

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS
CÉLULAS DE INTESTINO DE *Rhipicephalus microplus*
QUE INTERACCIONAN ESPECÍFICAMENTE CON FASES
SEXUALES DE *Babesia bigemina*; AGENTE CAUSAL
DE BABESIOSIS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
BIOL. ELBA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MINERVA CAMACHO NUEZ
DR. JUAN J. MOSQUEDA GUALITO

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2009

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Maestría en Ciencias Genómicas

Análisis e identificación de proteínas de las células de intestino de *Rhipicephalus microplus* que interaccionan específicamente con fases sexuales de *Babesia bigemina*; agente causal de babesiosis

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Genómicas

Presenta

Biól. Elba Rodríguez Hernández

Directores de tesis

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dr. Juan J. Mosqueda Gualito

México, D.F. Septiembre del 2009

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y el laboratorio de garrapata del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Jiutepec Morelos.

Para realizar este trabajo se contó con el apoyo económico y beca de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM-7D83023005) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México). Proyecto de Ciencia Básica 78921, así como el apoyo económico a través de la beca que se me otorgó en el periodo del 1 de febrero del 2008 al 31 de julio del 2009. Un agradecimiento especial para estas dos instituciones.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTOR

Dr. Juan J. Mosqueda Gualito

Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Querétaro

ASESORES

Dra. Elizbeth Álvarez Sánchez

Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Raquel Cossio-Bayúgar

Profesor investigador del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en
Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET)
INIFAP

Dra. Mavil López Casamichana

Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Profesor investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por la comprensión, amor y por siempre estar a mi lado

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por la formación académica y al CONACyT por el apoyo económico brindado

A mis directores de tesis y asesores que me supervisaron y apoyaron en este trabajo

A la Dra. Minerva Camacho Nuez quien fue una excelente tutora y siempre me guió acertadamente en este proyecto

Al Dr. Juan J. Mosqueda Gualito por sus útiles consejos, sus valiosas enseñanzas y sus atinadas observaciones

A la Dra. Raquel Cossio-Bayúgar por su asesoría, confianza y comprensión durante mi estancia en su laboratorio

Al Dr. Alfonso Falón y el Dr. Alberto Ramos por su colaboración para la obtención de las muestras biológicas.

A la Dra. Elizabeth Álvarez, la Dra. Mavil López y el Dr. Mauricio Castañón por su sobresaliente asesoría y contribución para la realización de este trabajo

A mis amigas (os) de la UACM por la magnífica armonía que me ofrecieron, especialmente a Eunice e Itzel por su afecto y a Cristhian por ser el mejor amigo

A mis amigas (os) del INIFAP por su amistad, principalmente a Ivonne y Rosy por su cariño y compañía

A Lulú, Caty y Sollange por su apoyo y atenciones siempre

Con cariño para todos ¡Gracias!

DEDICATORIA

A mis padres Bertha Hernández y Margarito Rodríguez: No es difícil escribir para personas que has amado toda tu vida, y para mí es un placer escribir para ustedes, aunque puedan sonar sencillas mis palabras quiero dedicar este espacio para agradecer a mis padres por esa combinación de amor, orientación y confianza que siempre me han brindado. Gracias por la fortaleza, por ser generosos por naturaleza, amor y voluntad. Como ya dije, mis logros son consecuencia de siempre llevarlos en mi corazón.

A mis hermanos que son mi país, gracias Rocy, Eli, Beni, Luis B y Victor por el amor incondicional, motivación y diversión que siempre me alimenta.

En cierto momento encontrándote en el silencio, es imprescindible disfrutar un té e invertir en descifrar esas cosas que crees comprender y que sin duda juzgas mal, esto seguro te guiará a la mejor de las teorías

Elba Rodríguez H.

Índice general

Lista de abreviaturas	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	v
Resumen	vi
1. Introducción	1
1.1. Aspectos generales de la babesiosis bovina	1
1.2. Agente etiológico de la enfermedad	3
1.3. Características genómicas de <i>Babesia spp</i>	4
1.4. Clasificación taxonómica de <i>Babesia spp</i>	6
1.5. Ciclo biológico de <i>Babesia spp</i> en el hospedero invertebrado	7
1.6. Signos clínicos de la enfermedad	11
2. Estrategias de control de la babesiosis basadas en la utilización de vacunas	13
2.1. Investigación sobre vacunas atenuadas	13
2.2. Investigación sobre vacunas inactivadas	14
2.3. Diseño de vacunas basadas en Antígenos Parasitarios Solubles (APS)	14
2.4. Diseño de vacunas basadas en proteínas recombinantes	16
3. Vector transmisor	18
3.1. Generalidades de la garrapata vector	18
3.2. Importancia biológica del vector <i>Rhipicephalus microplus</i>	19
3.3. Características del genoma de la garrapata <i>R. microplus</i>	20
3.4. Resistencia química de la garrapata a los acaricidas	22
3.5. Estrategias principales de control del vector	23
4. Antecedentes particulares del tema	25
5. Estado del arte	28
5.1. Avances en genómica y proteómica en el estudio de la interacción	28

6. Importancia de continuar el estudio del tema	34
7. Hipótesis	35
8. Objetivo general	35
8.1. Objetivos específicos	35
9. Esquema de la estrategia general de experimentación	36
10. Metodología	39
10.1. Obtención de órganos de la garrapata <i>R. microplus</i>	39
10.2. Establecimiento del cultivo primario de intestinos y ovarios de la garrapata <i>R. microplus</i>	40
10.3. Obtención y purificación de fases sexuales de <i>B. bigemina</i>	41
10.4. Preparación de extractos proteicos de células de intestino y ovario de la garrapata	43
10.5. Preparación de la muestra de proteínas de intestino de <i>R. microplus</i>	46
10.6. Isoelectroenfoque de la tira IPG	47
10.7. Reacción de equilibrio y Electroforesis en gel de poliacrilamida en segunda dimensión (SDS-PAGE 2D)	47
10.8. Protocolo de tinción con nitrato de plata	48
10.9. Tinción de coomassie G-250	50
10.10. Inmovilización de proteínas	50
10.11. Ensayo de Overlay en una y dos dimensión	51
10.12. Análisis de los geles de doble dimensión mediante el programa PDQuest e identificación de proteínas	53
11. Resultados	55
11.1. Obtención y degradación enzimática de órganos de la garrapata <i>R. microplus</i>	55
11.2. Extracción y purificación de proteína de células en cultivo de intestino y ovario de la garrapata	57

11.3.	Obtención y purificación de fases sexuales de <i>B. bigemina</i>	59
11.4.	Ensayo de Overlay de una dimensión (1D)	61
11.5.	Electroforesis en gel de doble dimensión (SDS-PAGE 2D)	64
11.6.	Ensayo de Overlay de doble dimensión (2D)	69
11.7.	Análisis de los geles en el programa PDQuest	72
11.8.	Identificación de las proteínas por espectrometría de masas	77
12.	Discusión de los resultados	80
13.	Conclusiones	91
14.	Perspectivas	92
15.	Apéndice (Preparación de soluciones y medios de cultivo)	93
16.	Bibliografía	95

Lista de abreviaturas

TEMED	N,N,N'.N` - tetrametilen-diamina
HBSS	Solución Balanceada de Sales de Hank's
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
MEM	Medio Minimo Escencial
DTT	Ditiotreitol
IEF	Isoelectroenfoque
V	Volts
V/hr	Volts /hora
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris	(hidroximetil) – amino- metano
SDS-PAGE 2D	Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones
TBS-T	Amortiguador Tris-NaCl-Tween
PSA	Persulfato de amonio
kDa	kilodaltones
rpm	Revoluciones por minuto
g	Constante gravitatoria 9.8 m/s
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
PM	Peso molecular
TNTE	Solución Tris-NaCl-Triton-EDTA
OVERLAY 1D	Overlay en primera dimensión
OVERLAY 2D	Overlay en segunda dimensión
FS	Fases sexuales

FS B	Fases sexuales biotiniladas
pb	pares de bases
Mpb	Mega pares de bases
A+T	Adenina + timina
Ab	Anticuerpo
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
µg	Microgramo
µl	Microlitros
°C	Grado Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
SFB	Suero fetal bovino
ARNi	interferencia del ARN

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Eritrocitos de bovino infectados con merozoítos de <i>B. bigemina</i>	4
Figura 2. Fases sexuales (cuerpos radiados) de <i>Babesia bigemina</i> obtenidas <i>in vitro</i>	9
Figura 3. Representación esquemática del ciclo biológico de <i>B. bigemina</i>	10
Figura 4. Garrapatas semirrepletas de <i>R. microplus</i>	19
Figura 5. Intestino disectado de la garrapatas <i>R. microplus</i>	56
Figura 6. Electroforesis de extracto total de proteínas de células de intestino de <i>R. microplus</i>	56
Figura 7. Patrón electroforético de las fracciones de proteína de células de intestino de <i>R. microplus</i>	58
Figura 8. Comparación del patrón electroforético de las proteínas de las fases sexuales de <i>B. bigemina</i>	60

Figura 9.	Análisis de la interacción mediante overlay 1D	62
Figura 10.	Separación de proteínas de extracto total de células de intestino de <i>R. microplus</i>	65
Figura 11.	Separación de proteínas de membrana de células de intestino de <i>R. microplus</i>	65
Figura 12.	Separación de proteínas solubles de células de intestino de <i>R. microplus</i>	66
Figura 13.	Separación de proteínas de extracto total de células de <i>R. microplus</i> mediante	68
Figura 14.	Análisis de la interacción de proteínas mediante Overlay 2D	71
Figura 15.	Análisis de los geles mediante el programa PDQuest	73
Figura 16.	Análisis de las manchas de los geles SDS-PAGE 2D	73
Figura 17.	Separación de proteínas de intestino mediante SDS-PAGE 2D, para escisión de las manchas	76
Figura 18.	Péptidos identificados por LC/MS/MS	79

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Aparición de fases de desarrollo de <i>Babesia bigemina</i> en órganos de <i>Rhipicephalus microplus</i>	11
Tabla 2. Comparación de geles 2D mediante el programa PDQuest	68
Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos del análisis de las manchas en el programa PDQuest	75
Tabla 4. Proteínas identificadas mediante LC/MS/MS	78

Resumen

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios del género *Babesia spp*, que son transmitidos por garrapatas *Rhipicephalus spp* a su hospedero bovino. Esta enfermedad tiene un gran impacto económico no sólo por pérdida en la producción de leche y carne, sino por el aumento en los costos de producción, por los tratamientos a animales enfermos (Bock et al., 2004; FAO, 1981; Callow et al., 1993). Una estrategia importante que se ha planteado para el desarrollo de nuevas alternativas de control de la enfermedad, es el estudio de la relación que existe entre la garrapata y los patógenos que transmite. Dentro de la garrapata, *Babesia spp* interacciona con órganos internos del vector, lo cual es primordial para la transmisión del parásito hacia su hospedero vertebrado. A la fecha se desconocen las proteínas del intestino de la garrapata que permiten la interacción con *Babesia spp*; por lo que, el propósito del presente trabajo fue la identificación de proteínas del intestino de *R. microplus* que interaccionan con fases sexuales de *B. bigemina*. En este estudio se encontró que existen interacciones entre diferentes proteínas de intestino de la garrapata (con pesos moleculares en un rango de 25-100 kDa) con fases sexuales biotiniladas y que estas interacciones se pueden dar tanto con proteínas de membrana como con proteínas solubles del intestino.

En ensayos de overlay en doble dimensión se detectaron seis manchas de proteínas que fueron analizadas por espectrometría de masas (LC/MS/MS). Por este método se identificaron tres proteínas: una glutamina sintetasa con una cobertura de identificación del 6% y dos proteínas mitocondriales que corresponden a una flavoproteína transportadora de electrones (cobertura de 28%) y un canal selectivo de aniones dependiente de voltaje ó porina mitocondrial (cobertura de 21%). Esta última participa en el proceso de apoptosis y se sobreexpresa durante la infección de otros patógenos a sus células blanco. La porina mitocondrial podría estar participando en la interacción con fases sexuales de *B. bigemina* inducidas *in vitro*. Este hallazgo inicial permitirá profundizar en la patogénesis y desarrollo de *B. bigemina* en el intestino de su vector para el establecimiento de métodos mejorados de control.

1. Introducción

1.1. Aspectos generales de la babesiosis bovina

La babesiosis es una enfermedad infecciosa causada por un protozoo intraeritrocítico del género *Babesia* que infecta a una amplia variedad de animales domésticos, silvestres y ocasionalmente a humanos. La enfermedad es transmitida por garrapatas y causa signos tales como: fiebre, hemoglobinuria, anemia hemolítica y en muchas ocasiones puede ocasionar la muerte si no es tratada (McCosker, 1981). El principal impacto económico de la babesiosis es en la industria ganadera donde ocasiona pérdidas económicas importantes. Un gran número de bovinos son importados a países en desarrollo para mejorar la industria ganadera. Esta práctica causa pérdidas debido a las enfermedades transmitidas por garrapatas incluyendo la babesiosis (Callow, 1977).

Entre las especies que causan la enfermedad en bovinos se encuentran *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* las cuales están ampliamente distribuidas a nivel mundial (Bock *et al*, 2004). *Babesia bigemina* junto con *Babesia bovis* son las especies más importantes que afectan el ganado bovino. Estas especies se encuentran localizadas en regiones tropicales y subtropicales; más específicamente entre los paralelos 40° norte y 32° sur del ecuador (McCosker, 1981). *B. bovis* y *B. bigemina* se consideran endémicas en el continente americano desde la zona sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Payne *et al.*, 1990); en donde son transmitidas por las garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* (Solís, 1991).

El impacto de la babesiosis bovina en México se presenta a diferentes niveles entre los que podemos mencionar: limitación de la importación del ganado genéticamente superior al que existe en zonas endémicas, pérdida en la producción de leche y carne, aumento en los costos de producción por los tratamientos a animales enfermos (en muchos casos los animales que se recuperan de la enfermedad no alcanzan a cubrir los gastos generados durante la infección) y pérdidas económicas por mortalidad y abortos (Bock *et al.*, 2004; FAO, 1981; Callow *et al.*, 1993).

En los últimos años se ha tomado en cuenta la relación que existe entre la garrapata vector y el patógeno que transmite (*Babesia*), como una alternativa de estudio que permite estrategias para el control de la enfermedad. De manera general el ciclo biológico de *Babesia* consiste en dos etapas; una etapa de reproducción sexual que se lleva a cabo en la garrapata vector y otra de reproducción asexual que ocurre en el hospedero vertebrado (bovino), esta última etapa del desarrollo de *Babesia spp* es la más estudiada hasta el momento. A la fecha no se conocen estudios dirigidos hacia el análisis o identificación de las proteínas de células de intestino de garrapatas que interaccionen con las fases sexuales de *Babesia bigemina*, lo cual permitiría diseñar una estrategia de control a partir del conocimiento de la interacción vector-patógeno. En este trabajo se investigaron las moléculas de las células de intestino que interaccionan con fases sexuales de *Babesia*; la interacción propone que estas proteínas están implicadas en el proceso de invasión a esas células.

Un enfoque adicional para el estudio de la interacción vector-patógeno, es la investigación de moléculas que se expresan en la superficie de las fases sexuales de *Babesia bigemina*. Hasta ahora no se han caracterizado las moléculas del parásito que pudieran estar involucradas en el proceso de infección de *Babesia* a las células de la garrapata. La caracterización de estas proteínas permitirá el desarrollo de nuevas estrategias de bloqueo de la transmisión del parásito.

1.2. Agente etiológico de la enfermedad

En 1888 Viktor Babés fue el primero en describir la piroplasmosis en la sangre de animales infectados; al descubrir una enfermedad que causaba hemoglobinuria en los bovinos en Rumania; Babes creía que era una bacteria y por lo tanto la llamó *Haematococcus bovis*, el cual después fue cambiado a *Babesia bovis* (Angus, 1996). Otras investigaciones posteriores de Smith y Kilborne en Estados Unidos identificaron al agente causal de la babesiosis al que denominaron *Pyrosoma bigeminum* (*Babesia bigemina*) y fueron los primeros en demostrar la transmisión de un patógeno por artrópodos a hospederos mamíferos al dilucidar que el organismo era transmitido por *Rhipicephalus annulatus* a bovinos (Smith y Kilborne, 1893). Después de la publicación de este trabajo se descubrió la babesiosis en varias partes del mundo. Las especies de *Babesia* que afectan eficientemente al ganado bovino son seis: *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. ovata* y *B. jakimovi* (Purnell, 1981). *B. bigemina* al igual que las otras especies se presenta en el interior de los eritrocitos del hospedero vertebrado (Fig. 1), ocupando un

espacio entre el centro y el margen, esté se encuentra en forma redondeada, ovalada o irregular (ameboide). La forma ovalada del parásito, mide de 3 a 4 micras de largo por 0.8 a 1.2 micras de ancho. Los parásitos se aproximan y se encuentran entre sí por sus extremos puntiagudos (Rodríguez N, 1992).

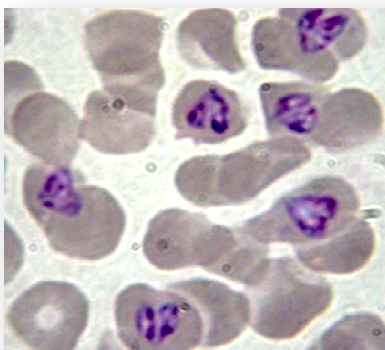


Figura 1. Eritrocitos de bovino infectados con merozoítos de *B. bigemina*. Frotis sanguíneo teñido con colorante Giemsa, observado en el objetivo de inmersión (100X). Fotografía donada por J. Mosqueda.

1.3. Características genómicas de *Babesia spp*

El genoma de diversas especies de *Babesia* se encuentra en diferente nivel de secuenciación. En el caso de *B. bovis* actualmente se tiene la secuencia genómica de un aislado de Texas (T2Bo); el genoma nuclear de este aislado consiste de cuatro cromosomas con una longitud de 2.62, 2.59, 1.73 y 1.25 Mpb. El genoma completo nuclear tiene un tamaño de 8.2 Mpb; cada cromosoma de *B. bovis* contiene una región rica en A+T (58.2%) de aproximadamente 3,000 pb. Tres de los cromosomas son acrocéntricos y uno submetacéntrico. El genoma de *B. bovis* contiene tres operones de rRNA dos de ellos en el cromosoma tres y uno en el cromosoma cuatro; contiene también 44 genes de tRNA distribuidos a través de los cuatro cromosomas, y 3,671

genes que codifican proteínas nucleares. Además del genoma nuclear, *B. bovis* contiene dos genomas extracromosomales ricos en A+T (78.2%): un genoma apicoplasto circular de 33,000 pb y un genoma mitocondrial de aproximadamente 6,000 pb. *B. bovis* tiene dos familias importantes de proteínas (Brayton *et al.*, 2007). Una de esas familias codifica para el antígeno variable de superficie del eritrocito (VESA), estas proteínas son sintetizadas por el parásito y subsecuentemente exportadas a la superficie de los eritrocitos del hospedero (O'Connor *et al.*, 1997).

Las proteínas de la familia VESA experimentan una rápida variación antigénica, y por lo tanto, están implicadas en la evasión del sistema inmune del hospedero (Allred *et al.*, 2000). Otra familia que codifica una proteína de 225 kDa conocida como proteína de cuerpos esféricos (SBP2). Los cuerpos esféricos son organelos apicales del parásito; SBP2 es una proteína de los cuerpos esféricos que es liberada por el parásito dentro de los eritrocitos del hospedero durante la invasión y se localiza en el lado citoplasmático de la membrana del eritrocito (Dowling *et al.*, 1996). La familia de antígeno variable de superficie del merozoíto VMSA contiene genes que codifican proteínas que son blanco de anticuerpos bloqueadores de la invasión (Hines., *et al.*, 1992). El genoma del aislado T2Bo contiene cinco genes *vmsa* incluyendo *msa1* y cuatro copias de *msa2* (Brayton *et al.*, 2007). A pesar de los esfuerzos realizados por determinar las secuencias del genoma de las especies de *Babesia*; aun no se logra determinar las características particulares del mismo.

1.4. Clasificación taxonómica de *Babesia spp*

Riek en 1968 usando como ejemplo el desarrollo de *B. bigemina* en el vector *Rhipicephalus*; analizó el ciclo de desarrollo de *Babesia* dentro de la garrapata, gran parte del trabajo que realizó fue dedicado a la clasificación de *Babesia* y su relación con las coccidias y *Plasmodium*. En esta investigación se determinó que diversos detalles del ciclo biológico de *Babesia* dentro de la garrapata (eventos que anteriormente eran desconocidos) eran sólo variantes de un ciclo básico que consiste en fases sexuales y asexuales; esto se observó en *Babesia*, coccidias y *Plasmodium* (Riek., 1968). Este resultado constituyó una sorpresa para los taxonomistas que especulaban que *Babesia* era pariente cercana a las amibas.

Posteriormente, con las investigaciones de Levine se plantearon cambios radicales en los criterios de clasificación de los *Esporozoas* y se dio origen a una nueva subrama; *Apicomplexa*, debido a la presencia de un órgano bastante complejo en el extremo anterior presente en *Babesia*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* y las coccidias (Levine., 1971). Este órgano denominado complejo apical solo se puede observar bajo el microscopio electrónico, es importante mencionar que los aspectos morfológicos de este órgano y sus dimensiones varían entre los géneros. (Scholtyseck, *et al.*, 1970). Entonces, la detallada observación de aspectos morfológicos de *Babesia* permitió establecer la relación cercana de este hemoparásito con otros miembros de la subrama *Apicomplexa*.

Sistema de clasificación propuesto por Levine (1971):

Clasificación de *Babesia* spp. Levine

Rama	<i>Protozoa</i>
Subrama	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Piroplasma</i>
Orden	<i>Piroplasmorida</i>
Familia	<i>Babesiidae</i>
Género	<i>Babesia</i>

1.5. Ciclo biológico de *Babesia* spp en el hospedero invertebrado

El conocimiento del ciclo de vida de *Babesia* hasta el momento es incompleto (Riek, 1968., Friedhoff, 1988). Estudios de microscopía electrónica realizados por Rudzinska *et al.* (1983) demostraron la reproducción sexual de *Babesia microti*, posteriormente mediante la cuantificación de cantidades de DNA, se demostró que existe reproducción sexual de *B. divergens* (Mackenstedt *et al.*, 1990), *B. bigemina* y *B. canis* (Mackenstedt *et al.* 1995) en el hospedero vector y, por lo tanto, probablemente en otras especies. El desarrollo de *B. bovis* y *B. bigemina* tiene patrones similares en la garrapata *Rhipicephalus* spp. El desarrollo del ciclo de vida de *Babesia* es complejo lo cual dificulta el estudio detallado del mismo, aunque se han realizado investigaciones dirigidas a explicar la interacción entre la garrapata vector y la *Babesia*, no se ha podido esclarecer de manera precisa el mecanismo a nivel molecular de la infección.

El ciclo de *B. bigemina* incluye fases sexuales y asexuales en el hospedero invertebrado y vertebrado respectivamente (Fig. 3); *Babesia spp* en el hospedero vertebrado sólo infecta a los eritrocitos (Friedhoff, 1988). El ciclo comienza cuando una garrapata se alimenta de la sangre de un bovino infectado, como paso inicial se observa la destrucción de los eritrocitos dentro del intestino de las garrapatas; ahí se experimentan cambios tales como: variación en temperatura, pH, tensión de oxígeno y la concentración de bióxido de carbono y glucosa, que estimulan el desarrollo de dos poblaciones de cuerpos radiados, que son los gametocitos (strahlenkörper) durante las primeras 24 horas, (Gough, Jorgensen y Kemp, 1998). Los cuerpos radiados se multiplican dentro y fuera de los eritrocitos (Fig. 2); dando lugar a grandes agregados de cuerpos radiados multinucleados. Cuando la división se completa emergen cuerpos radiados individuales haploides (gametos), (Mackenstedt *et al.*, 1995) y éstos se fusionan en pares (Gough *et al.*, 1998) para formar una célula esférica que es el cigoto, que infecta selectivamente a las células digestivas del intestino de la garrapata entre las 24 y 48 horas post-repleción (Friedhoff., 1988), donde posiblemente se multiplica, además de sufrir una división adicional en células basófilas (células que sintetizan vitelogenina).

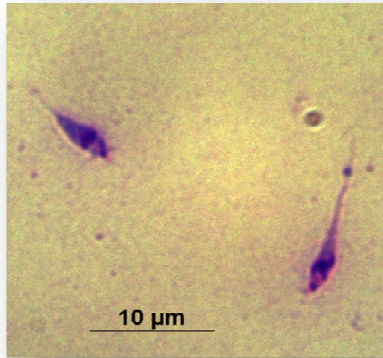


Figura 2. Fases sexuales (cuerpos radiados) de *Babesia bigemina* obtenidas *in vitro*. Fases sexuales teñidas con colorante Giemsa y observadas en el objetivo de inmersión (100X). Fotografía donada por Juan Mosqueda.

Un evento de multiplicación posterior, da lugar al desarrollo de los quinetos (formas móviles del parásito) lo cual ocurre a las 72 horas post-repleción (Tabla 1); los quinetos viajan por la hemolinfa de la garrapata e infectan a diversos órganos y tejidos, incluyendo glándulas salivales y ovarios (Agbede, Kemp y Hoyte, 1986). En los ovarios los quinetos penetran a los embriones de las garrapatas infectadas; por lo tanto ocurre transmisión transovárica (Riek RF., 1963, Bock *et al.*, 2004). Ésta es una adaptación importante del ciclo de vida ya que el vector *Rhipicephalus spp* es una garrapata de un solo hospedero. Cuando las larvas de una garrapata infectada eclosionan, los quinetos migran a las glándulas salivales y se transforman en fases multinucleadas (esporogonia), las cuales se rompen para formar los esporozoítos (merozoítos pequeños haploides).

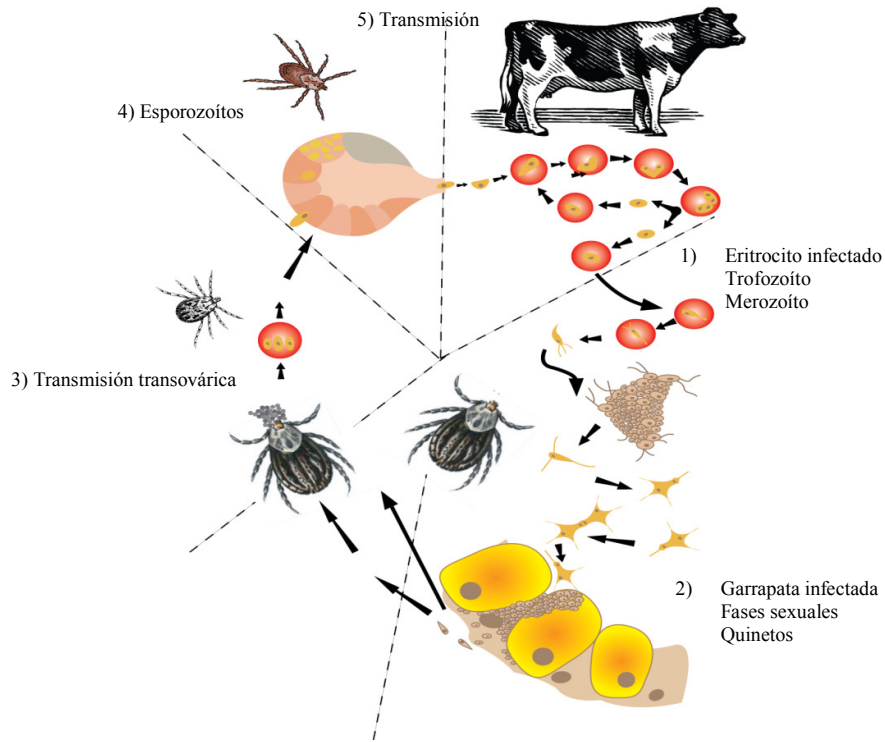


Figura 3. Representación esquemática del ciclo biológico de *B. bigemina*. 1) multiplicación de trofozoítos y merozoítos de *B. bigemina* dentro de los eritrocitos de bovino. 2) Infección de células intestinales por fases sexuales de *B. bigemina* y multiplicación de quinetos en el intestino. 4) Invasión de órganos internos de la garrapata por parte de quinetos, donde infectan los óvulos fecundados (transmisión transovárica). 4) Infección de glándulas salivales por quinetos y transmisión de esporozoítos a su hospedero vertebrado a través de la alimentación de la garrapata (Bock *et al.* 2004).

En todas las especies de *Babesia*, el desarrollo de los esporozoítos inicia cuando la garrapata infectada se adhiere al huésped vertebrado. Sin embargo, los esporozoítos en *B. bigemina* se desarrollan durante la alimentación de la larva y, para que éstos sean infectivos deben pasar alrededor de 9 días. Tomando en cuenta estas consideraciones, la transmisión de *Babesia* sólo ocurre cuando la garrapata está en fase de ninfa y adulto (Callow y Hoyte, 1961; Riek, 1964; Dalgliesh, Stewart y Callow, 1978). En el caso de *B. bovis* la formación de los esporozoítos infectivos usualmente ocurre

de 2 a 3 días después que las larvas de la garrapata se adhieren al bovino (Bock *et al.*, 2004).

Tabla 1. Aparición de fases de desarrollo de *B. bigemina* en órganos de *Rhipicephalus microplus* a 28°C (Smith R. D., 1978).

Tiempo (Hrs)	Intestino	Hemolinfa	Túbulo excretor	Ovario
0	Piroplasmas	-	-	Neg
24	Pocos anillos	-	-	Neg
48	Anillos Cuerpos de fisión	Neg	-	Neg
72	Anillos Quinetos	Quinetos	-	Neg
96	Anillos Quinetos	Quinetos	Pocos Quinetos	Pocos Quinetos
120	Pocos anillos Quinetos	Quinetos	Pocos Quinetos	Anillos Quinetos

1.6. Signos clínicos de la enfermedad

Dentro de la respuesta inmune a la infección, se puede destacar que las citocinas tienen una función importante en la respuesta a *Babesia spp.* El resultado de la respuesta inmune está relacionado a la cantidad de citocinas que se producen, y la sobreproducción de estas contribuye al progreso de la enfermedad causando vasodilatación, hipotensión, incremento en la permeabilidad capilar, edema, colapso vascular, desórdenes de la coagulación, daño endotelial y paro del flujo sanguíneo (Wright *et al.*, 1989; Ahmed., 2002).

Aunque este último es inducido en la microcirculación por agregación de eritrocitos infectados en capilares. Probablemente el deterioro fisiopatológico más importante ocurre en el cerebro y pulmón, lo que puede resultar en babesiosis cerebral y un síndrome de insuficiencia respiratoria, infiltración de neutrófilos, permeabilidad vascular y edema (Wright y Goodger., 1988; Brown y Palmer., 1999). El bovino desarrolla anemia hemolítica progresiva durante el curso de la infección de *B. bovis*.

La enfermedad aguda generalmente tiene un periodo de 3-7 días; la fiebre está presente por varios días antes que se presente cualquier otro signo, seguido por inapetencia, depresión, incremento en la tasa de respiración, reducción del movimiento, pérdida muscular, temblores, hemoglobinuria y en casos avanzados coma y muerte (de Vos y Potgieter., 1994). En *B. bigemina* los efectos patogénicos se relacionan más directamente a la destrucción de los eritrocitos. La hemoglobinuria se presenta más temprano y más consistentemente que en la infección con *B. bovis*. Los bovinos infectados con *B. bigemina* son menos afectados que en infecciones con *B. bovis*, no hay afectación cerebral y la recuperación es usualmente rápida. No obstante, en algunos casos la enfermedad puede desarrollarse muy rápidamente con anemia repentina y severa, ictericia y muerte (Callow, Rogers y de Vos., 1993).

2. Estrategias de control de la babesiosis basadas en la utilización de vacunas

2.1. Investigación sobre vacunas atenuadas

Una de las estrategias que se usa para el control de la babesiosis bovina es el uso de vacunas atenuadas. El uso de estas vacunas puede reducir considerablemente las pérdidas económicas relacionadas con la enfermedad. Existen vacunas obtenidas de organismos vivos atenuados obtenidos en diversos países; estas vacunas confieren protección inmunológica importante a los bovinos. En Australia, por ejemplo; existe una vacuna viva de cepas atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina*, se ha demostrado que una sola aplicación de la vacuna confiere protección contra *B. bovis* hasta por 4 años en bovinos jóvenes y que se presenta menos de un caso de enfermedad por cada mil animales que se vacunan (Bock y de Vos., 2001).

Es importante señalar que hasta ahora no existe una vacuna comercial contra la babesiosis bovina. En México investigadores del laboratorio de hemoprotozoarios del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), han desarrollado una vacuna viva atenuada; bivalente contra *B. bovis* y *B. bigemina* (Canto *et al.*, 1999). Esta vacuna bivalente se obtiene del cultivo *in vitro* de un aislado de campo de *B. bovis* y un aislado clínico la cepa de *B. bigemina*; esta vacuna se ha mantenido alternadamente en cultivo *in vitro* y criopreservación en nitrógeno

liquido. La vacuna bivalente confiere protección contra la infección de cepas virulentas en forma individual o combinada (Figueroa *et al.*, 1998) ya sea fresca o congelada; o bien cultivadas *in vitro* o multiplicadas en bovinos esplenectomizados (Canto *et al.*, 2002)

2.2. Investigación sobre vacunas inactivadas

Las vacunas contra la babesiosis bovina es una de las estrategias importantes de control de esta enfermedad, se han reportado varias vacunas que se basan en el uso de antígenos parasitarios. Estas vacunas se preparan a partir de lisados de eritrocitos infectados, también se han utilizado antígenos parasitarios solubles que son obtenidos del sobrenadante de cultivos de *Babesia spp* (Schetters *et al.*, 1995). El cultivo *in vitro* de las especies de *Babesia spp* es una herramienta crucial que permite el estudio a nivel molecular de los genes que codifican proteínas, que pueden ser protectoras contra la enfermedad. Esta herramienta ha abierto también una nueva vía para el uso de vacunas basadas en proteínas recombinantes y también para el estudio de polimorfismos moleculares de los antígenos que se han descubierto.

2.3. Diseño de vacunas basadas en Antígenos Parasitarios Solubles (APS)

Los antígenos parasitarios solubles son proteínas liberadas *in vivo* en el plasma de los bovinos infectados o liberadas *in vitro* en el sobrenadante del cultivo de *Babesia spp*. Los APS pueden ser obtenidos de la lisis artificial de los eritrocitos después de que estos ya liberaron los parásitos (merozoítos) o

secretados en el exterior cuando el parásito invade o sale del eritrocito (James *et al.*, 1981. Ristick *et al.*, 1988). Al inocular bovinos con un lisado de eritrocitos infectados homogeneizados con adyuvante completo de Freund; se ha demostrado una protección limitada contra *B. bovis*; causando un retraso en la multiplicación de parásitos y la disminución de signos clínicos. El uso de fracciones cromatográficas de APS, obtenidos a partir de lisados de eritrocitos infectados, ha permitido mejorar la preparación de la vacuna y de obtener una mejor protección en contra de *B. bovis* (Mahoney., *et al.*, 1981). Por otro lado se ha probado que una fracción proteica de APS denominada DSP confiere protección contra *B. bovis* (Goodger *et al.*, 1999). A pesar de todos los esfuerzos hasta ahora no se ha podido encontrar una vacuna que induzca una respuesta inmune efectiva de memoria en bovinos (Ristick *et al.*, 1988).

El poder cultivar *in vitro* las especies de *Babesia* representan un gran avance en el desarrollo de vacunas; debido a que con el establecimiento del cultivo se pueden obtener y producir grandes cantidades de APS que se encuentran en el sobrenadante del cultivo. La capacidad inmunoprotectora de los APS que se obtienen de los cultivos *in vitro* de *B. bovis* (Kuttler *et al.*, 1983), y *B. bigemina* se ha evaluado (Echaide *et al.*, 1993). En un experimento de vacunación en el que se combinaron diversos APS obtenidos de cultivos de *B. bovis* y *B. bigemina* se demostró que éstos confirieron una protección eficiente en bovinos desafiados con las dos especies de *Babesia* antes mencionadas (Montenegro-James *et al.*, 1992). Con estos datos se ha sugerido la idea de que al combinar APS de diferentes especies de *Babesia* se puede aumentar la capacidad de protección de esta vacuna; esta propuesta es lógica

considerando que existe variación en el poder de infección de cada especie. A pesar de las ventajas que confieren el uso de los APS, la única vacuna comercial disponible en la actualidad es una desarrollada en Francia contra *B. canis* denominada Pirodog (Moreau *et al.*, 1984).

2.4. Diseño de vacunas basadas en proteínas recombinantes

Los antígenos parasitarios que son blancos del sistema inmune, o que están implicados en funciones esenciales para la supervivencia del parásito, son los antígenos parasitarios mejor estudiados, éstos participan en la invasión al eritrocito y confieren variación antigénica, lo que le permite al parásito evadir la respuesta inmune del hospedero. De manera particular se han estudiado cuatro grupos de antígenos, con el fin de determinar su capacidad inmunoprotectora; esto se ha realizado mediante la inoculación de proteínas recombinantes. Estos antígenos son: los que están en la superficie de eritrocitos infectados; los presentes en la superficie de los merozoítos; los de organelos del complejo apical del parásito y los excretados-secretados en el sobrenadante de cultivo. Estudios de inmunofluorescencia realizados con sueros de bovinos inmunes, sobre eritrocitos infectados con *B. bigemina*, demostraron que la superficie de los eritrocitos que están parasitados son antigénicamente diferentes a los eritrocitos sanos (Ross *et al.*, 1968).

Una de las proteínas del parásito que se expresa en la superficie del eritrocito infectado es la proteína VESA-1, es un heterodímero formado por una proteína de 128 kDa (VESA-1a) y de una proteína de 113 kDa (VESA-1b).

VESA-1a, la cual se localiza sobre la fase extracelular de la membrana plasmática del eritrocito parasitado, a nivel de las protuberancias denominadas "knobs. (O'Connor *et al.*, 1997). Esta proteína confiere variación antigénica al parásito y está implicada en mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero.

Los antígenos de superficie del merozoíto de *Babesia* están expuestos brevemente al sistema inmune del hospedero, cuando estos están por invadir al eritrocito. Esta fase donde el merozoíto está expuesto es suficiente para inducir una respuesta inmune puesto que los sueros inmunes de bovinos infectados por *B. bovis* reconocen los antígenos de superficie de 42 kDa (MSA1) y de 44 kDa (MSA2) (Goff *et al.*, 1988). Las moléculas MSA 1 y MSA 2 han sido agrupadas en la familia de antígenos variables de superficie del merozoíto denominada VMSA. La capacidad del suero de bovino inmune para proteger contra la infección por *B. bovis*, así como la capacidad de anticuerpos provenientes de animales vacunados y dirigidos contra la proteína recombinante rMSA1 para neutralizar la infectividad de los merozoítos *in vitro*, sugieren un importante papel de la proteína MSA1 en la protección inmune contra *B. bovis* (Hines, *et al.*, 1992). Debido a que los antígenos del complejo apical de *Babesia* contenidos dentro de los organelos como las roptrías, micronemas o cuerpos esferoides están implicados en el proceso de invasión del eritrocito; éstos se han considerados como posibles candidatos vacunales contra *Babesia* (Wright *et al.*, 1992).

No obstante, los esfuerzos que se han realizado y el considerable avance que se han tenido en los últimos años respecto a la caracterización inmunológica molecular de los antígenos candidatos para vacunas, hasta ahora no se ha diseñado de forma comercial ninguna vacuna realmente efectiva contra la babesiosis bovina, por tanto permanece aún el desafío para descubrir un antígeno u antígenos que confieran protección total contra la enfermedad.

3. Vector transmisor

3.1. Generalidades de la garrapata vector

La importancia médica y veterinaria de las garrapatas radica en su capacidad para transmitir enfermedades a los humanos y animales. Las garrapatas pertenecen al *Phylum* Artrópoda; orden Acarina y se dividen en dos grandes grupos. Garrapatas blandas (Argasidae) y garrapatas duras (Ixodidae) (Klompen *et al.*, 1996). Las garrapatas duras se alimentan por largos periodos de tiempo en su hospedero, variando en días a semanas, dependiendo de muchos factores como: estadio de vida, tipo de hospedero, y especie de garrapata. La superficie externa o cutícula de las garrapatas duras aumenta para acomodar el gran volumen de sangre que ingiere, la cual, en adultos puede ser alrededor de 200 a 600 veces más el peso de una garrapata no alimentada (Sonenshine., 1991). Las garrapatas causan grandes pérdidas económicas en la ganadería a nivel mundial y causan efectos adversos en el ganado de diversas maneras (Snelson., 1975); y parasitan un amplio rango de hospederos vertebrados. Las garrapatas *Ixodides* más importantes

económicamente en las regiones tropicales pertenecen a los géneros, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* y *Amblyomma* (Fig. 4)(Frans., 2000).



Figura 4. Garrapatas semirrepletas de *R. microplus*. Garrapatas colectadas de un bovino a los 21 días post-infestación. Fotografía tomada por Elba Rodríguez.

3.2. Importancia biológica del vector *R. microplus*

Las garrapatas comprenden un problema veterinario por que transmiten enfermedades, producen parálisis o toxicosis, y causan daño físico al ganado, son responsables de pérdidas económicas a través de efectos directos e indirectos. Los efectos directos son: la alimentación por un gran número de garrapatas causa reducción en el peso del bovino y anemia, y también reduce la calidad de la piel. Aparte de irritación o anemia en casos de fuerte infestación (FAO, 1998), así como pérdidas en la producción de leche y carne (L'Hostis y Seegers, 2002; Peter *et al.*, 2005). Indirectamente las garrapatas causan efectos como son: la transmisión de patógenos y producción de toxinas.

Recientemente en México se ha reportado la distribución de la garrapata *Rhipicephalus spp* en regiones tropicales y subtropicales abarcando el 51.5% del territorio nacional (Mosqueda J.*et al.*, 2007). En México en el año 2004 se reportó que aproximadamente el 75% de la población total de cabezas de ganado estimada en 31,247,734, se encontraba en áreas infestadas con garrapatas y por consecuente en riesgo de contraer enfermedades transmitidas por este vector (SIAP., 2000). Actualmente no se tienen determinados los costos provocados por las garrapatas y las enfermedades que estas transmiten, sin embargo; podemos notar que en 1975 éstos fueron de alrededor de 286 millones de dólares (Beltran., 1975), el costo del control de las garrapatas en México es alto como en la mayoría de los países, recientemente se reportó que en el mercado mundial asciende a 70 millones de dólares y en el mercado mexicano es de 17 millones de dólares (Rothwell, 2003). Estos datos nos permiten tener una visión general del impacto e importancia económica a nivel mundial y en nuestro país provocado por las garrapatas.

3.3. Características del genoma de la garrapata *R. microplus*

En los últimos años se ha hecho un esfuerzo por tener herramientas que faciliten la investigación y por tanto desarrollo de nuevas formas de control del ectoparásito. La disponibilidad de una base de datos que contenga los genomas completos de organismos específicos, permite un gran avance en este aspecto, debido a que se pueden comprender y resolver paradigmas de sistemas biológicos de interés, que dañan a la salud humana, a la agricultura y al medio ambiente. El avance en el descubrimiento de genes promete

beneficiar e incrementar nuestro conocimiento sobre la biología de las garrapatas, los mecanismos que contribuyen al parasitismo, la resistencia a acaricidas y la transmisión transovárica y trans-estadial de los patógenos. La comprensión de estos fenómenos puede trasladarse al desarrollo de nuevas opciones de control de las garrapatas y las enfermedades transmitidas por éstas. Estas opciones pueden ser a través de la identificación de blancos biológicos para el desarrollo de una nueva química terapéutica y vacunas para el control de las garrapatas. Aún no se tiene secuenciado el genoma de *R. microplus* en su totalidad, pero en 1998 se reportó un total 752 secuencias para *R. microplus* disponibles en el GenBank; menos del 20% de esas secuencias corresponden a secuencias que codifican genes. El genoma haploide de *R. microplus* contiene 7.1×10^3 Mpb. El genoma contiene un alto porcentaje de secuencias de ADN repetidas (69%), el 31% de las secuencias son altamente repetitivas con una frecuencia promedio de 153,000 copias/genoma haploide y el 38% son secuencias moderadamente repetitivas, con una frecuencia promedio de 220 copias/genoma haploide, (Ullmann *et al.*, 2005).

En el 2005 se creó un índice de genes denominado BmiGI de 20, 417 ESTs (Expressed Sequence Tags, por sus siglas en inglés) (Los ESTs representan porciones expresadas de genes). Estas secuencias son derivadas de una librería de cDNA normalizado y se encuentran disponibles en la página web TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/tgi>) (Guerrero *et al.*, 2005). El BmiGI se analizó para identificar genes, que podrían estar envueltos en la resistencia a acaricidas, incluyendo genes que codifican para los sitios que son blancos de acción de pesticidas específicos y enzimas envueltas en detoxificación o

secuestro de pesticidas. La acetilcolinesterasa (AChE) es el blanco de organofosforados y mutaciones asociadas a resistencia en *Drosophila melanogaster* (Mutero *et al.*, 1994).

Secuencias del BmiGl codifican para proteínas con significativa similitud a la secuencia de aminoácidos de AChE. También se identificó que existen secuencias que tienen una alta similitud con genes que codifican proteínas como la carboxilesterasa, glutatión S- transferasa y citocromo P450 los cuales pertenecen a una familia de genes que están implicados en mecanismos de resistencia a pesticidas (Wei *et al.*, 2001). Los avances en la identificación de genes de la garrapata *R. microplus*, y el análisis detallado de las secuencias obtenidas y almacenadas en la base de datos, permitirán que eventualmente se puedan identificar nuevas proteínas como blancos potenciales para el diseño de vacunas anti-vector y para poder contrarrestar el fenómeno de resistencia.

3.4. Resistencia química de la garrapata a los acaricidas

La resistencia química que han desarrollado las garrapatas a diversos acaricidas es sin duda una respuesta genética a la intensidad y uso desmedido de estos productos químicos. Desde el año 1981 en México, se han identificado poblaciones de garrapatas resistentes a diferentes productos químicos que son usados para su control; como es el caso de los organofosforados. Estas garrapatas identificadas como resistentes a este producto en específico, se encuentran distribuidas en aéreas tropicales bajas del golfo de México y la península de Yucatán (Solís S., 1991). Desde un aspecto epidemiológico la

resistencia química puede ser trasladada a otras zonas donde se encuentran poblaciones de vectores que no son resistentes. Este fenómeno donde se adquiere la resistencia se da mediante la movilización del ganado infestado a esas zonas (Nari A., 1995). Para poder hacer frente al problema de resistencia a los acaricidas, se puede incrementar la concentración o cambiar el principio activo de los productos químicos, lo cual da lugar a que se incrementen los costos de producción, situación que no es conveniente para la industria ganadera.

3.5. Estrategias principales de control del vector

Diversos métodos de control de la garrapata se han desarrollado, uno de ellos, es la aplicación de ixodicidas. Sin embargo; se observa un patrón de desarrollo exponencial entre el descubrimiento de nuevos insecticidas y la aparición de especies resistentes a estos productos. Estos productos químicos actúan eficiente y rápidamente afectando principalmente a las garrapatas que se encuentran infestando un hospedero; sin embargo; no afectan a las larvas que se encuentran en los pastos, esto obliga a dar tratamientos continuos, lo que ocasiona que efectos dañinos colaterales tales como, la residualidad y la selección de poblaciones de garrapatas resistentes (Parra *et al.*, 1999). Debido a los fenómenos de resistencia se ha incitado al desarrollo de nuevas estrategias o búsqueda de nuevas opciones para el control de la garrapata.

En la actualidad las investigaciones están dirigidas a la búsqueda de estrategias de control que permita la erradicación del vector y del parásito. La

infección inicial que causa *Babesia spp* en los tejidos internos del vector es a nivel de las células epiteliales del intestino. El desarrollo y transmisión del parásito pueden verse afectados por diversos factores; algunos de estos factores son: la temperatura, clima, estación del año, edad de las garrapatas, estadio de las garrapatas y sexo.

El control mediante vacunas, se ha convertido en un método promisorio; con este método se logra inducir una respuesta importante en los animales lo que permite tener bajo control al vector. Esta estrategia permite tener una protección de mayor duración y eventualmente erradicar al parásito. Los antígenos del intestino son blancos prometedores para el desarrollo de estrategias de control de la garrapata; esto es debido a que los antígenos de la superficie luminal del intestino, están directamente expuestos a los efectores inmunes del hospedero (contenidos en la sangre de la cual se alimenta las garrapatas), ya que la digestión de la sangre dentro de la garrapata es intracelular; y por lo tanto las inmunoglobulinas del hospedero están en contacto con antígenos intracelulares del intestino. Los antígenos del intestino de *R. microplus* han sido explotados como blancos para el diseño de vacunas anti-garrapata. Uno de estos antígenos es la proteína del intestino Bm86; la cual se ha demostrado que reduce la sobrevivencia, peso y tasa de reproducción de las garrapatas; la vacuna basada en la proteína Bm86 tiene características altamente inmunogénicas y protectoras probadas en bovinos (Willadsen., 2004). La glicosilación de proteínas parece ser un evento importante que incrementa la capacidad protectora de las vacunas de antígenos de la garrapata; como se demostró en estudios con proteínas

recombinantes de Bm86 y Bm95 derivadas de levadura las cuales demostraron un poder protector más elevado que aquellas vacunas de proteínas no glicosiladas (de la Fuente *et al.*, 2006a).

Las pruebas de inmunización realizadas con vacunas que contienen la proteína Bm86 demuestran que protegen contra *R. microplus* y también protegen contra especies de garrapatas relacionadas como *R. annulatus* y *R. decoloratus* (Fragoso *et al.*, 1998). Sin embargo; existen variaciones en la susceptibilidad a la vacuna Bm86 entre cepa y cepa de *R. microplus*. la eficiencia de la vacuna Bm86 es tan alta en contra de *R. annulatus* como contra cepas de *R. microplus* (Fragoso *et al.*, 1998., de la fuente *et al.*, 2006b) lo que sugiere que la secuencia de Bm86 y/o diferencias fisiológicas en las garrapatas, pueden determinar la eficacia de la vacuna en *Rhipicephalus* (Sossai *et al.*, 2005; de Vos *et al.*, 2001).

4. Antecedentes particulares del tema

El intestino de la garrapata vector es la primera barrera que debe atravesar el patógeno que transmite, para poder desarrollarse y completar su ciclo de vida; por lo que el proceso de invasión de las fases sexuales de *Babesia* al epitelio intestinal de las garrapatas es un paso crítico para el establecimiento del parásito, sin embargo, existen muy pocos reportes acerca de las moléculas que participan o varían en su expresión durante la invasión de los parásitos al intestino del vector.

Uno de los pocos reportes que existen es el que describe Rudzinska y col. (1983) mediante el uso de microscopía electrónica; ellos sugirieron que *B. microti* probablemente invade el intestino de la garrapata *I. dammini* a través de una combinación de penetración activa e invaginación de la célula del intestino de la garrapata, pero las estructuras de *B. microti* que observaron y el mecanismo descrito, no han sido reportados para ninguna especie de *Babesia* en los años siguientes.

En cuanto a la identificación de proteínas del intestino de las garrapatas, que podrían jugar un papel determinante en la invasión de los parásitos solo existe el reporte de una glicoproteína de 55 kDa denominada TROSPA (por sus siglas en ingles, Tick receptor OspA protein), que se localiza en las células epiteliales de *Ixodes scapularis* y que es un receptor específico que media la invasión de la bacteria *Borrelia burgdorferi*, sin embargo, no existe ningún reporte de este receptor para parásitos protozoarios que se transmiten por garrapatas (Pal *et al.*, 2004).

A pesar de lo anterior, podemos apoyarnos en resultados que se han obtenido de los estudios realizados en *Plasmodium spp.* Los protozoarios del género *Plasmodium* son miembros del *Phylum Apicomplexa*, el cual presenta características muy parecidas a *Babesia spp.* La patogénesis de las enfermedades causadas por estos hemoparásitos son extremadamente similares (Schetters y Eling, 1999), así como también presentan semejanzas en cuanto a morfología, organelos, invasión a los eritrocitos y ciclo de vida, tanto en su fase de reproducción asexual en el eritrocito como en la fase sexual en el

vector que lo transmite (Fasila *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2004; Lobo C.A., 2005).

La teoría de la bomba de tiempo ha sido postulado por Han y col (2000) para explicar las interacciones moleculares entre *P. berghei* y *A. stephensi*. En el que se plantea que la invasión de los oocinetos resulta en cambios característicos de morfología y organización del citoesqueleto de las células epiteliales del intestino del mosquito vector, que son extensivos, irreversibles e inducen muerte celular. Además, se ha descrito que los oocinetos invaden específicamente a través de la membrana plasmática apical lateral del intestino y estimulan la apoptosis de la célula infectada (Zieler y Dvorak., 2000).

Por otra parte, se ha encontrado que los oocinetos de *P.falciparum* requieren de proteoglicanos (condroitin sulfato) para invadir las células del intestino del mosquito transmisor (Dinglasan *et al.*, 2007a). Recientemente se identificó a la glicoproteína Aminopeptidasa N1 del intestino de *A. gambiae*, que actúa como receptor específico de los oocinetos de *P. berghei* y *P.falciparum*. Los anticuerpos específicos dirigidos contra esta glicoproteína, son capaces de bloquear la transmisión de los parásitos, aunque de manera parcial, por lo que se postula que posiblemente existan otras moléculas específicas en el intestino del mosquito vector, que medien la interacción con el parásito (Dinglasan *et al.*, 2007b).

5. Estado del arte

5.1. Avances en genómica y proteómica en el estudio de la interacción garrapata-patógeno

Los avances en el desarrollo de la genómica y la proteómica han permitido progresar en el entendimiento de la relación vector - patógeno. La garrapata *R. microplus* se declaró erradicada en Estados Unidos en 1943 (Graham y Hourrigan, 1977). Sin embargo; la importación de ganado bovino de regiones de México donde la babesiosis es endémica y las poblaciones de garrapatas son abundantes (Temeyer *et al.*, 2004), se considera una amenaza constante para la industria ganadera en los Estados Unidos. El riesgo aumenta constantemente debido a la resistencia de las poblaciones mexicanas de garrapata a los acaricidas que son comúnmente usados para el control en bovinos importados (Temeyer *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2005).

El conocimiento del genoma de *R. microplus*, puede permitir el desarrollo de nuevas estrategias de control. En la actualidad se encuentran bases de datos con la información genómica y proteómica de varias especies de artrópodos de importancia veterinaria. Esto puede servir como fuente para la identificación de nuevos blancos moleculares para el control de los artrópodos. El estudio a gran escala del proteoma de *R. microplus* permitió la identificación de al menos 20 proteínas larvarias abundantemente expresadas, entre las cuales se encuentran proteínas cuticulares, de citoesqueleto, asociadas a glándulas salivales y tropomiosina (Untalan *et al.*, 2005).

La saliva del vector contiene una variedad de componentes bioactivos especie-específicos que entran al hospedero y afectan el sistema inmune, lo que es un primer blanco para el desarrollo de vacunas para combatir las enfermedades transmitidas por vectores (Ribeiro y Francischetti., 2003; Valenzuela., 2004). Patógenos como *B. bovis* se desarrollan y replican en las glándulas salivales y son transmitidos a través de la saliva hacia el hospedero vertebrado (Bowman y Sauer., 2004; Bock *et al.*, 2004).

Actualmente, se dispone de información extensa del transcriptoma y del proteoma de las glándulas salivales (lo que se conoce como sialomas) de diversas especies de artrópodos transmisores de enfermedades, entre las que se encuentran; las garrapatas *Amblyomma variegatum* e *Ixodes scapularis* (Nene *et al.*, 2002; Valenzuela *et al.*, 2002). Reportes recientes con respecto a las moléculas de las glándulas salivales en el género *Rhipicephalus spp*, incluyen el aislamiento de proteínas anticoagulantes (Motoyashiki *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2000) y la clonación y caracterización de calreticulina, una proteína que se encuentra involucrada en la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Ferreira *et al.*, 2002).

Las moléculas del intestino de la garrapata son de interés como blancos para el desarrollo de vacunas; Riding y colaboradores en 1994, aislaron tres glicoproteínas de membrana de preparaciones de intestino de *Rhipicephalus spp*, la glicopeptidasa Bm91 y dos proteínas de función desconocida, Bm86 y BMA7. Estas proteínas confirieron protección al ser usadas como vacuna

contra garrapatas en bovinos, lo que las hace atractivas para su estudio (Riding *et al.*, 1994; Willadsen *et al.*, 1995; McKenna *et al.*, 1998). En el 2004 se desarrolló una vacuna recombinante comercial llamada TickGARD basada en la molécula Bm86, esta vacuna reduce la sobrevivencia y la tasa de reproducción de las garrapatas (Willadsen., 2004).

Las garrapatas adquieren una significativa porción de inmunoglobulinas cuando se alimentan de sangre en el hospedero bovino; estas inmunoglobulinas pasan del intestino de la garrapata a la hemolinfa, de ahí a las glándulas salivales y regresan al hospedero deteniendo su actividad biológica durante el pasaje. Esto incrementa el número de blancos potenciales para una respuesta inmune protectora, ya que, un gran número de antígenos en órganos internos de la garrapata están potencialmente en contacto con anticuerpos del hospedero, incluyendo antígenos localizados en los ovarios (Wang y Nuttall., 1999). Recientemente se describió una proteína relacionada a la follistatina aislada de ovarios de la garrapata *Haemaphysalis longicornis*, que podría participar en la regulación de la ovoposición (Zhou *et al.*, 2006). El silenciamiento de esta proteína mediante RNA de interferencia de doble cadena disminuye la ovoposición en garrapatas; indicando que esta molécula podría ser un blanco interesante para el desarrollo de una vacuna basada en la proteína recombinante. Con el diseño de vacunas dirigidas contra proteínas de los ovarios, se podrían afectar a las garrapatas a diferentes vías, por disminución de la oogenesis y embriogénesis y de este modo se reduciría la tasa de reproducción o el desarrollo y reproducción de los parásitos de *Babesia spp* que causan la enfermedad. La transmisión de *Babesia spp* siempre es

transovárica, por lo tanto, la identificación de blancos moleculares en los tejidos involucrados en este proceso puede ayudar al desarrollo de métodos de control novedosos que interfieran en la reproducción de la garrapata o la transmisión del patógeno.

Recientemente Rachinsky y colaboradores en el 2007 realizaron un estudio proteómico donde analizaron las diferencias en la expresión de proteínas en tejido de ovario de *R. microplus* infectadas y no infectadas con *B. bovis*, para lo cual extrajeron las proteínas solubles y de membrana de ovarios de garrapatas *R. microplus* adultas. La separación por electroforesis en gel de poliacrilamida de doble dimensión (SDS-PAGE 2D) reveló que existen proteínas que disminuyen su expresión y otras que se sobre-expresan en respuesta a la infección con *Babesia spp*, particularmente proteínas asociadas a la membrana y proteínas en un rango de peso molecular entre 6 a 36 kDa (lisozima) no identificadas, las cuales podrían ser péptidos de defensa del hospedero que se inducen en respuesta a la infección con *B. bovis* en la garrapata. En otros organismos se ha descrito recientemente un gran número de péptidos antimicrobianos con propiedades similares (Papagianni, 2003). Un péptido parasitocidal nuevo llamado longicina se describió en garrapatas *H. longicornis*. La longicina es un péptido de 6.4 kDa y punto isoeléctrico de 8.5 que tiene la habilidad de unirse y matar a los parásitos *B. equi* y *B. gibsoni* (Tsuji *et al.*, 2007). Se seleccionaron 43 proteínas de ovario expresadas diferencialmente en respuesta a la infección con *B. bovis*; entre las proteínas sobreexpresadas están: la calreticulina, dos subunidades de miosina, proteína de retículo endoplásmico, cis-trans peptidil prolil isomerasa (PPIasa), una

subunidad de citocromo c oxidasa, una glutamina sintetasa y una familia de los inhibidores de serina proteasa tipo Kunitz. Las que disminuyen su expresión están otra PPIasa, una subunidad de hemoglobina y una lisozima. Los cambios en la expresión de estas proteínas pueden ser en respuesta adaptativa de la garrapata hospedera a la infección por *Babesia spp* o indicar cambios patológicos inducidos por el parásito en el ovario. Este estudio permitió iniciar una base de datos que puede ser utilizada para investigar proteínas específicas envueltas en la transmisión del patógeno y para identificar proteínas blanco para el desarrollo de vacunas; aunque es necesario nuevos estudios para determinar cuál es la función de esas proteínas y como su concentración en tejido puede afectar la viabilidad y capacidad reproductiva de la garrapata (Rachinski A, *et al.*, 2007a).

Como parte de los esfuerzos por iniciar una base de datos del proteoma de la garrapata, que pueda ser utilizado para investigar las moléculas envueltas en la transmisión del patógeno; se analizaron las diferencias en la expresión de proteínas en tejido de intestino de garrapatas infectadas y no infectadas (Rachinski A, *et al.*, 2007b). En este reporte se reveló que entre las proteínas identificadas de intestino de garrapata infectadas por *Babesia spp* se encuentran 6 proteínas implicadas en procesos de señalización, incluyendo tres proteínas de unión a calcio; una proteína de unión a guanina, una proteína con actividad péptido señal y un receptor asociado al translocón. Además se sobreexpresaron cinco enzimas metabólicas que participan en el transporte de electrones y protones, el procesamiento de proteínas y el metabolismo del ácido retinoico. Entre las proteínas que disminuyeron su expresión están las

chaperonas moleculares, una proteína de citoesqueleto y una proteína multifuncional de la familia prohibitina (Rachinski A. *et al.*, 2007b).

Hasta la fecha, solo existe un trabajo donde se demuestra la infección *in vitro* de células de la garrapata con *Babesia spp*; en el cual se estandarizó un cultivo primario de células de ovarios, glándulas salivales e intestinos de garrapata, donde se sugiere la interacción específica del parásito *B. bigemina* con células del intestino de *B. microplus* (Rodríguez., 2007; Mosqueda *et al*, 2008).

Mediante el estudio de inmunofluorescencia de las células infectadas *in vitro*, se logró concluir que fases sexuales de *B. bigemina* infectan las células de intestino, pero no las células de ovario ni las células de las glándulas salivales, y que quinetos de *B. bigemina* infectan las células de ovarios y de glándulas salivales, pero no las células de intestino de *R. microplus*. Este es un descubrimiento importante en la investigación de la interacción vector-patógeno, ya que se pudo identificar que diferentes fases del parásito infectan diferencialmente órganos internos de la garrapata. Esas observaciones proveen un soporte para la hipótesis de que los parásitos deben tener moléculas que interactúen con receptores específicos en tejidos de la garrapata. La caracterización de estas interacciones permitirá profundizar en el conocimiento de del mecanismo de infección de *Babesia spp* dentro de la garrapata.

6. Importancia de continuar el estudio del tema

La babesiosis bovina es una enfermedad de impacto económico a nivel mundial en la industria ganadera, existen más de 1.2 billones de bovinos en el mundo que están expuestos a la enfermedad (McCosker., 1981). Los costos de la babesiosis no incurren sólo en la mortalidad sino también a las pérdidas en la producción de leche, carne, abortos y gastos en las medidas de control y tratamiento de bovinos infectados como en el caso de uso de acaricidas, vacunas y tratamientos terapéuticos (Bock *et al.*, 2004). En México, se ha estimado que las pérdidas económicas ocasionadas por las garrapatas del ganado y las enfermedades que transmiten incluyendo la babesiosis bovina fueron de 286 millones de dólares en 1975 (Beltran., 1975).

Existe una relación compleja entre el hospedero bovino-vector-patógeno, en la garrapata ha sido poco estudiada la interacción que existe entre la garrapata vector y los parásitos que ésta transmite; el cual es un punto crucial en la infección y transmisión de los parásitos a su hospedero vertebrado. Hasta la fecha no se han investigado las proteínas de intestino de la garrapata que interaccionan con *Babesia spp*; por lo tanto, el propósito de este estudio es la identificación de proteínas de intestino de *R. microplus* que interaccionan específicamente con fases sexuales de *B. bigemina*, ayudará a la identificación de nuevas estrategias de control de la enfermedad, mediante el desarrollo de vacunas anti-garrapata o bloqueadoras de la transmisión de *Babesia spp*.

7. Hipótesis

Proteínas de membrana de células de intestino de la garrapata *Rhipicephalus microplus* interaccionan con fases sexuales de *Babesia bigemina*

8. Objetivo general

Analizar a nivel proteómico la interacción de las células de intestino de la garrapata *Rhipicephalus microplus* con fases sexuales de *Babesia bigemina*

8.1. Objetivos específicos

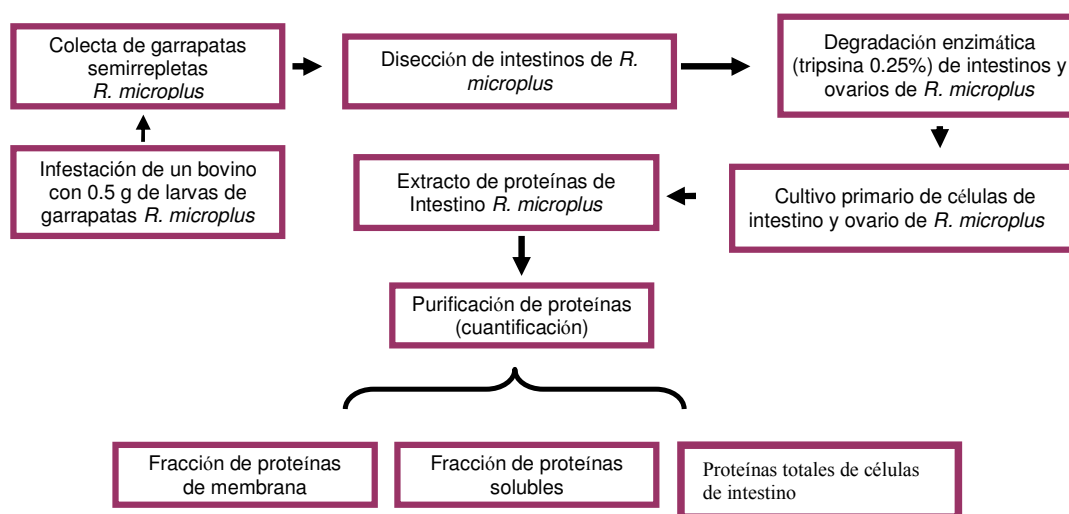
1. Demostrar que proteínas de intestino de *Rhipicephalus microplus* reconocen fases sexuales de *Babesia bigemina*
2. Identificar por lo menos una proteína de intestino de *Rhipicephalus microplus* que interacciona con fases sexuales de *Babesia bigemina*

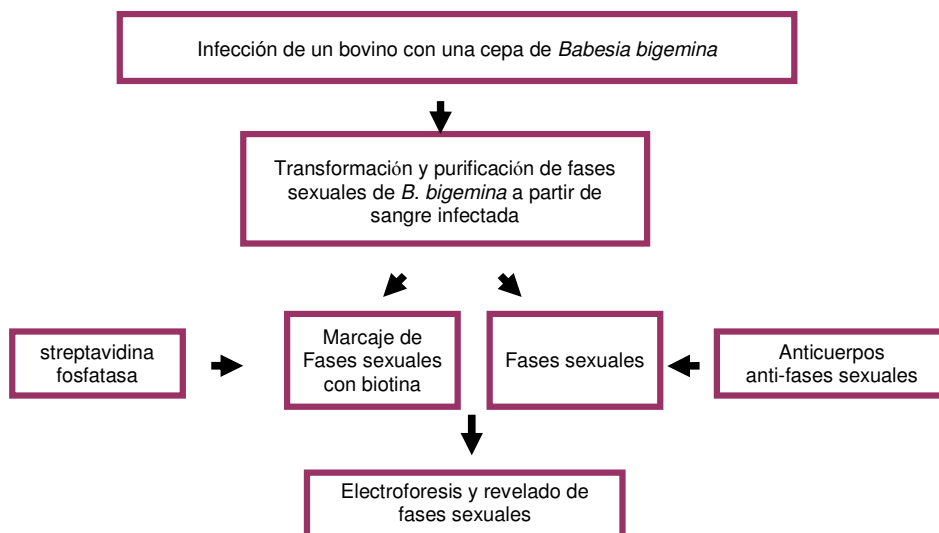
9. Esquema de la estrategia general de experimentación

- 1) Demostrar que proteínas de intestino de *Rhipicephalus microplus* reconocen fases sexuales de *Babesia bigemina*

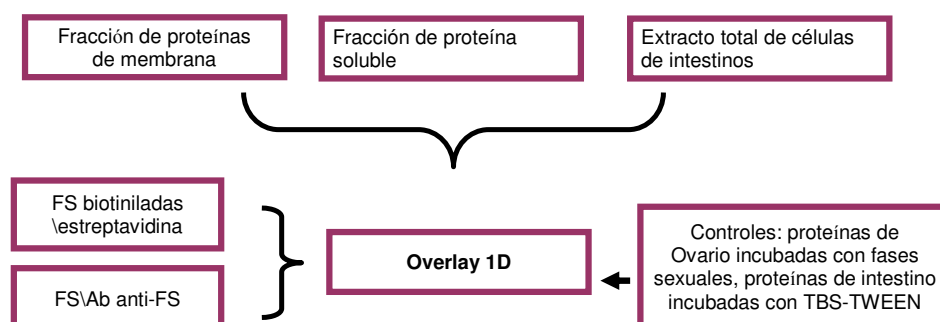
- a) Obtención de cultivos primarios y extracción de proteína de células

R. microplus



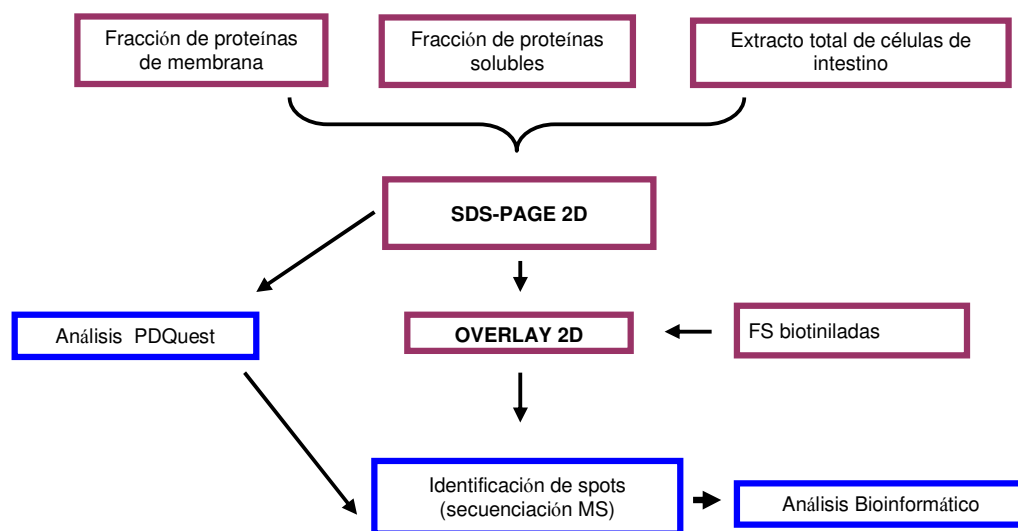
b) Inducción purificación y biotinilación de fases sexuales (FS) de *B.**bigemina*

c) Ensayo de overlay en primera dimensión (1D)



- 2) Identificar por lo menos una proteína de intestino de *Rhipicephalus microplus* que interacciona con fases sexuales de *Babesia bigemina*

- a) Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones (SDS-PAGE 2D) y ensayo de overlay en dos dimensiones



10. Metodología

10.1. Obtención de órganos de la garrapata *R. microplus*

Para obtener el cultivo de células de intestinos de *R. microplus* se infestó un bovino con 0.5 g de larvas de garrapatas *R. microplus* de una cepa mantenida en el laboratorio libre de *Babesia* spp (cepa kuttler y cepa Chiapas). El día de infestación del bovino se consideró día cero. A los 20 días post-infestación se colectaron garrapatas para la disección de los intestinos, esto con la finalidad de obtener órganos libres de cualquier otro componente o tejido que dificulte el análisis. Las garrapatas del día 20 corresponden a garrapatas semi-repletas. Las garrapatas se lavaron con agua corriente y se desinfectaron con una solución de cloruro de benzalconio al 10%.

La disección de los intestinos se realizó cuidadosamente manipulando los órganos internos de las garrapatas (ovarios e intestinos) con pinzas para facilitar la separación, aislamiento y obtención de órganos completos bajo las mejores condiciones asépticas. De 300 garrapatas del día 20 post-infestación, se disectaron por separado los intestinos y ovarios, éstos fueron colocados en una gota de solución balanceada de sales de Hank's (HBSS) con antibiótico y antimicótico (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, amfotericina B 0.25 µg/mL; GIBCO) en una superficie plana de parafina, este proceso se realizó bajo el microscopio estereoscópico y para su conservación se mantuvieron en hielo en tubos de 1.5 ml con HBSS y con 40 µl/ml de coctel de inhibidor de proteasas completo (complete protease inhibitor cocktail. Cat. No.

11 697 498 001, ROCHE); después de que se disectaron todos los órganos se lavaron cinco veces con PBS estéril, centrifugando a 800 rpm, 4°C por 5 minutos.

10.2. Establecimiento del cultivo primario de intestinos y ovarios de la garrapata *R. microplus*

Para la disociación de las células de los intestinos de la garrapata *R. microplus*, se utilizó un protocolo enzimático que consta de un tratamiento con tripsina al 0.25% (Rodríguez., 2006). Los intestinos y ovarios disectados se cortaron con un bisturí estéril en piezas de 3 a 4 mm, se depositó el tejido en un tubo de 1.5 ml con solución balanceada de sales de Hank's (Hank's Balanced Salt Solution [HBSS]). Se centrifugó el tejido a 800 rpm por 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavaron los pedazos de tejidos 3 veces resuspendiéndolos en HBSS libre de calcio y magnesio. En cada paso se mantuvo la muestra en hielo. Posteriormente se añadió 1 ml de tripsina al 0.25% en HBSS por cada 100 mg de tejido y se incubó la muestra por 30 minutos a 4°C.

Después de la incubación a 4°C se decantó el sobrenadante y de inmediato se incubó con la tripsina residual a 37°C por 20 minutos; enseguida se añadió medio de garrapata a temperatura ambiente y se agitó suavemente 3 veces durante el período de incubación. Se centrifugó a 800 rpm por 30 minutos y se filtró la suspensión de células a través de un filtro celular (GIBCO Cat. No. 15050057) y se centrifugó a 800 rpm por 30 minutos. La pastilla se resuspendió en HBSS sin calcio ni magnesio y se centrifugó nuevamente 3

veces a la misma velocidad y tiempo para eliminar residuos de tripsina. Al término de la centrifugación se resuspendió la pastilla en medio y se contaron las células en un hematocitómetro. La suspensión de células se cultivó *in vitro* en medio de garrapata preparado a base de Medio Mínimo Esencial (MEM), Medio Leibovitz's 15 (L-15), caldo triptosa fosfato, suero fetal bovino con antibiótico y antimicótico. El cultivo se mantuvo en incubación a 28°C con una atmosfera de aire al 5% de CO₂, durante 3 días en placas de 24 pozos con 400µl de medio. Después de los tres días de cultivo las células se contaron y se almacenaron en alícuotas de 1x10⁶ células/ml a -70°C.

10.3. Obtención y purificación de fases sexuales de *B. bigemina*

Para la obtención y purificación de las fases sexuales, se infectó un bovino previamente esplenectomizado con una cepa criopreservada de *B. bigemina* (cepa kuttler) y otro bovino con una cepa de campo (cepa Chiapas). Cuando la parasitemia alcanzó el 4%, que correspondió a 9 días post-infección, se colectaron aproximadamente 400 ml de sangre infectada en un sistema de extracción que consta de un matraz kitazato que contiene perlas de vidrio al 10% del volumen total del matraz; las perlas permiten la eliminación de la mayoría de las plaquetas; sin la necesidad de utilizar anticoagulante. Después de que se obtuvo la sangre completa, se depositó en tubos de 50 ml y se centrifugó a 4,000 rpm 20 min a 4°C; se eliminó el suero y el paquete de glóbulos blancos (leucocitos). Se lavó la sangre tres veces con una solución Vega y Murgía [VyM] (Vega *et al.*, 1984) y se centrifugó a 4,000 rpm por 20 min a 4°C. El paquete de eritrocitos se cultivó en botellas de 25 ml, quedando del

volumen total de cultivo el 20% de eritrocitos con medio de inducción de fases sexuales [medio 199 suplementado con 20% de suero de bovino, 100 μ M de ácido xanturénico y antibiótico-antimicótico] (Mosqueda J. *et al.*, 2004b) desarrollado en el laboratorio del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) localizado en Jiutepec Morelos.

El cultivo de sangre se mantuvo a 28°C por 18 horas. Posterior a la incubación; se vació el contenido de la botella en tubos de 50 ml y se centrifugó a 4,000 rpm por 20 min a 4°C para retirar el medio. La separación de los parásitos transformados (fases sexuales de *B. bigemina*) se realizó mediante un gradiente de densidad con percoll isosmótico al 47% en solución salina de fosfatos 1X (PBS). Para realizar esta separación, se colocaron 27 ml de percoll al 47% en un tubo de ultracentrífuga de 50 ml y se añadieron 2 ml de sangre infectada, esto se centrifugó a 20,000 g por 20 minutos a 4°C. Después de centrifugar se colectó la fase superior del tubo (fase que contiene a los parásitos); enseguida se lavaron 3 veces con PBS a 2,401 g 20 minutos a 4°C para eliminar el percoll. Al retirar el sobrenadante se obtuvieron los parásitos transformados. La pastilla se resuspendió en 200 μ l de PBS 1X y se añadió un coctel de inhibidor de proteasas complete (Roche, No. Cat. 11873 580 001).

Una parte de las fases sexuales obtenidas se almacenaron a -20°C hasta realizar el ensayo de overlay, donde se probaron con anticuerpos anti-fases sexuales y por otro lado, a otra parte de las fases sexuales se realizó el marcaje con biotina cromogénica con el kit EZ-Link NHS-Chromogenic Biotinylation Kit (No. Cat. 21625 PIERCE), siguiendo las instrucciones del

fabricante, que se describen brevemente a continuación: Para la reacción de marcaje se disolvieron 10 mg de proteína en 1 ml de PBS. Antes de usar la biotina se preparó 10 mg/ml de la solución (200 µl de N´N dimethylformamide [DMF] más 2 mg de biotina cromogénica). Se adicionaron 5.4 µl de biotina cromogénica (10 mg/ml) a la solución de la proteína de interés, se incubó la solución por 1 hora a temperatura ambiente; posteriormente se removió el reactivo mediante columnas (Zeba Desalt Spin Columns, PIERCE), para lo cual la muestra se colocó en la columna y se centrifugó a 1,000 g por 2 minutos, se decantó la solución y se le adicionó 2.5 ml de PBS sobre la resina y se realizaron 4 lavados centrifugando a 1,000 g por 2 minutos. Se cambió la columna a un tubo nuevo de 15 ml y se añadió 1 ml de muestra de proteína biotiniladas en el centro de la resina y se dejó que la muestra se absorbiera en la resina. Se adicionaron 100 µl de agua ultrapura sobre la muestra; y finalmente se centrifugó la columna a 1,000 g por 2 minutos. La muestra que se colectó en el tubo, es la muestra de proteína biotinilada. Las fases sexuales biotiniladas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

10.4. Preparación de extractos proteicos de células de intestino y ovario de la garrapata

Para el análisis de las proteínas de intestino y ovario de *Rhipicephalus microplus* se realizó primero una extracción de proteína de membrana y proteínas solubles de células de intestino y ovario en cultivo, los cuales se utilizaron para ensayos de overlay en una dimensión. Del cultivo de células se realizó una extracción de proteínas, mediante un protocolo de extracción en el

cual se obtienen fracciones de proteínas hidrofílicas y proteínas hidrofóbicas, este protocolo permite simplificar el análisis proteómico de las muestras y se basa en la separación de proteínas de membrana, por separación de las fases dependiente de temperatura usando detergente (Tritón X-114), dos de las ventajas del uso de este método es que no requiere de ultracentrifugación, ni la preparación de gradientes de densidad (Ready Prep, Protein Extraction Kit (membrane I) BIO-RAD. No. Cat. 163-2088). Las células (0.05 ml de la pastilla) se mezclaron y homogeneizaron en un buffer de extracción de proteínas de membrana (0.5 ml (M1). Se sonicó la suspensión de células para fragmentar el DNA genómico, durante 40 segundos 4 veces a 60% amplitud (Ultrasonic processor, Modelo GEX 130); se colocó la suspensión en hielo entre cada sonicada.

Posteriormente se adicionó un volumen igual de amortiguador M2 en el extracto celular y se añadieron además 40µl/ml de un coctel de inhibidor de proteasas, completo, se agitó en vortex 5 veces por 60 segundos y se incubó en hielo por 10 minutos; posteriormente la muestra se incubó por 30 minutos más a 37°C y se centrifugó a 16,000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se recupero la fase y inferior se le adicionaron 0.5 ml de amortiguador M2, y nuevamente se incubó en hielo por 10 minutos, al termino de lo cual se repitió el ciclo de centrifugación y la pastilla se resuspendió en amortiguador para electroforesis de segunda dimensión.

Para la preparación de la muestra de extractos totales de células de intestino, se descongeló un vial de 1×10^6 células de intestino, estas fueron

lavadas 3 veces con PBS (pH 7) centrifugando a 1800 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y a la pastilla se le añadió el amortiguador de lisis TNTE que consta de Tris 50mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, triton 0.5% y EDTA 1mM; más los inhibidores de proteasas complete 40µl/ml y PMSF 10 mM, se mezcló por vortex se incubó por 15 minutos. Después se centrifugó a 1800 rpm por 5 minutos colectándose la muestra contenida en la capa intermedia del tubo y se purificó.

Las muestras obtenidas de los protocolos anteriores se purificaron mediante el uso del kit ReadyPrep 2-D Cleanup (No. Cat. 163-2130. BIO-RAD), este protocolo permite la preparación de las muestras de proteínas de baja conductividad. Previamente se realizó la cuantificación de proteínas mediante el kit de cuantificación RC DC Protein Assay según indicaciones del fabricante (BIO-RAD, No. Cat. 500-0119). Se transfirieron 500 µg de proteína en un volumen final de 100 µl a un tubo de 1.5 ml, a la cual le adicionamos 300 µl de Precipitating Agent , fue mezclado e incubado por 15 minutos en hielo. Enseguida se agregaron 300 µl de Precipitating Agent 2 y se centrifugó la muestra a 12,000 g por 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante adicionamos 40 µl del Wash Reagent 1 y se centrifugó con los parámetros anteriores, el reactivo fue removido y adicionamos 25 µl de agua ultrapura y se mezcló por vortex 20 segundos. Posteriormente adicionamos 1 ml de Wash Reagent 2 (pre-incubado por 1 hora a -20°C) y 5 µl de Wash 2 Additive y se mezcló por vortex 1 minuto. El tubo fue incubado a -20°C por 30 minutos (se mezcló por vortex cada 10 minutos durante la incubación). Se centrifugó el tubo a 12,000 g por 5 minutos, después de esto el sobrenadante fue eliminado. Se

dejó secar la pastilla por 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió adicionando 200 µl de amortiguador de rehidratación de muestra para electroforesis de doble dimensión. La proteína obtenida fue cuantificada mediante el protocolo RC DC Protein Assay (BIO-RAD, No. Cat. 500-0119).

10.5. Preparación de la muestra de proteínas de intestino de *R.*

microplus

Para la preparación de la muestra de proteínas de intestino y ovario de *R. microplus*; se utilizaron 40 µg de proteína la cual se disolvió en amortiguador de rehidratación de muestra (amortiguador de lisis) para electroforesis de doble dimensión y 5 µl de marcador de punto isoeléctrico, (pI) que contiene nueve proteínas con un rango de puntos isoeléctricos de 4.5 a 8.5 (BIO-RAD, No. Cat. 161-0320). Con esta muestra se hidrataron pasivamente tiras de 7 cm con un rango de pH de 7-10 (ReadyStrip IPG, No. Cat. 163-2099. BIO-RAD). El amortiguador de lisis consta de urea 8 M, ditiotretol (DTT) 50 mM, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0.001% y anfolinas 0.2% (100X Bio-Lyte 3-10 ampholytes No. Cat. 163-2094. BIO-RAD). Se mezcló gentilmente la solución de proteína y los 120µl de la muestra se colocaron sobre la cámara de rehidratación; arriba de ésta se colocó la tira con el lado del gel hacia la muestra y se dejó hidratar de modo que toda la muestra quede en contacto con el gel. Posteriormente se añadió 1 ml de aceite mineral sobre la tira, con el fin de evitar evaporación durante el proceso de rehidratación y se dejó hidratar durante toda la noche a temperatura ambiente.

10.6. Isoelectroenfoque de la tira IPG

Para realizar la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico, se realizó isoelectroenfoque (IEF) de las muestras de proteínas.. Para realizar el isoelectroenfoque se preparó la cámara colocando en los extremos y sobre los electrodos papeles rectangulares (electrode Wicks, BIO-RAD, Cat. No. 1654071) en cada canal de la cámara. Se pipeteó 10 µl de agua ultrapura estéril sobre los papeles. Posteriormente se sacó la tira de la cámara de rehidratación con pinzas, se lavó con agua ultrapura y se puso sobre la cámara de isoelectroenfoque cuidadosamente. Sobre la tira se agregó 1 ml de aceite mineral. Utilizando la cámara de isoelectroenfoque Protean IEF Cell (Protean IEF cell, Basic Unit. No. Cat. 165-4001. BIO-RAD). El protocolo de isoelectroenfoque que se empleó consta de 3 pasos: Paso 1: 250 V con una duración de T: 40 Lineal. Paso 2: 4000 V con una duración de T: 3 Lineal. Paso 3: 4000 V con una duración de T: 1000 V\hr R.

10.7. Reacción de equilibrio y Electroforesis en gel de poliacrilamida en segunda dimensión (SDS-PAGE 2D)

Antes de la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular, (electroforesis en segunda dimensión) se equilibró la tira IPG en amortiguador de equilibrio que consta de, Urea 6 M, Glicerol 30%, Tris HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 2% w/v y Azul de bromofenol 0.002%. Con unas pinzas se retiró la tira de la cámara de isoelectroenfoque, se lavó con agua ultrapura para eliminar el aceite mineral; y se incubó la tira en 5 ml del amortiguador de equilibrio que

contenía adicionalmente DTT al 2% (amortiguador 1) durante 15 minutos. Posteriormente se incubó en 5 ml del mismo amortiguador reemplazando el DTT por iodacetamida al 2.5% (amortiguador 2).

Para la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 12% y para colocar el marcador de peso molecular se usó un trozo de papel filtro impregnado con 2 μ l del marcador y se puso en el gel; se colocó la tira con el gel y sobre la preparación se agregó agarosa precalentada al 0.5% con azul de bromofenol 0.002%. Se corrió el gel a 200 V por una hora, con amortiguador de electroforesis de proteína [Glicina 192 mM, Tris base 25 mM y SDS 0.1%].

10.8. Protocolo de tinción con nitrato de plata

Para la visualización de las proteínas previamente separadas por electroforesis de doble dimensión se procedió a teñir el gel con nitrato de plata. Realizando el siguiente protocolo: se fijó el gel en una solución que consta de Metanol al 50%, Ácido acético 12%, Formaldehído (HCOH) al 37 % durante toda la noche. Se lavó el gel con una solución de etanol al 30% y H₂O destilada y se aforó hasta 30 ml. Tras dar tres lavados de 20 minutos con esta solución, se realizó un pretratamiento con tiosulfato de sodio Na₂S₂O₃ · 5H₂O 0.2 g/l durante un minuto exacto. Se pesó un cristal de tiosulfato de sodio y se ajustó el volumen a 50 ml. Posteriormente se dieron tres lavados con H₂O destilada; cada lavado de 20 segundos exactos. Enseguida se procedió a la impregnación del gel con nitrato de plata Ag NO₃ 2 g/L y formaldehído (HCOH) al 37 %. Se

incubó el gel durante 20 minutos en agitación suave. Después de la impregnación se hicieron dos lavados con H₂O destilada, cada lavado de 20 segundos exactos.

El revelado se llevó a cabo en una solución que consta de carbonato de sodio Na₂CO₃ 60 g/L, formaldehído (HCOH) al 37 % y tiosulfato de sodio Na₂S₂O₃ · 5H₂O 4 mg/L. Se agitó continuamente hasta que aparecieron las bandas; se lavó dos veces con H₂O destilada cada lavado de 2 minutos exactos y se paró la reacción con una solución con metanol al 50% y ácido acético al 12%, durante 10 minutos en agitación. Se tomó fotografía del gel y posteriormente se almacenó el gel en una solución de metanol al 50% y se mantuvo a temperatura ambiente.

Después de estandarizar las condiciones de electroforesis en segunda dimensión, los geles se tiñeron con nitrato de plata compatible con el método de espectrometría de masas. Para esto se utilizó un kit de tinción de plata comercial, Silver Stain Plus (Cat. Num. 161-0449. Bio-Rad). El gel se fijó con una solución que consta de Metanol al 50%, Ac. Acético 10%, Fixative Enhancer concentrate 10%, agua deionizada 30%; durante 20 minutos en agitación. Se decantó la solución anterior y se dieron 2 lavados con agua deionizada por 10 minutos en agitación suave. Posteriormente se procedió a hacer la tinción y revelado del gel siguiendo las indicaciones del manual que describiremos brevemente: se usó una solución que se preparó con 5 ml de Silver Complex Solution, 5 ml de Reduction Moderator Solution, 5 ml de Image Development Reagent, e inmediatamente antes de que se usara se adicionó 50

ml de Development Accelerator Solution a temperatura ambiente. Se puso en agitación suave durante 15 minutos y después de ese tiempo se agregó Ac. Acético al 5% para parar la reacción, que se dejó actuar por 15 minutos y finalmente el gel se rehidrató con agua y se tomó fotografía.

10.9. Tinción de Coomassie G-250

Para la obtención de las manchas de proteínas de los geles, se realizó una electroforesis en gel de doble dimensión al 12%, en el cual se utilizaron 100 µg de proteína y 5 µl de marcador de punto isoeléctrico. El gel de doble dimensión se tiñó con azul de Coomassie G-250 (No. Cat. 161-0786 BIO-RAD), debido a que es un colorante compatible con espectrometría de masas. Se lavó el gel tres veces con agua deionizada estéril durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 50 ml de colorante, se colocó el gel en agitación durante 1 hora. Se lavó el gel por 30 minutos con agua deionizada estéril. Se almacenó el gel en agua hasta que se cortaron los puntos.

10.10. Inmovilización de proteínas

La transferencia o inmovilización de proteínas es un método que se basa en la transferencia de proteínas que previamente se separan en una electroforesis en gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Este procedimiento se realizó tanto para los ensayos de overlay en una dimensión, como para los ensayos de overlay en doble dimensión, donde las proteínas se

separaron de acuerdo a su punto isoeléctrico y peso molecular. La preparación del casete se ordenó de tal manera que sobre un lado del casete (el que queda hacia el electrodo negativo) se acomodó una esponja sobre la cual se puso un papel Whatman y cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa. Sobre la membrana de nitrocelulosa se acomodó el gel de proteínas. Enseguida se colocó un papel Whatman y sobre éste una esponja; todo el proceso se realizó en un recipiente conteniendo buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, almacenado a 4 °C), y se colocaron en una cámara de electrotransferencia (BIO-RAD, modelo 170-3930). La cámara se llenó con amortiguador de transferencia y se colocó un recipiente con hielo; la transferencia de proteínas se realizó a 100 V durante una hora.

10.11. Ensayo de Overlay en una y dos dimensiones

Para determinar la interacción entre las proteínas de intestino de *R. microplus* y las fases sexuales de *B. bigemina* se realizaron ensayos de overlay en una y dos dimensiones. En este trabajo los primeros ensayos de overlay en una dimensión se realizaron con fases sexuales y anticuerpos policlonales anti-fases sexuales, y posteriormente se utilizaron fases sexuales biotiniladas que se emplearon en ensayos de overlay de una y dos dimensiones; para este fin se transfirieron las proteínas de intestino a una membrana de nitrocelulosa y se tiñó con una solución de rojo Ponceau al 0.1%, para verificar que efectivamente se realizó la transferencia de proteínas. La membrana se lavó con agua destilada para eliminar el colorante y se bloqueó con leche al 5% en TBS-T (TBS-Tween 1X al 5% de leche) por 3 horas. Posteriormente se lavó la

membrana con TBS-Tween 1X, 5 veces por 20 minutos y se cortó en tiras de aproximadamente 0.5 cm de ancho. Las tiras fueron incubadas con fases sexuales durante toda la noche, mientras que otras tiras se incubaron con TBS-T leche 1%. Posteriormente se dieron 5 lavados con TBS-T por 20 minutos, y se incubaron con anticuerpos anti-fases sexuales de conejo (dilución en TBS-T leche 1%, 1:1000) por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Las tiras se lavaron con TBS-T por 20 minutos y fueron incubadas con el anticuerpo conjugado de ratón anti-conejo IgG (HRP-Mouse Anti-Rabbit IgG [H+L] Conjugate [ZyMax Grade]. No. Cat. 81-6720. ZYMED Laboratories) (dilución en TBS-T leche 1%, 1:5000) por 1 hora. Finalmente la membrana se lavó 5 veces según lo descrito anteriormente; y se añadió kit de quimioluminiscencia.

Para revelar la interacción de las proteínas de intestino con fases sexuales biotiniladas, se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, solo que el conjugado que se utilizó fue streptavidina acoplada a peroxidasa. Se realizaron ensayos donde, se incubó una tira de las diferentes fracciones de proteínas de intestino con fases sexuales biotiniladas, una tira de cada una de las diferentes fracciones con TBS-Tween 1X con leche al 1%, una tira de proteínas de ovario con fases sexuales biotiniladas y otra tira con TBS-Tween 1X. Tanto las tiras como las membranas que así lo requerían, se incubaron con fases sexuales biotiniladas en una dilución 1:16, preparadas con TBS-Tween 1X al 1% de leche; durante toda la noche a 4°C en agitación. Posterior a la incubación, se lavaron las membranas y las tiras 5 veces con TBS-T 1X por 20 minutos. Se incubaron con el conjugado de Streptavidina -HRP peroxidasa (HRP-Streptavidin Conjugate, Invitrogen, Cat. No. 43-4323) preparada con

TBS-Tween 1X al 1% de leche en una dilución de 1:8000. Esta incubación se realizó durante una hora. Se hicieron 5 lavados con TBS-Tween 1X por 20 minutos cada uno y se visualizó con reactivo de revelado ECL (ECL plus western Boltting Detection System, Amersham GE healthcare).

10.12. Análisis de los geles de doble dimensión mediante el programa PDQuest e identificación de proteínas

Para determinar la reproducibilidad de los geles de doble dimensión, se utilizó el programa PDQuest (PDQuest Advanced 2D Analysis Software, BIO-RAD No. Cat. 170-9630). En este trabajo se hizo un análisis de los geles de doble dimensión a partir de proteínas de extractos celulares de intestino de *R. microplus* que fueron reconocidas por las fases sexuales de *B. bigemina*; con el fin de determinar el peso molecular y punto isoeléctrico de estas proteínas, y ver la reproducibilidad de los geles. Las imágenes de los geles se analizaron en el programa haciendo coincidir las manchas, se seleccionó un gel para ser el gel master (gel que contiene todos los puntos). Se obtuvo la imagen cruda del gel a la cual se le restó fondo, y se obtuvo la imagen filtrada. El programa aplicó un modelo de regresión local para normalizar los datos, lo cual ayudó a disminuir la variación entre cada uno de los geles. Posteriormente en el gel crudo se identificaron las manchas correspondientes al marcador de punto isoeléctrico; lo cual nos permitió ubicar los puntos isoeléctricos y pesos moleculares de las manchas de nuestro interés.

Después que se localizaron las manchas en los geles de doble dimensión, éstas fueron cortadas y analizadas por espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC MS/MS). El espectrómetro de masa es un instrumento diseñado para ionizar moléculas, separar los iones resultantes en función de su relación masa carga y registrar las cantidades relativas de los diferentes iones producidos. Por lo tanto; la espectrometría de masas se basa en la ionización que sufren los compuestos orgánicos al ser sometidos a un haz de electrones de energía superior a su potencia de ionización (Watson J., 1997). La espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida es una técnica que combina las capacidades de separación física de la cromatografía líquida con la capacidad de análisis de masas de la espectrometría de masas.

La espectrometría de masa es uno de los métodos de detección más sensibles y específicos para el análisis molecular. La utilización de LC MS/MS es una ventaja ya que la separación de los iones se realiza empleando dos analizadores. Lo cual se traduce a la disminución del ruido de fondo con respecto al que se produce en otros métodos y por tanto en un aumento de la sensibilidad. Las secuencias de las proteínas identificadas por medio de la espectrometría de masas se analizaron contra la base de datos de todos los metazoa y otros metazoa, mediante el programa MASCOT (Matriz Science).

11. Resultados

11.1. Obtención y degradación enzimática de órganos de la garrapata

R. microplus

Los cultivos primarios de células de garrapata son una valiosa herramienta para el estudio de la infección causada por los parásitos en el vector. *B. bigemina* infecta diferentes órganos dentro de la garrapata como: ovarios, glándulas salivales e intestinos; el uso de los cultivos celulares de estos órganos permiten mejorar nuestro conocimiento sobre el ciclo biológico de *Babesia* dentro de la garrapata, cubriendo aspectos del reconocimiento celular y mecanismos de invasión de *Babesia* hacia células del hospedero invertebrado. Para dar cumplimiento al primer objetivo de este trabajo, se procedió a realizar un cultivo primario de células de intestino y ovario de garrapata, con la finalidad de obtener células libres de otros componentes que pudieran interferir en nuestros análisis. En la figura 5 se muestra un intestino de garrapata disectado (Fig. 5), los cuales los cuales fueron sometidos a una degradación enzimática a con tripsina; se mantuvieron en cultivo por 5 días y posteriormente las células se almacenaron a -70°C en viales con 1×10^6 células.

Para evidenciar la integridad de las proteínas y determinar la concentración óptima necesaria para los ensayos de overlay, se realizó una electroforesis con el extracto total celular con diferentes cantidades de proteínas (Fig. 6); después de analizar el patrón electroforético se determinó utilizar la cantidad de 10 µg de proteína para el overlay en una dimensión.



Figura 5. Intestino disectado de la garrapata *R. microplus*. Las garrapatas fueron colectadas a los 20 días post-infestación, que corresponden a garrapatas semi-repletas. De cada una de las garrapatas se disectaron los ovarios e intestinos, este procedimiento se llevó a cabo en una Caja de Petri conteniendo parafina y los órganos se mantuvieron hidratados en PBS.

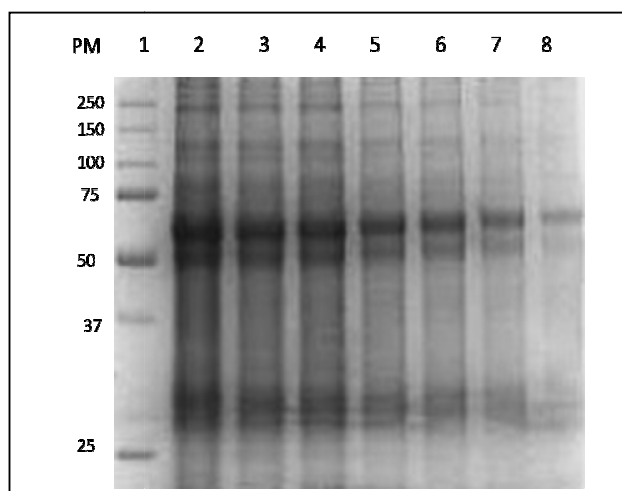


Figura 6. Electroforesis de extracto total de proteínas de células de intestino de *R. microplus*. Las células fueron sonicadas en hielo durante 40 segundos 4 veces a 60% de amplitud y posteriormente separadas en una SDS-PAGE al 10%, teñido con nitrato de plata. Marcador de peso molecular (1). Extractos totales de células de intestino 15, 12, 10, 8, 6, 4 y 2 µg (2-8).

11.2. Extracción y purificación de proteína de células en cultivo de intestino y ovario de la garrapata

Para obtener proteínas de membrana y solubles de células de ovario e intestinos de la garrapata, se realizó un protocolo de extracción seguido de la purificación de las dos fracciones de proteínas. La cantidad de proteínas fue determinada para cada fracción mediante el un kit de cuantificación (ver metodología). Para ver la integridad de las proteínas de las distintas fracciones; estas se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida al 10%; en el cual se cargó 10 µg de cada proteína (Fig. 7).

En la figura 7 podemos apreciar el patrón electroforético de las proteínas del intestino; basándonos en la distribución de proteínas extraídas en las dos fracciones; obtuvo una mayor cantidad de proteínas solubles con respecto a las proteínas de membrana ó asociadas a la membrana. La mayoría de las proteínas de la fracción soluble se aprecian como bandas más intensas (proteínas abundantes) comparadas con las proteínas obtenidas en las fracciones de proteína de membrana. Como se puede apreciar en la figura 7, la mayoría de las proteínas que se encuentran están por encima de los 50 kDa.

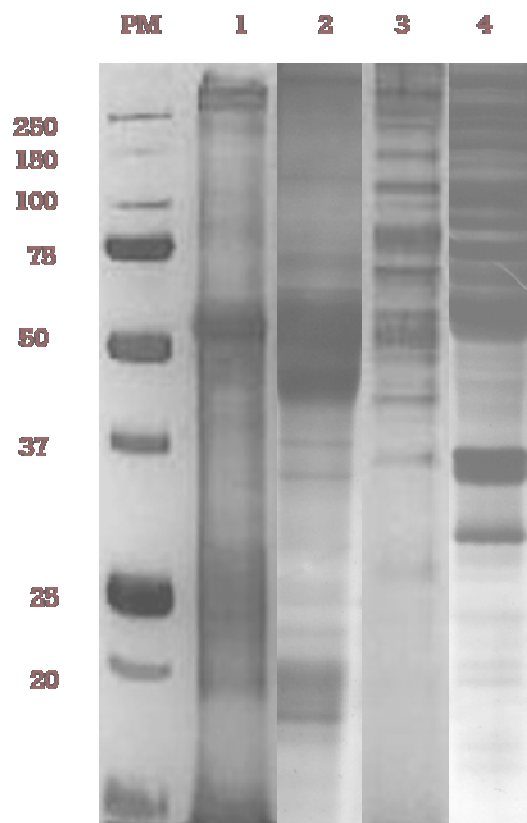


Figura 7. Patrón electroforético de las fracciones de proteína de células de intestino de *R. microplus*. Proteínas separadas en una SDS-PAGE al 10%, teñido con nitrato de plata. Marcador de peso molecular (PM). Proteínas de membrana de células de intestino (1). Proteínas solubles de células de intestino (2). Proteínas de membrana de células de ovario (3). Proteínas solubles de células de ovario (4).

11.3. Obtención y purificación de fases sexuales de *B. bigemina*

Las fases sexuales son inducidas dentro de la garrapata a través de cambios en la concentración de diferentes sustancias; variaciones en la temperatura y otros factores presentes en el intestino (Bock., *et al* 2004). La transformación *in vitro* de fases sexuales libres de antígenos de garrapata, permite obtener grandes cantidades de fases sexuales libres de contaminantes proteicos y ácidos nucleicos; lo cual facilita que puedan ser utilizadas para el estudio de la interacción que existe entre las fases sexuales y las células que infectan. Después de obtener las fases sexuales se marcaron con biotina.

Para determinar el patrón de proteínas marcadas con biotina; se comparó el patrón de proteínas biotiniladas reveladas contra el patrón electroforético de las proteínas totales de fases sexuales teñidas con plata. Este análisis revela que las fases sexuales biotiniladas corresponden a fases sexuales integras al momento de ser marcadas, puesto que el patrón electroforético de estas difiere de las fases sexuales teñidas con plata, donde se observa mayor cantidad de bandas [en el revelado de las fases sexuales se muestran al menos 10 bandas marcadas] (Fig. 8).

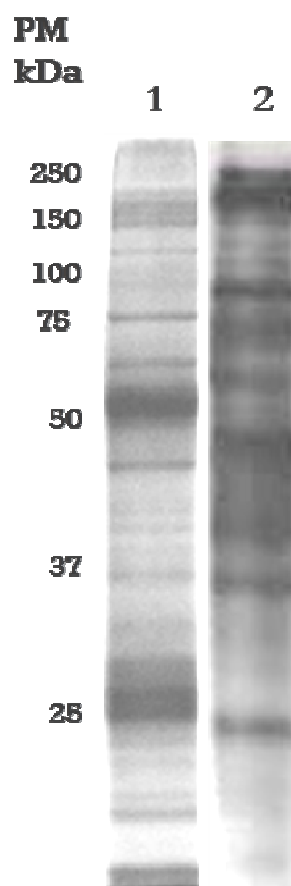


Figura 8. Comparación del patrón electroforético de las proteínas de las fases sexuales de *B. bigemina*. Las fases sexuales fueron marcadas con biotina y separadas en una SDS-PAGE al 10%. Marcador de peso molecular (PM). Electroforesis de Fases sexuales teñidas con nitrato de plata (1). Revelado de fases sexuales biotiniladas (2).

11.4. Ensayos de Overlay de una dimensión (1D)

Para determinar si las proteínas de intestino interactúan con fases sexuales de *B. bigemina*; se realizó el ensayo de overlay en primera dimensión, a partir de proteínas de membrana, solubles y extractos totales de células de intestino; donde se observó que fases sexuales de *B. bigemina* de dos cepas distintas (cepa Kuttler y cepa Chiapas), reconocen varias proteínas de intestino de la garrapata. En el ensayo donde se analizaron extractos de células, se observó que al menos cuatro proteínas fueron reconocidas por fases sexuales marcadas (con pesos aparentes de 25, 37, 50, y 100 kDa) (Fig. 9, carril EI / FS +).

Cuando se probó con proteínas de membrana se observa al menos dos bandas con pesos aproximados de 50 y 37 kDa (Fig. 9, carril PMI / FS +). El análisis de las proteínas solubles reveló una banda de peso aproximado de 75 kDa (Fig. 9, carril PSI / FS +). En contraste con proteínas de ovario incubadas con fases sexuales (carril EO / FS +); extractos totales de células de intestino (carril EI / FS -), proteínas solubles y de membrana de intestino (PSI y PMI / FS - respectivamente) (estas dos últimas se incubaron con TBS-T) donde no se observa reconocimiento. Estos resultados fueron reproducidos en otros ensayos de overlay como se muestra en la figura 10, donde se pueden observar cinco bandas de pesos aproximados de 25, 37, 50, 75 y 100 kDa.

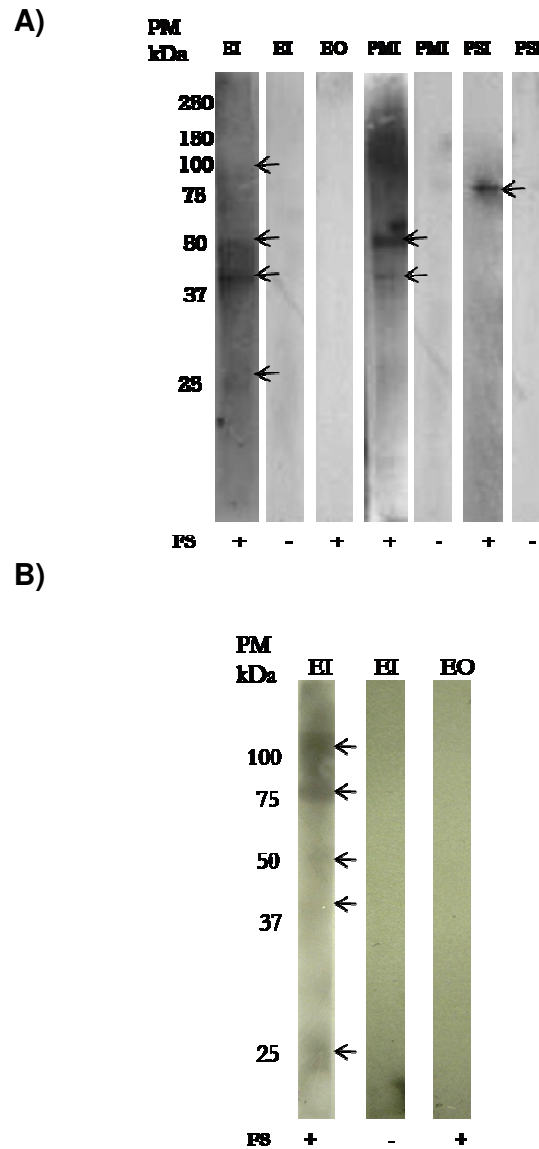


Figura 9. Análisis de la interacción mediante overlay 1D. Interacción de fases sexuales de *B. bigemina* con proteínas de intestino de *R. microplus*. Panel A) utilizando la cepa Chiapas de *B. bigemina*. Extracto total de células de intestino incubada con fases sexuales biotiniladas (EI / FS +). Extracto total de células de intestino incubada con TBS-T (EI / FS -). Extracto total de células de ovario incubada con fases sexuales biotiniladas (EO / FS +). Proteínas de membrana de intestino incubadas con fases sexuales biotiniladas (PMI / FS +). Proteínas de membrana de intestino incubadas con TBS-T (PMI / FS-). Proteínas solubles de intestino incubadas con fases sexuales biotiniladas (PSI / FS +). Proteínas solubles de intestino incubadas con TBS-T (PSI / FS -). Panel B) Extracto de intestino y ovario incubados con fases sexuales, utilizando la cepa kuttler de *B. bigemina* y anticuerpos anti-fases sexuales.

Estos resultados coinciden con un resultado preliminar obtenido en el laboratorio donde se observan al menos cinco bandas de proteínas en los extractos completos del intestino con pesos aproximados de 25, 37, 50, 75, y 100 kDa (resultado no mostrado). Es importante señalar que estos resultados preliminares se obtuvieron con la cepa kuttler de *B. bigemina*, mientras que los resultados anteriores se obtuvieron con la cepa Chiapas. Estos datos indican reproducibilidad en los resultados.

Los resultados obtenidos en los ensayos de overlay 1D demuestran que existe interacción de las proteínas del intestino de *R. microplus* con fases sexuales de dos cepas diferentes de *B. bigemina*, y que se observa el mismo patrón de interacción cuando se usan métodos de detección distintos, como es el caso del uso de fases sexuales biotiniladas y el uso de anticuerpos anti-fases sexuales.

La interacción se da con diversas proteínas de las células de intestino, esto se observó por la presencia de una señal en el revelado en varias repeticiones del ensayo de overlay, mientras que en células de ovario no existió señal de interacción, al igual que cuando se incubaron células de intestino y ovario con TBS-Tween (Fig. 9). Los resultados nos sugieren que varias proteínas del intestino de la garrapata son capaces de reconocer las fases sexuales de *B. bigemina* lo cual probablemente sea un punto crucial de la infección.

11.5. Electroforesis en gel de doble dimensión (SDS-PAGE 2D)

La separación de las proteínas a través de electroforesis en gel de doble dimensión nos permite determinar el peso molecular y punto isoeléctrico de cada una de las proteínas separadas. Como parte de la estrategia para cumplir con el segundo objetivo del trabajo, se realizó la SDS-PAGE 2D tanto de las fracciones de las proteínas como de extractos de intestinos completos (Fig. 10, 11 y 12). Se realizó la electroforesis en gel 2D (SDS-PAGE 2D) donde se probaron diferentes cantidades de proteína con efecto de estandarizar las cantidades necesarias. En las figuras 10, 11 y 12 se muestra que las proteínas están distribuidas en un rango de pH de 3 a 10. Se llevo a cabo un primer ensayo de SDS-PAGE 2D con proteínas de membrana, proteínas solubles y de extractos celulares totales. El procedimiento de preparación de la muestra limitó la obtención de un buen rendimiento de proteína; y se tuvo poca cantidad de manchas de proteínas. Por esta razón se decidió utilizar para los siguientes ensayos, solo de extractos totales de células de intestinos y así poder tener un mejor rendimiento de proteína.