



CARACTERIZACIÓN DE UNA CISTATINA TIPO II DE POBLACIONES DE *Rhipicephalus microplus* DE URUGUAY

Maestría en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
DMTV CAROLINA ACEVEDO

TUTOR: DR ITABAJARA DA SILVA VAZ JUNIOR (Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS)

COTUTOR: DR. URUGUAYSITO BENAVIDES (Universidad de la República-Udelar)

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de esta tesis y a mi formación.

Especialmente a:

- Mi tutor Dr Itabajara da Silva Vaz, cotutor Dr Uruguaysito Benavides por todos los conocimientos vertidos, la oportunidad de trabajo y abrir las puertas de sus laboratorios.
- A Luiz y Adriana por su tiempo y sus enseñanzas
- A mis compañeros de laboratorio de la UFRGS y principalmente de la UDELAR (Dinora, Rodrigo, Gabriela, Keving, Marcelo, Carolina, etc)
- En especial a Uruguaysito Benavides por ser mi mentor y amigo
- A Veterinaria Libia por permitirme ausentarme varios meses
- A mis hermanas de vida (Ana Paula, Analía, Lorena) por acompañarme.
- A mis amigos hechos en estos años de Maestría (Marinella, Germán, Eduardo) por enseñarme en las primeras etapas de este camino.
- A Martí Cancela por darme buenos consejos.
- A Fernanda Alzugaray por haberme acompañado tantas horas de laboratorio.
- Al tribunal por su atención y tiempo dedicado a la lectura de mi tesis.
- A mi familia, principalmente a mi Madre por ser una mujer genial, ejemplo de trabajo y esfuerzo. A Pablo por acompañarme y apoyarme en esta última etapa del camino.
- **A todos GRACIAS.....**

RESUMEN.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus o garrapata común del ganado bovino causa importantes pérdidas económicas en la industria agropecuaria nacional (estimado en 45 millones de dólares anuales en el año 2006). Sumado a las pérdidas económicas por el daño directo de las garrapatas, el control de este parásito cuenta con situaciones críticas por el uso de compuestos ixodicidas que llevan al desarrollo de resistencia a los mismos, crean residuos químicos en los animales y medio ambiente con el consiguiente riesgo en la salud pública. La búsqueda de nuevas alternativas para su control como el uso de vacunas, está siendo investigada mundialmente. La búsqueda de nuevos antígenos que desarrollen una buena inmunidad protectora es el principal objetivo de la mayoría de los grupos de investigación del mundo.

Las cistatinas son inhibidores reversibles de las cistein proteasas presentes en diversos organismos (mamíferos, nematodos, artrópodos, etc). Se han identificado en varias especies de garrapatas y dentro de éstas, en diversos tejidos y estados del desarrollo de las mismas dentro de su ciclo biológico. Estas moléculas tienen importantes funciones en modular la respuesta inmune del huésped, y participar activamente en el proceso de alimentación de las mismas. Por lo dicho las cistatinas son imprescindibles para la vida de éstos parásitos hematófagos y constituyen candidatos promisorios para ser incluidos como antígenos en el desarrollo de vacunas.

El objetivo general del presente trabajo consistió en la búsqueda de la región codificadora de una cistatina tipo II en poblaciones *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de Uruguay y de la expresión de su proteína recombinante (UrBmcis2-r).

Como estrategia experimental primero se determinó la presencia del ARNm de cistatina tipo II en diferentes tejidos de la garrapatas(carcaza, intestino, glándula salival, ovario) de partenóginas y teleóginas de *R. microplus* se realizó RT-PCR, observándose la expresión del ARNm principalmente a nivel de intestino en ambos estadíos. Posteriormente se clonaron los fragmentos amplificados por PCR, perteneciente al intestino de *R. microplus* en el vector pGEM-T y se secuenció la región que codifica para cistatina tipo II del intestino de diferentes poblaciones de garrapatas colectadas del Norte de Uruguay junto con la cepa Mozo (referencia de Uruguay) y cepa Porto Alegre. Se compararon las secuencias traducidas de aminoácidos de las cepas clonadas junto con la de referencia TIGR (TC 12831-TC 3423) observándose variaciones en los aminoácidos en gran parte de las poblaciones. Estas variaciones no producirían cambios en las características hidrofóbicas de la proteína en el sitio de unión a proteasas. La expresión de la proteína recombinante (UrBmcis2-r), fué producida por el clonado de la región codificadora, en el vector de expresión pET5a en *Escherichia coli*, y se confirmó por SDS-PAGE y Western Blot. Con el propósito de conocer las diferencias y similitudes entre las cistatinas de tipo II de nuestras cepas estudiadas, comparadas con otras garrapatas duras como blandas, se analizó *in silico* la secuencia de aminoácidos de *R. microplus* (UrBmcis2g) de Uruguay con secuencias de cistatinas publicadas en el Genbank. Al analizar estas secuencias se observó que todas presentan dos o tres dominios conservados y además las 4 cisteínas que forman los puentes disulfuro propio de la familia cistatina tipo II. Al calcular las similaridades de las secuencias de *R. microplus* con las

garrapatas analizadas observamos que presentan una similaridad del 71,6% con Hlcys3 (NCBI: ABZ89554) y del 56 % con Hlcys 2 (NCBI: ABC94582) ambas de *Haemaphysalis longicornis*. Con el resto de las cistatinas tipo II de otras especies de garrapatas presentan un promedio de similaridad del 33% con un rango de 48 -27,8%. La gran similaridad entre las cistatina de *H. longicornis*. Hlcys3 y *R. microplus* podrían considerarse genes similares ya que ambas proteínas se expresan principalmente en el intestino. Al realizar el análisis de Jameson Wolff de las secuencias de *R. microplus* de Uruguay junto con Hlcys3 observamos que ambas presentan regiones antigénicas con secuencias comunes, lo que nos permite proponerla como potencial antígeno para el desarrollo de una vacuna contra ambas garrapatas, logrando así avanzar en una vacuna multivalente que contenga una mezcla de antígenos que pueda ser utilizada contra más de un especie de garrapata.

Palabras clave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cistatina, *Haemaphysalis longicornis*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y UNIDADES.

°C	grados centígrados
µg	microgramos
µl	microlitros
ADN	ácido desoxirribonucleico
cDNA	ADN complementario
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphatase
dATP	trifosfato de desoxi-adenosina
DEPC	diethylpyrocarbonato
Da	daltons
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
g	Fuerza gravitacional
kDa	quilodalton = 1000 daltons
LB	Luria Bertani
lt	litro
min	minuto
mg	miligramo
ml	mililitro

mM	milimolar
MGAP	Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay
MW	Masa molecular
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Cl
ng	nanogramo
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa.
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
seg	Segundos
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INDICE

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

	pág
1.1 Generalidades e importancia económica de <i>Rhipicephalus microplus</i>	9-10
1.2 Ciclo biológico.....	10-11
1.3 Métodos de Control del parásito.....	12-13
1.4 Vacunas parasitarias y búsqueda de antígenos.....	13-15
1.5 Interacción huésped-parásito.....	15-16
1.6 inhibidores de proteasas -familia cistatina.....	16-20

Capítulo 2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21

Capítulo 3: MATERIALES y MÉTODOS

3.1 Cebadores proyectados para clonado, RT-PCR y expresión de una cistatina tipo II de <i>Rhipicephalus microplus</i>	22-23
3.2 Búsqueda del gen de cistatina en <i>Rhipicephalus microplus</i>	23-26
3.2.1 Garrapatas y su disección	
3.2.2 Extracción de ARN	
3.2.3 Cuantificación del ARN	
3.2.4 Síntesis de cADN por Transcripción reversa	
3.2.5 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	
3.2.6 RT- PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).	
3.3 Clonado y secuenciación decistatina de diferentes poblaciones de Uruguay y Brasil.....	26-30
3.3.1 Ligado del amplicón al plásmido pGEM-T (Promega).	
3.3.2 Transformación por shock térmico en <i>E.coli</i> TOP 10 (Invitrogen)	
3.3.3 Extracción del ADN plásmidico por lisis alcalina con SDS: Miniprep.	
3.3.4 Digestión del ADN plasmidico con enzimas de restricción	
3.3.5 Secuenciación del ADN plasmidico y análisis <i>in silico</i>	
3.4 Clonado de la región codificadora de UrBmcis2 en un vector de expresión....	30-33.
3.4.1 Clonado de la región codificadora de UrBmcis2 en pET-5a	
3.5 Expresión de una cistatina recombinante del intestino de <i>Rhipicephalus microplus</i> de Uruguay (UrBmcis2) en <i>E.coli</i>	33-34
3.5.1 Test de expresión de Marcador de Peso Molecular (IgG), en <i>E.coli</i>	
3.6 Purificación de la cistatina recombinante UrBmcis2 mediante cromatografía de afinidad.....	34-36

3.7 Métodos de análisis de proteínas.....	36-39
3.7.1 Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	
3.7.2 Tinción de proteínas en geles de acrilamida	
3.7.3 Análisis de proteínas mediante Western blotting	
3.7.3.1 Electrotransferencia de proteínas	
3.7.3.2 Sistemas de revelado	

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Clonado de la región que codifica una cistatina del intestino de <i>Rhipicephalus microplus</i>	41-42
4.2 Analisis <i>in silico</i> de secuencias de cistatinas Tipo II en garrapatas.....	42-47
4.3 Analisis <i>in silico</i> de las propiedades inmunológicas de UrBmcis2 de <i>Rhipicephalus microplus</i>	48-51
4.4 Expresión del ARNm de una cistatina en diferentes tejidos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	52-55
4.5 Expresión y purificación de la proteína recombinante UrBmcis2 de <i>Rhipicephalus microplus</i>	55-58

CAPITULO 5: PERSPECTIVAS59

CAPITULO 6: BIBLIOGRAFIA.....60-63

ANEXO I.....	64-70
ANEXO II.....	71
ANEXO III.....	72

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades e importancia económica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Bajo el nombre de garrapata común del ganado vacuno nos referimos a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Este artrópodo fue introducido en el continente americano entre los siglos XVII y XVIII al importarse vacunos de sangre británica, convirtiéndose en la parasitosis que causó mayores pérdidas económicas en la mayoría de los países americanos en esos siglos (Nari A et al, 1994).

Las garrapatas son ectoparásitos temporales hematófagos pertenecientes al phylum Arthropoda, clase Arachnida y orden Acarina.

Dentro de este orden se divide en 3 familias:

Familia Argasidae o garrapatas blandas: Caracterizadas por carecer de escudo quitinoso, se las conoce como garrapatas blandas, con aproximadamente 193 especies en el mundo. Son ectoparásitos de aves y mamíferos. (Gugleimone A; et al, 2010)

Familia Ixodidae o garrapatas duras. Caracterizadas por la presencia de escudo quitinoso y conocidas como garrapatas duras. Incluye 14 géneros y 702 especies en el mundo.: *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, etc; algunos de los cuales son de importancia médica y/o veterinaria, ya sea por las pérdidas económicas que causan o por ser vectores de enfermedades infecciosas al hombre (Lyme, Tifus, etc) o a animales (*Anaplasma*, *Babesia*, etc). (Gugleimone A et al, 2010)

Familia Nuttalliellidae Presentan características intermedias de las dos familias anteriores, representada por una única especie africana, *Nuttalliella namaqua* de la cual solo se registraron ninfas y hembras (Gugleimone A et al, 2010).

En el año 2003, *Boophilus microplus* fue reclasificado en base a análisis moleculares y morfológicos como perteneciente al genero *Rhipicephalus*, subgénero *Boophilus* por lo que la nomenclatura *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) va a ser utilizada en este texto (Murrel A & Barker SC, 2003).

En Uruguay *R. microplus* es considerado el ectoparásito más importante en bovinos y su combate ha sido reglamentado desde el año 1940 donde se legisló su control con el uso de acaricidas. A partir de los años 80 la situación se agravó por la aparición de resistencia a distintos grupo de acaricidas, no obstante el país logró desarrollar y mantener hasta fines de la década de los 90 una infraestructura adecuada que

permitió controlar la plaga de forma eficaz. En los primeros años del 2000 la crisis económica llevo a una dramática disminución del control de la garrapata, principalmente por parte de pequeños y medianos productores que disponían de menores recursos económicos. (Nari A, 2003.)

En el año 2006 en Uruguay se perdieron 45 millones de dólares por la acción directa de este parásito distribuido en: acciones del Estado (4,5%), cueros dañados (6,3%), tratamientos garrapaticidas (44,6%), pérdida promedio de 34 kg de carne por animal infestados, abortos (31,1%) (Errico F et al, 2008)

En Brasil se estimó que las pérdidas anuales ascendían a 2 billones de dólares en el 2002 cuyas causas son muy similares a las de nuestro país. (Grisi L et al, 2002)

Sumado a las pérdidas económicas por el daño directo de las garrapatas, el control de éste parásito cuenta con situaciones críticas por el uso prolongado y/o mal uso de compuestos químicos ixodicidas seleccionando así poblaciones resistentes a los mismos. A su vez generan un gran impacto negativo sobre el medio ambiente por los residuos químicos que dejan sobre los animales y la contaminación de efluentes, pasturas, etc con el consiguiente riesgo en la salud pública.

La garrapata también es responsable de la transmisión de protozoarios del genero *Babesia* que presentan un 2,5 % de morbilidad y un 1,6% de mortalidad en los meses de marzo a mayo y del género *Rickettsia*, como el *Anaplasma marginale* que presenta muertes en goteo distribuida en el tiempo (Solari M.A 1992, 2006).

En Uruguay ha quedado demostrada su importancia por el equipo técnico del PLAN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD ANIMAL (PLANISA-2009), al determinar como prioridad en investigación en salud animal principalmente en la cadena cárnica el control de la garrapata y en tercer lugar la conservación de la inocuidad de las carnes, ambos problemas producidos por la alta infestación con garrapatas y los tratamientos con acaricidas para controlarla (Gil A et al, 2009)

Nuevas alternativas para su control están siendo investigadas, considerándose las vacunas como una alternativa muy promisoría para el control de estos ectoparásitos.

1.2 Ciclo Biológico

El conocimiento del ciclo biológico de *R. microplus* es uno de los puntos claves para lograr establecer una estrategia para combatir este parásito. El ciclo biológico de esta garrapata consta de una fase de vida libre y otra parasitaria. Los factores que afectan ambas etapas son diametralmente opuestos ya que la fase parasitaria está

influenciada por el huésped y la fase de vida libre por factores medio ambientales lo cual determina la epidemiología del parásito (Nari. A, Field C, 1994).

La fase de vida libre del ciclo se divide en 4 etapas muy influenciadas por factores ambientales (temperatura, humedad, etc.). El comienzo de esta etapa se produce cuando la teleogina (hembra madura pronta para desovar) se desprende del animal hasta que comienza la postura de huevos llamando a esta etapa protoquia o preaoe, su duración es muy variable oscilando entre 2-4 días en verano y 20 a 90 días en invierno. Posteriormente la teleogina comienza a depositar sus huevos que van entre 2500 a 3000, variando esta etapa de aoe entre 13-15 días en verano y 35-45 días en invierno. Luego comienza la etapa de incubación de los huevos variando desde 25- 30 días en verano a 70-187 días en invierno. Al terminar el período de incubación eclosionan las larvas que trepan al pasto preparándose para la llegada del huésped. Esta etapa varía mucho llegando a durar desde 90 a 185 días, siendo el 80 a 90% del ciclo biológico total y está determinada por la oportunidad que tiene de encontrarse la larva con su huésped (Nari. A, Field C1994). Esta etapa varía mucho llegando a durar desde 90 a 185 días, siendo el 80 a 90% del ciclo biológico total y está determinada por la oportunidad que tiene de encontrarse la larva con su huésped (Nari. A, Field. C, 1994).

Fase de vida parasitaria comienza cuando la larva se trepa al huésped. Esta larva pasa por varias etapas (larva, ninfa, adulto) con cambios fenotípicos característicos. La duración de esta etapa no está influenciada por el medio ambiente por lo que normalmente es de 3 semanas. Cada etapa presenta características fenotípicas salientes que las diferencia. En la fase larval se caracteriza por presentar 3 pares de patas e hipostoma con doble hilera de dientes, se alimenta de linfa, esta etapa dura aproximadamente 7 días donde sufre la primera muda transformándose en ninfa. Las ninfas se caracterizan por presentar 4 pares de patas, hipostoma con triple hilera de dientes, mudando a los 8 días a adultos. Los adultos se caracterizan por presentar 4 pares de patas, con cuádruple hilera de dientes en el hipostoma, se evidencia el dimorfismo sexual: los machos o gonandros son muy móviles y pueden copular con diferentes hembras. Luego de la copula la hembra se ingurgita parcialmente pasando a la fase de hembra parcialmente ingurgitada (o partenogina), al final de esta fase la hembra totalmente ingurgitada (o teleogina) crece rápidamente llegando a pesar 240 mg cayendo del huésped comenzando su fase de vida libre (Nari. A, Field. C, 1994).

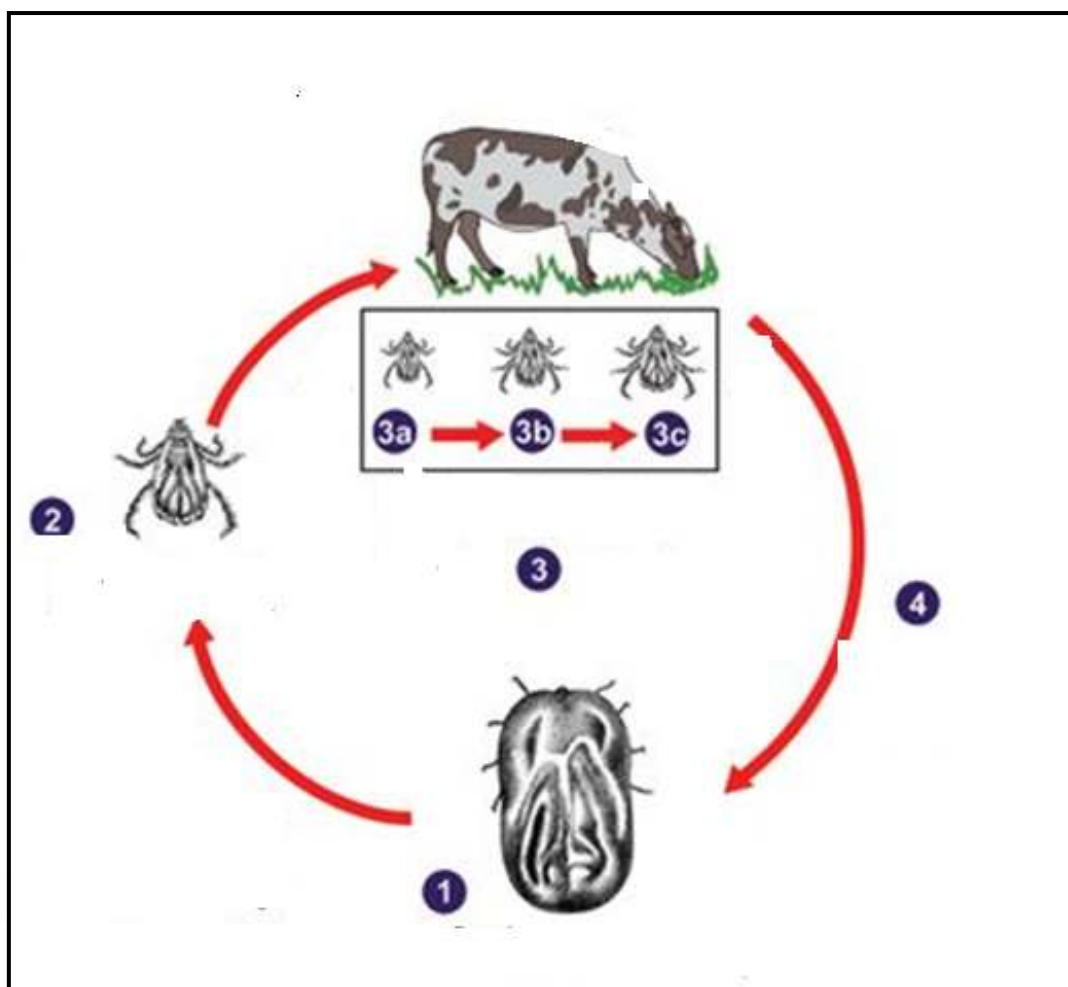


Figura 1. Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*, consta de dos fases: vida libre, vida parasitaria. La fase de vida libre comienza cuando las teleoginas (1) se desprenden del huésped comenzando su período de postura. (2) luego de su incubación los huevos se convierten en larvas de seis patas. (3) Las larvas suben al huésped, comenzando así su ciclo de vida parasitario que consta de dos mudas hasta que se convierten en adultos (4) La teleogina cae del huésped comenzando su ciclo de vida libre. (Fuente: www.dpd.cdc.gov)

1.3 Métodos de Control del parásito

Con el objetivo de mantener niveles bajos la infestación por garrapatas se utilizan diferentes métodos de control ya sea químico y no químico. El control químico en Uruguay ha sido el método utilizado por excelencia con el uso de compuestos acaricidas. Desde el año 1941 existe una ley nacional de lucha contra la garrapata la cual está basada en el uso de productos químicos fundamentalmente. El parásito fue

desarrollando resistencia a medida que los acaricidas fueron aplicados sistemáticamente, tanto es así que ya en 1950 se reportan casos de resistencia a arsenicales y clorados. En las últimas décadas han aparecido nuevos grupos químicos (fipronil, lactonas macrocíclicas) de los cuales comenzaron a aparecer varios casos de resistencia a los mismos. A su vez cabe señalar y no es de menor importancia que el uso de acaricidas produce contaminación ambiental, crean residuos químicos en los animales generando un riesgo para la salud humana (Nari A, 2003).

En el control no químico se encuentran involucrados diferentes aspectos ya sea: manejo del pastoreo rotando con agricultura, integrar al rodeo razas de ganado más resistentes al parásito como *Bos indicus*, etc. Estas prácticas han sido poco validadas en la región y su utilización para el control de ectoparásitos es poco práctica.

El control inmunológico de las garrapatas abre una perspectiva promisoría en la lucha contra *Rhipicephalus microplus*; desde hace mas de 40 años diversos estudios avalan que la resistencia adquirida en bovinos no es innata si no lograda durante sucesivas infestaciones por la garrapata (Roberts JA, 1968; Wagland BM et al, 1978). Se ha observado que animales resistentes llegan a rechazar entre un 80% a 99% de larvas (Allen, JR 1994) Estos estudios son la base para la búsqueda del control de la garrapata por medio de vacunas.

1.4 Vacunas parasitarias y búsqueda de antígenos.

El aumento de parásitos resistentes a drogas enfatiza la necesidad de la búsqueda de métodos de control alternativos como ser vacunas parasitarias. Sumado a esto, la mayor demanda por productos ecológicos ha llevado a la mejora en la sensibilidad de las técnicas de detección de antiparasitarios utilizados (Willadsen P, et al 2004)

A su vez en algunas infecciones por protozoarios en la que no existen quimioterapéuticos disponibles para su control, las vacunas podrían ser usadas para el control, por ejemplo para *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*. En la industria avícola se ha visto que cepas de *Eimeria* han reducido la sensibilidad a tratamientos preventivos con coccidiostáticos. En relación a los parásitos gastrointestinales como ser *Hemonchus contortus* de ovejas y cabras la eficacia contra los 3 principales grupos de antihelmínticos se encuentran en niveles catastróficos. En equinos se ha visto resistencia a los bencimidazoles en pequeños strongylidos, dicha resistencia ha ido en aumento (Willadsen P. et al 2004)

En relación a los ectoparásitos el ejemplo más dramático como ya dijimos lo presenta *R. microplus* desarrollando resistencia sobre la gran mayoría de los acaricidas-organofosforados, piertroides sintéticos, amidinas, lactonas macrocíclicas, etc viéndose estas resistencias tanto en Uruguay, Brasil, y otros países (Nari A, 2003).

Finalmente la aparición de nuevas drogas puede verse disminuida debido a que antiguamente las drogas se descubrían en forma relativamente simple. Se realizaba un screening de diferentes moléculas, con conocimiento o sin él de como actuaban sobre los parásitos. Actualmente se seleccionan drogas en base al conocimiento de la bioquímica y/o fisiología del parásito (Willadsen P, et al 2004)

El uso de vacunas contra parásitos se comenzó a implementar en la década del 60 con la comercialización de una vacuna con larvas irradiadas de *Dictyocaulus viviparus* (Bovilis™ Huskvac). En la década del 70 se desarrolló una vacuna contra el parásito de caninos *Ancylostoma caninum* (aunque se dejó de comercializar debido a efectos secundarios), en la década de los 90 se desarrollaron vacunas recombinantes efectivas contra *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* y *Echinococcus granulosus*, lo que ha demostrado que es posible lograr un alto nivel de protección contra estos parásitos complejos utilizando antígenos recombinantes (Willadsen P, et al 2004, Rickard, MD et al. 1995, Lightowers MW et al 2003)

En relación a los ectoparásitos y en particular a *R. microplus* existen en el mundo desde la década de los 90 dos vacunas recombinantes comerciales que presentan como inmunógeno una proteína del intestino denominada Bm86. Está proteína del intestino de la garrapata de la que no se conoce exactamente su función aunque se la ha relacionado en los procesos de endocitosis, ha sido incluido en los planes de control integrado de *R. microplus*, en Cuba (Gavac™) y en Australia (Tick GARD™) (Rodríguez M et al 1995, Willadsen P et al 1995, García-García JC et al, 2000, De la Fuente J et al 2000). En Uruguay, se hicieron ensayos de vacunación con éstas dos vacunas comerciales, no mostrando niveles aceptables de protección. Por lo tanto no contamos actualmente con vacunas para ser utilizadas en el control de *R. microplus* en nuestro país (comunicación personal Nari A). Las fallas en la eficacia de estas vacunas tanto en Uruguay como en otros países de la región varían entre un 51% y 91% dependiendo de las características de la población de garrapatas y de las condiciones nutricionales de los bovinos. Se ha sugerido que estas diferencias observadas en la eficacia es debida a la variación génica del locus de este antígeno que va desde un 5,7% a un 8,6% en poblaciones de garrapatas de diferentes zonas América Latina (García-García JC et al 1999, De la Fuente J et al 2000, Sossai S et al 2005, 2005a). Por lo que la búsqueda de nuevos antígenos que desarrollen una buena

inmunidad protectora contra poblaciones de garrapatas regionales es una meta marcada por varios grupos de investigación. Más importante aún lograr desarrollar una vacuna universal que permita controlar las poblaciones de garrapatas.

1.5 Interacción huésped- parásito

Las garrapatas de la familia Ixodidae se caracterizan por una alimentación hematófaga por prolongados períodos de tiempo. Este tipo de alimentación ha llevado a la formación de un complejo coctel proteínas en la saliva (anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios, vasodilatadores, antiinflamatorios e inmunomoduladores) que le permiten al parásito superar las barreras de defensa del huésped permitiéndole fijarse sobre el mismo por largos períodos de tiempo (Figura 2) (Francischetti IM et al 2009).

Sumado a la capacidad que tienen las garrapatas de actuar como vectores de patógenos puede llegar a producir anemia en el ganado bovino, ya que una sola hembra aumenta su peso entre 100 a 200 veces. Esta capacidad está dada por la proteólisis de las proteínas del huésped principalmente albúmina y hemoglobina (aproximadamente el 80% de las proteínas ingeridas) que ocurre predominantemente dentro de vesículas acidas en células digestivas, pero con rutas bien diferentes. Se vio en *R. microplus* que la albumina se localizó en pequeñas vesículas (1-2 μ m) sin un receptor específico, en contraste con la hemoglobina que se localizó en vesículas grandes (3-12 μ m) y reconocida por receptores específicos de superficie celular. Ambas vesículas son capaces de acidificarse llegando a un pH 3 en el intestino medio de las garrapatas lo que estaría señalando la presencia de proteasas (Lara FA et al 2005).

En *R. microplus* se ha purificado la catepsina D del intestino medio de hembras ingurgitadas, también la catepsina L-like (BmCL1) fue caracterizada e inmunolocalizada en el intestino medio de hembras parcialmente ingurgitadas (Renard G et al 2000, 2002). Esta caracterización enzimática sugiere que *R. microplus* utiliza para su digestión aspártico y cistein proteasas similar a lo que ha sido descrito en otros parásitos hematófagos como ser *Ixodes ricinus* (Sojka D et al 2008), nematodos (Williamson AL et al 2004) y *Fasciolas gigantica y hepatica*. (Caffrey CR et al 2004, Delcroix M et al 2006, Chantree P et al, 2012)

La hemoglobina es esencial no solo para suministrar los nutrientes de muda y vitelogénesis, sino también para generar hemocidinas que pueden actuar como un

mecanismo de defensa contra microorganismos (bacterias Gram positivas, hongos) en concentraciones micro molares (Cruz CE et al 2010)

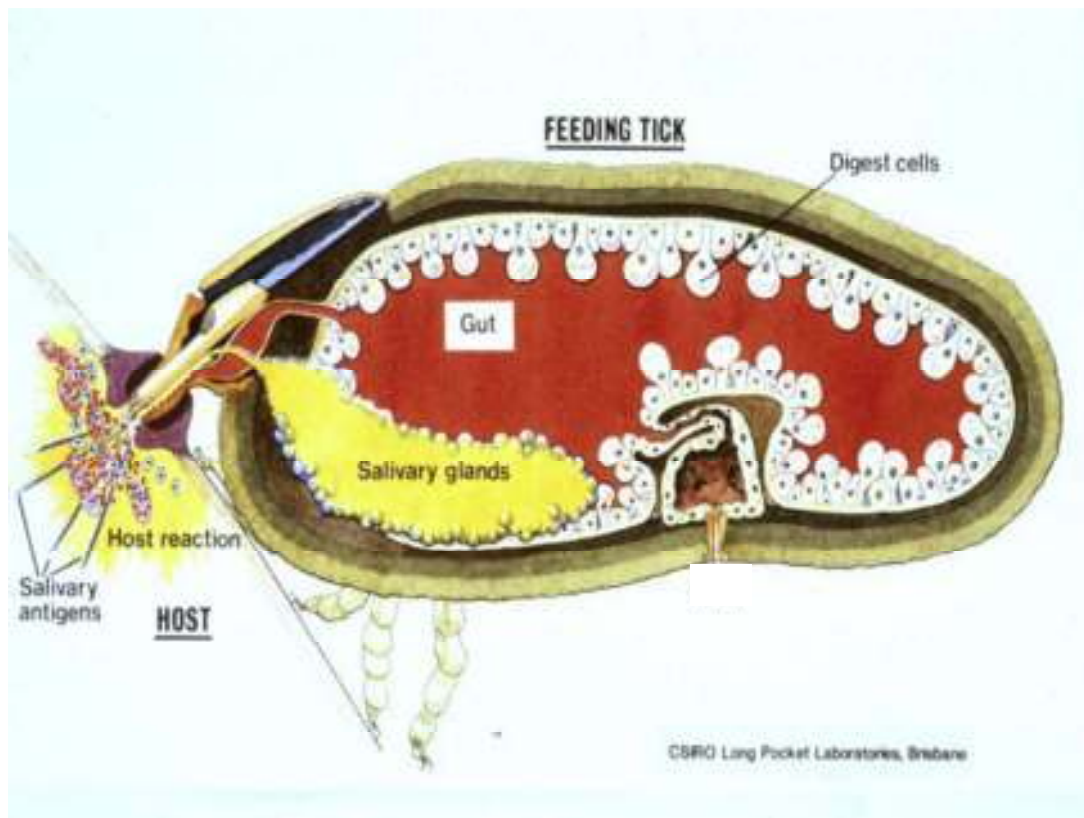


Fig 2. Esquema de un corte longitudinal de una garrapata donde podemos observar la ubicación de sus dos órganos principales involucrados en la interacción huésped parásito.

1.6 Inhibidores de proteasas-familia cistatina

Los inhibidores de proteasas son un objetivo interesante para el desarrollo de vacunas contra parásitos, dado que todos los organismos los utilizan para regular su actividad proteolítica. Los recientes progresos en el transcriptoma de las garrapatas ha descubierto la presencia de familias con dominios de inhibidores de proteasas como ser familia serpinas, inhibidores tipo Kunitz, familia cistatinas, entre otros. (Francischetti IM et al, 2009)

La familia cistatina son inhibidores naturales y reversibles de las cystein proteasas de la familia papaína, han sido identificadas en plantas, insectos, microorganismos y mamíferos. Han sido divididas en 3 familias según sus secuencias homólogas y número de puentes de disulfuro. La familia del tipo 1 (stefins) son péptidos cistosólicos (aunque se ha llegado a encontrar en fluidos en ínfimas concentraciones) de aproximadamente 100 aminoácidos, sin puentes di-sulfuro ni carbohidratos. La

familia del tipo 2 (cistatinas) son sintetizadas con un péptido señal de 19 a 28 aa que le permite transportar la proteína dentro de vesículas hacia el espacio extracelular; presentan aproximadamente 120 aminoácidos, 2 puentes di-sulfuro y generalmente no son glicosiladas. La familia tipo 3 (kininogenos) son varios dominios de cistatina en tándem llegando a pesar 60 a 120 kDa, las integrantes de la familia 1 y 2 presentan un peso molecular de 11 a 15 kDa. (Zavasnik-Bergant T, 2008).

En los últimos años se han cristalizado cistatinas de garrapatas del genero *Ornithodoros moubata* (Salat J et al, 2010) e *Ixodes Scapularis* (Kotsyfakis M et al, 2010) observándose que estas moléculas adoptan un típico pliegue, caracterizándose por 5 hojas β que envuelve un α hélice, contenida por dos puentes disulfuro. Como vemos en la figura 3 de la cristalización de *O moubata*. También demostraron que las cistatinas tipo II de garrapata bloquean el sitio activo de las cisteín proteasas por una estructura en forma de cuña altamente conservada en esta familia cistatina. Esta estructura está formada por 3 regiones, la primera se encuentra en el extremo N-terminal encontrándose una Glicina (G) que le da flexibilidad, la segunda región es una secuencia consenso de Glutamina-Xaa-Valina - Xaa-Glicina (QXVXG) ubicada en el primer bucle o loop 1 (L1). La tercera región es una Prolina-Triptofano (PW) ubicada en el segundo bucle o loop 2 (L2).

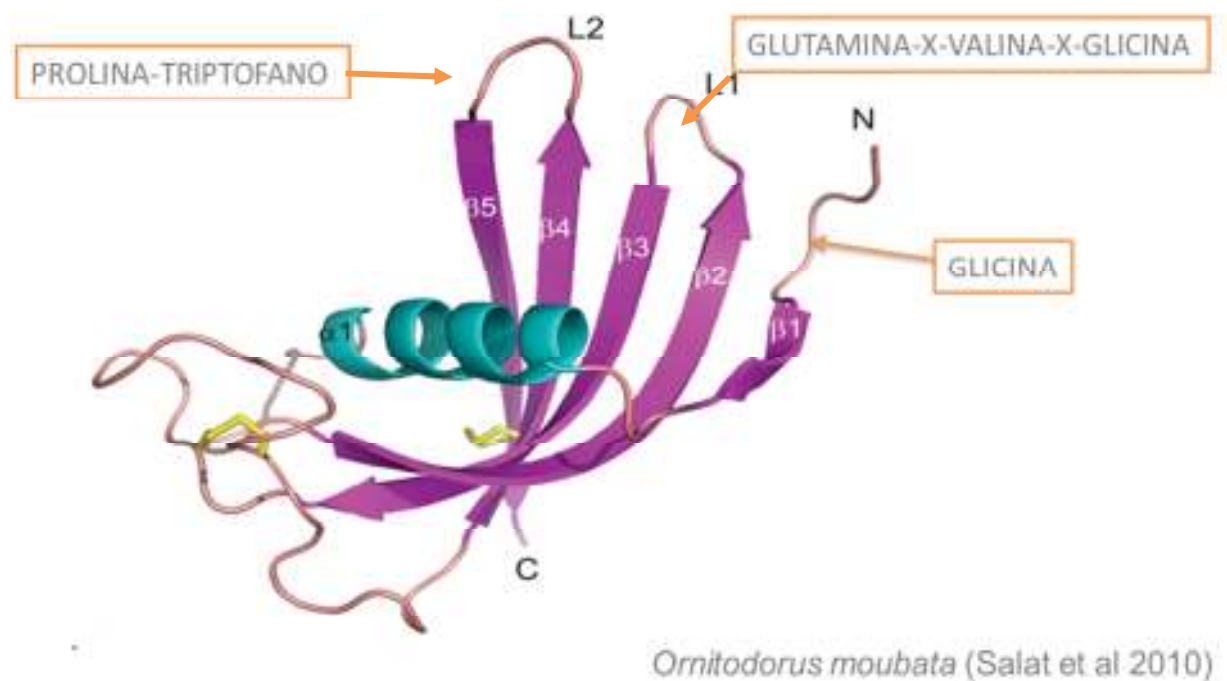


Fig 3 dibujo de la estructura secundaria de una cistatina tipo 2 cristalizada de saliva de *Ornithodoros moubata*. Se observan las 5 hojas β (violeta) que envuelven la α hélice (turquesa), contenida por dos puentes disulfuro (amarillo), los bucles L1, L2 y el

extremo N terminal estarían involucrados en la unión de las peptidasas del tipo papaína.

Hay descritas aproximadamente 21 cistatinas tipo 1 y 2 en diferentes especies de garrapatas, se han detectado principalmente en glándula salival e intestino medio, ambos órganos responsables de la digestión de sangre y expresión de proteínas presentes en la saliva. También se han localizado en hemocitos, cuerpo gordo (hígado) y ovario (Schwarz A et al 2012).

La función fisiológica de las cistatinas en garrapatas no está completamente dilucidada, pero se ha demostrado en diversos trabajos la importancia vital que tienen éstas durante la alimentación, digestión de hemoglobina, disminución de la respuesta inmune por el huésped, entre otros.

Un trabajo realizado en *Amblyomma americanum* con ARN de interferencia vieron que disminuía la capacidad de alimentarse y aumentar de peso. Por otra parte conejos que fueron desafiados con garrapatas silenciadas al ser expuestos a garrapatas normales fueron significativamente resistentes. Esto parece demostrar que las garrapatas evaden hábilmente el sistema inmune del huésped al secretar cistatinas, quebrando el normal procesamiento de presentación de antígeno por las células presentadoras. (Karim S et al 2005).

En *Ixodes scapularis* se han caracterizado dos cistatinas tipo II de glándula salival (sialostatin L y L2 sialostatin) se observó que ambas presentan efectos anti-inflamatorios e inmunosupresoras, posiblemente debido a su actividad inhibidora contra catepsinas L y S, las que son importantes en la degradación de la matriz por los fibroblastos, e intracelularmente en la escisión de proteínas por las células presentadoras de antígeno. Se estudió por PCR en tiempo real que estas dos cistatinas presentaban niveles de transcripción diferentes en intestino y glándula salival durante la alimentación. Se vio que la sialostatina L disminuye su transcripción tanto en intestino como en glándula salival durante la alimentación. Mientras que sialostatina L2 disminuye su expresión en intestino aumentando en glándula salival. Estas cistatinas mostraron inhibir las catepsinas L y S sugiriendo así cierta actividad en la modulación del sistema inmune y en el re-modelamiento de los tejidos facilitando así su alimentación hematófaga. A su vez se determinó que cuando se infectaban conejos con *Ixodes scapularis* normales, los cuales fueron previamente infectados con garrapatas silenciadas en el gen de cistatina L2 por medio de RNA de

interferencia (RNAi), mostraron una menor capacidad para alimentarse y una mayor respuesta inmune asociada en los conejos. (Kotsyfakis M et al 2006, 2007, 2008)

En la garrapata blanda *Ornithodoros moubata* se describieron 2 cistatinas tipo 2, OmCistatina-1 (Omcis-1) y OmCistatina- 2(Omcis-2) en intestino y glandula salival. Se vió que ambas cistatinas inhiben el efecto de papaína, catepsina B y H por lo que tienen un efecto inmunosupresor sobre la respuesta inmune del huésped. A su vez al vacunar ratones con Omcis- 2 recombinante, y estos ser infestados con ninfas de *O.moubata* las mismas presentaron un aumento significativo de mortalidad. Este aumento estaría vinculado a la cantidad de anticuerpos anti Omcis-2. Estos anticuerpos pueden bloquear la función fisiológica de Omcis- 2 en el intestino de la garrapata. Se presume que la función fisiológica de las cistatinas de *O.moubata* estaría involucrada en la digestión de sangre y detoxificación de los grupos heme, por lo que se supone que Omcis-2 estaría involucrada en inhibir la proteólisis no deseada por peptidasas endógenas y exógenas. (Salat J et al 2010, Schwarz A et al 2012).

En *Haemaphysalis longicornis* se localizaron 3 cistatinas llamadas Hlcyst-2 , Hlcyst-3 y HISC-1 en intestino y glandula salival . En el caso Hlcyst 2 la evidencia experimental mostró su papel en la inmunidad innata de la garrapata, ya que mayores niveles de Hlcyst-2 se detectaron en garrapatas infectadas con *Babesia gibsoni*, sugiriendo que existe un aumento de éstas proteínas inducidas por éste patógeno. Se vió que los niveles de transcripción de HISC-1 en glandula salival aumentaban en las primeras 24 horas de la alimentación de la garrapata y luego disminuye, en contraste con los niveles de transcripción de estos mismos genes en el intestino, indicando que desempeña un rol fundamental en el proceso de digestión (Zhou J et al 2006; Yamaji K et al 2009, Schwarz A et al 2012).

En *R. microplus* se clono del cuerpo gordo una cistatina tipo 1 llamada Bmcystatin ; la misma fue igualmente detectada por Western Blot en cuerpo gordo, extracto de glandula salival y ovario, sugiriendo la posibilidad de que la misma presenta más de una función. En glandula salival podría actuar como proteína de defensa o de regulación de la respuesta inmune, en ovario las cistatinas regulan la proeolisis prematura del vitelo (principal fuente de proteínas de los huevos) durante la embriogenesis (Lima CA et al; 2006)

Estos trabajos demuestran la importancia vital que tienen las cistatinas durante la alimentación y digestión de las garrapatas, por lo que las hace un candidato promisorio para desarrollar vacunas contra la garrapata del ganado bovino.

CAPITULO 2: OBJETIVOS

Objetivo general

Búsqueda de la región codificadora de una cistatina en *Rhipicephalus microplus* en poblaciones de Uruguay y expresión de la proteína recombinante.

Objetivos específicos

1. Clonaje de la región codificadora de una cistatina en *Rhipicephalus microplus* de diferentes poblaciones de Uruguay.
2. Secuenciación y estudios del polimorfismo.
3. Caracterización *in silico* de las propiedades de UrBmcis2 de *Rhipicephalus microplus*
4. Expresión de la cistatina recombinante UrBmcis2-r en *E. coli*.

CAPITULO 3: MATERIALES Y METODOS

3.1 Cebadores proyectados para clonado, RT-PCR y expresión de una cistatina tipo II de *R. microplus*

A partir de una secuencia publicada por Ribeiro et al 2007 de una cistatina tipo II de glándula salival en *Ixodes scapularis* (NCBI: AAM 93646) se buscó la misma en la base de datos de secuencias expresadas (expressed sequence tag, EST) de *Rhipicephalus microplus* de la Universidad de Harvard, Estados Unidos (TC12831-TC3423) (fig 4). A partir de ahí se proyectaron manualmente los cebadores de clonado y expresión de la proteína recombinante, posteriormente sus parámetros fueron revisados utilizando el programa Vector NTI ®Software(Invitrogen).

ATGGCTCGTATGGCAGTTAGCATTGCAGTTCTCGTAACAGCACTCATCGCTGTTT
CCTTAGCGATTCTGAGGTTGGTCGACAAAAGAACCCTCGTCGAGCCCTAAGT
ATAAGGAACTCGCCACTTCGTTGTCGCTCAGCGTGTAGAGGGGCTGCAGAAA
TACGACACGGTTCTCAAATTAACCAAAGTGGAGACTCAGATTGTCGCCGGCGTG
AATTACCGTCTAACCTTCACCATTACCACCACTGATTGCATAATAGCCGAAGTAG
AGTACAACGCTGAACGTTGCCACCTAAGAACAATCAGGCGAAGGCGACCTGC
ACAGCTGTCGTCTACGAGAGGCCCTGGGAAAATGTGCGGTCTCTGACTTCTCTT
CGATGCGCTTAG

Fig 4 Secuencia de nucleótidos expresados (expressed sequence tag, EST) de *Rhipicephalus microplus* de la base de datos de Universidad de Harvard, Estados Unidos (TC12831- TC3423).

- Cebador Forward: Cist-Bm- For:

TTTTTCATATGGCTCGTATGGCAGTTAGCATTG

- Cebador Reverse Cist-Bm- Rev:

AAAAAGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAGCGCATCGAAGAGAAGTCAGAGACAAAAGGATCCCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAGCGCATCGAAGAGAAGTCAGAGAC

Como control positivo se utilizó la actina, la que es altamente conservada entre las diferentes especies de artrópodos. Se utilizaron dos pares de cebadores que generan amplicones de diferentes tamaños. (da Silva Vaz I et al 2005)

Cebadores para Actina:

Forward: BmAct2 -GGGGTGTAGAAGGAAGGG

Reverse: BmAct3-GCATCCACGAGACCAACG

Amplifica un fragmento de 339 pb.

Primes para Actina:

Forward: FOR-A - ATGTGTGACGACGAGGTTGCCG

Reverse: REV-A- TTAGAAGCACTTGCGGTGGACAATG.

Amplifica un fragmento de aproximadamente 800 pb.

3.2 Búsqueda del gen de cistatina en *Rhipicephalus microplus*

3.2.1 Garrapatas y su disección

En una primera etapa se obtuvieron garrapatas teleóginas *R. microplus* de diferentes estadíos proveniente de distintas zonas de Uruguay identificadas según la zona de donde provienen. Se extrajeron manualmente de diversas categorías de bovinos de las razas Hereford, Angus y sus cruza. La cepa Mozo en estadio de teleogina fue proporcionada por el Departamento de Parasitología de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE), es la cepa de referencia para nuestro país desde el año 1973. Se trabajó a su vez con los estadíos partenógina (extraídas manualmente) y teleógina la cepa Porto Alegre obtenida por infestación experimental en bovinos Hereford de la Universidad Federal de Río Grande do Sul -Brasil

Las garrapatas colectadas fueron lavadas con etanol 70% y enjuagadas con PBS 1X previo a la disección de los tejidos, bajo lupa. Los tejidos obtenidos fueron: glándula salival, intestino, ovario y carcasa de garrapatas. Los que se utilizaron para la extracción de ARN fueron rápidamente removidos, congelados en nitrógeno líquido y estoqueadas a -80°C hasta su uso.

3.2.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN del intestino de las garrapatas fue realizada utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen) siguiendo la siguiente metodología. Se agregó 1 ml de TRIzol® a cada muestra y por medio de un macerador se homogenizó por varios segundos. Luego se centrifugó a 15000 xG por 2 minutos removiendo así el material

insoluble. Se tomó el sobrenadante se centrifugó por 5 minutos logrando así la disociación de las nucleoproteínas. A cada muestra se le agregaron 200 µl de cloroformo se centrifugó a 15000 xG por 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante al que se le adicionó 500 µl de isopropanol se incubó por 10 minutos se centrifugó a 15000G por 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante lavando el pellet con 1 ml de etanol 70%. Se dejó secar el pellet y luego fue resuspendido en 10 µl de agua DEPC. Todos los materiales fueron libres de RNasa y/o tratados con una solución RNasa Free.

3.2.3 Cuantificación del ARN

Se cuantificaron las muestras de ARN midiendo su absorbancia aplicando la ley de Lambert-Beer. Se utilizó un espectrofotómetro SP-2000 UV-Visible Spectrophotometer.

La ley de Lambert-Beer indica que $\text{absorbancia} = \log I_0/I = \epsilon c l$

Donde I_0 = Intensidad de luz de incidente

I = Intensidad de luz de transmitida

ϵ = Coeficiente de extinción molar

c = Concentración de la especie absorbente

l = camino óptico

Se diluyeron en agua miliQ las muestras de ARN (1:400), se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Posteriormente se cuantificó el ARN siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Dilución} \times \text{coeficiente de extinción} \times \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$$

A su vez se evaluó la pureza en base a los resultados obtenidos ya que si el cociente de las absorbancias $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$ es menor a 2, sugiere una contaminación con proteínas o fenol no pudiéndose realizar una cuantificación específica del ARN. Si la relación $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280} = 2$, da una evaluación aproximada de la pureza del ARN y permite calcular su concentración.

3.2.4 Síntesis de ADNc por Transcripción reversa

Al total de ARN de intestino obtenido se le realizó la RT-PCR utilizando el kit Superscript II (Invitrogen), el mismo está compuesto por una ADN polimerasa que

sintetiza ADN complementario (cADN) a partir de ARN monocatenario. Todas las muestras llevaron 7µl agua DEPC, 2 µl de Oligo (dT), 1 µl de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) a una concentración de 10 mM y 3 µl de cada muestra de ARN, se incubó a 65°C por 5 minutos para luego pasarla inmediatamente a hielo. Posteriormente se le adiciona 4µl de First Strand Buffer 5X y 2 µl de DTT 100 mM, se incubó a 42°C por 2 minutos, agregándose 1 µl de la enzima ADN polimerasa en una concentración de 200 unidades de enzima/ µl, toda esta mezcla se incubó por 50 minutos a 42°C en el termociclador Infinigen Thermal Cycler 25/H.

3.2.5 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Luego de obtenido el ADNc se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los cebadores proyectados para cistatina (materiales y métodos 3.1). La preparación de las muestras de reacción y la incorporación final del ADN se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar.

Todas las muestras llevaron: 1µl Elongase® Enzyme Mix (INVITROGEN), 1µl tampón de la enzima A, 1µl tampón de la enzima B, 1µl dNTPs, 1µl de cDNA, 1µl primer Cist-Bm-Rev 1µl primer Cist-Bm-For, 35µl Agua miliQ. En cada amplificación se incluyeron controles negativos (se prepara la muestra de reacción pero no se incorpora ADN) y como control positivo se utilizó la actina. Los cebadores utilizados fueron para cistatina Cist-Bm-Rev y Cist-Bm-For, y para actina utilizó los cebadores BmAct2 y BmAct3 proyectados en el punto 3.1 de Materiales y Métodos.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador MiniCycler™ en Brasil y en Uruguay Infinigen Thermal Cycler 25/H. El programa utilizado fue de 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C, 1 minuto a 68°C, un último ciclo de 5 minutos a 68°C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (Anexo I) junto con el marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 Kb; Fermentas Company)

3.2.6 RT- PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).

Para verificar la expresión de la cistatina tipo II en diferentes tejidos de garrapatas de su dos estados partenoginas y teleoginas, se realizó una RT-PCR. Los tejidos utilizados fueron: ovario, carcaza, glándula salival e intestino de *R. microplus* cepa Porto Alegre. Se realizó la RT-PCR utilizando los cebadores para cistatina Cist-Bm-Rev y Cist-Bm-For. Como control positivo se utilizó el gen de Actina, cuyos

cebadores amplifican un fragmento de aproximadamente 800 pb, utilizando los cebadores Forward: FOR-A y Reverse: REV-A.

Todas las muestras llevaron: 0.4 µl de Enzima TAQ, 0.6 µl MgCl₂, 2 µl tampón de la enzima buffer 0.5 µl Cist-Bm-Rev, 0.5 µl Cist-Bm-For, 0.4 µl dNTP, 0.5 cDNA, 15.1 µl Agua miliQ. El programa utilizado fue de 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C, 1 minuto a 68°C y un último ciclo de 5 minutos a 68°C. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador MiniCyclerTM. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 0,8% junto con el marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 Kb; Fermentas Company).

3.3 Clonado y secuenciación de cistatina de diferentes poblaciones de Uruguay y Brasil

3.3.1 Ligado del amplicón al plasmido pGEM-T (Promega).

El vector de clonación pGEM-T es uno de los sistemas ampliamente usado para la clonación de los productos de PCR (figura 2). Se caracteriza por poseer en sus extremos 3' Timina que se unen por complementariedad con los extremos poliA de los productos de PCR facilitando así la inserción de éstos en el vector. Presenta promotores de ARN polimerasa T7 y SP6 que flanquean la región de clonación donde se incorpora el inserto ubicado en medio del operón lactosa de *E.coli* que codifica para la subunidad alfa de la enzima beta-galactosidasa (gen lac Z). Por otro lado se han mutado células de *E.coli* de modo que codifiquen la beta-galactosidasa sin la región alfa, provocando que las células no puedan hidrolizar la galactosa o su producto sintético X-gal. Cuando se transforman las bacterias con el vector pGEM-T, el vector les aporta el péptido alfa que tienen inactivo provocando lo que se llama la alfa complementación. Las bacterias transformadas por este vector se reconocen fácilmente puesto que forman colonias azules en presencia del compuesto incoloro X-gal. Cuando X-gal es hidrolizado por la beta-galactosidasa produce una sustancia azul insoluble en presencia de IPTG (inductor de la expresión de la beta-galactosidasa). Al insertar un fragmento de ADN extranjero en la región del polilinker del pGEM-T se detiene la lectura y se inactiva la alfa complementación. Las bacterias que incorporaron el plásmido recombinante producen colonias blancas, puesto que la beta-galactosidasa es inactiva y las que no lo incorporaron producen colonias azules. Este método de coloración permite identificar de manera simple las bacterias que han incorporado el plásmido. A su vez este plásmido posee un gen de resistencia a

Ampicilina (Amp^r) para poder seleccionar aquellas bacterias que han incorporado el vector. El plásmido pGEM-T contiene numerosos sitios de restricción dentro de la región de clonado, estos sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción permite la liberación del fragmento.

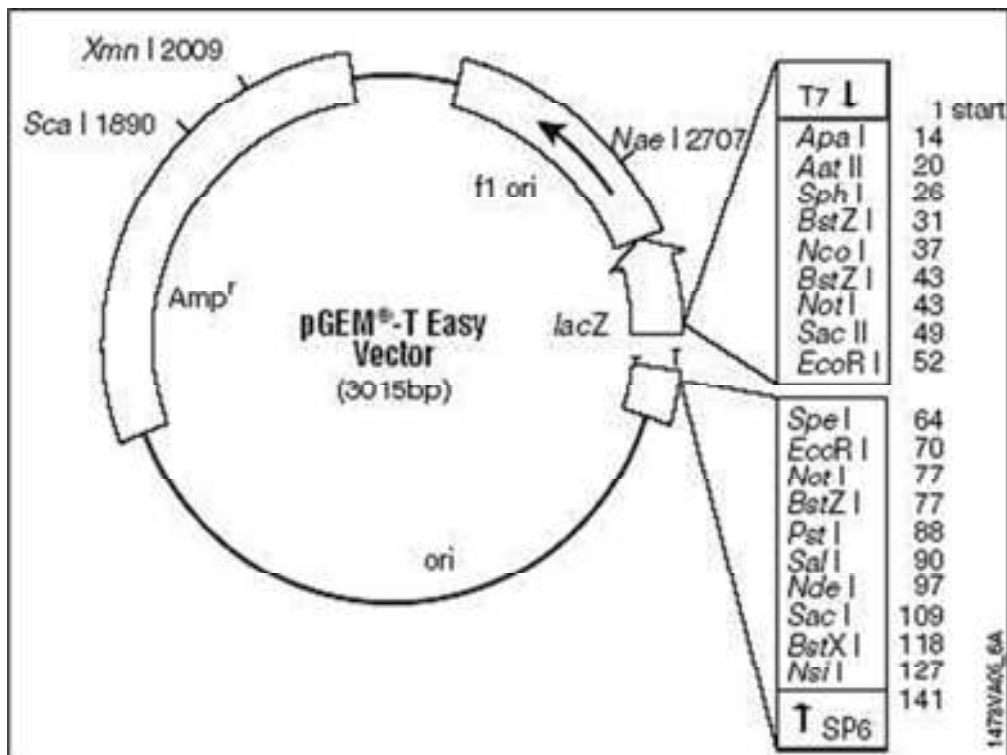


Figura 5 .Esquema del vector pGEM-T, mostrando los orígenes de replicación, el fragmento codificante para el fragmento "α" (lacZ), el gen que proporciona resistencia a la ampicilina, los sitios de múltiple clonado, la posición de las secuencias blanco de las enzimas de restricción (fuente: www.promega.com)

El protocolo de clonado se realizó en 2 etapas. En una primera etapa consistió en el agregado de adeninas al inserto. Esto se debe a que al realizar la PCR se utilizó la enzima *Elongasa* la que no agrega residuos de adenina en los extremos 5' del fragmento de PCR. Para ello realizamos una mix con: 5 µl del producto de PCR, 1 de µl *Taq* DNA Polymerase (Fermentas), 1 µl de 10X Reaction Buffer (Fermentas), 0.8 µl de MgCl₂, 0.2 µl de deoxiadenosina (dATP), 2 µl de agua DEPC, se dejó 15-30 minutos en el termociclador (Infinigen Thermal Cycler TC-XX/H) a 70°C. En una segunda etapa se realiza la acción de ligación del pGEM-T al inserto. En esta etapa utilizamos la T4 DNA ligasa (Promega) con su respectivo buffer la que unirá el plásmido al inserto con las adeninas agregadas previamente. Para ello realizamos

una mix con: 3 µl del amplicon, 1 µl del pGEM-T, 1µl T4 DNA ligasa, 5 µl buffer de ligación; se incubó a 4°C por 16 hs.

3.3.2 Transformación por shock térmico de *E.coli* TOP 10 (Invitrogen)

Las células de *E.coli* TOP 10 se transformaron utilizando 100 µl de células competentes (anexo I) con 2 µl del ADN ligado. Esta mezcla se deja en hielo por 20 minutos. Seguidamente se incubó a 42°C por 40 segundos y nuevamente se mantuvieron en hielo por 1 minuto. A la mezcla se le agregó 1 ml de medio Lauria Bertain (LB) bajo condiciones estériles. A continuación las células transformadas se incubaron a 37°C en baño maría por 1 hora para su proliferación. Finalizado dicho tiempo se procedió a cultivar las células en placas de Petri de LB con Ampicilina (50 mg/ ml), Xgal (20 mg/ml) e IPTG (0,1 M) estos últimos fueron agregados en el tiempo de proliferación evitando así su degradación. Las células fueron centrifugadas a 2200 xG por 5 minutos, se descartó 900 µl del sobrenadante se plaquearon las placas con los 100 µl restantes. Se envolvieron en papel de aluminio se dejó en estufa a 37°C toda la noche.

3.3.3 Extracción del ADN plásmidico por lisis alcalina con SDS: Miniprep.

Para la extracción del plásmido de la bacteria se han desarrollado varios métodos. Nosotros utilizamos la lisis alcalina combinada con detergente SDS. Se exponen las suspensiones bacterianas a soluciones detergente fuertemente anionicas con pH alto que rompe la pared celular, desnaturaliza los cromosomas y proteínas, desprendiendo el plasmido dentro del sobrenadante. El mismo es purificado por varios pasos de acuerdo a la necesidad de pureza necesaria. Para ello primero se toman colonias aisladas blancas (han incorporado el plásmido con el inserto) y colonias azules como control negativo (sin el inserto) se incuban en 2,5 ml de medio LB con Ampicilina (50mg/ml) se incuban a 37°C/160 rpm toda la noche en un incubador rotatorio. Se transfirió 1 ml del cultivo a un eppendorf se centrifugó a 12000 xG por 30 segundos. Se descartó el sobrenadante el que es resuspendido en 100 µl de solución de lisis Alcalina I refrigerada (Glucosa 50Mm, Tris HCl 25mM (pH8); EDTA 10Mm (pH 8)), se agitó vigorosamente en vortex se deja 10 minutos en hielo. Se agregaron 200 µl de solución de lisis Alcalina II (Hidroxido de sodio 0,2N; SDS 1%, agua milliQ) a cada suspensión bacteriana preparada en el momento se invirtieron los eppendorf y posteriormente son colocados en hielo por 5 minutos. Agregar 150 µl de solución de lisis Alcalina III (Acetato de Potasio 5M; Ácido Acético, H₂O) homogenizar vigorosamente se colocó en hielo por 20 minutos. Se centrifugaron las muestras a

14000g por 5 minutos a 4°C. Transferimos el sobrenadante a 450 µl de fenol refrigerado agitando levemente. Centrifugamos a 12000 Xg a por 5 minutos. Transferimos el sobrenadante a un nuevo eppendorf con Fenol: Cloroformo (250:250µl) se homogeneizó y centrifugó (12000 Xg - 5 min), se transfirió el sobrenadante a 450 µl de Cloroformo se homogeneizó y centrifugó (12000 Xg - 5 min) y se vuelve a colectar. Para precipitar el ADN se adicionó 1 ml de etanol 100% refrigerado, 40 µl de Acetato de Sodio 3M, se deja a -70°C por 1 hora o más. Se colectó el ADN por centrifugación a 12000 Xg , 20 minutos, 4°C. Se descarto el sobrenadante dejando los tubos destapados a temperatura ambiente hasta que el etanol se haya evaporado. Lavamos el pellet con 1 ml de etanol 70% se centrifugó a 12000 Xg por 3 minutos, se dejó secar. Se disolvió el plásmido en 48 µl de agua mili Q con 2 µl de Ribonucleasa (Fermentas) e incubó por 30 minutos a 37°C para la digestión del ARN.

3.3.4 Digestión del ADN plasmidico con enzimas de restricción

Con el objetivo de determinar si el ADN plasmidial UrBmcis2 de 391 pb se clonó completamente, se realizó una digestión con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción reconocen y cortan secuencias específicas presentes tanto en el gen como en el plásmido. Luego de realizar un análisis de restricción se determinó que la endonucleasa EcoRI corta en los extremos del inserto por lo que obtenemos un fragmento de 3000 pb correspondiente al plásmido pGEM-T y otro fragmento de aproximadamente 400 pb que corresponde al inserto. Para ello en una primera fase se cuantificó la cantidad de ADN extraído en geles de agarosa al 0,8 % junto con el marcador de peso molecular determinando así la cantidad de ADN presente en cada muestra, y el tamaño del mismo. Posteriormente de cuantificado el ADN se realizaron las digestiones correspondientes con la enzima EcoRI. El tampón seleccionado fue siguiendo las instrucciones del fabricante. Las digestiones se incubaron durante 2 horas a 37°C y en todas ellas se utilizó una unidad de enzima por cada µg de ADN. Luego de la digestión confirmamos la liberación del inserto del plásmido por una corrida electroforética en geles de agarosa al 0.8%.

3.3.5 Secuenciación del ADN plasmídico y análisis *in silico*.

Los clones fueron posteriormente secuenciados para confirmar el clonaje de la región codificadora de la UrBmcis2. Los cebadores utilizados fueron para los promotores T7 y terminador SP6 cada uno con una concentración de 5pmol/ µl. Por cada clon se enviaron tubos con aproximadamente 150 ng de ADN en un volumen máximo de 5µl

junto con 1 µl de cada cebadores. Las muestras fueron enviadas al Sector de Secuenciamiento de ADN del Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Se utilizó el 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 Aligment Editor 7.1.3.0. La alineación de las secuencias se realizó utilizando el programa Clustal W del programa Mega 5.1. El análisis filogenético se utilizó el programa MEGA 5.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5) el mismo es uno de los programas más utilizados dada su precisión y velocidad, para la construcción del árbol se siguió el algoritmo de Neighbor Joining. Para el análisis de antigenicidad se utilizó el programa Lasergene 7.1.

Las secuencias de cistatinas tipo II de garrapatas duras y blandas, y la secuencia de una cistatina tipo I de *R. microplus*, fueron obtenidas del Genbank. Los números de acceso son: cistatina tipo I de *R. microplus* (NCBI ABG 36931) *Amblyoma variegatum* (NCBI DAA34288), *Dermacentor variabilis* (NCBI ACF35514), *Haemaphysalis longicornis* (Hlcyst-2 NCBI ABC94582, Hlcyst-3 NCBI ABZ89554, HISC-1 NCBI 59105), *Ixodes ricinus* (NCBI CAD68002), *Ixodes scapularis* (Sialostatin L NCBI AAM93646, Sialostatin L2 NCBI AAY66685) *Rhipicephalus sanguineus* (cystatin NCBI ACX53862, cystatin NCBI 53922) y con los géneros de garrapatas blandas: *Ornithodoros moubata* (Om-cystatin 1 NCBI AAS01021, Om-cystatin 2 NCBI AAS55948), *Ornithodoros parkeri* (NCBI ABR23498).

3.4 Clonado de la región codificadora de UrBmcis2 en un vector de expresión procariota.

Con el objetivo de lograr la expresión de la proteína recombinante cistatina (UrBmcis2) se utilizó el plásmido pET-5a (Figura 3) en el cual se clonó la secuencia que codifica esta proteína. Este vector de expresión se caracteriza por presentar una región promotora reconocida por la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5 de manera que tras la adición del IPTG la T7 RNA polimerasa expresada desde el cromosoma bacteriano induce la expresión de la proteína a partir del vector. Este vector presenta una secuencia que codifica un segmento de seis histidinas que quedan unidas a la región C-terminal de la proteína recombinante después de la traducción, facilitando su localización por Western Blot y purificación por cromatografía de afinidad usando resinas de Níquel. Adicionalmente este vector contiene el gen de β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina.

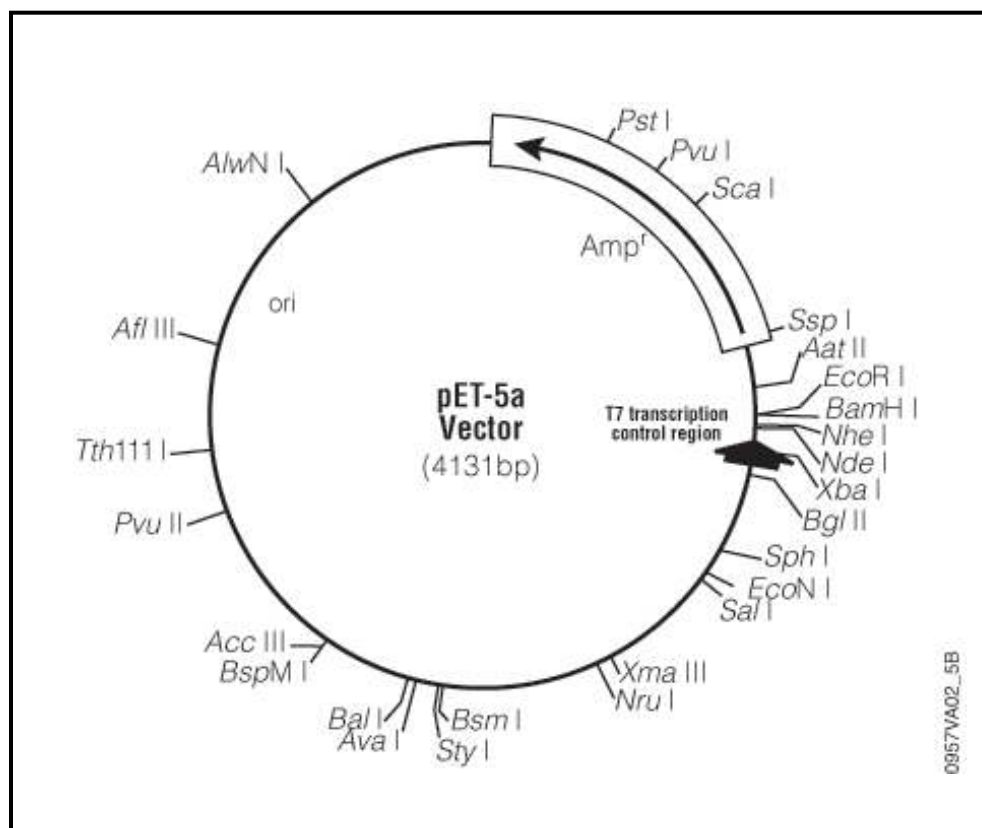


Figura 6 Esquema del vector de expresión de proteínas pET-5 a. Mostrando las posiciones de las secuencias blanco para las enzimas de restricción, el gen que le confiere resistencia a la ampicilina, el sitio de clonado multiple. (fuente:www.novagen.com)

3.4.1 Clonado de la región codificadora de UrBmcis2 en pET-5.

Al confirmar por secuenciación el clonado completo de la región codificadora de UrBmcis2 en el vector pGEM-T, se procedió al clonado de una de las cistatinas en el vector de expresión pET-5a. El proceso consta de varias etapas. En una primera etapa se amplificó el inserto para ello se utilizó la reacción de PCR realizada con el ADN plasmidial extraído del clon cis g/pGEM-T. Las amplificaciones se llevaron a cabo siguiendo la metodología explicada en el punto 3.2.5. Posteriormente las muestras se concentraron para obtener un mayor rendimiento en el proceso de purificación para ello los productos de PCR se unieron en un tubo al que se le agregó etanol 100% y acetato de sodio 3M, se dejó a -20°C por 1 hora, luego se centrifugó a 2000 Xg por 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante. A la muestra concentrada se

resuspendió en 15 µl de agua MilliQ, cuantificándose al realizar una corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8%

En una segunda etapa realizamos midiprep del pET-5 a, con el objetivo de extraer grandes cantidades de ADN plasmidial. Luego del shock térmico (anexo I) se toman colonias aisladas se incuban en 25 ml de medio LB con Ampicilina (50 mg/ml) e incuban a 37°C / 160 rpm, toda la noche en un incubador rotatorio, seguidamente se centrifugó a 2000 Xg por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante el que es resuspendió en 2,5 ml de buffer Tris 50mM, EDTA 10mM pH 8, se agitó vigorosamente se dejó 5 minutos en hielo. Para lisar la bacteria se agregaron 3.3 ml de solución de lisis alcalina II (hidróxido de sodio 0,2N; SDS 1%) preparada en el momento se invirtieron los eppendorf y posteriormente son colocados en hielo por 5 minutos. A los mismos se le agregaron 3,3 ml de solución de lisis Alcalina III (acetato de potasio 5M; ácido acético, H₂O) se homogenizó lentamente y colocó en hielo por 30 minutos. Luego se centrifugaron las muestras a 14000 Xg por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante es filtrado con gasa, al que se le agrego a polietilenglicol 8000 20%, cloruro de sodio 2.5M esta solución rica en sales precipita fragmentos grandes de ADN quedando los fragmentos pequeños de ADN y ARN en el sobrenadante. Se dejó 1 hora a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.4 g por 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con buffer TE. Se adiciono RNase (10mg/ml) (Fermentas) e incubó por 45 minutos a 37°C para la digestión del ARN.

En una tercera etapa se realiza la hidrolisis de los ADN. Los productos de PCR concentrados son hidrolizados con las enzimas de restricción NdeI (Invitrogen) y BamHI (Invitrogen) correspondientes al sitio de clonado de cada vector de expresión. Los reactivos utilizados fueron: 5 µl de amplicón (50 ng), 0.5µl de BamHI, 1µl de NdeI, 1 µl de tampón 3 (indicado por el fabricante) ,2.5 µl agua miliQ, se dejó a 37°C por 5 horas. El vector de expresión también fue hidrolizado con las mismas enzimas de restricción para su posterior ligación con el amplicon de la cistatina. Los reactivos utilizados fueron: 1.25 µl ADN, 0.5µl NdeI, 0.25µl Bam HI, 1µl tampón 3, 7 µl agua miliQ. En una cuarta etapa se realiza la purificación de ADN utilizando el Kit GeneClean. La purificación de los productos de PCR de UrBmcis2 y el ADN del plásmido de expresión salvaje, fueron obtenidos por extracción en geles de agarosa. Ambos ADN fueron sometidos a una corrida electroforética en una cuba de purificación, las bandas correspondientes al tamaño del ADN de interés fueron cortadas, pesadas y se le adiciono una solución de Ioduro de sodio 6M según las instrucciones del fabricante. Posteriormente fue incubada a 65° C hasta disolver la banda en la solución. Seguidamente se le agrego resina para la ligación del ADN.

Esta resina es lavada con buffer de lavado dos veces, centrifugando y secando. Luego se seca la resina y el ADN es resuspendido en agua y cuantificado.

En la etapa de ligación primero se realiza la desfosforilación del vector de expresión. El pET-5a es desfosforilado, para ello se utiliza la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP, Invitrogen) para impedir la re-ligación del vector salvaje aumentando así la eficiencia de ligación con nuestro inserto. Al ADN extraído se le adiciona 1U de la enzima CIAP con su buffer correspondiente incubándolo por 5 minutos a 50°C. La reacción de defosforilación se inactivó con el agregado de EDTA 10mM por 15 min a 65°C.

El ADN de la región codificadora para UrBmcis2 y los vectores fueron cuantificados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, para calcular la relación inserto/vector 1:3,1:6.

A la reacción de defosforilación se le adicionó 2 U de la enzima T4 DNA ligasa y su buffer correspondiente, dejándola 18 h a 16°C. Después de la ligación se realizó electroporación en *E.coli XL1-Blue* los clones transformados fueron extraídos por lisis alcalina o miniprep (Ver 3.2.3) y cuantificados.

Los clones fueron posteriormente secuenciados confirmando así el clonaje de la región codificadora de la UrBmcis2. Las muestras fueron analizadas en el Sector de Secuenciamiento de DNA del Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Se utilizó el 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 Aligment Editor.

3.5 Expresión de una cistatina recombinante de intestino de *Rhipicephalus microplus* de Uruguay (UrBmcis2) en *E.coli*.

3.5.1 Test de expresión de UrBmcis2 en *E.coli*

Para determinar las mejores condiciones de expresión de la proteína recombinante UrBmcis2 se utilizaron diferentes cepas de *E.coli* transformadas por shock térmico: *E.coli* BL21 Star (DE3); *E.coli* BL21 (DE3) pLysS; *E.coli* Rosseta (DE3); *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP; *E.coli* BL21 (DE3) C43, *E.coli* BL21 (DE3) C41 cuyas características se describen en anexo I.

Para cada test se partió de colonias frescas transformadas con el plásmido pET 5a-UrBmcis2 sembradas en placas de LB-agar a las que se le agregó ampicilina (50mg/ml). Para determinar las condiciones óptimas de expresión se probaron

diferentes condiciones de temperaturas (20 a 37°C), concentración de IPTG (0,4; 0,7; 1mM, se tomaron muestras a las 2 hs, 4hs y después de la incubación durante toda la noche.

Una colonia de la cepa transformada fue sembrada en medio líquido LB con ampicilina (50 µl/ml) e incubaron a 37°C con agitación constante a 180 rpm durante toda la noche (pre-inoculo). Adicionalmente se crecieron controles negativos de expresión los que fueron bacterias transformadas no inducidas. Posteriormente se pasó a un mayor volumen de medio LB e incubó a 37°C 160 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 en los tiempos ya mencionados.

Luego de tomadas las muestras se centrifugaron a 15000 Xg durante 5 -10 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante quedándonos con el sedimento que fue resuspendido en PBS 1X. Seguidamente se congelaron en nitrógeno líquido y descongelaron en baño María a 37°C. El análisis de los resultados se realizó mediante SDS-PAGE al 16% (Anexo 1) y Western Blot

Las mejores condiciones de expresión de UrBmcis2 se obtuvieron con *E.coli* BL21 (DE3) C41 inoculado en LB incubado a 20°C toda la noche, con agitación constante de 160 rpm, la inducción se logró con la adición de IPTG en una concentración final de 1mM.

3.6 Purificación de la cistatina recombinante UrBmcis2.

Antes de iniciar el proceso de purificación de UrBmcis2 resulta necesario identificar su localización y de esta forma seleccionar la técnica apropiada para su posterior aislamiento. Las proteínas heterólogas pueden ser expresadas de forma soluble o insoluble en cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son agregados densos en el interior de la célula constituidos principalmente por la proteína de interés en su estado nativo.

Luego de lavado el extracto crudo se resuspende en buffer de ligación para sonificarlo en hielo durante 15 segundos con descansos de 15 segundos por 5 minutos, con una amplitud de 40, potencia 80.

Seguidamente se separó en precipitado o fracción insoluble y sobrenadante o fracción soluble por centrifugación a 14000g por 10 minutos a 4°C. Se confirmó la presencia de la proteína por SDS page y Western Blot (Materiales y métodos 3.7.3). Ambas

fracciones fueron sometidas a tratamientos diferentes con el objetivo de obtener la cistatina recombinante.

3.6.1 Solubilización de UrBmcis2 de la fracción insoluble.

Los cuerpos de inclusión son granulos citoplasmáticos compuestos por agregados insolubles de la proteína de interés en su estado nativo. Con el objetivo de obtener la proteína soluble y activa de los cuerpos de inclusión estos fueron lavados y solubilizados con Urea como agente desnaturizante. En una primera etapa los cuerpos de inclusión son lavados resuspendiendo el pellet en PBS 1X, luego se centrifugo 14000g por 20 minutos a 4°C separando pellet de sobrenadante, repitiendo esta etapa 3 veces. Posteriormente se realizo el tratamiento de solubilización con Urea, para ello se resuspendio el pellet en Urea 1 M (Tris HCl 20mM pH 7.5) , luego se centrifugo a 14000 g por 20 minutos a 4 °C, separándose en pellet y sobrenadante, este tratamiento se repitió 3 veces aumentando la concentración de Urea a 2,4,6 M. En todas las etapas se separo una alícuota de sobrenadante con el objetivo de realizar un SDS PAGE 12%.

3.6.2 Purificación de la cistatina recombinante UrBmcis2 de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad.

Luego de localizada la proteína recombinante se procedió a la purificación por cromatografía de afinidad de la fracción soluble en columnas His Trap™ (GE Healthcare) siguiendo la metodología indicada por el fabricante. Se emplearon columnas His Trap™ (GE Healthcare) puesto que la proteína recombinante presenta en su extremo C- terminal, una cola de seis histidinas que interaccionan con el Níquel (Ni) cargado en la resina. El procedimiento consta de varias etapas. En una primer etapa se lavó la columna con 5 volúmenes de buffer fosfato, luego se equilibró con 5 volúmenes buffer de ligación. La muestra se filtra e iguala su pH al del buffer de ligación, pasándola por la columna recolectando su producto considerando como lo no ligado a la resina. Posteriormente se pasaron 15 volúmenes de columna con buffer de ligación, con el objetivo de lavar la columna, se va midiendo la absorbancia hasta que llega a niveles basales Finalmente, la proteína recombinante es eluída con concentraciones crecientes de Imidazol 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500mM en buffer

fosfato pasándose 5 volúmenes de columna aproximadamente de cada concentración. De cada elución se tomaron muestras de 2 ml aproximadamente y midió su DO para posteriormente realizar SDS page y Western Blot. Luego de su uso la resina fue lavada con 10 volúmenes de H₂O destilada y 5 volúmenes de etanol al 30%.

Las muestras que presentaron una mayor absorbancia se concentraron por evaporación del líquido utilizando el concentrador Centrivap (Labconco), de cada muestra se tomaron 150 µl llevándose a 20 µl, realizándose SDS PAGE y Western Blot.

3.7 Métodos de análisis de proteínas

3.7.1 Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para la electroforesis en geles de acrilamida se siguió la metodología bajo condiciones desnaturalizantes descrita por Laemmli (1970). Se utilizó una cubeta Thermo Scientific vertical systems Owl P8DS, con geles separadores al 16% y geles concentradores al 5%. Para llevar a cabo el tratamiento desnaturalizante, las muestras se incubaron a 70°C por 5 minutos con el buffer de muestra SDS-PAGE 5X (Anexo 1) las muestras se agitaron vigorosamente y centrifugaron durante unos segundos, repetidas veces. Posteriormente se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular Page Ruler Unstained (Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo sumergiendo el gel en la cuba con buffer de corrida al que se le aplicó un voltaje de 100 V cuando las muestras estaban en el gel concentrador al 5% pasándose a 150 V cuando las muestras estaban en el gel separador al 16%, durante un tiempo aproximado de 2 horas

3.7.2 Tinción de proteínas en geles de acrilamida

Los geles de acrilamida se tiñeron con una solución de azul de *Coomasie Brilliant Blue* R-250, 1% (p/v), metanol 40% y ácido acético 10%. El tiempo de tinción fue entre 1 hora como mínimo y 24 horas como máximo, a temperatura ambiente. Seguidamente 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). Los geles se secaron sobre vidrio entre 2 celofanes a temperatura ambiente, luego se escanearon las imágenes con el programa informático HP Scanjet G2710

3.7.3.1 Electrotransferencia de proteínas

Después de la electroforesis SDS-PAGE las proteínas se transfirieron desde los geles a membranas de nitrocelulosa. Este procedimiento se realizó de forma húmeda o semiseca, con objeto de optimizar la técnica y obtener una mejor resolución en la detección de la proteína recombinante, siguiendo la metodología de Antibodies a Laboratory Manual.

Para la electrotransferencia húmeda se utilizaron cubas mini-V 8.10 Gibco BRL. Se utilizaron membranas de nitrocelulosa de 8.5 x 6 cms, y 6 piezas de papel *Whatman* tipo 1 de 3 mm de grosor y tamaño 7 X 9 cms, se sumergieron en el buffer de transferencia (anexo I). A continuación, manteniendo todos estos elementos dentro del tampón, se realizó el montaje dentro del *cassete* porta gel como sigue: 2 esponjas, 3 piezas de papel *Whatman*, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, 3 piezas de papel *Whatman* y finalmente 2 esponjas. El *cassete* se colocó dentro del módulo de transferencia y éste se introdujo dentro del tanque contenedor con tampón de transferencia. El gel se orientó hacia el cátodo y la membrana hacia el ánodo. La transferencia se llevó a cabo a una intensidad de 70 V durante 1 hora.

La transferencia semiseca se realizó mediante el *Semidrive* Thermo scientific. Finalizada la SDS-PAGE, se procedió al montaje del *sándwich* sumergido en buffer de transferencia (anexo I) 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.

3.7.3.2 Sistemas de revelado

Luego de realizada la transferencia a la membrana de nitrocelulosa se tiñó la membrana con Ponceau Red 2% (1:200) diluido en PBS X por 5 minutos (según recomendación del fabricante) o con Fast Green 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 UrBmcis2 se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-histidina conjugado con la peroxidasa del rábano (HRP) (Anti his- C term –HRP-Invitrogen). Este sistema de marcado indirecto lo utilizamos dado que

nuestra proteína recombinante presenta en su extremo 6 aminoácidos de Histidina o molécula reportera. El anticuerpo anti molécula reportera conjugado con la enzima peroxidasa del rábano nos permitió evidenciar la proteína mediante una reacción catalizada por la enzima, agregando el sustrato adecuado para esa enzima. Se utilizaron 2 sustratos diferentes con el objetivo de optimizar la técnica y obtener una mejor resolución en la detección de UrBmcis2, se utilizó Diamino Benzidina (DAB) y por otro lado NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride)- BCIP (5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphatase). La metodología empleada al utilizar DAB fue: se preparó una solución de bloqueo con PBS-Tween 20- 0.05% (PBS-T) y leche descremada 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 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-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 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. 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, 6µl 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.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSION

El aumento de garrapatas resistentes a drogas Ixodidas y el cuidado del medio ambiente, ha generado la necesidad de buscar métodos de control alternativos, como el uso de vacunas..

Las garrapatas del género *Rhipicephalus microplus* se caracterizan por una alimentación hematófaga por prolongados períodos de tiempo. Esta alimentación hematófaga puede llegar a producir anemia en el ganado bovino, ya que una sola hembra aumenta su peso entre 100 a 200 veces. Esta capacidad esta dada por la proteólisis de las proteínas del huésped principalmente albumina y hemoglobina. La digestión de estas proteínas ocurre principalmente dentro de vesículas acidas en células digestivas Estas vesículas son capaces de acidificarse llegando a un pH 3 en el intestino medio de las garrapatas lo que estaría señalando la presencia de proteasas.

Se ha caracterizado e inmunolocalizado las proteasas catepsina D, catepsina L-like (BmCL1) del intestino medio de partenoginas y teloginas de *R. microplus* (Renard G et al 2000, 2002) Esta caracterización enzimática sugiere que *R. microplus* utiliza para su digestión aspártico y cistein proteasas, esto ya ha sido descrito en otros parásitos hematófagos como ser *Ixodes ricinus* (Sojka D et al 2008), *Fasciola gigantica* y *F. hepatica* nematodos y otros (Caffrey CR et al 2004, Delcroix M et al 2006, Williamson AL et al 2004). Los inhibidores de proteasas son un objetivo interesante para el desarrollo de vacunas contra parásitos, dado que todos los organismos los utilizan para regular su actividad proteolítica. La familia cistatina son inhibidores naturales y reversibles de las cystein proteasas. Diversos estudios en Ixodidos demuestran que las cistatinas están presentes en diversos tejidos: glándula salival, intestino, cuerpo gordo en *Boophilus microplus* (Lima CA et al 2006) *Amblyomma americanum* (Karim S et al, 2004, 2005) *Haemaphysalis longicornis* (Yamaji K et al 2009, 2009a, Jinlin Z 2010) e *Ixodes scapularis* (Kotsyfakis M et al 2007)

La función fisiológica de las cistatinas no está completamente dilucidada, pero se ha demostrado su acción en procesos importantes como ser la evasión del sistema inmune del huésped (Francischetti IM et al. 2009) o en la remodelación de los tejidos facilitando la alimentación hematófaga (Kotsyfakis M et al 2006,2007; Schwarz A et al 2012). Al actuar en estos procesos esenciales de la vida de la garrapata las hace un candidato promisorio para desarrollar vacunas.

Nuestro grupo ha caracterizado 5 genes con alta similaridad a las cistatinas tipo II basándose en las secuencias conocidas de genes depositados en el Genbank, las

amplificaciones se realizaron sobre glándula salival y ovario de partenóginas de *R. microplus* de Rio Grande do Sul.

En la presente maestría nos propusimos identificar y secuenciar el cDNA de una cistatina nativa de diferentes poblaciones de *R. microplus* de Uruguay y expresar y purificar la cistatina recombinante.

El objetivo de la búsqueda de proteínas con potencial antigénico en *R. microplus* es aportar información al conocimiento de las cistatinas en garrapatas y conocimiento muy importante para desarrollar una vacuna regional.

4.1 EXPRESIÓN DE ARNm DE UNA CISTATINA EN DIFERENTES TEJIDOS DE *Rhipicephalus microplus*

Con el objetivo de determinar la presencia de ARNm del gen que codifica la proteína para esta cistatina tipo II se realizó una RT-PCR. Los tejidos utilizados fueron carcaza, intestino, glándula salival, ovario de garrapatas partenoginas y teleoginas de *R. microplus* Porto Alegre. (Ver materiales y métodos 3.2.6) . Los cebadores utilizados fueron Cist-Bm-pAE-For Cist-Bm-pAE-Rev, (ver materiales y métodos 3.1) que amplifican un fragmento de aproximadamente 400 pb. Se utilizó actina como control positivo el cual es un gen constitutivo, los cebadores utilizados fueron: FOR A Y REV A (ver materiales y métodos 3.1) que amplifican un fragmento de 800 pb.

Se siguieron las mismas condiciones de PCR utilizadas en el clonado de la cistatina.

Se observó que la Actina amplificó en todos los tejidos con una banda de aproximadamente 800pb. Se observó que el gen de cistatina solo amplificó en el intestino de partenoginas y teleoginas en un fragmento de aproximadamente 400 pb, el cual era el tamaño esperado. Indicando la expresión del ARNm de un gen que codifica esta cistatina tipo II solamente en el intestino de la garrapata. Los resultados se observan en la figura 11.



Figura 7. RT-PCR de diferentes tejidos de teleoginas y partenoginas de *R. microplus* . del gen de cistatina y actina (recuadros naranjas). carril 1.- ovario- teleogina carril 2.- ovario - partenogina carril 3.- carcaza –teleogina, carril 4 carcaza-partenogina carril 5.- intestino- teleogina carril 6.-intestino-partenogina. carril 7.- glándula salival – teleogina carril 8.- glándula salival-partenogina . carril 9 Marcador de peso Molecular Lambda HindIII ds DNA Markers (Invitrogen)carril 10 - ovario- teleogina carril 11.- ovario - partenogina carril 12.- carcaza –teleogina, carril 13 carcaza- partenogina carril 14.- intestino- teleogina carril 15.-intestino-partenogina. carril 16.- glándula salival –teleogina carril 17.- glándula salival-partenogina

4.2 CLONAJE DE LA REGIÓN QUE CODIFICA UNA CISTATINA DEL INTESTINO DE *Rhipicephalus microplus*

Con el objetivo de secuenciar el cDNA de una cistatina de *R. microplus* se colectaron en el año 2009-2010 aproximadamente 100 garrapatas de diferentes departamentos y localidades del Norte Uruguayo, zona considerada endémica por el Ministerio de Ganadería y Pesca. A su vez también se trabajó con la cepa de referencia de Uruguay- cepa Mozo y la cepa Porto Alegre. Las muestras fueron identificadas como se observa en la primera columna de la Tabla 1. Luego de obtenido el cADN se realizó una PCR con los cebadores diseñados para cistatina y actina como se

describió en materiales y métodos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. Todas las muestras de intestino amplificaron un fragmento de 400 pb, no observándose amplificación en las muestras de larvas lo que podría indicar la ausencia de esta proteína en este estadio parasitario. La actina amplificó en todas las muestras un fragmento de 300 pb. Los resultados se observan en la figura 4.

Tabla 1 Departamentos y localidades de Uruguay de donde se obtuvo *R.microplus*

Identificación de cDNA	Departamento	Localidad	Observaciones
Muestra Cis larva	Artigas	Tabacalera	Larva
Muestra Cis a	Montevideo	Montevideo	Intestino (cepa Mozo)
Muestra Cis b	Rivera	Zanja Honda	Intestino
Muestra Cis c	Rivera	Las chircas	Intestino
Muestra Cis d	Tacuarembó	Caraguata	Intestino
Muestra Cis e	Rivera	Palmito	Intestino
Muestra Cis f	Rivera-Cerro Largo	Masangano	Intestino
Muestra Cis g	Rivera		Intestino

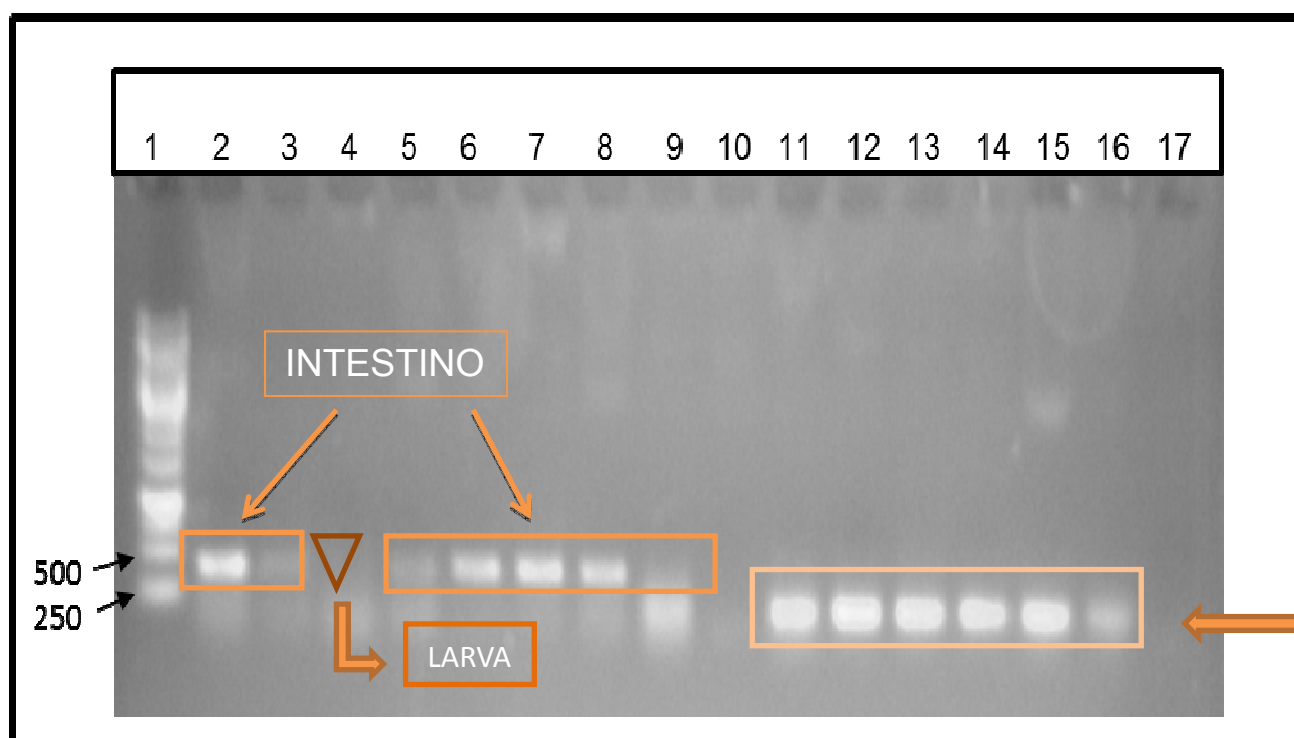


Figura 8: PCR para la detección de un gen que codifica una cistatina (carril 2 a 8) en diferentes poblaciones de *R. microplus* de Uruguay. Se utilizó la actina como control positivo (carril 11 a 16). Carril 1: marcador de peso molecular Gene Ruler 1 Kb (Fermentas).- Carril 2: - Cepa Mozo (cis a) Carril 3: Rivera-Zanja Honda (cis b).- Carril 4: Artigas-Tabacalera (cis larva).- Carril 5: Rivera-Las chircas (cis c).- Carril 6 Tacuarembó-Caraguatá (cis d) .- Carril 7 Rivera-Palmito(cis e) .- Carril 8: Rivera-Cerro Largo (cis f) .- Carril 9 Rivera (cis g).- Carril 10 control negativo Carril 11: - Cepa Mozo (cis a) Carril 12: Rivera-Zanja Honda (cis b).- Carril 13: Artigas-Tabacalera (cis larva).- Carril 14: Rivera-Las chircas (cis c).- Carril 15 Tacuarembó-Caraguatá (cis d) .- Carril 16 Rivera-Palmito(cis e) .- Carril 17 control negativo Actina

El clonado de la región codificadora para la cistatina se realizó en el vector pGEM-T. Se clonaron todos los productos de PCR de intestino de diferentes poblaciones de garrapatas. Se analizó el clonado por hidrolisis del plásmido con la enzima EcoRI, liberando el inserto en el tamaño esperado (400pb) (Figura 5) y una banda de 3000 pb que corresponde al plásmido pGEM-T. Luego de la hidrolisis las muestras fueron secuenciadas confirmando así la presencia del inserto correspondiente a la región codificadora de la cistatina.

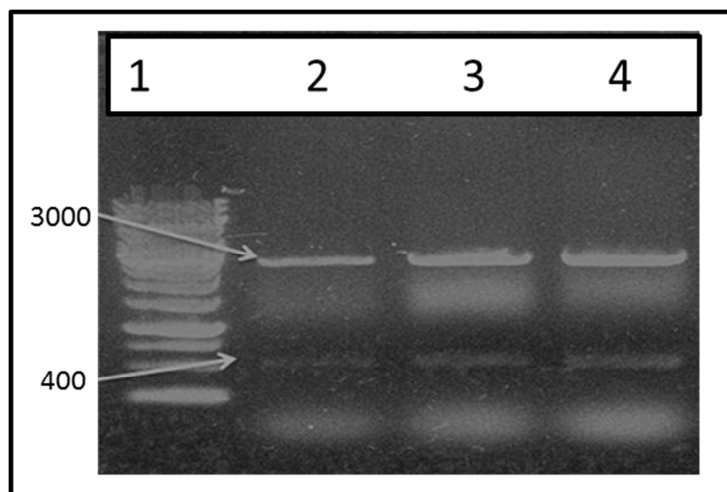


Figura 9: Digestión enzimática con EcoRI, gel de agarosa al 0.8%.- carril 1. marcador de peso molecular Gene Ruler 1 Kb (Fermentas).- carril 2- cistatina cepa Mozo .- carril 3 – cistatina cepa Rivera-Zanja Honda ; carril 4- cistatina cepa Tacuarembó - Caraguatá. (no se muestra control negativo que fue realizado con el plasmido solamente)

A partir de estas secuencias de nucleótidos se obtuvo la secuencia de aminoácidos deducida, utilizando el programa BioEdit. (Anexo 2) Al analizar dichas secuencias podemos confirmar que se realizó el clonado de una cistatina tipo II de diferentes poblaciones de garrapatas *R. microplus*. Nos basamos en que todas las secuencias presentan: péptido señal, secuencias consenso características de las cistatinas, 2 puentes disulfuro, una masa molecular de aproximadamente 14 kDa (figura 6). En los últimos años se han cristalizado cistatinas de garrapatas del genero *Ornithodoros moubata* (Salat J et al 2010) e *Ixodes Scapularis* (Kotsyfakis M et al 2010) donde se pudo observar que esta molécula adopta un típico pliegue, caracterizándose por 5 hojas β que envuelve un α hélice, contenida por dos puentes disulfuro. También demostraron que las cistatinas tipo II de garrapata bloquean el sitio activo de las cisteín proteasas por una estructura en forma de cuña altamente conservada en la familia cistatina. Esta estructura está formada por 3 regiones, la primera se encuentra en el extremo N-terminal encontrándose una Glicina (G) que le da flexibilidad. La segunda región es una secuencia consenso de Glutamina-Xaa-Valina - Xaa-Glicina (QXVXG) ubicada en el primer bucle o loop 1 (L1). La tercera región es una Prolina-Triptofano (PW) ubicada en el segundo bucle o loop 2 (L2). Al poseer un péptido señal nos indica que probablemente sea secretada (Zavansnik-Bergant T 2008, Salat J et al 2010, Kotsyfakis M et al 2010)

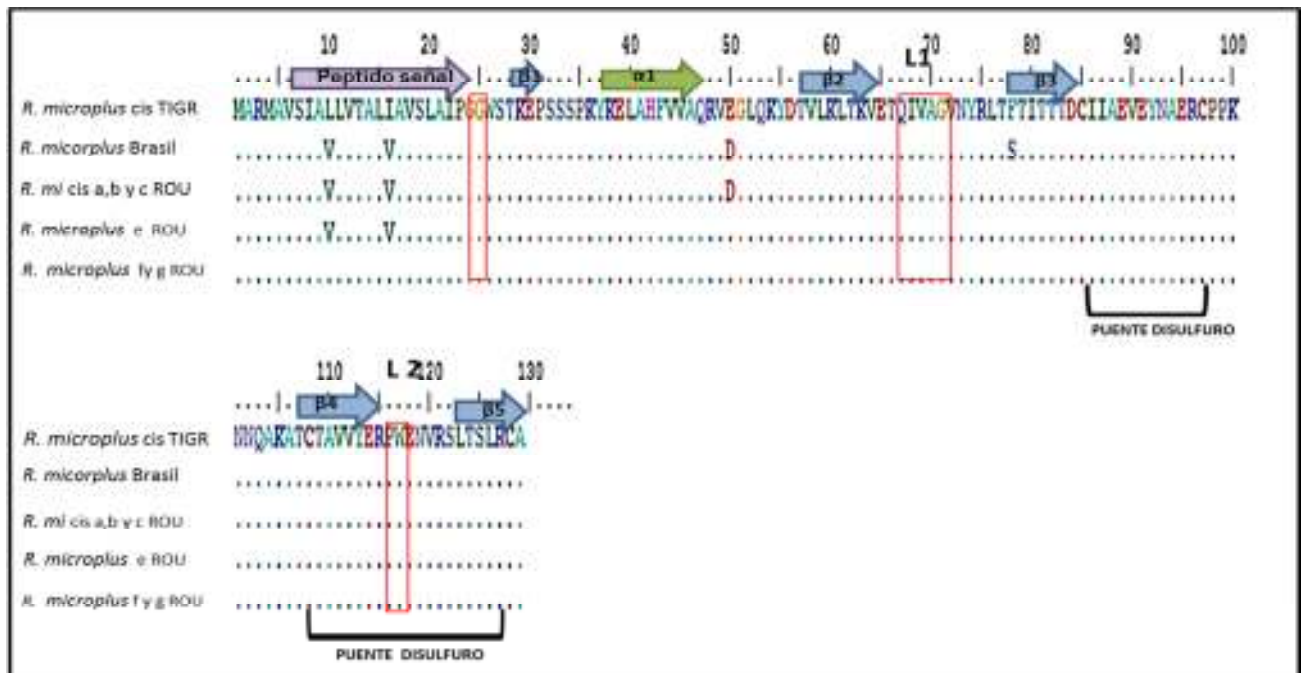


Figura 10: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de una cistatina tipo II clonadas de intestino de *R. microplus* de Uruguay y Brasil. Se utilizó como secuencia de referencia una cistatina del TIGR (TC 12831-TC 3423). En los recuadros rojos observamos los 3 dominios consenso y las 4 cisteínas que forman los probables puentes de disulfuro están unidos por líneas de conexión negras, típicos de las cistatinas tipo II. La estructura secundaria está representada en la parte superior por una flecha violeta el péptido señal, con flechas azules para las cadenas β y por una flecha verde para la α hélice.

En relación a las secuencias nucleotídicas, al realizar el cálculo de similitud podemos observar que las secuencias de las cistatinas tanto de Uruguay como de Brasil en relación a la de referencia del TIGR tienen un promedio de similitud del 90%. Las Cistatinas de las poblaciones de Uruguay en relación a la cistatina de Brasil 3222 tienen un promedio de similitud en su secuencia del 94%. El porcentaje promedio de similitud entre las poblaciones de Uruguay es de aproximadamente el 94%.

Al comparar las secuencias de aminoácidos de las cistatinas de diferentes zonas de Uruguay junto con la de, Brasil-Río Grande do Sul y la de referencia del TIGR (TC 12831-TC 3423) observamos que hay variaciones en los aminoácidos en 4 (cis a, b, c, e) de las 6 poblaciones secuenciadas. Estos cambios suceden en diferentes lugares de la proteína, como ser en las posiciones 10 y 16 afectando el péptido señal, en la posición 50 afectando el α hélice- cadena β 2 y por último en la posición 78 afectando la cadena β 3, ninguno de estos cambios modifica el sitio de unión a proteasas. Según sus características de polaridad vemos que los cambios en las

posiciones 10, 16 (en cis a, b, c y e) suceden por aminoácidos pertenecientes al mismo grupo no polar o hidrófobo. En la posición 10 se observa una Leucina en la secuencia de Referencia TIGR y una Valina en todas las secuencias de Uruguay y Brasil. En la posición 16 observamos Isoleucina en la secuencia del TIGR y en las secuencias de las poblaciones de Uruguay Cis a, b, c, e y Brasil una Valina. En la posición 50 en la secuencia del TIGR y en las poblaciones de Uruguay cis 5,6 y 7 hay un ácido Glutámico, y en las secuencias de Uruguay a, b, c y Brasil hay un ácido Aspártico, ambos son ácidos de carga negativa a pH 7 y ambos tiene un segundo grupo carboxilo. Estas modificaciones no llevarían a grandes cambios en las características hidrofobias de la proteína. Pero en la posición 78 observamos un cambio muy interesante, donde en la secuencia del TIGR y las de Uruguay existe un ácido aromático la Fenilalanina el cual es remplazado por una Serina perteneciente al grupo de los no polares o sin carga. Este cambio puede llevar a modificaciones en el plegamiento de esta cistatina en las poblaciones de Uruguay y Brasil por la presencia de un anillo aromático en la Fenilalanina, como en las características de solubilidad ya que los aminoácidos aromáticos son considerados hidrófobos y los no polares son hidrófilos (Leningher AL , 2006).

Tabla 2. Variaciones de aminoácidos en las secuencias proteicas las cistatinas de Uruguay (UrBmcis2 a, b, c, e, f y h), Brasil-Río Grande do Sul(BrBmcis2) y TIGR (TC 12831).

Posición del aminoácido en la secuencia Peptídica	Secuencia TIGR	BrBmcis2 – Brasil-Río Grande Do Sul.	UrBmcis2 a, b, c ROL	Rubemcas-e ROA	Sic g y h-ROA
10	Lucina(L) Hidrófobo	Valina(V) Hidrófobo	Valina(V) Hidrófobo	Valina(V) Hidrófobo	Lucina(L) Hidrófobo
16	Isoleucina (I) Hidrófobo	Valina(V) Hidrófobo	Valina(V) Hidrófobo	Valina(V) Hidrófobo	Isoleucina (I) Hidrófobo
50	Ácido Glutámico (E) Ácido-carga negativa	Ácido Aspártico (D) Ácido-carga negativa	Ácido Aspártico (D) Ácido-carga negativa	Ácido Glutámico (E) Ácido-carga negativa	Ácido Glutámico (E) Ácido-carga negativa

78	Fenilalanina (F) Aromático	Serina (S) Hidrofílico- neutro polar	Fenilalanina (F) Aromático	Fenilalanina (F) Aromático	Fenilalanina (F) Aromático
-----------	---	---	---	---	---

4.3 ANÁLISIS *in silico* DE SECUENCIAS DE CISTATINAS TIPO II EN GARRAPATAS.

Las cistatinas de tipo II han sido ampliamente estudiadas en garrapatas duras y blandas. Hay descritas actualmente 16 cistatinas tipo II de las cuales 14 presentan gran parte de los dominios conservados de esta familia: la glicina (G) en el extremo N-terminal (primer bucle), la secuencia consenso de Glutamina-Xaa-Valina - Xaa-Glicina (QXVXG), Prolina-Triptofano (PW) en el segundo bucle (L2) , las 4 cisteínas que forman 2 puentes disulfuro. En *Ornithodoros coriaceus* se describieron 2 proteasas semejantes a las cistatinas (NCBI ACB70345, NCBI ACB70343), estas presentan diferencias llamativas con las cistatinas de garrapatas ya que no presentan los motivos QXVXG y PW; estas diferencias las pueden hacer únicas en su función en la fisiología de la garrapata. De todas las cistatinas secuenciadas, 9 se han logrado caracterizar funcionalmente y bioquímicamente. (Schwarz A et al 2012)

Al analizar una de las secuencias de *R. microplus* UrBmcis2g de Uruguay con secuencias publicadas de cistatinas tipo II de los géneros de garrapatas duras: *Amblyoma variegatum* (NCBI:DAA34288), *Dermacentor variabilis* (NCBI:ACF35514), *Haemaphysalis longicornis* (Hlcyst-2 NCBI:ABC94582, Hlcyst-3 NCBI:ABZ89554, HISC-1 CBI:59105), *Ixodes ricinus* (NCBI:CAD68002), *Ixodes scapularis* (Sialostatin L NCBI AAM93646, Sialostatin L2 NCBI:AAY66685) *Rhipicephalus sanguineus* (cystatin NCBI:ACX53862, cystatin NCBI:53922) y con los géneros de garrapatas blandas: *Ornithodoros moubata*(Om-cystatin 1 NCBI:AAS01021, Om-cystatin 2 NCBI:AAS55948), *Ornithodoros parkeri*(NCBI:ABR23498), observamos similitudes y diferencias . (Figura 7)

- Todas son secretadas ya que presentan péptido señal, exceptuando *Dermacentor variabilis* donde no podemos afirmar su secreción por la ausencia del mismo.
- Presentan dos o los tres dominios conservados de la familia cistatina tipo II que forman una estructura en forma de cuña inhibiendo las peptidasas del tipo

papaína. En las dos cistatinas descritas de *Ixodes scapularis* (sialostatinas SL y SL2) están ausentes los aminoácidos prolina y triptófano (PW) del segundo bucle, el cual fue sustituido con Asparagina- Leucina (NL). Sin embargo ambas sialostatinas presentan los aminoácidos glutamina y glicina (QG) presente en la cistatina C de humano (NCBI P01034). Estas diferencia en el segundo bucle podría explicar la incapacidad de estas proteínas de inhibir a las catepsinas B y H (Kotsyfakis M et al 2006, 2007)

- Presentan las 4 cisteína que forman los puentes disulfuro que mantienen la estructura secundaria de la proteína. En *Haemophilus longicornis* HISC-1 posee solo 3 de los residuos de cisteína.
- Al calcular las similaridades de las secuencias de *R. microplus* con las garrapatas analizadas observamos que presenta una alta similaridad del 71,6% con Hlcys3 y del 56 % con Hlcys 2 ambas de *Haemophilus longicornis*. Presenta un promedio del 33% con un rango de 48 -27,8% con el resto de las cistatinas tipo II de garrapatas.

La gran similaridad entre las cistatina de *Haemophilus longicornis*.Hlcys3 y *Rhipicephalus microplus* podrían considerarse genes similares Ambas proteínas se expresan principalmente en el intestino

Tabla 3. Análisis de similitud entre la cistatina tipo II de *R. microplus* de Uruguay con las cistatinas tipo II de diferentes garrapatas publicadas en el Genbank

ESPECIE DE GARRAPATA	IDENTIFICACIÓN (Genbank)	PORCENTAJE DE SIMILARIDAD (%)
<i>Amblyoma variegatum</i>	DAA34288	34,0
<i>Dermacentor variabilis</i>	DvM334 (ACF35514)	31,0
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	HISC 1(ABS59105)	27,8
	Hlcys 2 (ABC94582)	56,0
	Hlcys 3 (ABZ89554)	71,6
<i>Ixodes ricinus</i>	CAD68002	38,5
<i>Ixodes scapularis</i>	Sialos L (AAM93646)	31,8
	Sialos L2 (AAY66685)	33,6
<i>Rhipicephalus sanigineus</i>	ACX53922	30,0
	ACx53862	43, 6
<i>Rhipicephalus microplus</i>	DQ646915.1	16,0
<i>Ornithodoros parkeri</i>	ABR23498	31,6
<i>Ornithodoros moubata</i>	Omcys1(AAS0102)	44,0
	Omcys 2 (AAS55948)	48,0

```

m1 TIGR : -----MARMAVSTALLVTALIAVSLAIPGGWSTK-EPSSSPKYLKELAHFV---AQRVEGLQKYDT : 57
Rm2 BRASIL : -----MARMAVSTAVLVLTALVAVSLAIPGGWSTK-EPSSSPKYLKELAHFVX---AQRVDGLQKYDT : 57
Rm3URUGUAY : -----MARMAVSTAVLVLTALVAVSLAIPGGWSTK-EPSSSPKYLKELAHFV---AQRVDGLQKYDT : 57
A.variegat : --MAAFKQVCLLFVAMWAAVLLSGGHGRSAYVGGWQE-QPDGDPKYLQLAHYAV---STQTQNLTMKYDT : 64
D.variabilis : -----VGDREFEDT : 9
Hl.Hlcyst-3 : -----MAGCAALSGAALACLFVVCASIPGGWRDQ-DPQSSPKYLKELAHYAV---AQRVEGLDNYDT : 57
Hl.HLSC-1 : MKVAKLVFEMRVPSACLLFIFLATRVNSARLVGGWRHQ-NPLSNPRFFELAHFAL---SGENKGHGIPGA : 66
Hl.Hlcyst-2 : -----MKQAAIIAFFGLVGVAFCSHPKRLIGGWTOH-DPSSNPKYLKELAHFAI---SQQTKGLDVMYHT : 59
I.ricinus : -----MSIVKAALLVLGVVCLSTAFPGIWRH-HPDVPDPRYKEWAHFAI---SSQVEGRTNKYDT : 55
Is.sialost L2 : -----MTSSLALVLLFGGAAVCAELALRGYRER-SNQDDPEYLELAHYATSTWSAQQPGKTHFDT : 60
Is.sialost L : -----MTSTFALVLLGGMAVCVATGVFGGYSERANHQANPEFLNLAHYATSTWSAQQPGKTHFDT : 61
O.mcystatin-1 : -----MSSFKAVALLIIVYGASQGTSLPGGWTRQ-DPT-EARLELAHFAT---SSQTEGREFYDT : 56
O.mcystatin-2 : -----MIRSAVLTVLVGVCLAQRGFVGGWSQV-DPKIRPDLELAHFAY---ASQTAGLEYVHT : 56
O.parkeri : -----WTKK-DAS-NPFLALAHIAASE-SSKTQGLSHYHT : 33
Rs cys 1 : --MPSLGATACGIAVALVAVFACTAXPVGLVGGWQKH-NVSEEAIIEELAHFAV---SQQVEGREFFDT : 64
Rs cys 2 : -----MPHYVLVTLALTLSLFGSCATSAMVGGWRKQ-DPDKNSKYLFFAHYAV---STQTQGLKHYNT : 60

Rm1 TIGR : VLKTKVETIAAVNRFTTITTTDIIAEV-----EINAERCPPKN-NQAKATTAVERPWEN : 119
Rm2 BRASIL : VLKTKVETIAAVNRFTTITTTDIIAEV-----EINAERCPPKN-NQAKATTAVERPWEN : 119
Rm3URUGUAY : VLKTKVETIAAVNRFTTITTTDIIAEV-----EINAERCPPKN-NQAKATTAVERPWEN : 119
A.variegat : VVNTRVRTVAIVNRNFTTAPSNITIGTD-----NNTAQHCVSA--GTVNGLSAIIVVG--- : 121
D.variabilis : VLEVDVQTVAITNRKFKTAESTRVTD-----SKELCLPKSSETVKDTTAVERPWEN : 71
Hl.Hlcyst-3 : VLDTKVETVAIVNRFTTIAGSSKIGEV-----EITEESCPPTT-TEAKATTAVERPWEN : 119
Hl.HLSC-1 : ATKRSVATVAIKKKEFDLVPLVSSNKVPRQLYDGSRGYGSLLWVMGVRMNTTTVYQVWPWA : 136
Hl.Hlcyst-2 : VLKVKVETVAIVNRIFETAPNIPVNEK-----SIENCKPTT-NMPSATIAVERPWEN : 120
I.ricinus : LLKMSVESVAIVDKKMMVAESTVVGKD-----WSRTRCHPKV-DAPHMITAVERPWEN : 117
Is.sialost L2 : VVELVKVTVAITNRTLKVAESTELTST-----LNKDTQANA-NAAQRTTTVYRNLOQ : 120
Is.sialost L : VAEVKVETVAITNRTLKVAESTELTST-----LNKDTCLPKA-DAAHRTTTVYRNLOQ : 121
O.m est cr : VVTKEVETVAIVNRKTIETISPSVKIGEV-----QSAEQCVPKD-AQOKSTVAVYHVPWON : 118
O.mcystatin-1 : VLETKASQVAIVNRKTLKVAPSKKVSET-----VSKELQCPQL-NAAPKDEAQYVVPWRN : 118
O.parkeri : VKKLEVEVTSIVNRKMKVAPSTNVNEK-----SKKTCPPQK-KAQVKTAVYHVPWEN : 93
Rs cys 1 : VLEMDVDTVAIVNRKFKTAESTRVTES-----XRETCLXKSREVVKDVTAVERPWEN : 126
Rs cys 2 : VVRLEVKTVVAIVNRKIFETAPNIVIGKV-----HSPHVCTQV--GHEDRLSAIYVIPWMN : 120

Rm1 TIGR : VRS-----LTSLRCA----- : 129
Rm2 BRASIL : VRS-----LTSLRCA----- : 129
Rm3URUGUAY : VRS-----LTSLRCA----- : 129
A.variegat : ----- : -
D.variabilis : ERS-----VSSFTCEGDAVST----- : 87
Hl.Hlcyst-3 : VRT-----LTSFDCV----- : 129
Hl.HLSC-1 : I-----CKG----- : 140
Hl.Hlcyst-2 : YRE-----LTSFRCPR----- : 131
I.ricinus : TKS-----IKYYSCGEPVNN----- : 133
Is.sialost L2 : EKS-----INSFECAAA----- : 132
Is.sialost L : DKS-----VSPFECEAA----- : 133
O.m est cr : QKS-----VTSYRCE----- : 128
O.mcystatin-1 : TKE-----VTSFEEN----- : 128
O.parkeri : TKDVLEKNVTQFQCQRGSKATLR----- : 116
Rs cys 1 : QRS-----VTSFTCEGTV----- : 139
Rs cys 2 : RIS-----VTSYTCESLGLSHFPNHLVQQPGSTQKNGASTIILK : 160

```

Figura 11 Alineamiento de cistatinas tipo II de *R. microplus* de Uruguay, Brasil TIGR y otras cistatinas tipo II de garrapatas duras y blandas depositadas en el Genbank. Las cistatinas presentan péptido señal, una glicina en el extremo N terminal, las secuencias consenso QXVXG y PW, y además presentan 4 cisteínas que podrían formar los 2 puentes disulfuro. Las secuencias consenso y otros aminoácidos idénticos en todas las secuencias están marcados en negro, otros residuos que se repiten en la mayoría de las secuencias están marcados en gris. Las siguientes cistatinas tipo II son las utilizadas: *Rhipicephalus*

microplus (Rm1 TIGR TC12831 TC3423, Rm2 Brasil, UrBmcis2g Uruguay), *Amblyoma variegatum* (NCBI DAA34288), *Dermacentor variabilis* (NCBI ACF35514), *Haemaphysalis longicornis* (Hlcyst-2: NCBI ABC94582, Hlcyst-3: NCBI ABZ89554, HISC-1: NCBI 59105), *Ixodes ricinus* (NCBI CAD68002), *Ixodes scapularis* (Sialostatin L: NCBI AAM93646, Sialostatin L2 NCBI AAY66685), *Rhipicephalus sanguineus* (Rscys1: NCBI ACX53862, Rscys2: NCBI 53922) y con los géneros de garrapatas blandas: *Ornithodoros moubata* (Om-cystatin-1: NCBI AAS01021, Om-cystatin-2: NCBI AAS55948), *Ornithodoros parkeri* (NCBI ABR23498).

4.4 ANALISIS *IN SILICO* DE LAS PROPIEDADES INMUNOLOGICAS DE UrBmcis2 de *Rhipicephalus microplus*

Con el objetivo de predecir sitios antigénicos comunes en cistatinas tipo II de garrapatas publicadas se realizó análisis de Jameson-Wolf. Este sistema *in silico* predice la estructura secundaria de la proteína a partir de la secuencia primaria. Dado que los sitios antigénicos a los cuales pueden unirse los anticuerpos y/o receptores del sistema inmune, se encuentran en las regiones expuestas de una proteína, el programa ofrece un medio fiable de predicción de los determinantes antigénicos potenciales.

En una primera instancia se realizó un árbol filogenético con las cistatinas tipo II publicadas de garrapatas duras, blandas y la cistatina tipo I de *R. microplus*, con el objetivo de conocer el grado de similaridad entre las secuencias. Analizando el árbol vemos 4 grandes ramas en las que se han agrupado la mayoría de las cistatinas tipo II, con excepción de la cistatina de *Haemaphysalis longicronis* (NCBI BAI59105). En una rama bien distante se encuentra la cistatina tipo I de *R. microplus* (NCBI ABG36931). Observamos que las cistatinas de tipo II tanto de garrapatas duras como blandas no se encuentran en ramas muy distantes entre sí. En una primera rama encontramos principalmente garrapatas duras como ser *Rhipicephalus sanguineus* (NCBI ACX53862), *Dermacentor variabilis* (NCBI ACF35514), *Ixodes scapularis* (Sialostatin L y L2) *Ixodes ricinus* (NCBI CAD68002) y una cistatina de la garrapata *Ornithodoros moubata* (NCBI AAS55948), las cuales presentan entre ellas una similaridad promedio de aproximadamente un 40 %. En esta rama se encuentran las sialostatin L y L2 de *Ixodes scapularis* ambas involucradas con la inmunomodulación. En una segunda encontramos exclusivamente las cistatinas de garrapatas blandas *Ornithodoros moubata* (NCBI AAS01021), *Ornithodoros parkeri* (NCBI ABR23498), *Ornithodoros coriaceus* (NCBI ACB70343 y ACB70345) . En una tercer rama encontramos las cistatinas de *Rhipicephalus microplus* de Uruguay, Brasil y TIGR, junto

con la de *H. longicornis* (Hlcyst-3 y Hlcyst-2) ambas involucradas con la regulación de la digestión y la inmunidad innata. La cistatina de *R. microplus* de Uruguay y Hlcyst-3 presentan una similaridad del 71,6%, ambas se encuentran principalmente en el intestino. En una cuarta rama encontramos las cistatina de *Rhipicephalus sanguineus* (NCBI ACX53922) y de *Amblyomma variegatum* (NCBI DAA34288) ambas de glándula salival, presentan una similaridad del 40%.

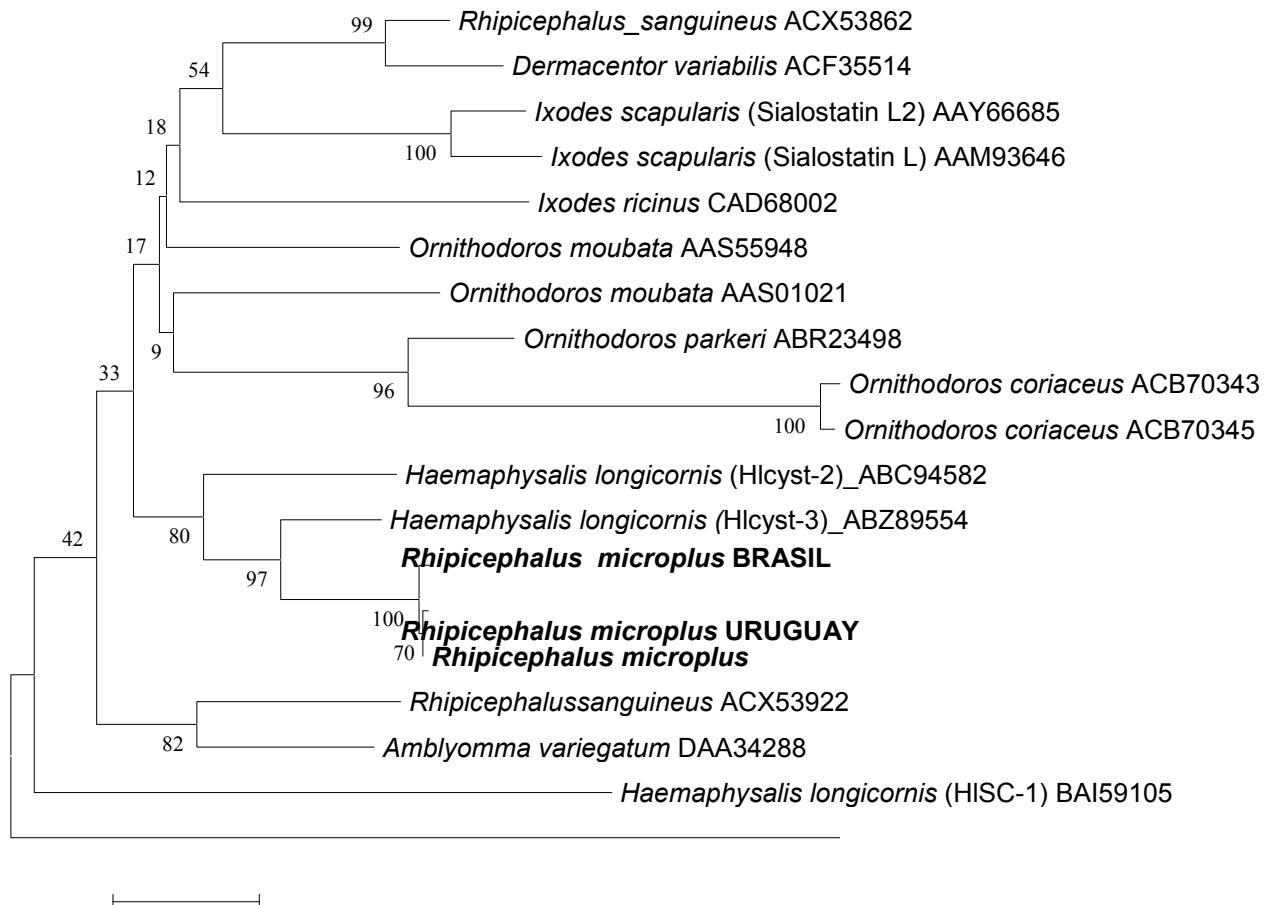
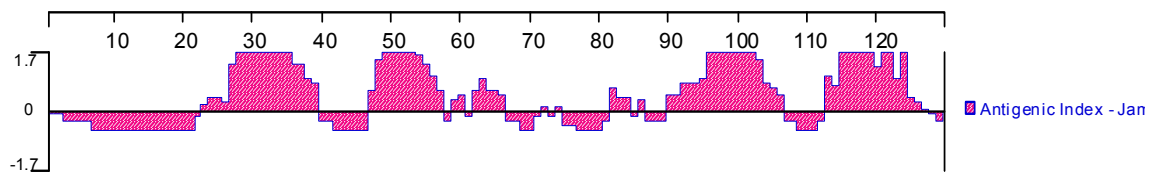


Figura 12 Análisis filogenético basado en las secuencias de cistatina tipo II de garraptas duras y blandas publicadas en el Genbank, junto con una cistatina tipo II de *R. microplus* de TIGR, de Uruguay y Brasil no publicadas. Se analiza también una cistatina tipo I de *R. microplus*.

Al realizar el análisis Jameson-Wolf de la cistatina de *Haemaphysalis longicornis* (ABZ 899554) ubicada en la misma rama que *R. microplus* podemos observar que ambas presentan regiones antigénicas semejantes y conservadas (figura 9), los cuales las hace excelentes candidatos para ser usadas como antígenos para el desarrollo de vacunas contra éste parásito

***Rhipicephalus microplus* (Uruguay)**



***Haemaphysalis longicornis* ABZ89554**

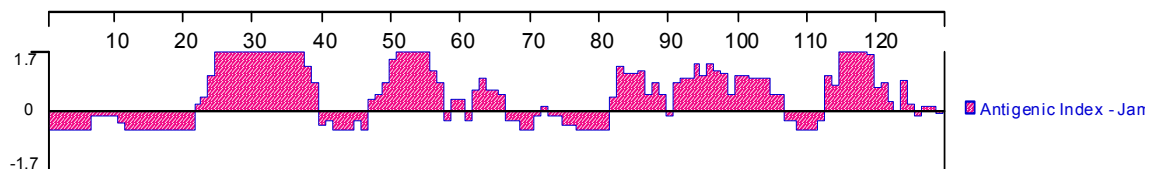


Figura 13- Análisis comparativo de índices antigénicos de cistatinas de *R. microplus* y *Haemaphysalis longicornis*, utilizando el programa Lasergene y el algoritmo de Jameson-Wolf. El grado de positividad esta dado en función de la escala ubicada a la izquierda de la grafica y el mismo es predictivo del sitio antigénico.

A partir de dicho resultado analizando las secuencias de aminoácidos de ambas cistatinas observamos que presentan regiones antigénicas con secuencias comunes (ver fig. 10). Este análisis nos permite proponer este polipéptido como un potencial antígeno de una vacuna que activando la inmunidad adaptativa específica genere anticuerpos que protejan contra ambas especies de garrapatas *R. microplus* y la *H. longicornis*. Este es uno de los objetivos marcados por los grupos de investigación del Laboratorio de Inmunología Animal Aplicada del Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Rio Grande Do Sul, Brasil , el Área de Inmunología de la Facultad de Veterinaria de la UDELAR y el Laboratorio de Biología Parasitaria de la Facultad de Ciencias de la UDELAR. Involucrados en una colaboración científica desde hace unos años. El objetivo principal es desarrollar vacunas contra las garrapatas de ganado bovino, focalizado en *R. microplus*, pero en donde lograr producir una vacuna universal, contra varias especies y usando antígenos conservados, es un gran objetivo en común.

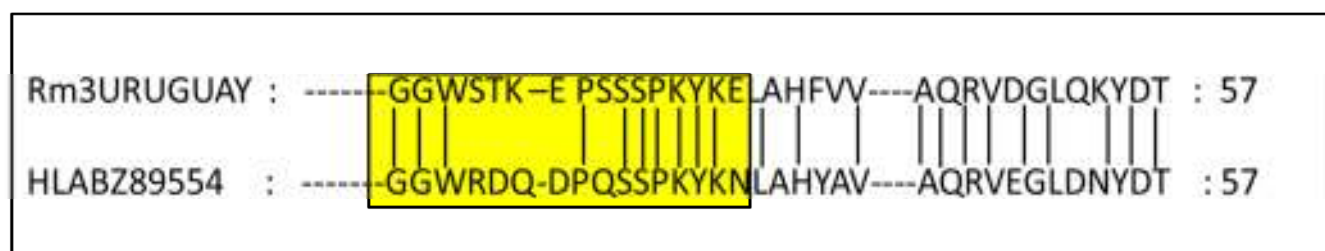


Figura 14. En esta figura podemos observar los aminoácidos en común que presentan las secuencia nucleotídica de una cistatina tipo II de *Rhipicephalus microplus* de Uruguay y *Haemaphysalis longicornis* (NCBI:ABZ89554). Ambas secuencias presentan gran cantidad de aminoácidos en común pertenecientes a una zona antigénica de la proteína (marcada en amarillo) pudiendo ser usada dicho péptido en una única vacuna .

4.5 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

UrBmcis2 DE *Rhipicephalus microplus*

Para la producción de la cistatina recombinante UrBmcis2 en *Escherichia coli* se realizó una construcción en el vector de expresión pET5a (Novagen). Se seleccionó el clon cis g, ya que su secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia de referencia del TIGR (TC 12831-TC 3423). Se identificó la proteína recombinante de cistatina como UrBmcis2g-r. El plásmido utilizado se caracteriza por fusionar 6 histinas en el extremo C-terminal de la proteína y le confiere resistencia a la ampicilina como método 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. Luego de subclonada la proteína se confirmó la integridad del plásmido (pET5a/ UrBmcis2g) por secuenciación en el Sector de Secuenciamiento Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil. Confirmando también la presencia de 6 histidinas en el extremo C terminal. La expresión de la proteína recombinante se logró con la cepa *E.coli* BL21 (DE3) C41, cultivada en medio LB, a una temperatura de 20°C, toda la noche, con una concentración de inductor 1mM de IPTG. Las demás cepas descritas en materiales y métodos (materiales y métodos 3.5.1) no expresaron la proteína.

La expresión fue determinada por SDS-PAGE y Western Blot, revelado con un anticuerpo anti- hisitidina conjugado con la peroxidase del Rabano (HRP) (Anti his- C term –HRP-Invitrogen). (materiales y métodos 3.7.3)

Con el objetivo de purificar la proteína recombinante se sonicó, centrifugó a 12000g a 4°C separando así el cultivo en fracción soluble (sobrenadante) y en fracción insoluble (cuerpos de inclusión) evidenciándose la proteína en ambas fracciones, por SDS PAGE (16%) y Western blot y (figura 15 y 16).

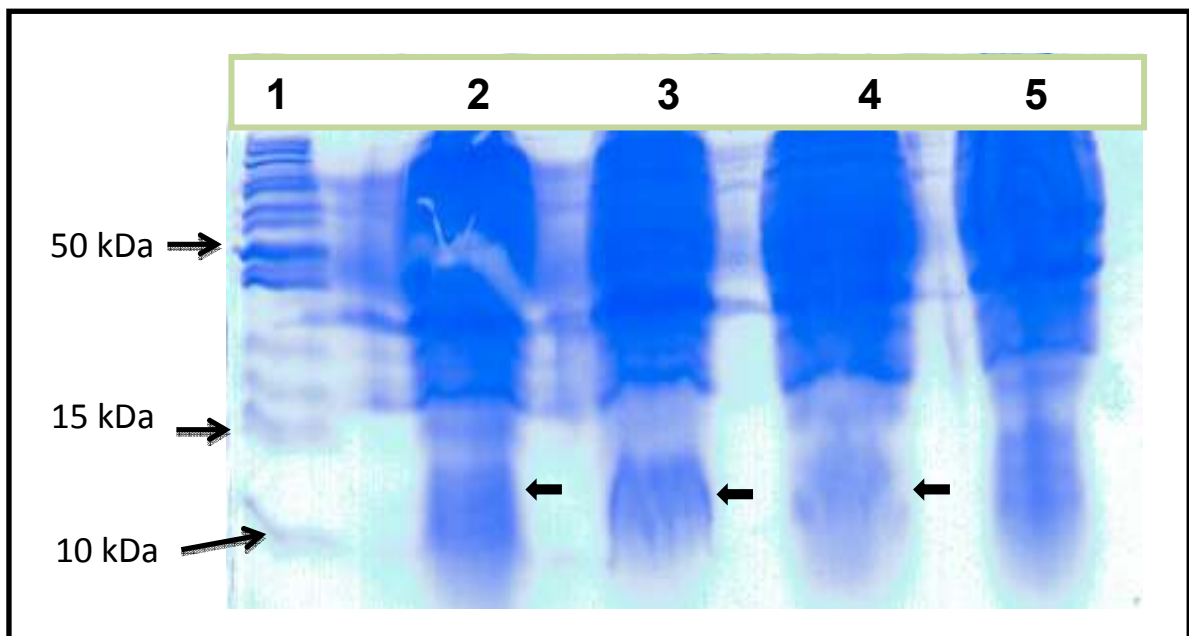


Figura 15: SDS PAGE(16%) teñido con Coomassie G-250 de UrBmcis2g recombinante expresada en E.coli. C41. carril 1.- Marcador de peso molecular Page Ruler Unsteined (Fermentas) carril 2. Control positivo (E.coli C41 sin sonicar) carril 3 fracción soluble. carril 4 fracción insoluble carril 5 E.coli C41 sin inducir. Las flechas indican 14 kDa lo cual se considera el peso aproximado de UrBmcis2g-r

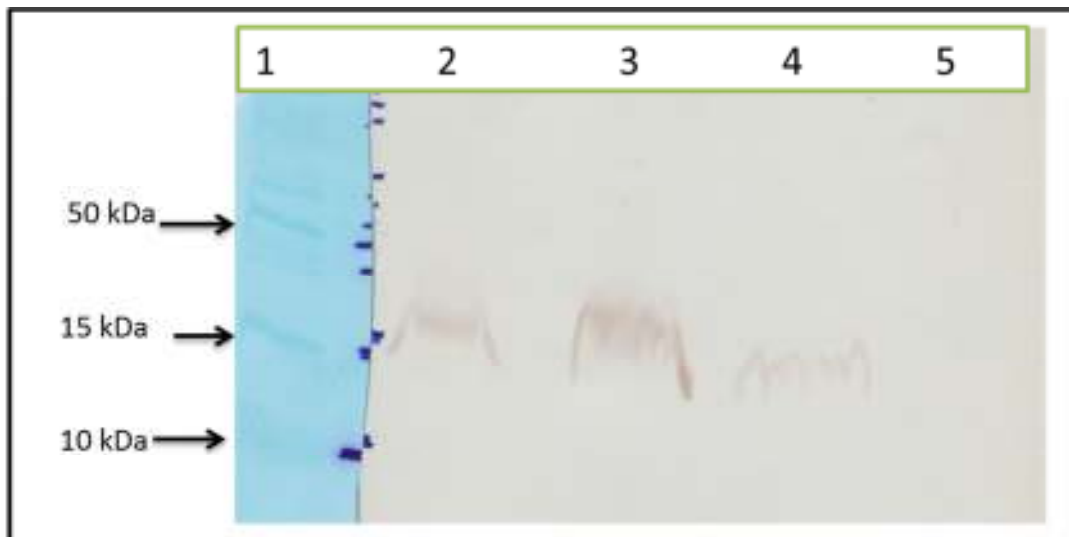
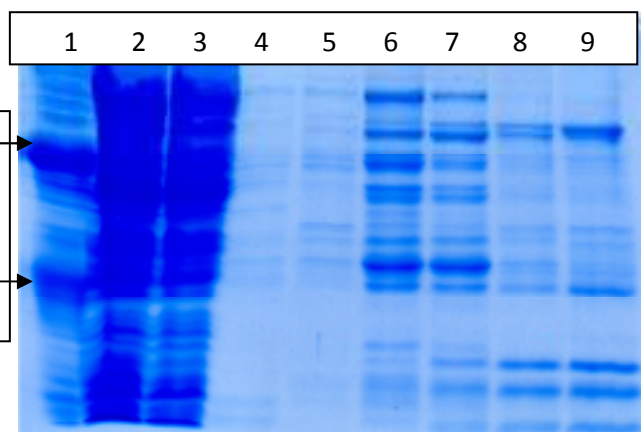


Figura 16: Western Blot de UrBmcis2g recombinante expresada en E.coli. C41 carril 1.- Marcador de peso molecular Page Ruler Unsteined (Fermentas) carril 2. Control positivo (E.coli C41 sin sonicar) . carril 3 fracción soluble , carril 4 fracción insoluble carril 5 E.coli C41 sin inducir

Con el objetivo de purificar la proteína presente en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) se utilizó como agente desnaturalizante la Urea en diferentes concentraciones molares (1, 2, 4 ,6M) (materiales y métodos 3.6.1). Posteriormente se realizó un SDS PAGE 12% no evidenciándose proteínas lo que nos indicó que no se logró solubilizar los cuerpos de inclusión. (Datos no mostrados).

El sobrenadante fue purificado por cromatografía de afinidad utilizando una matriz de Níquel que retiene la cola de 6 histidinas fusionada en el extremo C-terminal de la proteína siendo eluido por diferentes concentraciones de Imidazol (materiales y métodos 3.6.2) Aquellas fracciones que presentaron una mayor densidad óptica (Tablas de datos Anexo 3), con las diferentes eluciones se realizó SDS PAGE al 12% (Figura 17) Posteriormente se realizó Western blot (materiales y métodos 3.7.3) de las muestras que presentaban mayor densidad optica no observándose señal (Datos no mostrados).

A)



B)

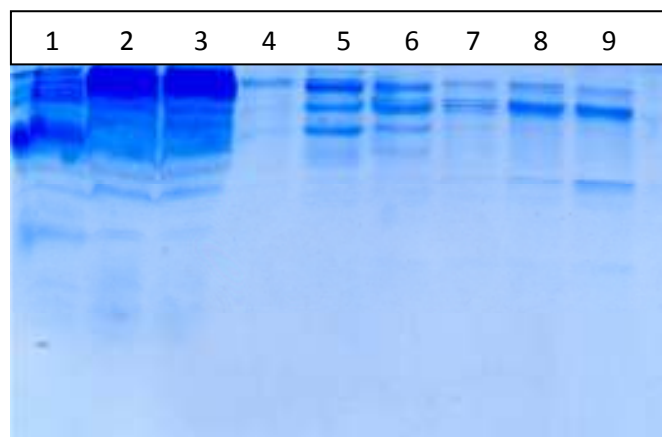


Figura 17 Analisis por SDS PAGE al 12% de la purificación de UrBmcis2-r por cromatografía de afinidad en columna Histrap FF (GE) . A) Carril 1: Inmunoglobulina G usada como referencia, Carril 2: muestra inicial previa realización de la purificación Carril 3 material no ligado, Carril 4: lavado Carril 5 y 6: fracciones eluida con 100 mM de Imidazol, Carril 7,8,9: fracción eluida con 200 mM de Imidazol. B) Carril 1 Inmunoglobulina G usada como referencia Carril 2, 3 : fracciones eluidas con 300 mM de Imidazol. Carril 4: vacío Carril 5, 6 7, 8, 9: fracciones eluidas con 500 mM de Imidazol.

CAPITULO 5: PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis describe el clonado molecular, análisis de secuencia de una cistatina tipo II de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Se analizaron las secuencias obtenidas de poblaciones de diferentes regiones de Uruguay, Río Grande do Sul-Brasil, con garrapatas duras y blandas.

Así mismo, la expresión de la proteína recombinante UrBmcis2g-r se realizó exitosamente. Se vio que la cepa *E.coli* (DE3) C41 resultó ser la más adecuada para la producción. Sin embargo, no se obtuvieron buenos rendimientos de la proteína luego de su purificación. El lograr optimizar este proceso es un objetivo a futuro, para poder realizar ensayos de vacunación en conejos y bovinos.

El conocimiento de las cistatinas involucradas en la alimentación de las garrapatas y la disminución de su capacidad para alimentarse de animales inmunizados, así como de su función en el sistema inmune del huésped, ha hecho evidente su importancia en la fisiología de la garrapata.

El detectar posibles antígenos candidatos genera nuevas expectativas para el desarrollo de una vacuna que protejan a los animales y que impida la transmisión de patógenos a humanos.

Este trabajo de tesis es un aporte a la búsqueda de potenciales antígenos para el desarrollo de una vacuna eficaz contra la garrapata *R. microplus*, contribuyendo así a disminuir las pérdidas económicas producidas por la acción directa de las garrapatas sobre el ganado bovino y el daño al medio ambiente generado por la contaminación por los tratamientos con productos ixodicidas con el consiguiente daño a la salud pública.

CAPITULO 6 BIBLIOGRAFÍA

- Allen JR (1994) Host resistance to ectoparasites. Rev Sci Tech. Dec;13(4):1287-303
- Caffrey CR, McKerrow JH, Salter JP, Sajid M (2004) Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. Trends Parasitol, 20:241-48
- Chantree P, Wanichanon C, Phatsara M, Meemon K, Sobhon P (2012) Characterization and expression of cathepsin B2 in *Fasciola gigantica*. Exp Parasitol
- Cruz CE, Fogaça AC, Nakayasu ES, Angeli CB, Belmonte R, Almeida IC, Miranda A, Miranda MT, Tanaka AS, Braz GR, Craik CS, Schneider E, Caffrey CR, Daffre S. (2010) "Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. Parasit Vectors. Jul 27;3:63.
- De La Fuente J, Rodríguez M, García-García JC (2000) Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. Ann N Y Acad Sci.;916:617-21.
- De la Fuente J, García-García JC, González DM, Izquierdo G, Ochagavia ME. (2000) Molecular analysis of *Boophilus* spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. Vet Parasitol. Oct 1;92(3):209-22.
- Delcroix M, Sajid M, Caffrey CR, Lim KC, Dvorak J, Hsieh I, Bahgat M, Dissous C, McKerrow JH (2006) A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. J Biol Chem, 281:39316-29.
- Errico F Grupo Técnico de Garrapata (MGAP/DIGESEGA). (2008). Una nueva ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay. Disponible en: http://www.planagro.com.uy/publicaciones/revista/R131/R_131_42.pdf. Fecha de consulta: 7/9/2012.
- Francischetti IM, Anderson Sá-Nunes, Ben J. Mans, Santos I, Ribeiro M.C., (2009) The role of saliva in tick feeding Frontiers in Bioscience 14, 2051-2088
- García García JC, Gonzalez IL, González DM, Valdés M, Méndez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni D, Fragosó H, Ortiz M, Rodríguez M, de la Fuente J. (1999) Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. Exp Appl Acarol.;23(11):883-95
- García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodríguez M, Joglar M, Machado H, González IL, 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. 28;18(21):2275-87.
- Gil A, Nari E, Hirigoyen D (2009) Propuestas de líneas de investigación y acciones para el PLANISA. (on line) disponible desde <http://acadevet.org/wp-content/uploads/PLANISA>
- Grisi, L., Massard C.L., Moya Borja G.E. et al. (2002) Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. A Hora Vet., v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

- Gugliemone A; Robbins, R.; Apanaskevich, D.; Petney, T.; Shao, R.S. Barker. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528: 1-28
- Itabajara da Silva Vaz Jr, Saiki Imamura, Chie Nakajima, Felipe Cardoso de Cardoso, Misao Onuma, et al. (2005) Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding for *Boophilus microplus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Veterinary Parasitology* 127 147–155.
- Jinlin Z, Min L, Haiyan G, Xuenan X, Kozo Fujisaki (2010) Characterization of Hlcyst-3 as a member of cystatins from the tick *Haemaphysalis longicornis*.-Exp Appl Acarol 51:327–333.
- Karim S, Ramakrishnan VG, Tucker JS, Essenberg RC, Sauer (2004) *Amblyomma americanum* salivary gland homolog of Sec1 is essential for saliva protein secretion. *JR.Biochem Biophys Res Commun*;324(4):1256-63.
- Karim S, Miller NJ, Valenzuela J, Sauer JR, Mather TN (2005) RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding..*Biochem Biophys Res Commun*.;334 (4):1336-42.
- Kotsyfakis M, Sá-Nunes A, Francischetti IM, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JM (2006) Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*..*J Biol Chem*. 8;281(36):26298-307.
- Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM. (2007) Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*. 282(40):29256-63.
- Kotsyfakis M, Anderson JM, Andersen JF, Calvo E, Francischetti IM, Mather TN, Valenzuela JG, Ribeiro JM. (2008) Cutting edge: Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed.. *J Immunol*;181(8):5209-12.
- Kotsyfakis M, Horka H, Salat J, Andersen F. (2010) The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Mol Microbiol* ; 77(2): 456–470
- Leningher biochemistry 4 edición
- Lightowlers, M.W. et al. (2003) Vaccination against cestode parasites:anti-helminth vaccines that work and why. *Vet. Parasitol*. 115, 83–123
- Lima CA, Sasaki SD, Tanaka AS (2006)Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 18;347(1):44-50.
- Murrel A & Barker SC. (2003) Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol*. 56(3):169-72.
- Nari. A.; Field.C; (1994) Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos: bases epidemiológicas para su prevención y control. Ed Hemisferio Sur.
- Nari.A (2003) Aplicación del control integrado de parásitos (CIP) a la garrapata *Boophilus microplus* en Uruguay. FAO.

- Lara, F. A, Lins U, Bechara G. H, Oliveira P. L.; (2005) “ Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus* ”The Journal of Experimental Biology 208, 3093-3101
- Oliver, Jr. J.H. (1989). Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). Annual Review of Ecology and Systematics, vol 20:397-430.
- Renard G, Garcia JF, Cardoso FC, Richter MF, Sakanari JA, Ozaki LS, Termignoni C, Masuda A. (2000) “Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme.” Insect Biochem Mol Biol. Nov;30(11):1017-26.
- Renard G, Lara FA, de Cardoso FC, Miguens FC, Dansa-Petretski M, Termignoni C, Masuda A. (2002) “Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. Insect Mol Biol. Aug; 11(4):325-8.
- Rickard, M.D. et al. (1995) *Taenia ovis* recombinant vaccine– ‘quovadit’. Parasitology 110, S5–S9 29
- Riding GA, Jarney J, McKenna RV, Pearson R, Cobon GS, Willadsen P (1994) P. protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. J Immunol. 1;153(11):5158-66
- 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):667-73.
- Rodríguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Luaces LL, Rubiera R, Cordovés C, Sánchez PA, Ramos E, Soto A, et al. (1995) “ Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation” Vet Parasitol.;57(4):339-49.
- Salat J, Paesen G, , Rezacovas P, Kotsyfakis M, Kovarovas Z, Sandas M, Michael Mares et al (2012) Crystal structure and functional characterization of an immunomodulatory salivary cystatin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. Ticks and Tick-borne Diseases 3:117– 127
- Sambrook. Russell “Molecular Cloning :a laboratory manual” 3 Edición CSHL Press
- Schwarz A ,Valdes JJ, Kotsyfakis M (2012) The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. Ticks and Tick-borne Diseases 3: 117– 127
- Sirlei Daffre et al (2010) Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides . Parasite & Vectors vol 3: 63
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Hajdusek O, Caffrey CR, Mares M, Kopacek P 2008: Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. Parasit Vectors, 1:7.
- Solari, M.A.; Nari, A.; Cardozo, H. Babesia Bigemina On The Production Of Beef Cattle In Uruguay. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87 Suppl 3:143-9. Impact Of Babesia Bovis And Babesia Bigemina On The Production Of Beef Cattle In Uruguay.
- Solari M.A. (2006). Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú.

- Sossai S, Peconick AP, Sales-Junior PA, Marcelino FC, Vargas MI, Neves ES, Patarroyo JH. (2005) Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol.*;37(3-4):199-214.
- Stack C, Dalton JP, Robinson MW (2011) The phylogeny, structure and function of trematode cysteine proteases, with particular emphasis on the *Fasciola hepatica* cathepsin L family. *Adv Exp Med Biol.* 712:116-35. Review.
- Wagland BM Sutherst RW, , Roberts JA (1978).The effect of density on the survival of *Boophilus microplus* on previously unexposed cattle.*Int J Parasitol.*8(4):321-4.
- Willadsen P, Bird P, Cobon GS, Hungerford J. (1995) Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology.*;110 Suppl:S43-50
- Willadsen P, Smith D, Cobon G, McKenna RV. (1996)Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* May;18(5):241-6
- Willadsen P Vercruysse J, Knox DP, Schetters TP(2004) Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol*Oct;20(10):488-92. Review.
- Williamson AL, Lecchi P, Turk BE, Choe Y, Hotez PJ, McKerrow JH, Cantley LC, Sajid M, Craik CS, Loukas A: A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. *J Biol Chem* 2004, 279:35950-7.
- Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman M, Kushibiki S, Fujisaki K (2009) A salivary cystatin, HISC-1, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* play roles in the blood-feeding processes..*Parasitol Res* ;106(1):61-8.
- Yamaji K, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Alim MA, Anisuzzaman, Takenaka A, Fujisaki K (2009) Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*.*Parasitol Int.*;58(3):232-7
- Zavasnik-Bergant T (2008) Cystatin protease inhibitors and immune functions..*Front Biosci.* May 1;13: 4625-37. Review.
- Jinlin Zhou; Mami Ueda, Rika Umemiya, Badgar Battsetseg, Damdinsuren Boldbaatar, Xuenan Xuan, Kozo Fujisaki (2006) A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36 (2006) 527–535.

ANEXO I

BUFFERS

- PBS 1X : cloruro de sodio 140 mM, cloruro de potasio 2,7 mM , fosfato de disodico 10 mM, fosfato de potasio monobasico 1,8 mM
- Buffer TAE 50X: 242 g de Tris-base, 57,1ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M (pH8,0) y agua destilada hasta completar un litro.
- Buffer de muestra para geles de agarosa: azul de bromofenol 0,25% y sacarosa 40%
- 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 TE : Tris base 10mM, EDTA 5mM, pH8
- Buffer de ligación: fosfato monosódico 20 mM, cloruro de sodio 0.5 M, Imidazole 20 mM (pH 7.4)
- Buffer fosfato: fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 0.5M
- Buffer de transferencia humeda: carbonato de sodio 13mM, metanol 20% (v/v) pH 9,9.
- 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 -20°C.
- Bromuro de Etidio (EtBr): se prepara una solución madre de 10 mg/ml en agua destilada se conserva a 4°C
- Isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) (Amresco): se prepara una solución madre de 0.1M de IPTG en agua destilada, se filtra, se conserva a -20°C.
- Ponceau Red (Amresco) se prepara una solución de 2 gr de Ponceau S junto con 30 gr de ácido tricloroacético, 30 gr ácido sulfosalicílico, en 100 ml de agua destilada.

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 autoclavados a 121°C/ 1 atmosfera por 15 minutos y mantenidos a temperatura ambiente hasta su uso.

- Luria Bertain (LB) liquido: 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 liquido, 1.5 gr de agar bacteriológico.
- Medio SOB (Super Optimal Broth): bacto-triptona 2 g/l (marca BD), extracto de levadura, 0.5 g/l (marca BD), cloruro de sodio 0.05 g/l (marca Carlo Erba), cloruro de potasio (2,5 mM) 0.018 g/l (marca Carlo Erba), 100 ml de agua destilada
- Medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) completo: 100 ml medio SOB al que se le agrega cloruro de magnesio (10 mM) 0.09 g/l (marca Carlo Erba) y glucosa (20Mm) 0.36 g/l (marca Carlo Erba)

GEL PARA ELECTROFORESIS

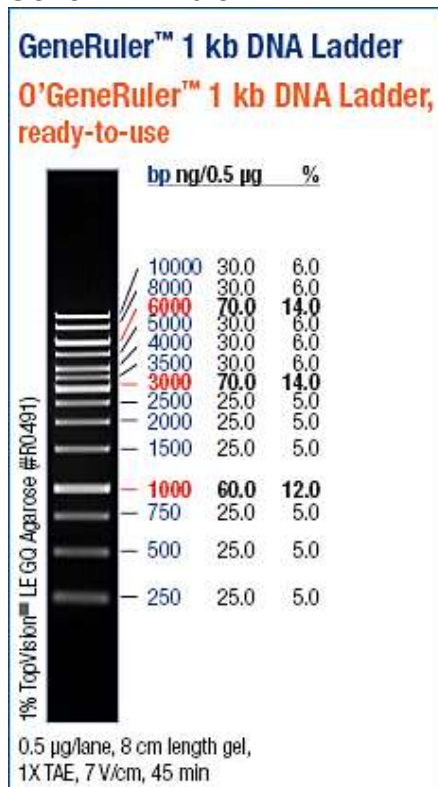
Los geles al 0.8% se prepararon con agarosa (Sigma®) disuelta en tampón TAE 1X. Se incorporo Bromuro de Etidio (Sigma®) al 0.005% a la mezcla antes de su gelificación. En todo los procedimientos se tomaron las precauciones indicadas al trabajar con Bromuro de Etidio, como ser usar guantes, mantener los recipientes que han tomado contacto separados del resto, etc

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

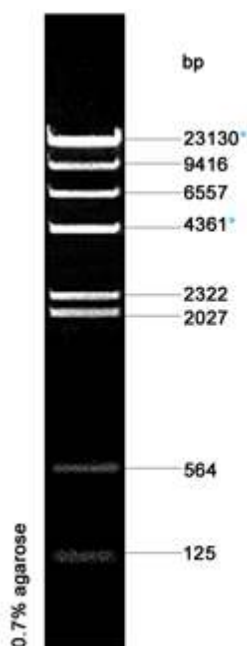
Las muestras fueron aplicadas en geles de agarosa junto con el buffer de la muestra. Los geles fueron sometidos a una diferencia de potencial eléctrico de 50 Volts en una cuba de electroforesis sumergidos en buffer TAE 1X, por un período aproximado de 20 a 30 minutos, se visualizó por la exposición a luz ultravioleta.

MARCADORES DE MASA MOLECULAR

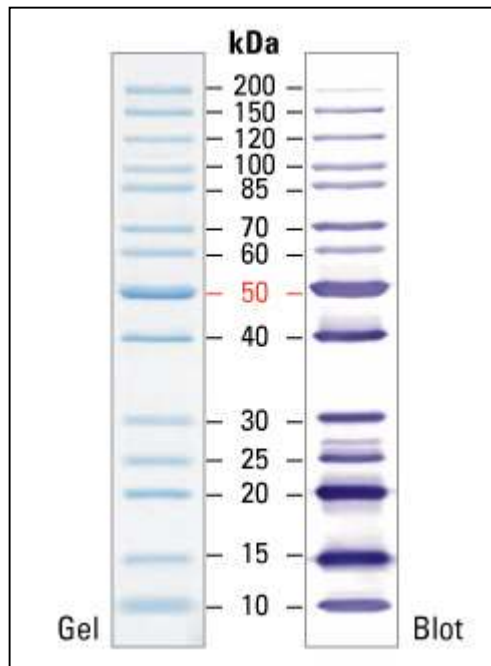
- Gene Ruler 1 Kb; (Fermentas Company)



- Marcador de peso Molecular Lambda HindIII ds DNA Markers (Invitrogen)



- Page Ruler Unsteined (Fermentas)



PREPARACIÓN DE CELULAS COMPETENTES PARA LA TRANSFORMACION BACTERIANA POR SHOCK TERMICO

En una primer etapa se retira la cepa bacteriana del freezer de -70°C , descongélándose. Luego se siembra la cepa bacteriana en una placa de LB-agar, dejándose toda la noche a 37°C . Posteriormente se toma una colonia de esta placa en 1ml de LB (pre-inoculo) se deja toda la noche a 37°C /160 rpm, luego este pre-inoculo se transfiere a su inoculo de 100 ml de LB, llevándose al incubador rotatorio a 37°C hasta que llegue a una OD_{600} de aproximadamente de 0,35- 0,4, posteriormente se transfiere el inoculo a tubos estériles de 50 ml y se deja en hielo 10 minutos. Luego se centrifuga a 2700g por 10 min a 4°C , se descarta el sobrenadante, resuspendiendo lo precipitado en 30 ml de solución I (cloruro de Magnesio 80 mM, cloruro de calcio 20mM), se centrifuga nuevamente a 2700 g por 10 min a 4°C . Se descarta el sobrenadante y resuspende el precipitado suavemente en 2 ml de solución II (cloruro de calcio 0.1M) por cada 50 ml del cultivo original. Posteriormente para congelar las células competentes que estamos preparando, se agregan 140 μl de DMSO por cada 4 ml de células resuspendidas en la solución II, se mezcla suavemente se deja 15 minutos en hielo. Luego de los 15 minutos se agregan 140 μl de DMSO se mezcla suavemente dejándose 15 minutos, posteriormente se alícuota de 100 μl y congela en nitrógeno liquido. Stockear a -70°C hasta su uso.

TRANSFORMACIÓN POR SHOCK TERMICO

Las células de *E. coli* se transformaron utilizando 100 µl de células competentes con 2 µl del ADN ligado. Esta mezcla se deja en hielo por 20-40 minutos. Seguidamente se incubó a 42°C por 40 segundos y nuevamente se mantuvieron en hielo por 1 minuto. A la mezcla se le agregó 1 ml de medio Lauria Bertain (LB) bajo condiciones estériles. A continuación las células transformadas se incubaron a 37°C en baño maría por 1 hora para su proliferación. Luego son centrifugadas a 2200g por 5 minutos, se descartan el sobrenadante (900 µl) se plaquea con los 100 µl restantes. Se dejó en estufa a 37°C toda la noche.

PREPARACIÓN DE CELULAS COMPETENTES PARA LA TRANSFORMACION BACTERIANA POR ELECTROPORACIÓN

La cepa bacteriana utilizada para la preparación de células competentes para transformación por electroporación fue *E.coli XL 1 Blue*. Se parte de una placa de LB de menos de 12 horas, a partir de esta placa se prepara un pre-inoculo en 100 ml LB liquido se deja toda la noche a 37°C/160 rpm, se pasa este pre-inoculo a 1 litro de LB liquido, se deja en el incubador rotatorio a 37°C/160 rpm hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0,5-0,8, posteriormente es centrifugado a 4000 g por 15 minutos 4°C, se descarta el sobrenadante y el precipitado es colocado en hielo, se resuspende en 500 ml agua Mili-Q helada, se centrifuga a 4000g por 15 minutos 4°C. Se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 20 ml de glicerol al 10%, se centrifuga 4000 g por 15 minutos, el precipitado se resuspende en 3 ml de glicerol 10% helado, se alícuota de a 100 µl. Se conservan a -70°C hasta su uso

TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACION

Las bacterias *E.coli XL1-Blue* (200 µl) preparada en el ítem anterior se mezclan en una cubeta de electroporación junto con 2 µl del plasmido (ver materiales y métodos 3.4.1). Luego se descarga un pulso de 2.5 KV, 200 OHMs de resistencia y 25µFD, inmediatamente se le agrega a la cubeta 1 ml de medio SOC completo, se carga el contenido de la cubeta con las bacterias transformadas y se siembra en placas de Petri con LB solido con ampicilina, se deja toda la noche a 37°C.

LINAJES BACTERIANOS UTILIZADOS

Linaje	Características genotípicas	Utilidad	Compañía
<i>E. coli</i> BL21 <i>Star</i> TM (DE3)	F ⁻ , omp ^T , hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm, me131, (DE3)	Expresión de proteínas	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>LysS</i>	F ⁻ , omp ^T , hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm, (DE3), pLysS, Cam	Expresión de proteínas	Invitrogen
<i>E. coli</i> Rosseta (DE3)	F ⁻ , omp ^T , hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm, lacY1, (DE3), pRARE (Cam ^R)	Expresión de proteínas conteniendo codones raros	Novagen
BL21- <i>CodonPlus</i> (DE3)- <i>RIL</i>	<i>E. coli</i> B F ⁻ , omp ^T , hsdS (r _B ⁻ , m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^R , gal, □ (DE3), endA, Hte, [argU, ileY, leuW, Cam ^R]	Expresión de proteínas con conteniendo codones raros (genomas ricos en AT)	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21- <i>CodonPlus</i> (DE3)-RP	<i>E. coli</i> B, F ⁻ , omp ^T , hsdS (r _B ⁻ , m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^R , gal, □ (DE3), endA, Hte, [argU, ileY, leuW, Cam ^R]	Expresión de proteínas con conteniendo codones raros (genomas ricos en GC)	Stratagene
BL21 (DE3) C41	F ⁻ omp ^T gal dcm hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻)	Expresión de proteínas tóxicas	1
BL21 (DE3) C43	F ⁻ omp ^T gal dcm hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻)	Expresión de proteínas tóxicas	1

<i>E.coli top 10</i>	lacZΔM15, endA1, recA1	Clonado	Invitrogen
<i>E.coli XL 1 Blue</i>	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].	Clonado	Stratagene

(1) Proporcionada por la Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC).

Soluciones para la preparar los geles de poliacrilamida.

	Gel concentrador 5%	Gel separador 16%
ACRILAMIDA: BISACRILAMIDA (30:8)	0.5 ml	2.66 ml
TRIS 1 M pH 8.8		2.13 ml
TRIS	0.39 ml	
SDS 10%	0.03 ml	0.05 ml
AGUA DESTILADA	2.062 ml	0.125 ml
APS 10%	0.03 ml	0.025 ml
TEMED	0.003 ml	0.005 ml

Anexo 2

Alineamiento de nucleótidos de diferentes poblaciones de garrapatas de Uruguay, Brasil y de referencia TIGR TC12831 TC3423, alienadas utilizando el programa BioEdit.

		10	20	30	40	50	60	70
cis TIGR TC 12831 TC3423		ATGGCTCGTATGGCAGTTAGCATTGCACCTTCTCGTAACAGCACTCATCGCTGTTTCCTTAGCGATTCCTG						
R.microplus cis Brasil		G.....G.....						
R.microplus cis a Uruguay		G.....G.....						
R.microplus cis b Uruguay		G.....G.....						
R.microplus cis c Uruguay		G.....G.....						
R.microplus cis e Uruguay		G.....G.....						
R.microplus cis f Uruguay								
R.microplus cis g Uruguay		-----						
		80	90	100	110	120	130	140
cis TIGR TC 12831 TC3423		GAGGTGGTCGACAAAAGAACCCCTCGTCGAGCCCTAAGTATAAGGAACCTCGCCCACTTCGTTGTCGCTCA						
R.microplus cis Brasil		A.....G.....Y.....						
R.microplus cis a Uruguay		A.....G.....						
R.microplus cis b Uruguay		A.....G.....						
R.microplus cis c Uruguay		A.....G.....						
R.microplus cis e Uruguay		G.....						
R.microplus cis f Uruguay								
R.microplus cis g Uruguay								
		150	160	170	180	190	200	210
cis TIGR TC 12831 TC3423		GCGGTAGAGGGGCTGCAGAAATACGACACGGTTCTCAAATTAACCAAAGTGGAGACTCAGATTGTCGCC						
R.microplus cis Brasil		T.....G.....C.....C.....						
R.microplus cis a Uruguay		T.....G.....C.....G.....C.....						
R.microplus cis b Uruguay		T.....G.....C.....G.....C.....						
R.microplus cis c Uruguay		T.....G.....C.....G.....C.....						
R.microplus cis e Uruguay								
R.microplus cis f Uruguay								
R.microplus cis g Uruguay								
		220	230	240	250	260	270	280
cis TIGR TC 12831 TC3423		GGCGTGAATTACCGTCTAACCTTCACCATTAACCACCACTGATTGCATAATAGCCGAAGTAGAGTACAACG						
R.microplus cis Brasil		C.....						
R.microplus cis a Uruguay								
R.microplus cis b Uruguay								
R.microplus cis c Uruguay								
R.microplus cis e Uruguay								
R.microplus cis f Uruguay								
R.microplus cis g Uruguay								
		290	300	310	320	330	340	350
cis TIGR TC 12831 TC3423		CTGAACGTTGCCACCTAAGAACAATCAGGCGAAGGCGACCTGCACAGCTGTCGTCTACGAGAGGCCCTG						
R.microplus cis Brasil								
R.microplus cis a Uruguay								
R.microplus cis b Uruguay								
R.microplus cis c Uruguay								
R.microplus cis e Uruguay								
R.microplus cis f Uruguay								
R.microplus cis g Uruguay								
		360	370	380	390	400	410	420
cis TIGR TC 12831 TC3423		GGAAATGTGCGGTCTCTGACTTCTCTTCGATGCGCT-----						
R.microplus cis Brasil		CACCACCACCACCACCACCTAGGGATCCTTTTTTA						
R.microplus cis a Uruguay		CACCACCACCACCACCACCTAG-----						
R.microplus cis b Uruguay		A-----ACTAG.AAT.CGCGCC-----						
R.microplus cis c Uruguay		CACCACCACCACCACCACCTAGGGATCCTTTTTTA						
R.microplus cis e Uruguay		CACCACCACCACCACCACCTAG-----						
R.microplus cis f Uruguay		CACCACCACCACCACCACCTAG-----						
R.microplus cis g Uruguay		CACCACCACCACCACCACCTAG-----						

Anexo 3

DENTIFICACIÓN	MUESTRAS (Figura A)	DO	IMIDAZOL
1	PESO MOLECULAS (IG G)		
2	MUESTRA INICIAL	0.57	
3	NO LIGADO	3	
4	LAVADO		
5	TUBO 4	0.150	100
6	TUBO5	0.803	100
7	TUBO 6	0.407	200
8	TUBO 8	0.118	200
9	TUBO 9	0.622	200

IDENTIFICACIÓN	MUESTRA (Figura B)	DO	IMIDAZOL
1	TUBO 14	0.100	300
2	TUBO 15	0.091	300
3	TUBO 18	-0.199	500
4	XXXXX		
5	IG G		
6	XXXXX		
7	TUBO 19	-0.160	500
8	TUBO 20	-0.032	500

Muestras WB

IDENTIFICACIÓN	MUESTRA	DO	imidazol
1	PESO MOLECULAS (Ig G) + CONTROL +		
2	Muestra inicial	0.57	
3	No ligado	3	
4	Tubo 4	0.150	100
5	Tubo5	0.803	100
6	Tubo 6	0.407	200
7	Tubo 8	0.282	200
8	Tubo 9	0.573	200
9	Tubo 10	0.622	200
10	Tubo 15	0.091	300
