

DISEÑO Y EXPRESION DE UN PÉPTIDO RECOMBINANTE POTENCIALMENTE ÚTIL CONTRA LAS INFESTACIONES POR GARRAPATAS DEL GANADO BOVINO

¹Delia Inés Domínguez-García, ²Rodolfo Lagunes-Quintanilla, ³Moises Martínez-Velazquez, ⁴Hector Quiroz Romero, ¹Rodrigo Rosario-Cruz.

¹Laboratorio de Investigación en Biotecnología, Salud y Ambiente de la Unidad Académica de Ciencias Naturales de la UAGro. Campus el Shalako, Petaquillas Guerrero. ²Unidad de Artropodología del Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria INIFAP. Carretera Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec, Morelos. C.P. 62550. ³Centro de Investigación en asistencia tecnológica y diseño del estado de Jalisco, México., Avenida Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal; Guadalajara, Jalisco, CP 44270. ⁴Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

✉Correo: deliadomgar@yahoo.com.mx

RESUMEN. El objetivo de este estudio fue diseñar un péptido recombinante, con potencial inmunoprotector. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR un fragmento de 303 pb. El producto de PCR se clonó, expresó y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot, el producto expresado fue un péptido de 15 kDa. El péptido recombinante se purificó por cromatografía de afinidad y se inmunizaron dos becerros con 2 dosis de 100 ug/dosis del péptido recombinante adyuvado. Quince días después de la segunda inmunización, los dos becerros se infestaron con 250 mg de larvas de garrapata. Se utilizaron dos becerros como grupo control. Se colectaron las garrapatas adultas en el día 21 y se evaluó el número de garrapatas, el peso de las garrapatas adultas, el peso de la masa de huevos y la tasa de eclosión. La reducción en el número de garrapatas y la tasa de eclosión fué estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Palabras clave: Subolesin, péptido recombinante, inmunización, *R. microplus*.

Design and expression of a recombinant Peptide potentially useful for prevention of cattle tick infestations

ABSTRACT. The aim of the study was to design a recombinant peptide. Specific oligonucleotides were designed to amplify by PCR a 303 bp fragment. The PCR product was cloned, expressed and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot, the resulting expressed product was a 15 kDa peptide. The recombinant peptide was purified by affinity chromatography. Two calves were immunized with two doses of 100 ug/dose of purified and adjuvated recombinant peptide on day 0 and 30 with 250 mg of tick *Rhipicephalus microplus* larvae. Fifteen days after the second immunization, they were infested with 250 mg of tick larvae. Two calves were used as a control group. Adult ticks were collected on day 21 and the number of ticks, the weight of engorged females, the egg mass weight and hatching rate were evaluated. The reduction in the number of ticks and the hatching rate was statistically significant ($p < 0.05$).

Key words: Subolesin, recombinant peptide, immunization, *R. microplus*.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo económico de la industria ganadera bovina es seriamente amenazada por los parásitos externos e internos (Craig, 2003). Entre ellos, se encuentran las garrapatas con una alta capacidad para transmitir enfermedades, ocupando el segundo lugar después de los mosquitos. Ambos son vectores importantes que afectan a la salud humana y animal, han sido combatidos mediante el uso de programas de control basados en el uso de ixodicidas (George, 2004). Esta práctica ha originado problemas de salud, de contaminación ambiental y de los alimentos

destinados para consumo humano, que se derivan de esta actividad, como la carne y la leche, así como la aparición de garrapatas resistentes a los pesticidas. Esto ha puesto de relieve la importancia de impulsar nuevas alternativas de control y acelerar los procesos de investigación que apunten hacia la búsqueda de blancos moleculares para el desarrollo de vacunas recombinantes que ayuden a prevenir las infestaciones por garrapata, a reducir el uso de pesticidas y mitigar la resistencia a los acaricidas y la contaminación ambiental (Domínguez-García *et al.*, 2010).

Existe una gran cantidad de genes que han sido identificados como candidatos vacunales pero pocos han demostrado ser efectivos para controlar las infestaciones por garrapatas. El Gen Subolesin (*Sub*) se ha descrito como un gen protector altamente conservado a nivel de nucleótidos y aminoácidos entre especies de garrapatas pertenecientes a la misma familia (Almazán *et al.*, 2005). Posteriormente, se encontró que la proteína recombinante expresada derivada del gen *Sub*, protege contra todas las etapas de desarrollo de la garrapata, pero la eficacia es de aproximadamente 50%. (Almazán *et al.*, 2010). Estos resultados demuestran que el gen *Sub* es un importante candidato vacunal, sin embargo, es necesario elevar la eficacia para que se pueda utilizar como inmunógeno. Por lo anterior, el presente estudio fue identificar la región inmunogénica del gen *Sub* con la finalidad de amplificarla, clonarla, expresarla y caracterizar su potencial inmunológico e inmunoprotector.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa media Joya, mantenida en el CENID-PAVET INIFAP, de la cual se obtuvo el material genético que se utilizó para los ensayos de amplificación por PCR. Se obtuvo la secuencia del gen *Sub* a partir de la base de datos disponible en el GenBank con el fin de analizar y predecir la región inmunogénica de la secuencia del gen para su amplificación mediante PCR utilizando los oligos diseñados para hibridar las regiones adyacentes de la región de interés y por consiguiente clonar, expresar y purificar la proteína codificada en el fragmento del gen.

La región inmunogénica y las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas del gen fueron identificadas a partir del análisis *in silico* utilizando el algoritmo (Kolaskar-Tongaonkar, 1990), la función putativa del mismo se predijo con la utilidad bioinformática disponible en la red (BLAST) y las variaciones se dedujeron a partir de las alineaciones con el algoritmo Klustal W (Larkin *et al.* 2007).

Se amplificó la región de interés y se clonó en *E. coli*, a partir de la cual se indujo la expresión de las clonas recombinantes. Se llevó a cabo la identificación y purificación del producto de expresión por cromatografía de afinidad en columnas de Níquel, confirmándose la pureza del péptido por electroforesis en geles de poliacrilamida.

El producto de expresión purificado, se emulsificó con el adyuvante comercial Montanide (1:1 v/v) en una concentración de 50 µg/ml el fin de aplicarlo de manera intramuscular en dos bovinos usados en el experimento para demostrar la capacidad de producir una respuesta inmune sólida.

Se inmunizaron intramuscularmente dos bovinos y se tomó una muestra de sangre semanal durante 11 semanas con el fin de analizar la cinética de producción de anticuerpos mediante el inmunoensayo de ELISA y confirmar las características inmunológicas del péptido predichas por el algoritmo de Kolaskar-Tongaonkar (1990). La prueba de ELISA se llevó a cabo en microplacas sensibilizadas con 10 microgramos por pozo del péptido purificado y un

anticuerpo dirigido contra la cadena pesada de la molécula de IgG.

Se llevaron a cabo dos infestaciones artificiales con aproximadamente cinco mil larvas de *B. microplus* antes y después de la inmunización y se colectaron a los 21-25 días las hembras adultas ingurgitadas para analizar los efectos antes y después de la inmunización, sobre el peso de las garrapatas y de la masa de huevos, el número de garrapatas y la tasa de eclosión.

Los datos serológicos fueron analizados mediante la prueba t de Student para la comparación de medias entre los grupos experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en la secuencia del gen obtenida del GenBank se derivaron oligonucleótidos en las regiones adyacentes a la región inmunogénica predicha mediante el algoritmo de Kolaskar-Tongaonkar (1990). Dicha región de interés se amplificó por PCR (Figura 1), se clonó, se secuenció y se expresó confirmándose un 100% de similitud con la secuencia de la cepa Santa Luisa disponible en el GenBank (DQ159965), el peso molecular del péptido y la longitud del fragmento de interés derivado del gen *Sub* y amplificado por PCR a partir del material genético de la cepa de referencia Media Joya correspondieron a una longitud del fragmento de ADN de 303 bp, a una longitud deducida del péptido de 101 aminoácidos y una masa molecular de 15 kDa (Figura 2).

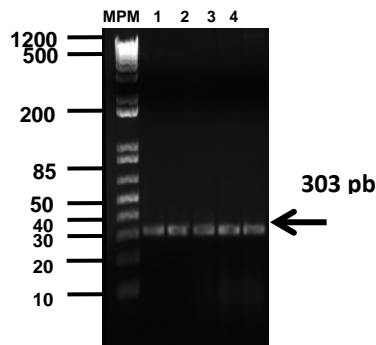


Figura 1. Amplificación por PCR de 5 colonias recombinantes para confirmar la presencia y la longitud del inserto de 303 pares de bases (pb). (Lagunes *et al.*, 2013).

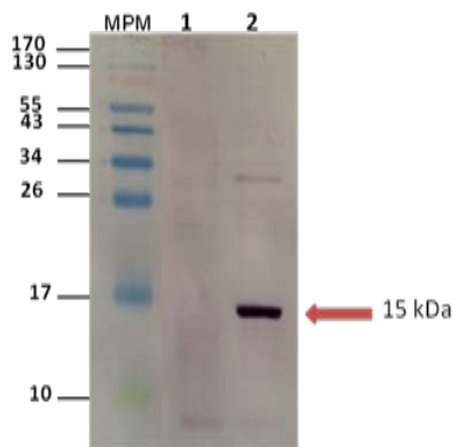


Figura 2. Western-Blot de las proteínas totales de dos colonias recombinantes en las cuales se muestra una colonia en la que no se indujo la expresión (1) y otra en la que se indujo la expresión (2), el producto de expresión tuvo una masa molecular de 15 kDa.

Los resultados obtenidos a partir de las muestras de sueros colectadas cada semana y analizadas mediante la prueba de ELISA, demuestran que el péptido posee una capacidad antigénica que concuerda con la antigenicidad predicha por el algoritmo de Kolaskar-Tongaonkar (1990); y los niveles de anticuerpos posteriores a la segunda inmunización se mantienen elevados ($p < 0.05$) hasta la semana número 11 (Figura 3).

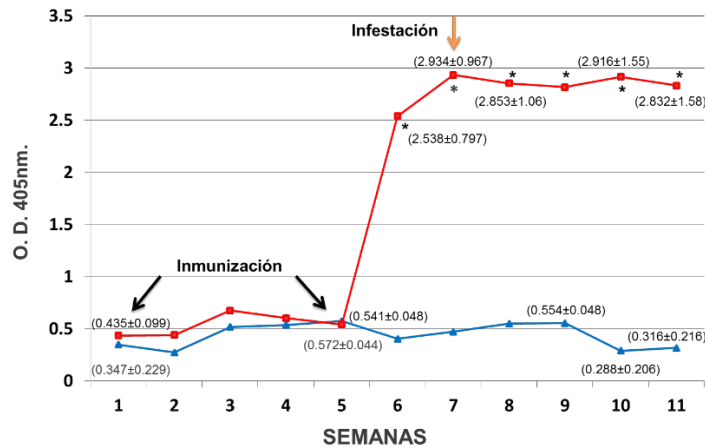


Figura 3. Cinética de producción de anticuerpos inducidos por la aplicación intramuscular del péptido recombinante, en muestras de sangre tomadas durante 11 semanas. La gráfica muestra la inmunización en la semana 1 y 4 respectivamente, así como la infestación en la semana 6.

Se observó una disminución significativa del 79% en el número de garrapatas (Cuadro 1) y la tasa de eclosión disminuyó en un 19%, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cuanto al peso de las garrapatas ni en el peso de la masa de huevos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Almazán y colaboradores (2005; 2010) donde menciona que el gen *Sub*, protege contra todas las etapas de desarrollo de la garrapata, pero la eficacia es de aproximadamente 50%. Estos resultados demuestran que el gen *Sub* es un importante candidato vacunal. Así como la proteína p64, identificada en *Rhipicephalus appendiculatus*; que disminuyó la sobrevivencia de garrapatas en cobayos infestados con ninfas y adultos de 48 a 70 % de forma respectiva (de la Fuente y Kocan, 2003). A la fecha subolesin es considerado como un candidato vacunal de importancia (de la Fuente *et al.*, 2005). En bovinos inmunizados con subolesin e infestados artificialmente con *R. microplus* para evaluar el efecto de la inmunización, reportándose, una reducción de garrapatas hembras adultas del 47%, una reducción de la oviposición del 18%, y una eficacia general de la vacunación de 60% (Merino *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Parámetros reproductivos de las garrapatas afectados por la inmunización.

| | INMUNIZADOS | NO INMUNIZADOS | REDUCCION |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|------------|
| Numero de garrapatas | 1303±221 | 273±133* | 79% |
| Peso de garrapatas (mg) | 273±42 | 302±87 | 0% |
| Masa de huevos (mg) | 126±36 | 145±50 | 0% |
| Eclosión (%) | 63±0.16 | 44±0.25* | 19% |

CONCLUSIONES

Con base en los resultados del análisis electroforético y de secuenciación obtenidos concluimos que el producto de expresión corresponde a un fragmento de 303 bp y 101 aminoácidos derivado del gen *Sub* de acuerdo con el análisis *in silico*.

El péptido es muy antigénico y capaz de producir anticuerpos, a esta capacidad se le atribuye un efecto adverso en las poblaciones de garrapatas, observándose una disminución del 79% en el número de garrapatas y un 19% de disminución en la tasa de eclosión, por lo que se sugiere que el desarrollo de esta tecnología puede ser de gran utilidad para el control integral de las infestaciones por garrapatas que afectan a la ganadería bovina y para reducir el uso de los pesticidas, en programas que sean amigables con el ambiente, que coadyuven con la producción de alimentos inocuos, que mitiguen los riesgos asociados con las prácticas tradicionales de control y disminuyan los problemas de salud pública.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Universidad Autónoma de Guerrero y por la Fundación Produce Guerrero, a través de los proyectos otorgados por ambas instituciones a la Dra. Delia Inés Domínguez García, y se realizó en el Centro Nacional de Parasitología Veterinaria del INIFAP. Se agradece al CONACyT la beca doctoral otorgada al MC Rodolfo Lagunes Quintanilla, en el programa de Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

LITERATURA CITADA

Almazán, C., Blas-Machado, U., Kocan, K. M., Yoshioka, J. H., Blouin, E. F., Mangold, A. J., de la Fuente, J. (2005). Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine* 23, 4403–4416.

Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Rosario-Cruz, R., Jongejan, F., de la Fuente, J. (2010). Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research*. 106, 471–479.

Craig, T. M. 2003. Treatment of external and internal parasites of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*(3):661-78.

de la Fuente, J., Kocan, K. M. (2003). Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Vaccine*; 4: 583-593.

de la Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E.F., Naranjo, V., Kocan, K. M. 2005. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol. Res*; 96: 137–141.

Dominguez -Garcia, D. I., Rosario-Cruz, R., Almazán-García, C., Saltijeral Oaxaca J. A., De la Fuente., J. 2010. *Boophilus microplus*: Biological and molecular aspects of acaricide resistance and their impact on animal health. *Tropical and subtropical Agroecosystem* 12 181-192.

George, J. E., Pound, J. M., Davey, R. B. 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology.*(129)2: 353-66.

Kolaskar, A. S., Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of

antigenic determinants on protein antigens. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. (276): 172-174.

Lagunes Quintanilla, R. E. Domínguez G. D. I. Quiroz, R. E. Martínez V. M. Rosario C. R. (2013). Clonación y expresión de un péptido recombinante derivado del análisis *in silico* del gen *Subolesin* de la garrapata *Boophilus microplus*. Memorias del XXXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, Guerrero. México. Pag. 928-933.

Merino, O., Antunes, S., Rosario-Cruz, R., Rodríguez, S., Domingos, A., de la Fuente, J. (2013). Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. *Vaccine*. (31): 5889-96.