sobrenadante fue filtrado a 0,22 micras. El material filtrado fue sometido a purificación en el sistema de purificación AKTA purifier (GE). Estos sistemas son ampliamente usados a nivel de laboratorio ya que proporcionan mayor control comparado con la purificación manual.

Los mismos permiten controlar automáticamente la tasa de flujo, y monitorear el progreso de la purificación mediante el uso de gradientes de buffer (cromatograma) y además coleccionar automáticamente las fracciones eluidas en tubos separados numerados correlativamente, (<http://www.gelifesciences.com>).

Para la elución se utilizaron concentraciones crecientes de Imidazol: 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500mM en buffer fosfato (20mM de fosfato de sodio, 0.5 M de cloruro de sodio, pH 7.4).

La recombinante obtenida en los diferentes picos se semicuantificó a partir de una corrida electroforética en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12%) en el cual se corrieron las fracciones coleccionadas en los diferentes tubos con mayor absorbancia. Posteriormente se realizó la tinción del SDS PAGE con Coomassie Blue GR250



**Figura 2.** Flujoograma de producción y purificación de Bm86r-uy

### ❖ 6.3 Evaluación de la respuesta inmune mediante ELISA y Western Blot.

Para cumplir con tal objetivo las inmunizaciones se realizaron en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Miguel C Rubino. Se diseñó un experimento con 6 terneros machos de 7 meses de edad raza Hereford (90 a 100 kg aproximadamente) criados especialmente con este propósito por el instituto M.C Rubino(alimentados con ración balanceada 16%). Se dejaron 3 animales control y 3 animales vacunados. Los animales inmunizados fueron inoculados los días 0, 10 y 21(ver tabla 1) en forma subcutánea con aproximadamente 100 microgramos de Bm86uy-r. La vacuna se preparó, mezclando 0.5 ml de solución antigénica (Bm86uy-r) en buffer fosfato salino fisiológico (PBS) con 0.5 ml del adyuvante Montanide 888. Posteriormente se mezclaron ambas soluciones mediante Vortex a máxima velocidad durante 10 minutos. Se probó la correcta emulsión de las partes de la vacuna mediante el depósito de una gota de la vacuna sobre un recipiente con agua. Si están bien emulsionadas las soluciones antigénicas y el adyuvante, la gota debería flotar en el agua, conservando su morfología. Los animales controles fueron inoculados únicamente con una emulsión de 0.5ml de PBS + 0.5 ml de Montanide 888.Las inmunizaciones y los sangrados para estudiar la respuesta de anticuerpos están indicados en la tabla 1.

Este protocolo cuenta con la autorización de la CEUA-DILAVE.

**Tabla 1. Diseño experimental del ensayo de inmunización con Bm86uy-r**

Día	Sangrado	Inoculación
0	1	1
10		2
21		3
32	2	
59	3	

Las muestras de sangre obtenidas fueron procesadas luego de su coagulación realizándose centrifugación a 3000 RPM por 20 minutos. Luego de esto se extrajo el suero y se lo dejó en stock a 20°C hasta su utilización.

### **6.3.1 Evaluación de la respuesta inmune mediante estudio de la cinética de anticuerpos por ELISA y de la especificidad por Western Blot.**

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune de los animales a la inoculación de la Bm86uy-r se determinaron los niveles de anticuerpos así como la especificidad de los anticuerpos de los bovinos a la proteína Bm86uy-r inoculada. Para esto se utilizaron las técnicas de ELISA y Western Blot, los protocolos se describen brevemente a continuación y el detalle del procedimiento se encuentra en el anexo 5.

#### **6.3.1a ELISA indirecto para detectar anticuerpos anti Bm86uy-r:**

Para este método se sensibilizaron placas de ELISA (Greinerbio-one) con 100 ng de Bm86uy-r por pocillo y se realizó el bloqueo con PBS-Tween al 5%. Posteriormente se le agregaron 100  $\mu$ l de sueros diluidos 1/6400, se lavó para sacar el exceso de anticuerpos y se incubó con 100  $\mu$ l del conjugado (inmunoglobulinas de conejo (H+L) anti IgG Bovina conjugado a peroxidasa) (A5295 Sigma) en una dilución de 1/10000 como lo recomienda el fabricante. Se lavó nuevamente para sacar el exceso de conjugado y se lo reveló con una solución de Tetramethyl Benzidine (TMB, Novex-HRP, Invitrogen). Se detuvo el revelado agregando 100  $\mu$ l de HCl 1N para luego realizarse la lectura a 450 nm. En cada placa se incluyó: a) curva de suero estándar que se realizó con 20  $\mu$ l de cada animal vacunado de las sangrías 2 y 3 diluyéndolo 12 veces comenzando 1/1600; b) control de conjugado; c) control de bloqueo; d) control de actividad peroxidasa del antígeno recombinante; e) suero bovino positivo inmunizado con GAVAC (vacuna cubana que tiene como antígeno Bm86 clonado de garrapatas nativas cubanas).

#### **6.3.1b Western Blot para detección de anticuerpos anti-Bm86uy-r:**

Para el análisis del WB las proteínas fueron separadas mediante SDS PAGE al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen). Se realizó un sistema de

transferencia semiseca utilizándose el Semidrive Thermoscientific conforme descrito en el anexo 5. La membrana obtenida conteniendo la Bm86uy-r se cortó en tiras y se bloqueó con una solución de leche descremada (preparación conforme anexo 5) Estas tiras fueron luego desafiadas con una dilución 1/100 de los suero de los bovinos (vacunados y control) obtenidos en las sangrías 1, 2 y 3. Se realizó la incubación Over Night y luego se lavaron con PBS-Tween al 0.5%. A las tiras se las desafió con anti-IgG bovina conjugada peroxidasa y se realizó luego un nuevo lavado con PBS-Tween 0.5%. Posteriormente se realizó el revelado con TMB como se indica en el anexo 5

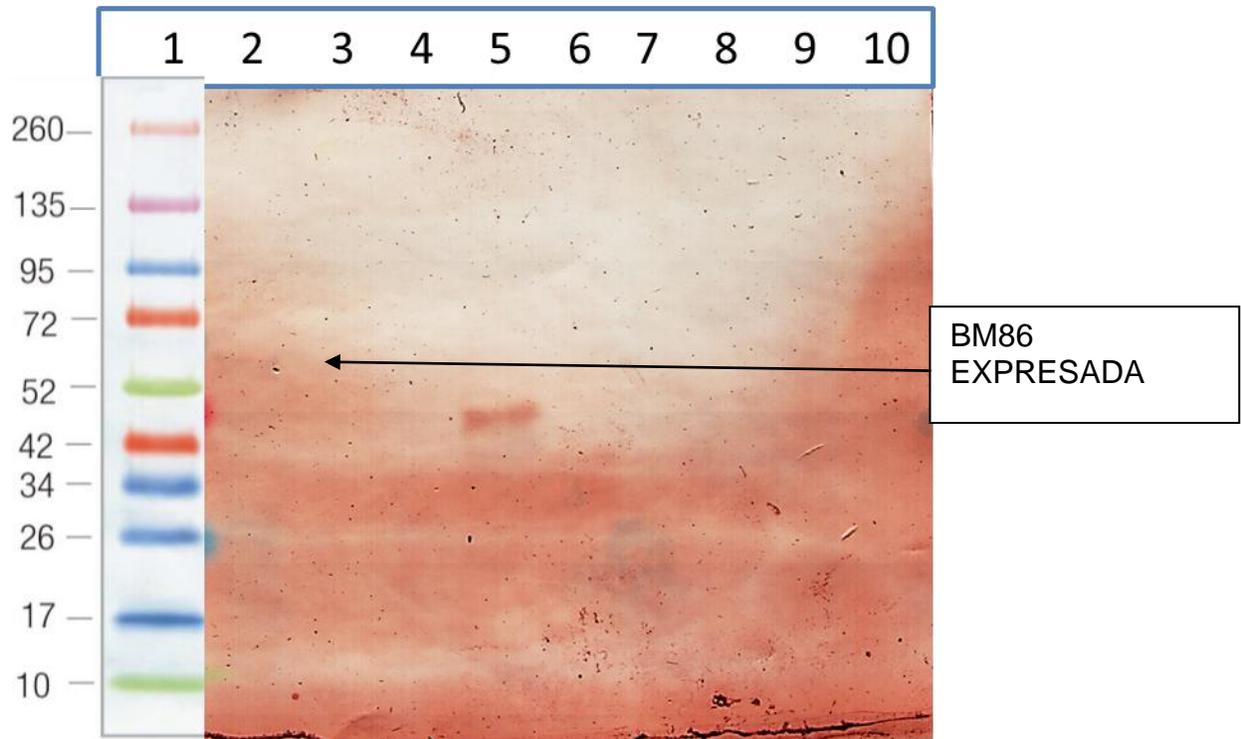
## **7. Resultados**

---

### **❖ 7.1 Producción de la proteína Bm86uy-r**

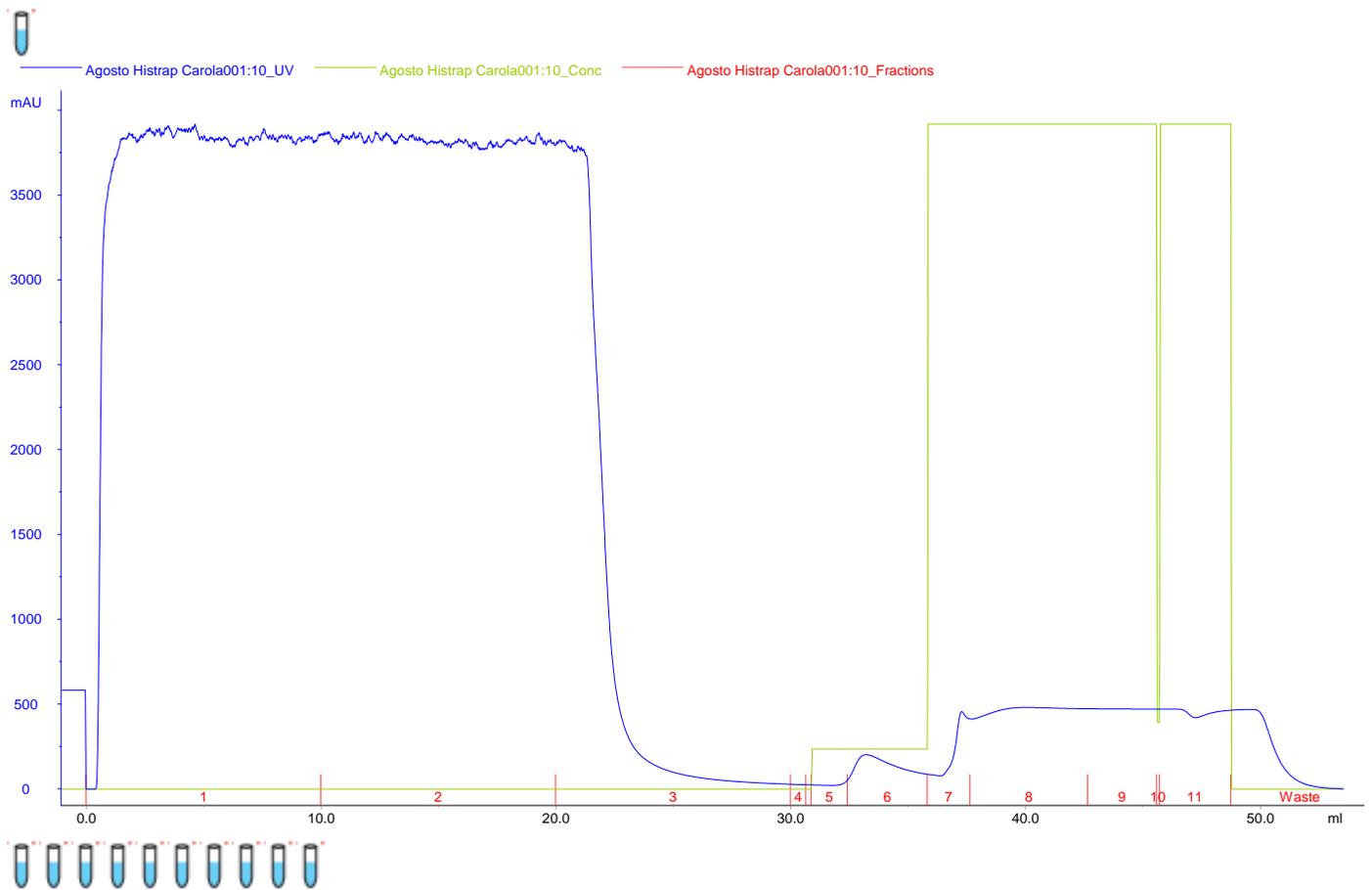
La proteína Bm86uy-r se expresó a 37°C realizando agitación constante de 160 rpm, con adición de IPTG en una concentración de final de 1mM y con un tiempo de incubación de 2 horas.

La expresión de Bm86uy-r se analizó mediante Western Blot como se detalla en el punto 6.1.1 de la metodología usando un anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina que reconoce específicamente la cola de histidinas. Esto se observa en la figura 3 donde se observa una banda de aproximadamente 70 Kda en el carril 2 correspondiente a la fracción soluble a las 2 horas de realizada la inducción. Esta banda coincide con el peso molecular de la Bm86. Se utilizó como control positivo la proteína recombinante glutathione S-transferase (GST) por poseer cola de histidina.

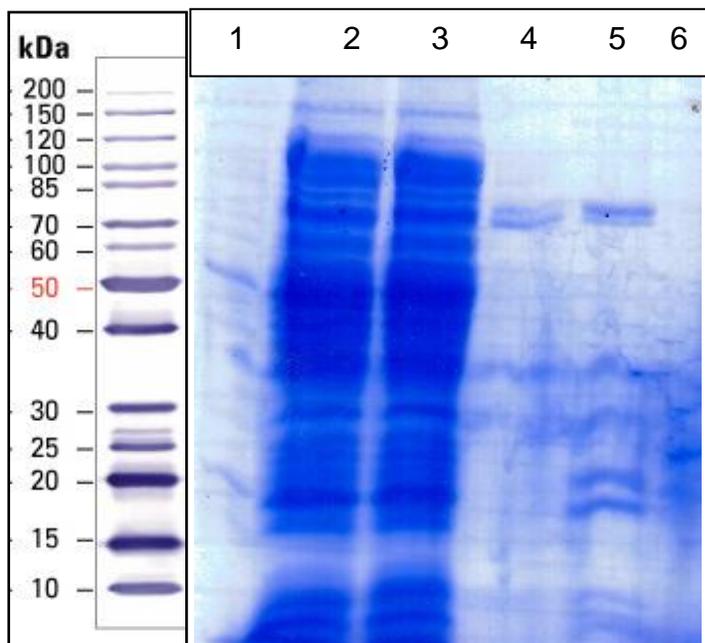


*Figura 3. Expresión de Bm86 en E.coli ipLys a 37°C 1mM IPTG, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: sobrenadante 2 horas luego de sonicatedo, carril 3: sobrenadante 4 hs luego de sonicatedo, carril 4: sobrenadante O/N, carril 5: control positivo (GST-r) carril 6: vacío, carril 7: pelet 2 hs luego de sonicatedo, carril 8: pelet 4 hs luego de sonicatedo, carril 9 pelet incubación over night(ON) luego de sonicatedo.*

Confirmada la expresión la proteína fue purificada por cromatografía de afinidad (de acuerdo al punto 6.1.2 de la metodología). El cromatograma obtenido en la primera purificación se observa en la figura 4. Podemos observar en el tubo 7 la liberación (elusión) de la proteína Bm86uy-r. Posteriormente se confirmó la presencia de la Bm86uy-r mediante SDS PAGE (figura 5).



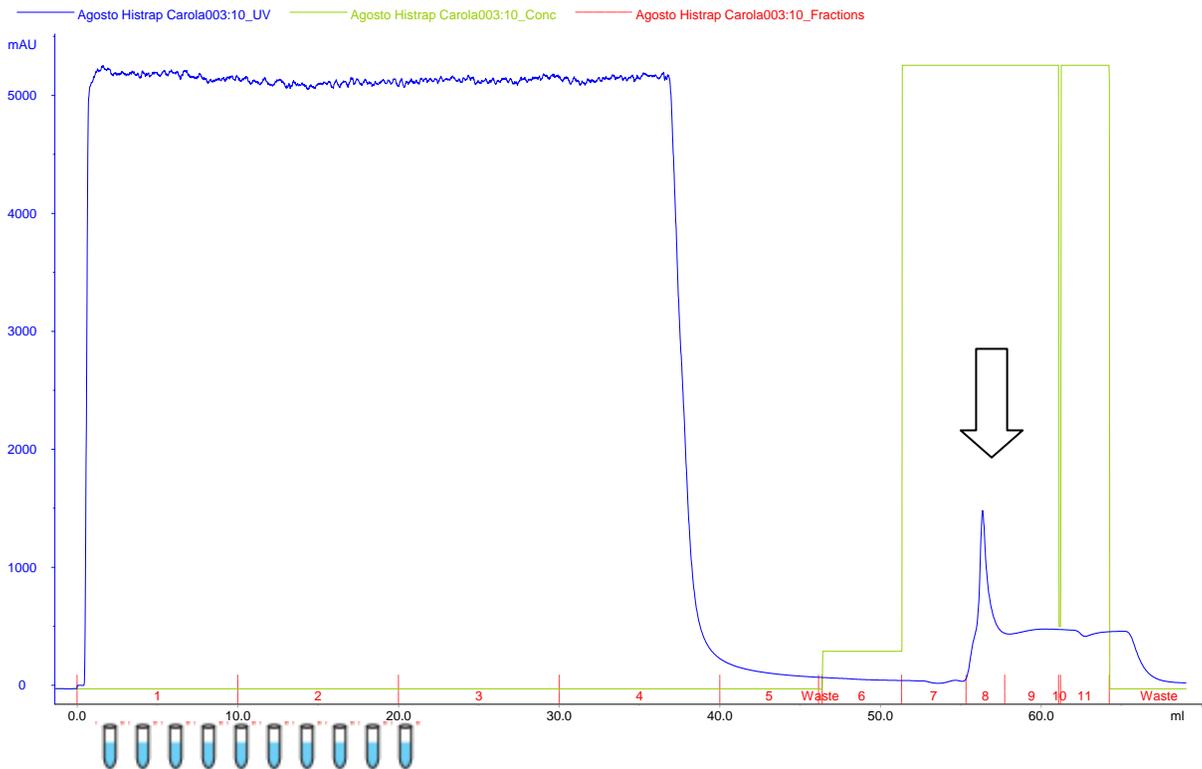
**Figura 4.** Cromatograma de la proteína recombinante Bm86uy-r por columna de Histrap purificada. Obsérvese el pico de salida de la proteína recombinante Bm86u-r y luego de la adición del imidazol (línea verde= absorvancia por agregado de midazol- línea azul absorvancia producida por proteína que a traviesan la columna y posteriormente son colectadas en diferentes tubos de colecta (eje de las X))



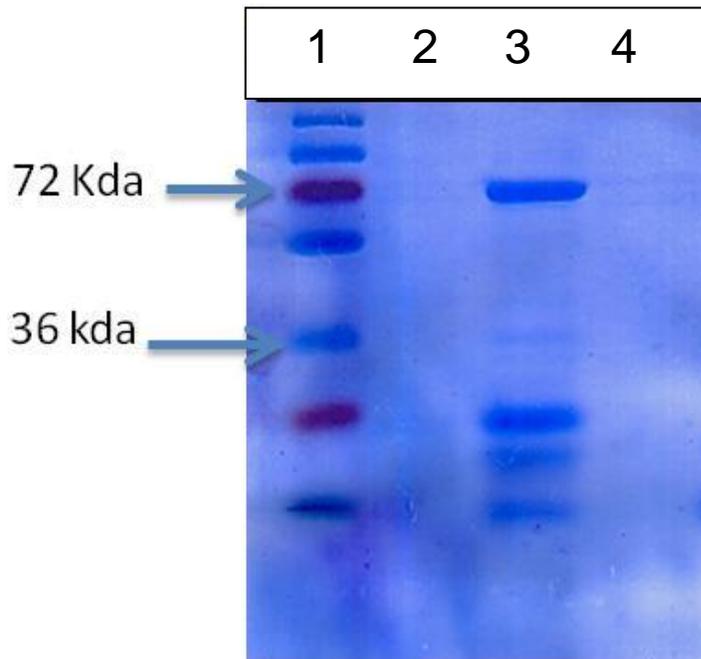
**Figura 5.** SDS-PAGE al 12% de la producción de *Bm86uy-r* en *E.coli BL21*: 1) PM Kda, 2) muestra sonicada, 3) no retenido en la columna His- Trap(tubo 2), 4) tubo 6, 5)tubo 7, 6) tubo 8.

En el SDS-PAGE obtenido (figura5) se mostró que ambos picos corresponden a la proteína Bm86 (figura 5 carril4 y 5) pero que las cantidades recuperadas son bajas, por lo que se decidió aumentar el volumen de cultivo que se pasó por la columna con la finalidad de aumentar la cantidad de proteína purificada. Con esto si se logró una buena purificación de la *Bm86uy-r* (figuras 6 y 7) en cantidades aceptables.

Para esta segunda purificación se utilizó 2L de volumen de cultivo lográndose mayor cantidad de proteína purificada. Esto se observa en el cromatograma de la figura 6 donde en el tubo 8 (T8b)se observa un pico de absorvancia correspondiente a la Bm86 eluida lo cual se confirmó por SDS page



**Figura 6.** Segundo Cromatograma de la proteína recombinante Bm86uy-r por columna de Histrap purificada, utilizando mayor volumen de cultivo. El pico de salida de la proteína recombinante Bm86uy-r se observa en el pico indicado por la flecha eluida (desprendida por la columna) con Imidazol 500 mM.

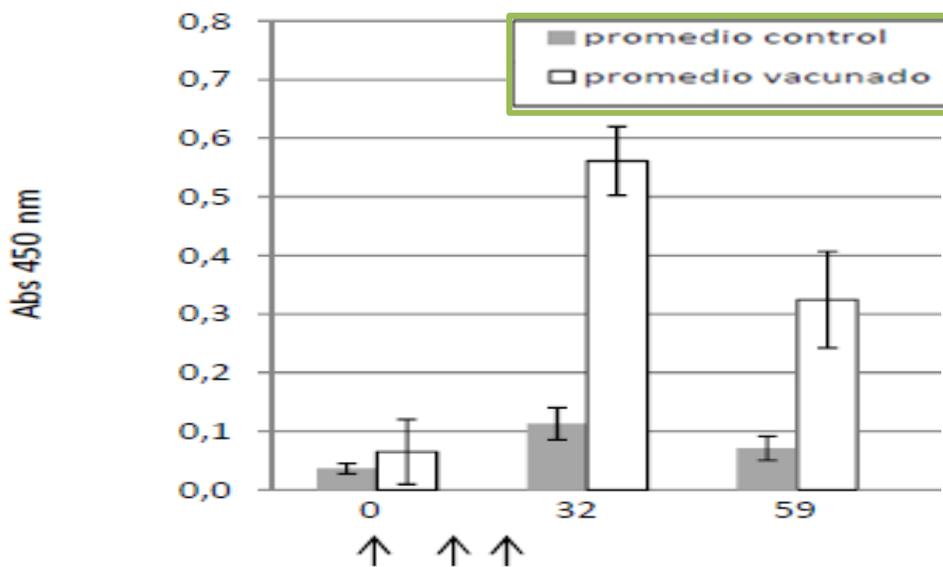


**Figura 7.** SDS PAGE 12% del 2 cromatograma de purificación de Bm86uy-r. (figura 6).  
 1) Peso molecular, 2) tubo 7 de colecta pre-elusión de la proteína; 3) tubo 8 donde está Bm86uy-r eluida de la columna por 500mM de Imidazol; 4) tubo 9 pos elución de la Bm86uy-r indicando que no queda nada pegado a la misma.

## ❖ 7.2 Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante ELISA y Western Blot:

### 7.2.1. Respuesta sistémica de anticuerpos específicos contra Bm86uy-r evaluada mediante ELISA

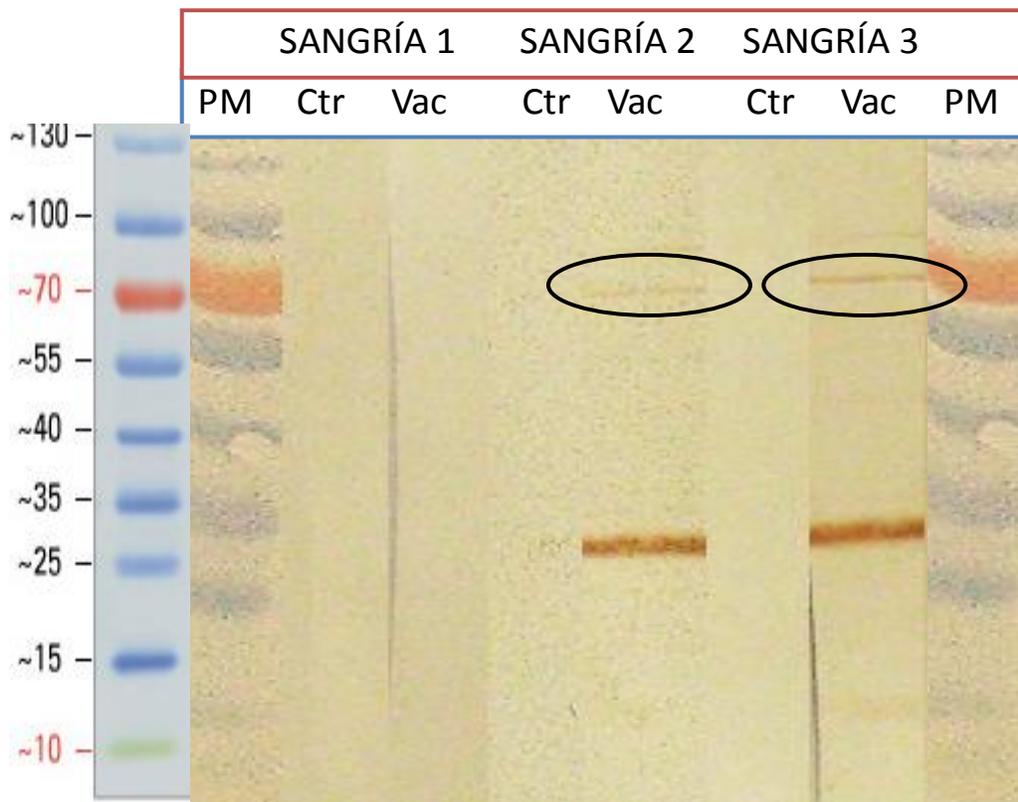
Para medir la respuesta inmune se realizó un ELISA con las muestras de sangre extraídas los días 0 32 y 59, tanto a los animales control como a los vacunados con Bm86uy-r (conforme punto 6.1.3 de la metodología). Analizando los datos obtenidos podemos observar un incremento de los niveles de anticuerpos de los animales vacunados en comparación con los niveles de los animales control. Se observa un incremento rápido de anticuerpos en la segunda sangría (día 32) la cual se mantienen durante 59 días.



**Figura 8.** Diferencia entre los niveles de anticuerpos anti Bm86 de los sueros de animales vacunados y no vacunados determinados por Elisa. Las flechas indican la primera segunda y tercera inmunización que serían los días 0 10 y 21 del experimento. Las barras representan el valor medio del grupo y las líneas verticales la desviación estándar.

### 7.2.2. Respuesta sistémica de anticuerpos específicos contra Bm86uy-r evaluada mediante Western Blot.

En el Western se confirma la presencia de anticuerpos observados en el Elisa son anti Bm86uy-r debido a que se observa una banda en las muestras obtenidas de los animales vacunados con un peso molecular de aproximadamente 70 Kda, (Ver figura 9). Dicha banda no se observa en las muestras obtenidas de los animales control, ni en las muestras obtenidas en la primera sangría debido a que aún no existían anticuerpos frente a la Bm86uy-r (sin desafío aun)



**Figura 9.** Western blot para detección de anticuerpos anti *Bm86uy-r* en sueros de animales del grupo vacunado y control. Sangría 1, 2 y 3 corresponden a los días 0, 32 y 59 respectivamente del experimento de vacunación

## 8. Discusión

---

En primer lugar queremos resaltar que se logró producir exitosamente la Bm86uy-r, utilizarla en un ensayo de vacunación y evaluar la respuesta inmune. Por lo que podemos afirmar que se cumplió el objetivo general y los específicos de este trabajo.

En primer lugar debemos destacar que el desarrollar una vacuna recombinante utilizando material génico de garrapatas nativas es importante debido al gran polimorfismo del locus de Bm86. El mismo ya fue demostrado en Latinoamérica para garrapatas provenientes de Brasil, Argentina, Uruguay, Venezuela y Colombia. Donde se detectaron variaciones de entre 1,76 a 3,65% en las secuencias de nucleótidos del gen, y un 3.4 a 6.8% en secuencias de aminoácidos. (Patarroyo, 2005).

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo de tesis se logró la expresión de la BM86uy-r en *E.coli* BL21 (DE3). Las condiciones de expresión fueron a 37°C, con agitación constante de 180 rpm, induciéndose la expresión de la proteína con el agregado de IPTG en una concentración de final de 1mM, y tiempo de 2 horas. Posteriormente el cultivo fue centrifugado y sonificado obteniéndose la proteína de 70 kda en la fracción soluble, confirmándose mediante Western Blot.

Esta proteína fue descrita por primera vez por Willadsen y col en 1989. Estos autores caracterizaron y purificaron la Bm86 nativa de extractos de intestino de garrapatas de *R. microplus* Australianas. En estos estudios se describió por primera vez la Bm86 como una glicoproteína de membrana con un peso molecular de 89.000 KD.

Posteriormente otro grupo de investigadores expresó la proteína en cuerpos de inclusión de *E.coli* realizando un ensayo de vacunación. Los resultados fueron una disminución del 24% en el número de garrapatas frente al grupo control y un 77% de reducción en su capacidad reproductiva. Por otro lado estos mismos autores demostraron que los anticuerpos de hembras parcialmente ingurgitadas lisaban las

células intestinales de garrapatas adultas, afectándola digestión de la sangre por el parásito. (Rand y col, 1989).

Otros grupos de investigadores han logrado expresar Bm86uy recombinante en diferentes sistemas de expresión. Como ser en células de insectos usando el sistema baculovirus. (Richardson y col, 1993) y *Pichia pastoris*. (Rodriguez y col, 1994, Cunha y col. 2010 y 2012), *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger*. (Turnball y col, 1990)

El antígeno Bm86r producido en *P. pastoris* al ser analizado por SDS-PAGE se observa una banda de un peso aproximado de 90 a 100 Kda. Esta diferencia con respecto a nuestro ensayo en cuanto al peso molecular de la Bm86uy-r obtenida se explica debido a que el sistema de expresión en *P. pastoris* tiene la capacidad de glicosilar la proteína producida. Sin embargo luego de un tratamiento de desglicosilación se obtuvo una única banda de 70 Kda, que corresponde al peso molecular de la proteína Bm86r sin la presencia de los oligosacáridos N-ligados. Al inocularse animales con esta recombinante se logró un 50% de disminución en peso de teleóginas caídas, 31% de disminución en número de garrapatas sobre los animales, 70% de disminución en capacidad reproductiva de las garrapatas. (Roriguez y col, 1994)

La Bm86 expresada en los trabajos de Cunha y col. 2010 y 2012 fue expresada también en *P. pastoris* presentando un peso molecular de 80 Kda. Los autores explican que se debe a que la Bm86 obtenida en el sistema de expresión utilizado por ellos sufre glicosilación lo que la hace una molécula más grande. Estos investigadores afirman que el peso molecular debería ser de 69.1 Kda si se predice el peso molecular usando CLC Viewer 6.0.2 software. (Cunha y col., 2010).

Otro grupo de investigadores ha logrado la expresión de Bm86 en un sistema basado en el *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger*, obteniéndose también una Bm86-r glicosilada, similar a la nativa, con un peso molecular de entre 83 y 87kd. (Turnball y col, 1990) En estos trabajos citados se marca una diferencia con nuestro estudio pues en estos las proteínas obtenidas están glicosiladas. En el anexo 7 se puede observar un resumen de los distintos sistemas de expresión citados en esta discusión.

La proteína recombinante expresada en nuestro trabajo no está glicosilada debido a que el sistema de expresión en *E. coli* no permite glicosilar proteínas (Cunha y col, 2010). Por lo tanto el peso molecular obtenido de alrededor de 70 Kda nos indica que estamos frente a la presencia de la Bm86uy recombinante.

El grupo de Willadsen y col 1995 expresó la Bm86 en *E.coli* cuya recombinante obtenida dio origen a la vacuna Australiana (Tick Gard).

Por lo tanto la glicosilación o no de la proteína recombinante obtenida no sería un factor determinante en los niveles de eficacia y protección de la vacuna.

Luego de expresar la proteína nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar la capacidad inmunogénica de la recombinante Bm86 obtenida. El estudio de la respuesta humoral se realizó mediante Elisa para determinar los niveles de anticuerpos y la persistencia de estos en el tiempo. También se determinó la especificidad de los anticuerpos observado utilizando Western Blot.

La técnica de Elisa nos permitió cuantificar la respuesta de anticuerpos a lo largo del tiempo(ver figura 8). Observando los resultados de dicha técnica vemos que ya a los 30 días de la primera inmunización se observan niveles altos de anticuerpos anti Bm86 en el suero de los animales vacunados, no así en los sueros control. Sumado a esto observamos que la persistencia de dichos anticuerpos en el suero de los animales vacunados se prologa por al menos 59 días.

En un trabajo realizado por De la Fuente y col (1999) en un ensayo de campo en Cuba en bovinos vacunados en condiciones de producción estableció una correlación negativa entre la respuesta de anticuerpos a la vacuna y la fertilidad de las garrapatas. Este resultado para De la Fuente permite la evaluación de la eficacia de la vacuna a través de la medición de los títulos de anticuerpos anti-Bm86 en los animales vacunados. Lo que nos permite suponer que la Bm86uy-r se comporta como un buen inmunógeno.

Al realizar el Western Blot se pudo detectar que anticuerpos anti Bm86uy-r en las muestras de suero obtenidas de los animales vacunados durante las 3 sangrías reconocían una proteína con un peso molecular de 70 Kda correspondiente a la

Bm86uy-r, no observándose en los animales control (ver figura 9). Esto nos habilita a afirmar que Bm86uy-r es inmunogénica, generando anticuerpos específicos.

La eficacia y protección en las vacunas comerciales desarrolladas está asociada a la presencia de anticuerpos específicos frente a esta proteína.

Por otro lado el hecho de que para obtener la Bm86uy-r utilizamos el gen nativo podemos presumir que esta vacuna recombinante desarrollada contribuirá al control de *R. microplus* en nuestro país y la región

Estudios de campo sobre costo beneficio realizados en Cuba demostraron que la aplicación de la vacuna Gavac (Bm86 como antígeno) redujo el uso de acaricida en un 60%, bajó la infestación por *R. microplus*, disminuyó la transmisión de Babesiosis y se obtuvo una ganancia de 23.4 dólares/animal/año. Por lo que el impacto económico y ambiental por la disminución del uso de acaricidas significaría para nuestra región un gran beneficio.

## 9. Conclusiones

---

Como conclusiones finales podemos resaltar:

- Se logró expresar, purificar y caracterizar inmunológicamente la Bm86 recombinante en *E.coli*, con un peso molecular de 70Kda.
- La Bm86uy-r obtenida es un buen inmunógeno.
- La Bm86uy-r tiene la potencialidad de ser usada en una vacuna frente al *R. microplus*.

## 10. Anexos

---

### ANEXO 1:

#### ❖ *Protocolo para transformación por shock térmico.*

1. Retirar bacterias del -70°C, pasarlas a hielo
2. Colocar 2µl del ADN ligado al plásmido, sobre *E. coli* competente dejar 20 minutos en hielo
3. En estos 20 minutos poner 1ml de LB s/ATB(Anexo 6) en ependorf estéril
4. Pasar las bacterias + plásmido 40seg a 42°C y luego 1 min en hielo
5. Posteriormente y en forma rápida pasar las bacterias + plásmido a los ependorf preparados en el paso 3.
6. Incubar 1 hora a 37°C
7. Posteriormente se centrifugan a 2200g por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y sembrar en placas de LB/Agar.
8. Incubar en estufa a 37°C toda la noche

## ANEXO 2:

### ❖ *Linajes bacterianos utilizados*

<b>Linaje</b>	<b>Características genotípicas</b>	<b>Utilidad</b>	<b>Compañía</b>
<b>BL21(DE3) pLysE</b>	F-, omp T, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> -, m <sub>B</sub> -), gal, dcm, (DE3), pLysE, Cam	Expresión de proteínas	Invitrogen
<b><i>E. coli</i> (DE3) Rosseta</b>	F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), gal, dcm, lacY1, (DE3), pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Expresión de proteínas conteniendo codones raros	Novagen
<b>BL21-CodonPlus (DE3)-RIL</b>	<i>E. coli</i> B F-, ompT, hsdS (rB-,mB-), dcm+, Tet <sup>R</sup> , gal, I (DE3), endA, Hte, [argU, ileY, leuW, Cam <sup>R</sup> ]	Expresión de proteínas conteniendo codones raros (genomas ricos en AT)	Stratagene
<b><i>E. coli</i>BL21-CodonPlus (DE3)-RP</b>	<i>E. coli</i> B, F-, ompT, hsdS (rB-,mB-), dcm+, Tet <sup>R</sup> , gal, I (DE3), endA, Hte, [argU, ileY, leuW, Cam <sup>R</sup> ]	Expresión de proteínas conteniendo codones raros (genomas ricos en GC)	Stratagene

### **ANEXO 3:**

#### **❖ *Protocolo para preparación de linajes de células competentes.***

1. A partir de placas de Lura Bertani (LB)/Agar sembradas con menos de 12 horas, se prepara un pre-inóculo en 100 ml de medio LB depositando una colonia.
2. Se llevan al shacker a 37°C, 180 rpm por aproximadamente 3 hs, hasta que llegue a una OD 600 aproximadamente de 0.3-0.4.
3. Transferir a tubos estériles de 50ml, poner en hielo
4. Centrifugar a 2700g /10min a 4°C
5. Homogenizar el pellet con 30ml de MgCl-CaCl<sub>2</sub> (80mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM CaCl<sub>2</sub>)
6. Centrifugar a 2700g 10min a 4°C
7. Descartar el medio.
8. Homogenizar por vortex suave en 2ml de 0.1M de CaCl<sub>2</sub> por cada 50ml del cultivo original.
9. Congelado de células competentes: juntar los 2ml de cada tubo del punto 8. Agregar 140µl de DMSO por cada 4ml de células homogenizadas, mezclar suavemente, dejar por 15 minutos en hielo. Luego de los 15 minutos repetir el procedimiento. Alicuotar de a 50µl y congelar en nitrógeno líquido.
10. Stockear a -70°C hasta su uso

## ANEXO 4:

### ❖ *SDS y Western Blot test de expresión(protocolo estándar)*

#### **Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes(SDS-PAGE):**

Para la electroforesis en geles de acrilamida se siguió la metodología descrita en Antibodyes

Se utilizó una cubeta Thermo Scientific vertical systems Owl P8DS, con geles separadores al 12% y geles concentradores al 5%.

Las muestras se incubaron a 70°C por 5 minutos con el buffer de muestra (Bio rad) SDS-PAGE 5X, para realizar la desnaturalización. Se agitaron y centrifugaron por unos segundos varias veces para luego cargarse junto al marcador de peso molecular Page Ruler Unstained (Fermentas). Para la electroforesis se sumergió el gel en la cuba con buffer de corrida (Bio rad), se aplicó un voltaje de 100 V cuando las muestras estaban en el gel concentrador al 5% y de 150 V cuando las muestras estaban en el gel separador al 12%, durante aproximadamente 2 horas

Tinción de proteínas en geles de acrilamida:

Se utilizó una solución de azul de Coomassie Brilliant Blue R-250, 1% (p/v), metanol 40% y ácido acético 10% para la tinción de los geles de acrilamida, la cual se realizó por 1 hora como mínimo y 24 horas como máximo, a temperatura ambiente.

Se destiñeron los geles a temperatura ambiente, con agitación suave en una solución acuosa de metanol al 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Se utilizó vidrio y celofán para secar los geles a temperatura ambiente, para posteriormente escanear las imágenes

Electro transferencia de proteínas:

Después de la electroforesis SDS-PAGE las proteínas se transfirieron desde los geles a las membranas de nitrocelulosa. Este procedimiento se realizó de forma semiseca, siguiendo la metodología de Antibodies: a Laboratory Manual.

La transferencia semiseca se realizó mediante el SemidriveThermoscientific.

Finalizada la SDS-PAGE, se procedió al montaje del sandwich sumergido en buffer de transferencia (Bio rad) desde el cátodo hacia el ánodo como sigue: 3 piezas de papel Whatman, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, y 3 piezas de papel Whatman. Mediante una varilla de vidrio se eliminaron por presión las burbujas existentes dentro del sándwich. Finalmente se cubrió el montaje con la tapa de seguridad y se mantuvo durante 1 hora a 200V.

Sistemas de revelado:

Luego de realizada la transferencia a la membrana de nitrocelulosa se tiñó la membrana con Fast Green (Biotech) diluido en 25% metanol, 10% ácido acético para comprobar la presencia de proteínas y se hicieron las marcas correspondientes al marcador de peso molecular, se lavaron las membranas con PBS 1X hasta la desaparición de los colorantes (5-10 minutos, 3 veces).

Posteriormente se procedió a bloquear los grupos reactivos de la nitrocelulosa adicionando una solución de bloqueo con leche descremada al 5%, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.

Para la detección de Bm86 uy-r se utilizó el anticuerpo monoclonal Anti his- C term -HRP (Invitrogen) y fue revelado utilizando Diamino Benzidina (DAB) como sustrato.

La metodología empleada al utilizar DAB fue: se preparó una solución de bloqueo con PBS-Tween 20- 0.05% (PBS-T) y leche descremada en polvo al 0.5%, se dejó 1 hora a temperatura ambiente, con agitación suave. Finalizado el tiempo de bloqueo, las membranas se lavaron con PBS-T durante 5 minutos, tres veces. A continuación la membrana se

incubo toda la noche con el anticuerpo primario Anti his- C term –HRP (Invitrogen) diluido 1:500 (v/v) a 4°C. Al cabo de la incubación se repitió el lavado de las membranas con PBS-T durante 5 minutos, 3 veces. Se preparó la solución de revelado que consiste en 10 ng de DAB diluidos en 10 ml de Tris 50 Mm (pH 7.6) y 10 µl agua oxigenada 30%. Esta solución se vertió sobre la membrana de manera que quedara cubierta completamente, cubriéndola con papel de aluminio no permitiendo la entrada de luz, se incubó en agitación hasta la aparición de bandas en ese momento se detuvo la reacción descartando la solución y lavando con PBS 1X en abundancia.

El revelado con NBT-BCIP consistió en que luego de finalizado el bloqueo, las membranas se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos, tres veces. A continuación la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario Anti his- C term –HRP (Invitrogen) diluido 1:500 (v/v) a 4°C. Al cabo de la incubación se repitió el lavado de las membranas con PBS 1X durante 5 minutos, 3 veces, se incubó por 5 minutos en buffer de revelación. Esta solución se vertió sobre la membrana de manera que quedara cubierta completamente, cubriéndola con papel de aluminio, se dejó 15 minutos con agitación leve. Se preparó la solución de revelado: 1 ml de buffer de revelación, 6 µl NBT, 3 µl de BCIP. La solución se adicionó a la membrana hasta que se observaron bandas respectivas, en ese momento se detuvo la reacción descartando la mezcla y añadiendo agua destilada con abundancia.

## **ANEXO 5:**

### **❖ Protocolo para ELISA**

- 1) Se sensibilizaron las placas de ELISA (Greinerbio-one) con 100 ng de Bm86uy-r por pocillo, diluido en tampón carbonato bicarbonato 50 mM con un pH de 9,6, dejando ON a 4°C en cámara húmeda.
- 2) Se realizaron 3 lavados con PBS 1X + Tween 20 al 0,1% (PBST).
- 3) Se bloqueó con PBS Tween 20 al 5 % dejando ON a 4°C en cámara húmeda para lavarse nuevamente con PBS Tween 0.5% por 3 veces.
- 4) Se colocó 100 µl de suero problema diluido 1/6400 en PBS-Tween 0.5% y se dejó incubando a 37°C por 1 hora en cámara húmeda.
- 5) Se realizaron 3 lavados usando 200 ul de una solución de lavado conteniendo PBS-Tween 0.5%.
- 6) Luego se agregó 100 µl del conjugado (inmunoglobulinas de conejo (H+L) anti IgG Bovina conjugado a peroxidasa) (A5295 Sigma) diluido 1/10000 en PBS Tween 0.5% y se dejó incubando a 37°C por 1 hora, en cámara húmeda.
- 7) Luego las placas se lavan 3 veces con PBS-Tween 0.5%.
- 8) La unión específica conjugado anticuerpos de los animales se reveló con 100 µl de Tetramethyl Benzidine (TMB, Novex-HRP, Invitrogen) durante 20 minutos en cámara oscura a temperatura ambiente. Se detuvo el revelado agregando 100 µl de HCl 1N para luego realizarse la lectura a 450 nm.

### **❖ Protocolo Western Blot evaluación de respuesta inmune:**

- 1) Las proteínas fueron separadas mediante SDS-PAGE al 12%
- 2) Después de la electroforesis SDS-PAGE las proteínas se transfirieron desde los geles a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia semiseca (SemidriveThermoscientific). Para la misma, se precedió al montaje del sándwich sumergido en buffer de transferencia desde el cátodo hacia el ánodo como sigue: 2 piezas de papel *Whatman*, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, y 2 piezas de papel *Whatman*, mediante una varilla de vidrio se eliminaron por presión las burbujas existentes dentro del

*sándwich*. Finalmente se cubrió el montaje con la tapa de seguridad y se mantuvo durante 1 hora a 200V

- 3) La membrana obtenida fue cortada en tiras de 5mm de ancho y se realizó el bloqueo con una solución de bloqueo consistente en PBS-Tween 20 al 0.05% (PBS-T) y leche descremada en polvo al 0.5%
- 4) Las tiras conteniendo la proteína recombinante fueron luego desafiadas con el suero de los bovinos vacunado y control (sangrías 1, 2 y 3). Se utilizaron 2 diluciones, 1/500 y 1/1000. Las tiras se incubaron con las correspondientes diluciones de suero toda la noche a 4°C.
- 5) Posteriormente se lavaron las tiras con solución de lavado de PBS-Tween 0.5% durante 5 minutos cada uno.
- 6) Se colocó anti-IgG bovina conjugada con fosfatasa alcalina (1/10000), y se dejó las tiras por 1 hora, a temperatura ambiente.
- 7) Las tiras fueron lavadas nuevamente con PBS Tween-0.5%.
- 8) Finalmente se realizó el revelado con Diaminobenzidine (DAB) Se preparó la solución de revelado que consiste en 10 ng de DAB diluidos en 10 ml de Tris 50 mM (pH 7.6) y 10µl agua oxigenada 30%. Esta solución se vertió sobre la membrana de manera que quedara cubierta completamente, cubriéndola con papel de aluminio no permitiendo la entrada de luz, se incubó en agitación hasta la aparición de bandas. En ese momento se paró la reacción descartando la solución y lavando con PBS 1X en abundancia.

## **ANEXO 6:**

### **❖ Buffers**

- PBS 1X: cloruro de sodio 140 mM, cloruro de potasio 2,7 mM , fosfato de disódico 10 mM, fosfato de potasio monobásico 1,8 mM
- Buffer de muestra para SDS-PAGE 5X: 15% β mercaptoetanol, 15 % SDS, 1.5% Bromophenol blue, 50% glicerol.
- Buffer de corrida: Tris base 25 mM, glicina anidra 192 mM y SDS al 1% (p/v) a pH 8,3.

- Buffer de ligación: fosfato monosódico 20 mM, cloruro de sodio 0.5 M, Imidazole 20 mM (pH 7.4)
- Buffer de transferencia semiseca: Tris base 48mM, glicina 39mM, SDS 0.037%, metanol 20%.
- Buffer de revelación NBT-BCIP (Amresco): Tris- HCl 100 mM, cloruro de sodio 100mM, cloruro de magnesio 25mM

### ❖ Soluciones

- Ampicilina ( Laboratorio ION): se prepara una solución madre de 100 mg/ml en agua destilada, se filtra, y conserva a -20C.
- Isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) (Amresco): se prepara una solución madre de 0.1M de IPTG en agua destilada, se filtra y se conserva a -20°C.
- Fast Green: se prepara una solución de 0.1gr de Fast Green diluido en 25ml de metanol, 10ml de ácido acético y 65 ml de agua destilada

### ❖ MEDIOS DE CULTIVO:

Todos los componentes fueron auto clavados a 121°C/ 1 atmosfera por 15 minutos y mantenidos a temperatura ambiente hasta su uso.

- Luria Bertain (LB) líquido: 1 gr de cloruro de sodio (Carlo Erba), 1 gr triptona (BD), 0.5 gr extracto de levadura (BD), 100 ml de agua destilada, pH 7.5
- Luria Bertain (LB)-agar (Invitogen): 100 ml de LB líquido, 1.5 gr de agar bacteriológico.

## ANEXO 7:

### ❖ Resumen de los principales sistemas de expresión de Bm86

Sistema De Expresión	Proteína obtenida	Adyuvante usado en la vacuna	Plan de vacunación	Porcentaje de protección obtenida	Autores
<i>E.coli</i>	Proteína de fusión en cuerpos de inclusión. Pm total de 143 kDa consistente en 651 aminoácidos de <i>E. coli</i> /3-galactosidasa, 599 aminoácidos de Bm86 y 19 aminoácidos codificados por otras partes del vector	Primer y segunda inoculación Freund's complete adjuvant. La tercera en 0.9% NaCl.	Tres inoculaciones (2 IM y la última SC) separadas por 4 semanas.	24 % (disminución en el número de garrapatas frente al grupo control)	Rand y col., 1989.

<i>Aspergillus nidulans y niger</i>	Bm86-r glycosilada de entre 83 y 89 kda.	No se utilizó	No se realizó	No se evaluó	Turnball y col., 1990
<i>Pichia pastoris</i>	Proteínaglicósilada formando partículas de entre 17 y 45 nm	Primera inoculación con Adyuvante completo de Freund, 2ª y 3ª con adyuvante incompleto de Freund	Tres inoculaciones IM: una en el día 0, la 2ª en la cuarta semana y la 3ª en la séptima semana	50% de disminución en peso de teleóginas caídas. 31% de disminución en número de garrapatas. 70% de disminución en capacidad reproductiva	Rodríguez y col., 1994
<i>Pichia pastoris</i>	Proteína glicosilada de 80Kda(SDSp age)	Montanide	Aplicación IM en las semanas 0, 2 y 4.	31%	Cunha y col., 2012

## 11. Bibliografía

---

1. Benavides U, Acevedo C, Parizil, Seixas A, Masuda A, da Silva Vaz Jr (2011). Determinación del polimorfismo del gen Bm86 de la garrapata del ganado bovino *Boophilus microplus*, en poblaciones de zonas endémicas de Uruguay. Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay
2. Canales M, Almazan C, Naranjo V, Jongejan F, de la Fuente J (2009). Vaccination with recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 ortholog protein, Ba86, protects cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* infestations. *BMC Biotechnology*; 9:29. doi:10.1186/1472-6750-9-29.
3. Cardozo H, Nari A., Franchi M, López A, Donatti N. (1984). Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 20: 4-10.
4. Cordovés C, (1997). Carrapato: controle ou erradicação. 2 ed. Guaíba Agropecuária, 176 p
5. Cunha R, Pérez de León A, Leivas F, da Silva L, Gonçalves A, Andreotti R (2012) Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal; 21: 254-262.
6. Cunha R, Andreotti R, Leivas P (2010) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichiapastoris* *Rev. Bras. Parasitol. Vet*; 20: 103-110.
7. Cuore U, Solari M (2013) Poblaciones multirresistentes de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 50: 4-13.
8. De Freitas D, Vaz Ida S, Masuda A (2008) Expression and enzymatic activity of glutathione s-transferase in tissues of *Boophilus microplus* females. *Rev Bras Parasitol Vet*; 2: 99-104.
9. de la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal J, Kocan K, and Sonenshine D (2008) Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* 13: 6938–6946.

10. de la Fuente J, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra J, Kocan K, Willadsen P (2007) A 10-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim. Health Research Reviews*; 8: 23–28.
11. de la Fuente y M Kocan (2006) Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Review Article. Parasite Immunology*; 28:275–283.
12. de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García J, Méndez L, Serrano E, Valdés M, Enriquez A, Canales M, Ramos E, Boue O, Machado H, Leonart R (1999) Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™ Genetic Analysis. *Biomol. Eng.*; 15:143–148.
13. FAO (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Roma, FAO, 51p. *Producción y Sanidad Animal*, 157: 1-51.
14. Fragoso H, Rad H, Ortiz M, Rodríguez M, Redondo M, Herrera L, de la Fuente J. (1998) Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac Vaccine 16 (20): 1990-1992.
15. Furlong J. (2004) Controle estratégico do carrapato dos bovinos. *A Hora Vet*; 23(137): 53-56.
16. García-García J, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodríguez M, Joglar M, Machado H, González L, Valdés M, Méndez L, de la Fuente J (2000). Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*; 18(21):2275-87.
17. García-García JC, Gonzalez IL, González DM, Valdés M, Méndez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni D, Fragoso H, Ortiz M, Rodríguez M, de la Fuente J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol*. 1999. Nov;23(11):883-95.

18. García-García J, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodríguez M, Joglar M, Machado H, González L, Valdés M, Méndez L, Gough M, Kemp D.(1993). Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilusmicroplus* by immunogoldlabeling. J Parasitol. 79(6):900-907.
19. Gonzales J(1995) O controle do carrapato do boi. 2a ed. Porto Alegre: Edição do autor, 235p.
20. Gugliemone A, Robbins R, Apanaskevich D, Petney T, Shao R, Barker S (2010) The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Zootaxa 2528: 1-28.
21. Graf J, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini G, Molento M, Bordin E, Arantes G (2004) Tick control: an industry point of view. Parasitology 129: 427–442.
22. Hajek A, Delalibera Jr, (2012) Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. BioControl; 55:147-158.
23. Jonsson N, (2006) The productivity effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.*, 137: 1-10.
24. Jonsson N, Hhope M (2007) Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 146:3-4.
25. Kunz S, Kemp D, (1994). Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Ver. Sci. Tech.* 13: 1249-86.
26. Lapage G, (1971). *Parasitología veterinaria*. 6a ed. Mexico, Continental, 790p.
27. Martins J, Furlong J (2001) Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilusmicroplus* in Brazil. *Vet Rec.* 149(2)64.
28. Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M (2000) Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect;* 2: 1353–1361.
29. Murrel A, Barker (2003) Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol.* 56(3):72-169.
30. Nari A.(1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet Parasitol* ;57(1-3):65-153.

31. Nari A, Fiel C (1994). Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Montevideo, Hemisferio Sur, 519p.
32. Nari A, (1990). Methods currently used for the control of one-host ticks: their validity and proposals for future control strategies. *Parassitologia*; 32(1): 133-143.
33. Nascimento-Silva M, Alexandre L, Sirlei D, Juliano L, Itabajara da Silva Vaz Jr, Paiva-Silva G, Oliveira P, Sorgine F (2008) BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 149: 599–607.
34. Nuttall P, Trimnell A, Kazimirova A, Labuda M (2006) Anti-tick vaccines: Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasit Immunol.* 28: 155–163.
35. Opdebeeck J, Wong J, Jackson L, Dobson C (1988) “Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle tick *Boophilus microplus*”. *Immunology* 67(3):388-393.
36. Patarroyo J. (2005) Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol*; 37:199-214.
37. Pirali-Kheirabadi K, Haddadzadeh H, Razzaghi-Abyaneh M, Bokaie S, Zare R, Ghazavi M. (2007) Biological control of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi. *Parasitol Res*; 100:1297-1302.
38. Ramos C, Abreu P, Nascimento H. (2004) A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res.* 37:1103-1109.
39. Rand K, Terry M, Alagacone S, Kevin S, Ross T, Peter Willadsen, Gary C (1989). Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 86: 9657-9661.
40. Richardson M, Smith D, Kemp D, Tellam R (1993) Native and baculovirus-expressed forms of the immuno-protective protein BM86 from *Boophilus microplus* are anchored to the cell membrane by a glycosyl-phosphatidyl inositol linkage. *Insect Mol Biol*; 1:139-147.

41. Roberts JA (1968) Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (canestrini). II. Stages of the life cycle of the parasite against which resistance is manifest. *J. Parasitol* 54(4):663-666.
42. Rodríguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Luaces L, Rubiera R, Cordovés C, Sánchez P, Ramos E, Soto A, (1995). Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol.* 57(4):339-349.
43. Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcon V, Sanchez G, Bringas R, Cordoves C, Valdes M, (1994) High-level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotechnol*; 33: 135–146.
44. Sambrook J, Russell D. (2001) *Molecular cloning a laboratory manual*. 3a ed, New York Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p2100.
45. Snelson J (1975). Animal ectoparasites and disease vector causing major reduction in world food supplies. *FAO Plant Protection Bulletin*; 13:103-114.
46. Solari M, Nari A, Cardozo H (1992). *Babesia bigemina* on the production of beef cattle in Uruguay. *Mem Ins. Oswaldo Cruz*: 87(Sup 3): 143-149.
47. Tellam R, Smith D, Kemp D, Willadsen P, (1992). Vaccination against ticks. En: Yong, WK. *Animal Biotechnology*. Boca Raton, CRC, p303–331.
48. Toro-Ortiz R, Itabajara da Silva Vaz Junior, Gonzales JC, Masuda A (1997) Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on tick reproductive efficiency. *Vet. Parasitol*; 69: 297-306.
49. Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA. (2005) A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad spectrum tick vaccine. *Vaccine*; 23: 4329-4341.
50. Trimnell AR, Hail RS, Nuttall PA. (2002) Dual/action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “canceled” antigens. *Vaccine*; 20: 3560-3568.
51. Turnbull F, Sharp P, McInerney B, Smith D, Kemp D, Rand K, Cobon G (1990) Chromatography and generation of specific antisera to synthetic peptides from a protective *Boophilus microplus* antigen. *J Chromatogr*; 512:189-202.

52. Wagland B, Sutherst R, Roberts J (1978) The effect of density on the survival of *Boophilus microplus* on previously unexposed cattle. *Int J Parasitol*; 8 (4): 321-324.
53. Wharton R (1983). Tick-borne livestock diseases and their vectors. Acaricide resistance and alternative methods of tick control. *Wild. Anim. Rev (FAO)*; 36:34-41.
54. Wikel S, Allen J, Khalil H. (1979). Langerhans cells trap tick salivary antigens in tick-resistant guinea pigs. *J Immunol*; 122: 563-565.
55. Willadsen P (2006). Vaccination against ectoparasites. *Parasitology*; 133:9-25.
56. Willadsen P (2004). Anti-tick vaccines. *Parasitology*; 129: 367–387.
57. Willadsen P (2001) The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Vet Parasitol*; 101: 353–367.
58. Willadsen P, (1999). Immunological control of ectoparasites: past achievements and future research priorities. *Genet Anal*; 15: 3-5.
59. Willadsen P, Bird P, Cobon S, Hungerford J (1995) Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*; 110: 43-50.
60. Willadsen P, Heith N, Moore T, Sriskantha A, Spring K, Tellam R, Cobon S (1989). Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry*; 86: 9657-9661.