



**UNL**

Universidad  
Nacional  
de Loja

## Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Ambiental

### **Pruebas tempranas para la purificación de la enzima recombinante Acetilcolinesterasa (AChE) de las especies *Varroa destructor* y *Apis mellifera*, para el desarrollo de acaricidas de precisión.**

Trabajo de Integración Curricular  
previa a la obtención del título de  
Ingeniera Ambiental

#### **AUTOR:**

Fernanda Carolina Jaramillo García.

#### **DIRECTOR:**

Blgo. Jorge Isaac Armijos-Rivera. PhD.

Loja – Ecuador

2023

## Certificación

Loja, 11 de agosto de 2022

Blgo. Jorge Isaac Armijos-Rivera. PhD.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

### CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo proceso de la elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Pruebas tempranas para la purificación de la enzima recombinante Acetilcolinesterasa (AChE) de las especies *Varroa destructor* y *Apis mellifera*, para el desarrollo de acaricidas de precisión**, previo a la obtención del título de **Ingeniera Ambiental**, de autoría de la estudiante **Fernanda Carolina Jaramillo García**, con **cédula de identidad Nro. 1105805038**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



Firmado electrónicamente por:

**JORGE ISAAC  
ARMIJOS  
RIVERA**

Blgo. Jorge Isaac Armijos-Rivera. PhD.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

## **Autoría**

Yo, **Fernanda Carolina Jaramillo García**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.



**Firma:**

**Cédula de Identidad:** 1105805038

**Fecha:** 25 de febrero de 2023

**Correo electrónico:** [fernanda.jaramillo@unl.edu.ec](mailto:fernanda.jaramillo@unl.edu.ec)

**Teléfono:** 0996678926

**Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular.**

Yo, **Fernanda Carolina Jaramillo García**, declaro ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Pruebas tempranas para la purificación de la enzima recombinante Acetilcolinesterasa (AChE) de las especies *Varroa destructor* y *Apis mellifera*, para el desarrollo de acaricidas de precisión**, como requisito para optar el título de **Ingeniería Ambiental**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los veinticinco días del mes de febrero de dos mil veintitrés.



Firma:

Autora: Fernanda Carolina Jaramillo García

Cédula: 1105805038

Dirección: Sucre y Alamor.

Correo electrónico: [fernanda.jaramillo@unl.edu.ec](mailto:fernanda.jaramillo@unl.edu.ec)

Teléfono: 0996678926

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

Director del Trabajo de Integración Curricular: Blgo. Jorge Isaac Armijos-Rivera, PhD.

## **Dedicatoria**

Como siempre y como todo, para mis padres.

*Fernanda C. Jaramillo G.*

## **Agradecimiento**

No podría dejar de agradecer a Dios por la vida que me pone día a día, la gente, los retos, los escenarios, aprender de todas las posibilidades un poco, cada vez más.

Al increíble Grupo de Investigación de Enzimología Patológica e Inhibidores Enzimáticos, que me recibieron con los brazos abiertos y están dispuestos a enseñarme todo, y además se convirtieron en mis amigos, ejemplos y personas que admiro profundamente, Jorge, Daniela, Adamary, gracias por permitirme hacer este trabajo. A Katusca por ser una directora de carrera excepcional y luchar por sus estudiantes constantemente, por todo su apoyo y conocimiento, a Aurita y Marjorie por guiarme, motivarme, conversar y sobre todo enseñarme tantas cosas fascinantes sobre las posibilidades de mi carrera. A todos los profesores con los que compartí en estos años que sin duda dejaron lecciones valiosas y sus clases nunca me fueron indiferentes.

Al equipo del Instituto de Genética Molecular de la Universidad de Pavía, Emmanuele, Carolina, Sara, Massimiliano, Graziano, que hicieron posible que mi trabajo en laboratorio sea satisfactorio y que compartieron conmigo sus conocimientos pacientemente, a todo el Lab 500 y a todas las personas que conocí en Pavía. Además de la gente que conocí en Facatativá y que estuvieron pendientes y emocionados por mi tesis desde que llegué a esa ciudad.

Finalmente a mis padres Luis y Marjory por creer en mí más que nadie en el mundo, por no cansarse de darme oportunidades, no detenerme en lo que decido hacer y ser, y por impulsarme, motivarme y apoyarme cada segundo. A mis abuelitos y tíos que contribuyeron determinantemente en la ejecución de mi tesis pero también que están pendientes de mi bienestar desde antes de nacer. A mis hermanos que soportan mis noches con las luces encendidas, que no esté con ellos todo el tiempo, que me ayudan a estudiar y que escuchan críticamente mis presentaciones para darme sus opiniones, igual, todo es por ustedes. A mis amigos incondicionales Paula, Rosita, Nohely, Dayanna y Fabricio por su presencia, amor e impulso desde que nos conocemos. Y a mis amigos de la universidad con los que compartimos noches de trabajo interminables, bromas y tiempo inigualable. Gracias a todos.

*Fernanda C. Jaramillo G.*

## Índice de contenidos

<b>Portada</b> .....	<b>i</b>
<b>Certificación</b> .....	<b>ii</b>
<b>Autoría</b> .....	<b>iii</b>
<b>Carta de autorización</b> .....	<b>iv</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>v</b>
<b>Agradecimiento</b> .....	<b>vi</b>
<b>Índice de contenidos</b> .....	<b>vii</b>
Índice de Tablas .....	ix
Índice de Figuras .....	x
Índice de Anexos .....	xiii
Abreviaturas .....	xiv
<b>1. Título</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Resumen</b> .....	<b>2</b>
2.1. Abstract.....	3
<b>3. Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>4. Marco teórico</b> .....	<b>7</b>
4.1. Características de la acetilcolinesterasa (AChE).....	8
4.2. Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) .....	11
4.2.1. Efectos de los compuestos químicos de los acaricidas en <i>Apis</i> spp. ....	14
4.2.2. Resistencia genética de <i>Varroa destructor</i> a acaricidas.....	15
4.3. Diseño y producción de proteínas recombinantes .....	16
4.3.1. Diseño de constructos genéticos para la obtención de proteínas recombinantes: selección del vector de clonación.....	17
4.3.2. Purificación de proteínas.....	22
4.4. Relación del proyecto con los Objetivos de Desarrollo Sostenible.....	22
<b>5. Metodología</b> .....	<b>23</b>
5.1. Enfoque metodológico, técnicas y tipo de diseño de investigación. ....	23
5.2. Unidad de estudio, criterios de inclusión y criterios de exclusión. ....	24
5.3. Equipos, materiales y reactivos utilizados.....	25
5.3.1. Obtención de plásmidos con las secuencias nucleotídicas <i>AmAChE</i> y <i>VdAChE</i> .....	25
5.3.2. Diseño de cebadores.....	26
5.4. Procedimiento.....	27

5.4.1.	Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.....	27
5.4.2.	Digestión con enzimas de restricción.....	30
5.4.3.	Verificación de la concentración de la proteína AmAChE y VdAChE. ....	31
5.4.4.	Expresión de la acetilcolinesterasa.....	33
5.4.5.	Pruebas de purificación de las proteínas recombinantes AmAChE y VdAChE.	34
<b>6.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>51</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>Perspectivas a futuro y recomendaciones .....</b>	<b>57</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>59</b>
<b>11.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>65</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Estructura de los sustratos afines a la AChE y BuChE .....	10
<b>Tabla 2.</b> Nombres de las secuencias del gen <i>AChE</i> usadas para la comparación en BLAST	25
<b>Tabla 3.</b> Características de los cebadores (oligonucleótidos) para su transformación .....	28
<b>Tabla 4.</b> Proporciones de reactivos y ADN molde para la PCR con la Q5 polimerasa. ....	29
<b>Tabla 5.</b> Resultado de las secuencias genómicas (aminoácidos y nucleótidos), seleccionadas para este proyecto. ....	39
<b>Tabla 6.</b> Resumen de las secuencias elegidas junto con el vector de clonación. ....	39
<b>Tabla 7.</b> Cebadores diseñados en sentido 5' → 3', para Q5 como polimerasa. ....	41
<b>Tabla 8.</b> Concentración de ADN de las muestras de <i>AmAChE</i> y <i>VdAChE</i> en cada preparación de inóculos. ....	44
<b>Tabla 9.</b> Información sobre los resultados de la transfección de <i>AmAChE</i> y <i>VdAChE</i> recombinantes, tras seis días de cultivo. ....	46

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura y mecanismo de acción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Adaptado de Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007).....	9
<b>Figura 2.</b> Reacción de hidrólisis catalizada por la acetilcolinesterasa AChE, para regular la transmisión del impulso nervioso. ....	9
<b>Figura 3.</b> Inhibidores del sitio esterásico de la AChE. a) Organofosfatos, b) Carbamatos, c) Sulfonatos. ....	12
<b>Figura 4.</b> Unión de un inhibidor enzimático al grupo hidroxilo de la serina en la AChE. Adaptado de Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007).....	12
<b>Figura 5.</b> Inhibidores del sitio aniónico de la AChE. a) Prostigmina, b) Fisostigmina, c) Edrofonio, d) Tacrina, e)BW284C51, f) N,N-dimetil-2,cloro-2, feniletilamina. ....	13
<b>Figura 6.</b> Compuestos químicos usados para combatir la varroosis. a) Amitraz, b) Cumafó, c) Fluvalinato. ....	14
<b>Figura 7.</b> Constructo genético formado por un gen objetivo y un vector de clonación. ....	17
<b>Figura 8.</b> Estructura de un vector de clonación: plásmido bacteriano (Sandoval et al. 2013) .....	18
<b>Figura 9.</b> Posibilidad de señal peptídica o porciones transmembranales en la secuencia: a) <i>AmAChE</i> , y b) <i>VdAChE</i> . ....	40
<b>Figura 10.</b> Constructo genético final de <i>AmAChE</i> recombinante. En plásmido <i>pTwits Amp High copy</i> , con enzimas de restricción Bam HI y Not1.....	42
<b>Figura 11.</b> Constructo genético final de <i>VdAChE</i> recombinante. En plásmido <i>pTwits Amp High copy</i> , con enzimas de restricción Bam HI y Not1.....	42

- Figura 12.** Resultados de la amplificación por PCR de las secuencias objetivo con los cebadores. A1: cebador Apis FW y Apis Rev1 (correspondientes a *AmAChE*); A2: cebador Apis FW y Apis Rev2 (correspondientes a *AmAChE*); y V: cebador Var Fw y Var Rev (correspondientes a *VdAChE*)..... 43
- Figura 13.** Gel de agarosa para purificar las secuencias de *AmAChE* y *VdAChE* digeridas con las enzimas BamH1 y Not1, contenidas en las bandas del gel. M: marcador, A1 y A2: *AmAChE*, V: *VdAChE*..... 44
- Figura 14.** Tamaño del corte de las enzimas añadidas al ADN del plásmido con *AmAChE* (A) y *VdAChE* (V); marcador (M). ..... 45
- Figura 15.** Tinción con Comassie blue para visualizar la expresión de las AChE recombinantes presentes luego de las transfecciones. Se aprecian cerca de los 80 kDa (círculo amarillo). M (marcador), S<sub>A</sub> (sobrenadante apis), S<sub>V</sub> (sobrenadante varroa), L<sub>CTR</sub> (lisado de control), L<sub>A</sub> (lisado de apis), L<sub>V</sub> (lisado de varroa)..... 46
- Figura 16.** Resultados del segundo Western blot con la presencia del control del sobrenadante para visualizar la presencia y expresión de las proteínas objetivo. M (marcador), S<sub>CTR</sub> (sunatante de control), S<sub>A</sub> (sobrenadante apis), S<sub>V</sub> (sobrenadante varroa), L<sub>CTR</sub> (lisado de control), L<sub>A</sub> (lisado de apis), L<sub>V</sub> (lisado de varroa), His<sub>CTR</sub> (control de proteína con un tag de histidina). ..... 47
- Figura 17.** Resultado del segundo Western blot con la presencia del control del sobrenadante para visualizar la presencia y expresión de las proteínas objetivo. M (marcador), S<sub>CTR</sub> (sunatante de control), S<sub>A</sub> (sobrenadante apis), S<sub>V</sub> (sobrenadante varroa), L<sub>CTR</sub> (lisado de control), L<sub>A</sub> (lisado de apis), L<sub>V</sub> (lisado de varroa), His<sub>CTR</sub> (control de proteína con un tag de histidina)..... 47

<b>Figura 18.</b> Resultados de la purificación por cromatografía de afinidad por lotes, con aplicación de Coomassie blue para localizar a la proteína en las eluciones. a) Gel con las muestras de AmAChE. b) Gel con las muestras de VdAChE. M (marcador), L (control inicial), FT (flow through), E <sub>1-4</sub> (eluciones), W <sub>1-2</sub> (lavados de la resina, se consideraron para esta prueba tan solo los dos primeros lavados).....	48
<b>Figura 19.</b> Resultados del Wb de la cromatografía de afinidad con perlas de níquel para VdAChE. M (marcador), L (control inicial), FT (flow through), E <sub>1-4</sub> (eluciones), W <sub>1</sub> (lavado de la resina, se consideró solo el primero), HIS <sub>CTR</sub> (control de histidina), Resina (pellet de la resina).....	49
<b>Figura 20.</b> Fracciones en las que se detectaron concentraciones de proteínas durante la cromatografía por afinidad. M (marcador), L (control inicial), FT (flow through), W (lavado), 3-14, 17, 20, 23, 26, (fracciones).....	50
<b>Figura 21.</b> Fracciones con concentraciones de proteína en el sobrenadante de varroa, con respecto a la absorbancia de luz UV .....	50
<b>Figura 22.</b> Coomassie blue de la purificación por cromatografía de intercambio iónico del sobrenadante de Varroa, con distintas concentraciones de sal (NaCl). M (marcador), L (control inicial), FT (flow through), 250mM, 500mM, 1M, 1.5M (concentraciones de NaCl) para las eluciones.....	51
<b>Figura 23.</b> Estructura del sánduche de transferencia para Western blot. ....	74

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Preparación de medios de cultivo.....	65
<b>Anexo 2.</b> Preparación de geles.....	65
<b>Anexo 3.</b> Protocolos.....	66
<b>Anexo 4.</b> Secuencias nucleotídicas utilizadas.....	71
<b>Anexo 5.</b> Técnicas para identificación de proteínas.....	73
<b>Anexo 6.</b> Certificación de traducción del Abstract.....	76

## Abreviaturas

ACh	Neurotransmisor y sustrato acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
<i>AmAChE</i>	Secuencia nucleotídica de la enzima acetilcolinesterasa de <i>Apis mellifera</i>
AmAChE	Enzima acetilcolinesterasa de <i>Apis mellifera</i>
OPs	Compuestos organofosforados
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS- PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNC	Sistema nervioso central
SP	Señal peptídica
TMS	Segmento transmembranal
<i>VdAChE</i>	Secuencia nucleotídica de la enzima acetilcolinesterasa de <i>Varroa destructor</i>
VdAChE	Enzima acetilcolinesterasa de <i>Varroa destructor</i>

## **1. Título**

**Pruebas tempranas para la purificación de la enzima recombinante Acetilcolinesterasa (AChE) de las especies *Varroa destructor* y *Apis mellifera*, para el desarrollo de acaricidas de precisión**

## 2. Resumen

La varroosis es la enfermedad de abejas melíferas más perjudicial y de mayor distribución geográfica en el mundo. La forma de controlarla, es con la aplicación en colmena de medicamentos como plaguicidas organofosforados. Sin embargo, el ácaro *Varroa destructor* se ha adaptado a varios de los componentes químicos de estos acaricidas tradicionales que tienen por objetivo inhibir la acción de enzimas relacionadas con procesos neurotransmisores, representando incrementos en las dosis de medicamentos que perjudican a distintas escalas, la supervivencia de las abejas y otros organismos que poseen las mismas enzimas. Ante esta resistencia se ha planteado la creación o re-diseño de inhibidores enzimáticos de la proteína Acetilcolinesterasa-AChE, para desarrollar acaricidas específicos y de alta precisión biológica contra la varroa.

Como parte inicial del proyecto, se plantea a través de este trabajo, el diseño, expresión y purificación de la AChE recombinante de *Apis mellifera* (AmAChE) y de *Varroa destructor* (VdAChE), para ello se amplificaron mediante PCR las secuencias nucleotídicas codificantes de la enzima de ambas especies en el plásmido de clonación pTwist Amp High copy. La expresión de la proteína más una cola de poli histidina, se consiguió transfecando células HEK 293-F con cada constructo. Posteriormente, los sobrenadantes con las proteínas se sometieron a 2 tipos de purificación: 1) Cromatografía por afinidad de un metal inmovilizado (IMAC) por lotes y con el sistema AKTA Start y 2) Cromatografía por intercambio iónico. La AmAChE posiblemente perdió su cola de poli histidina previo a los procesos de purificación, dificultando la IMAC, pero su punto isoelectrico (PI) facilita futuras purificaciones por intercambio iónico. La VdAChE se purificó por IMAC e intercambio iónico y el grado de pureza obtenido permite continuar con la fase de ensayos de actividad enzimática, cambios en los protocolos y pruebas de inhibición enzimática específica.

**Palabras clave:** Plásmido, proteína recombinante, cromatografía, poli-histidina.

## 2.1. Abstract

Varroosis is the most damaging and geographically widespread disease of honey bees in the world. The way to control it, by decree in Europe, is with the application in the hive of drugs such as organophosphorus pesticides. However, the *Varroa destructor* mite has adapted to several of the chemical components of these traditional acaricides that aim to inhibit the action of enzymes related to neurotransmitter processes, representing increases in the doses of drugs that harm at different scales, the survival of bees and other organisms that have the same enzymes. In view of this resistance, the creation or re-design of enzymatic inhibitors of the Acetylcholinesterase-AChE protein has been proposed in order to develop specific acaricides with high biological precision against varroa.

As an initial part of the project, the design, expression and purification of recombinant AChE from *Apis mellifera* (AmAChE) and *Varroa destructor* (VdAChE) was proposed through this work, for which the nucleotide sequences coding for the enzyme of both species were amplified by PCR in the cloning plasmid pTwist Amp High copy. Expression of the protein plus a poly histidine tail was achieved by transfecting HEK 293-F cells with each construct. Subsequently, supernatants with the proteins were subjected to 2 types of purification: 1) Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) batch and AKTA Start system and 2) Ion exchange chromatography. AmAChE possibly lost its poly histidine tail prior to the purification processes, hindering IMAC, but its isoelectric point (IP) facilitates future ion exchange purifications. VdAChE was purified by IMAC and ion exchange and the degree of purity obtained allows us to continue with the enzyme activity assay phase, changes in protocols and specific enzyme inhibition tests.

**Keywords:** Acetylcholinesterase, nucleotide sequence, construct, purification.

### 3. Introducción

Uno de los servicios ecosistémicos más importantes para mantener el equilibrio ecológico de los hábitats y garantizar el bienestar de las personas a través de la soberanía alimentaria, es la polinización (Sosenski & Domínguez, 2018). Esta función se encarga de la reproducción de aproximadamente el 80% de las plantas silvestres y del 75% de los cultivos más consumidos en el planeta (Kearns et al., 1998; Klein et al., 2007; National Research Council, 2007), pudiendo alcanzar hasta un 100% de pérdidas de producción cuando no hay propagadores de polen (Ghazoul, 2005). Por ende, la polinización, afecta directamente a la supervivencia y adaptación de plantas, animales y personas (Sharma & Abrol, 2014), y su costo mundial se estima en alrededor de 153.000 millones de euros al año (Gallai et al., 2008).

Debido a su dinámica poblacional y al rol que cumplen en este servicio ecosistémico, las abejas melíferas (*Apis mellifera* Linneo, 1758) son las encargadas de la producción de 1.6 millones de toneladas de miel al año (FAO, 2018) y junto con los abejorros (*Bombus* spp. Fabricius, 1776) han sido declarados como los polinizadores por excelencia a nivel mundial (Rader et al., 2016). Sin embargo, las presiones ambientales como pérdida de hábitat, cambio climático y contaminación, así como la introducción de estos polinizadores no nativos en occidente y el empleo masivo de pesticidas, han generado la aparición de enfermedades y plagas (Sosenski & Domínguez, 2018) y ponen en riesgo a las estructuras poblacionales de estos polinizadores (González-Varo et al., 2013). Por ejemplo, el ácaro *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000) es un parásito introducido desde África hacia todo el hemisferio norte a través de abejas no nativas, que provoca la enfermedad de la varroosis y genera disminuciones letales de la población de *A. mellifera*, y con ello cuantiosas pérdidas económicas (National Research Council et al., 2007; Stout & Morales, 2009).

La varroosis es considerada como la enfermedad de abejas melíferas más perjudicial y de mayor distribución geográfica en el mundo (MAPA, 2019), que ha incrementado su letalidad como consecuencia del cambio climático (Sosenski & Domínguez, 2018) y al día de hoy es considerada como endémica en Ecuador (MAGAP & AGROCALIDAD, 2020). La varroosis consiste en la acariosis externa por parte de *V. destructor* a las abejas adultas y a las crías, provocando daños físicos al alimentarse de su hemolinfa y dejándolas vulnerables y

predispuestas a virus y bacterias, lo que acaba con la colonia entera (Sosenski & Domínguez, 2018), e incluso pueden llegar a afectar a más especies del género *Apis* de vida silvestre y a otros polinizadores comerciales y naturales (Gisder & Generch, 2017).

La manera tradicional de controlar la enfermedad en la Unión Europea, es con la aplicación de medicamentos veterinarios como acaricidas (MAPA, 2019), mientras que en Ecuador a pequeña escala se emplea la Técnica de Insecto Estéril (TIE) para discontinuar la descendencia de las plagas y a gran escala se usan productos químicos sistemáticos o de contacto, como el Amitraz y el ácido oxálico (MAGAP & AGROCALIDAD, 2020), pero el inconveniente con estos métodos es la adaptación de la varroa a varios de estos compuestos químicos y por ende los incrementos de las dosis que perjudican en distintas escalas a las abejas y a otros organismos (Sosenski & Domínguez, 2018). Ante esta resistencia es fundamental el planteamiento y desarrollo de estrategias enfocadas en el control del parásito, sin sobrepasar el límite máximo permisible de ninguna sustancia química de la medicina alopática tradicional, para evitar la contaminación de los recursos naturales y las especies beneficiosas involucradas.

La varroosis es una enfermedad que no puede ser erradicada hasta el momento (MAPA, 2019), pero investigaciones recientes impulsan a la creación de remedios inofensivos para las abejas, sus productos y el ambiente (Sosenski & Domínguez, 2018), pero con alta eficiencia en la disminución del ácaro (MAPA, 2019). Entre ellos, los trabajos enfocados en el desarrollo de inhibidores enzimáticos, representan una de las mejores alternativas para combatir la enfermedad de forma específica (Dmitryjuk et al., 2014). Pues se sabe que los pesticidas como los organofosforados (OPs) contienen compuestos que inhiben la acción de varias enzimas vitales, entre ellas a la acetilcolinesterasa (AChE), enzima encargada de descomponer a la acetilcolina (ACh) que tiene la función de transportar químicamente las señales neuronales al músculo esquelético y mantener el correcto funcionamiento del sistema nervioso de distintos organismos unicelulares, vertebrados e invertebrados (Fishel, 2018).

Sin embargo, la exposición continua a los pesticidas, conlleva al debilitamiento y posterior envenenamiento no sólo de los ácaros y demás plagas sino también de las abejas y otros polinizadores, debido a la reducción de los niveles de acetilcolina en sus cuerpos (Sánchez-

Chávez & Salceda, 2008). Estos antecedentes dan la pauta para la creación de pesticidas o medicamentos con inhibidores enzimáticos específicos para la acetilcolinesterasa de *Varroa destructor* (proteína VdAChE), evitando los daños sobre la acetilcolinesterasa de *Apis mellifera* (proteína AmAChE). Para lograr esto, se parte de la premisa de que en el gen estructural que codifica a la AChE de cada organismo, hay mutaciones puntuales que provocan enzimas AChE modificadas que resisten a la aplicación de OPs (Rodríguez-Vivas, 2012), es decir hay un sitio clave para la resistencia a inhibidores enzimáticos generalizados, que evitaría los daños que estos provocan al sistema nervioso de los organismos que producen AChE (Fournier, 1994).

El sitio clave de resistencia es distinto en cada especie, lo que sumado a la falta de una secuencia nucleotídica definitiva del gen de la acetilcolinesterasa de *V. destructor* (VdAChE) (Fournier, 1994; Rodríguez-Vivas, 2012), han limitado las investigaciones. Hasta el momento, los estudios más relevantes y completos sobre las plagas de las abejas melíferas y las propuestas de tratamientos eficaces se han priorizado en Europa y América del Norte (Sosenski & Domínguez, 2018), pese a que la pérdida de polinizadores afecta mayormente a las regiones en vías de desarrollo como Latinoamérica (Aizen et al., 2008) debido a la dependencia que aún mantiene con procesos tradicionales de polinización con abejas y al uso indiscriminado de acaricidas comunes (Klein et al., 2007).

Los resultados expuestos en este trabajo, se basan en el cumplimiento del objetivo general del proyecto de investigación del Grupo de Enzimología e Inhibidores Enzimáticos de la Universidad Nacional de Loja, que es la obtención de la secuencia nucleotídica adecuada de *AmAChE* y *VdAChE* a partir sus genomas, para así:

- Identificar los genes ortólogos entre la secuencia de la acetilcolinesterasa humana y las secuencias nucleotídicas de *Apis mellifera* y de *Varroa destructor*.
- Insertar el gen *AmAChE* y el gen *VdAChE* en un vector de clonación competente.
- Realizar pruebas de expresión de las proteínas *AmAChE* y *VdAChE* recombinantes (constructos) en células humanas.

Los hallazgos generados en esta primera parte del proyecto de investigación corresponden a datos de ciencia base para la obtención de dos proteínas recombinantes: *AmAChE* y *VdAChE*,

a partir de sus secuencias nucleotídicas, y su expresión a partir de células humanas, para aplicar protocolos de purificación de proteínas, que abren las puertas para la siguiente etapa del proyecto concerniente a la evaluación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes purificadas y continuar con pruebas que involucran inhibidores enzimáticos específicos que afecten directamente a la actividad de la enzima VdAChE (Rodríguez-Vivas, 2012) y consecuentemente la muerte del ácaro; y que no modifique el funcionamiento normal de la AmAChE de las abejas melíferas. Utilizar herramientas biotecnológicas para proponer soluciones sostenibles ambiental, social y económicamente, es la alternativa más eficiente para enfrentar a la varroosis y para mejorar los métodos tradicionales (MAPA, 2019) que en muchos casos son nocivos para el medio ambiente, y reemplazarlos por opciones biológicamente específicas, que contribuyan a las estrategias de conservación de la biodiversidad, a mejorar las prácticas agrícolas y a defender la soberanía alimentaria.

#### **4. Marco teórico**

Las abejas son los insectos encargados de mantener a la biodiversidad y equilibrio ecológico en la mayoría de ecosistemas (Sharma & Abrol, 2014), debido a la interacción evolutiva que han desarrollado con las plantas a través del tiempo y que les ha dotado la capacidad de esparcir el polen de las flores y propiciar su fecundación (Klein et al, 2007; Medellín, 2012), asegurando las suficientes plantas para la producción de oxígeno y retención de carbono y garantizando la existencia de los cultivos necesarios para la dieta humana y bienes forestales para materia prima (Medellín, 2012). También generan sus propios productos con importancia comercial, como la miel, jalea, polen, ceras y propóleos (MAPA, 2019). Todos estos bienes son conocidos como servicios ecosistémicos, cuya función es dotar a los humanos de productos indispensables para su supervivencia de forma gratuita (Pérez, 2005).

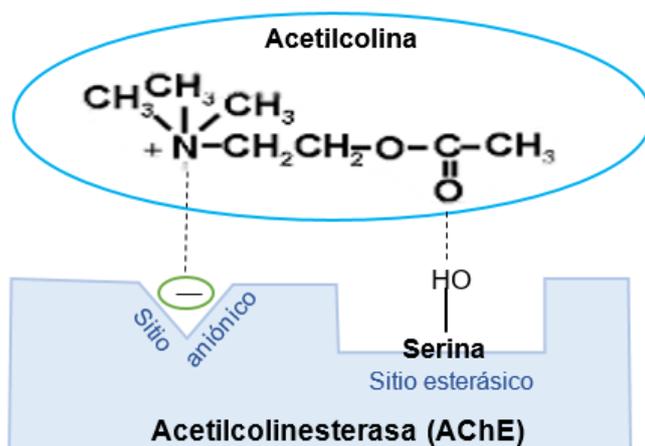
Pero la reducción de las poblaciones de abejas alrededor del mundo es uno de los problemas de apicultura, agricultura y de la biodiversidad más urgentes de los últimos 50 años (MAPA, 2019). Y es atribuido, entre otras causas, a la introducción de especies invasoras, al cambio climático y a la aplicación de pesticidas (Sosenski & Domínguez, 2018), que las hace más propensas a episodios de estrés y vulnerables ante enfermedades y plagas (Stout & Morales,

2009) como la varroosis, que no solo atenta contra las *Apis* spp. comerciales, sino también sobre las *Apis* spp. de vida silvestre que se encargan de la polinización de espacios naturales (Pérez, 2005; MAPA, 2019). La varroosis producida por el ácaro *Varroa destructor*, detiene el crecimiento normal de las larvas y debilita a las abejas adultas al alimentarse de su sangre y volverlas vulnerables ante patógenos (Sosenski & Domínguez, 2018), pudiendo causar el colapso de toda la colonia en menos de un año (Pérez, 2005).

La propuesta de esta investigación, es la creación de una solución ambientalmente sostenible para el tratamiento de la varroa, por medio de la obtención de proteínas recombinantes de la enzima AmAChE y VdAChE para el diseño de acaricidas de precisión que contengan inhibidores enzimáticos específicos y que actúen sobre los sitios clave de resistencia en el genoma de *V. destructor* (Dmitryjuk et al., 2014), y que no afecte a las colonias de *Apis mellifera*, sus productos o funciones (Jack et al; 2021). Ya que los remedios que actualmente son aplicados, no solo han dejado de ser letales para la varroa, debido al desarrollo de genes resistentes a los pesticidas y acaricidas organofosforados (OPs) (Fishel, 2018; MAPA, 2019), sino que también, su aplicación constante tiene como consecuencia el deterioro y contaminación ambiental por su alta toxicidad y baja estabilidad (del Puerto Rodríguez et al., 2014), además de la pérdida de especies que incluyen a otros polinizadores, vertebrados y plantas (Rodríguez-Vivas, 2012).

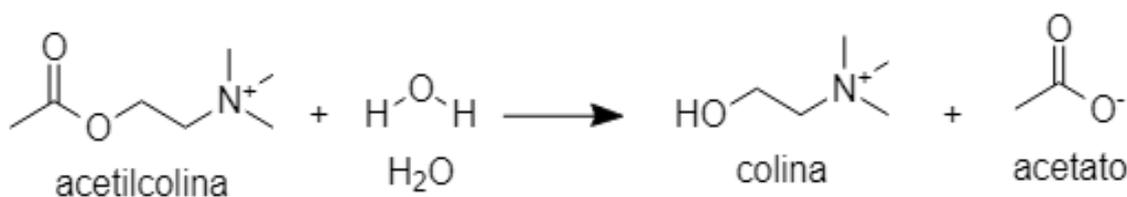
#### 4.1. Características de la acetilcolinesterasa (AChE).

La acetilcolinesterasa pertenece a la familia de las enzimas hidrolasas, específicamente a las colinesterasas (Flores, 1998), donde se agrupa con las proteasas de serina (Figura 1) y cuya función es encargarse del funcionamiento adecuado del sistema nervioso central (SNC) de una amplia lista de organismos, desde la etapa de formación y crecimiento embrionario hasta la muerte, a través de la hidrólisis de los ésteres de colina (Flores, 1998; Fishel, 2018; Sánchez-Chávez & Salceda, 2018), aunque se conoce que en cada organismo hay distintos niveles óptimos de presencia de la enzima y pueden variar incluso entre individuos de una misma especie (Fishel, 2018).



**Figura 1.** Estructura y mecanismo de acción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). *Adaptado de Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007).*

La importancia de la AChE, estudiada desde 1914 (Flores, 1998), corresponde al papel que juega en la terminación del mensaje químico del neurotransmisor acetilcolina (ACh) encargado de la dirección de las señales nerviosas provenientes del SNC que se dirigen hacia al sistema muscular, glándulas y ganglios, así como a la sinapsis de algunos nervios, por medio de una hidrólisis que bio-transforma a la ACh en ácido acético y colina (Figura 2) regulando así la transmisión del impulso nervioso (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008). Cuando la enzima AChE es inhibida, el SNC deja de funcionar, por lo que hay síntomas instantáneos y fáciles de apreciar de deficiencias del sistema nervioso considerables, además de producir envenenamientos que van de leves a agudos e irreversibles (Fishel, 2018).



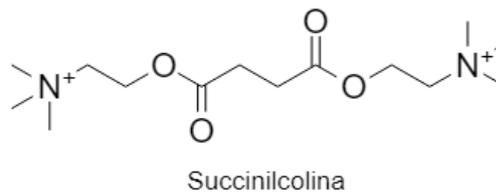
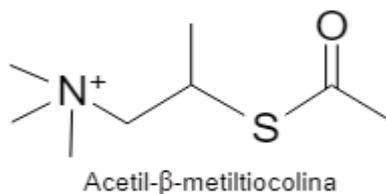
**Figura 2.** Reacción de hidrólisis catalizada por la acetilcolinesterasa AChE, para regular la transmisión del impulso nervioso.

La inhibición de las colinesterasas bajo concentraciones de la fisostigmina (conocido también como eserina) y otros organofosforados (OPs) (Dale, 1914; López-Durán et al, 2018), ha hecho que esta familia de enzimas haya sido ampliamente estudiada a lo largo de las últimas

décadas, lo que ha logrado determinar la existencia de dos tipos de enzimas colinesterasas en los vertebrados: la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE), las dos enzimas están determinadas por dos genes distintos (Flores, 1998; Soreq, 2001), pero ambas cuentan con polipéptidos altamente conservados en sus secuencias, derivadas posiblemente de un ancestro en común en la línea de los gnatostomados, que tuvo un proceso de duplicación-mutación de un gen de las colinesterasas (Flores, 1998). Generalmente en los vertebrados, las enzimas producidas para reacciones nerviosas en eritrocitos, placenta, timo y en el tejido muscular, nervioso o esquelético y con alta afinidad hacia los sustratos de ACh y sus tioanálogos (Tabla 1), son nombradas como enzimas **acetilcolinesterasas** (AChE) (Soreq et al, 1900; Sánchez-Chávez & Salceda, 2008). Mientras que las enzimas con actividad en el suero sanguíneo, páncreas, hígado o corazón y cuya preferencia son los sustratos sintéticos butirilcolina (BuCh), pro-pionilcolina o sus tioanálogos (Tabla 1), son denominadas enzimas **colinesterasas** (Soreq et al, 1990; Flores, 1998). Y de acuerdo a Shapira et al. (2001), los insectos comparten elementos moleculares generales con los vertebrados y un ejemplo claro es la presencia y cantidad de ACh y AChE, que condiciona el desarrollo conductual de las abejas melíferas, encargándose del aprendizaje en el cerebro.

**Tabla 1.** Estructura de los sustratos afines a la AChE y BuChE.

<i>Sustratos afines a la acetilcolinesterasa</i>	<i>Sustratos afines a la colinesterasa</i>
<p>Acetilcolina</p>	<p>Butirilcolina</p>
<p>Acetiltiocolina</p>	<p>Butiriltiocolina</p>
<p>Acetil-β-metilcolina</p>	<p>Propionilcolina</p>

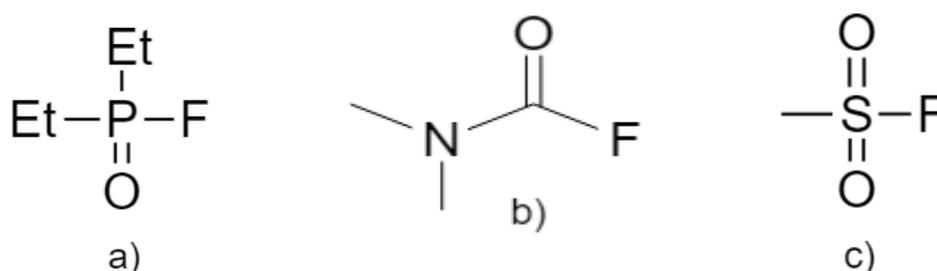


Pese a que el mecanismo de acción de ambas enzimas es distinto en cada organismo, la estructura molecular generada a partir de los estudios en *Electrophorus electricus* (Linneo, 1766) es aceptada para todos los tejidos y especies estudiadas, pues la AChE se establece en los músculos y en el sistema nervioso, mientras que la BuChE se encuentra comúnmente en hígado u otros tejidos (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008). A diferencia de los vertebrados, el gen *AChE*, es el único del tipo codificador para enzimas colinesterasas, presente en el cerebro de las abejas melíferas (Shapira et al., 2001) y es el encargado de determinar todas las formas moleculares posibles de la enzima acetilcolinesterasa en este grupo (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008), aunque de manera general su proceso catalítico requiere de la acilación y desacilación en un residuo de serina en el centro activo de la AChE, este centro puede estar rodeado de hasta 14 residuos de aminoácidos aromáticos que sirven para conducir al substrato hacia el centro activo y cuyas estructuras son complementarias (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008). Existen dos posibles sitios activos: el primero correspondiente al subsitio aniónico (PAS), que atrae como substrato, a la parte del grupo amonio de la acetilcolina y a los grupos metilo del nitrógeno cuaternario de la colina, por fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas, respectivamente. El otro sitio activo es el subsitio esterásico, que se encarga de la ruptura hidrolítica del enlace éster de la acetilcolina (Rosenberry, 1975; Dvir et al., 2010; Sánchez-Chávez & Chávez, 2008) (Figura 1).

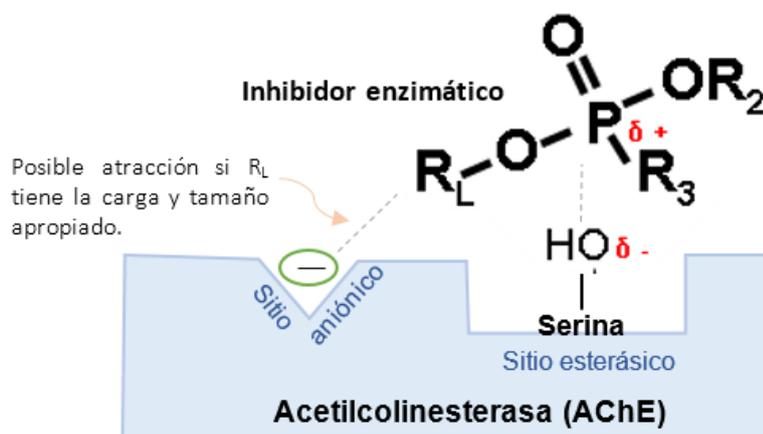
#### 4.2. Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE)

Los inhibidores enzimáticos son sustancias o compuestos químicos, que interactúan con los sitios activos de una determinada enzima, bloqueando su funcionamiento normal (Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR, 2007). Los inhibidores de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE) pueden dirigirse hacia cualquiera de los dos sitios

activos de la enzima, dependiendo de su naturaleza y estructura, y unirse al sitio esterásico o al sitio aniónico de la AChE (Vidal, 1981) originalmente destinados para que el neurotransmisor ACh sea hidrolizado por la enzima (Vidal, 1981; ATSDR, 2007). Los inhibidores que se unen al centro del éster o al sitio estérico, suelen ser moléculas organofosfatos, carbamatos o sulfonatos (Figura 3) y lo hacen gracias a que confieren un fosforilo, carbamilo o sulfonilo con cargas electropositivas (Vidal, 1981), a la molécula de hidroxilo de la serina que está cargada negativamente (Figura 4) (ATSDR, 2007). Los organofosfatos son más tóxicos, tienen mayor duración de acción y son los asociados a intoxicación de CNS que los carbamatos y los sulfonatos (Sobhani et al. 2000)



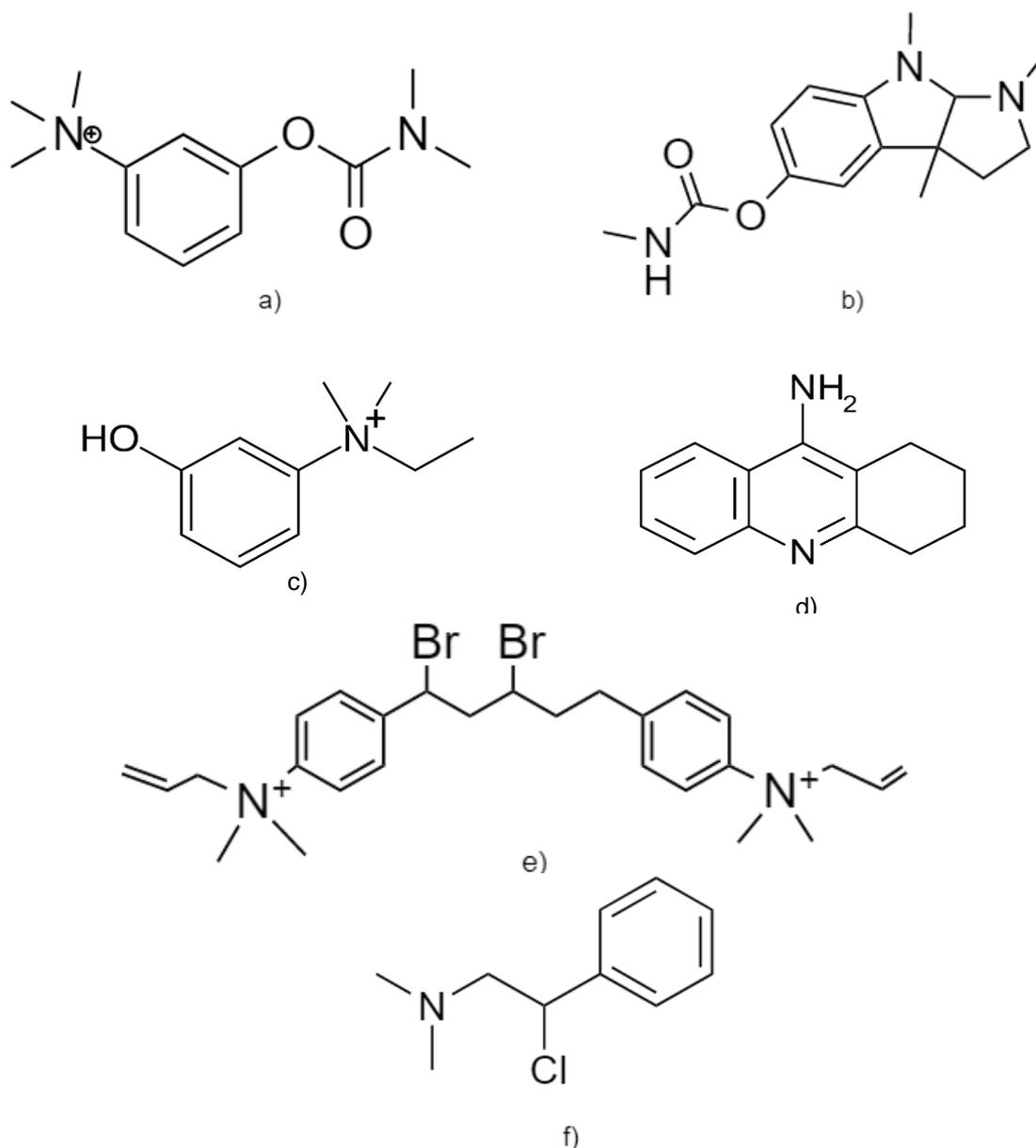
**Figura 3.** Inhibidores del sitio esterásico de la AChE. a) Organofosfatos, b) Carbamatos, c) Sulfonatos.



**Figura 4.** Unión de un inhibidor enzimático al grupo hidroxilo de la serina en la AChE. Adaptado de *Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007)*.

En cambio, los inhibidores que se unen al sitio aniónico (Figura 5), lo hacen gracias a la presencia de iones amonio en su estructura, como el amonio terciario y cuaternario presentes en compuestos como el BW284C51 (1,5-bis(4-aldimetilamoniofenil) pentano-3-1 dibromuro) (Benabent, 2015), así como a la presencia de cadenas hidrocarbonadas y a los anillos aromáticos

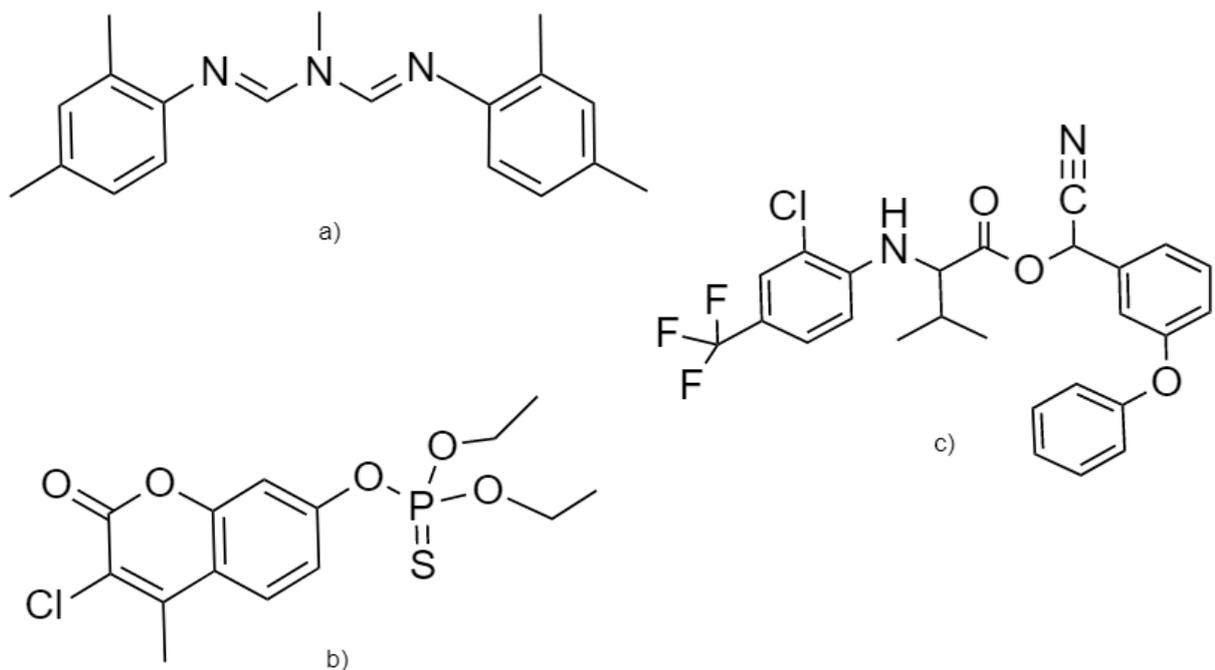
que suelen presentar las moléculas como la prostigmina y la fisostigmina, que generan enlaces estables y fuertes con el sitio aniónico de la AChE (Vidal, 1981), bloqueando su unión normal con el sustrato ACh y provocando acumulaciones peligrosas de este neurotransmisor (ACh) en los espacios parasinápticos del SNC, lo que se traduce en hiperactividad colinérgica por la intoxicación con ACh (ATSDR, 2007).



**Figura 5.** Inhibidores del sitio aniónico de la AChE. a) Prostigmina, b) Fisostigmina, c) Edrofonio, d) Tacrina, e) BW284C51, f) N,N-dimetil-2,cloro-2, feniletilamina.

#### 4.2.1. Efectos de los compuestos químicos de los acaricidas en *Apis* spp.

Los acaricidas son compuestos organofosforados (OPs), carbamatados, o de clase amidina, empleados para combatir la varroosis, como el amitraz, el cumafó y el fluvalinato (Figura 6) en Ecuador (Mitton, 2019; MAGAP & AGROCALIDAD, 2020), pero que tienen consecuencias en abejas melíferas, provocando desde pequeños problemas fisiológicos, neurológicos y metabólicos individuales hasta alterar toda la dinámica del grupo y su ciclo de vida (Johnson, 2015; Fishel, 2018). Además, la acumulación de concentraciones de pesticidas en las colmenas representa la inevitable contaminación de los productos apícolas, que perjudican la comercialización de los mismos, pero también son una fuente de exposición latente de contaminantes dentro de las colmenas, con consecuencias instantáneas y largo plazo, ya que las aplicaciones no solo se hacen de un tipo de pesticida, pues se debe evitar la resistencia de *Varroa*, entonces se rotan los medicamentos y la combinación resulta tóxica para las abejas (Mitton, 2019). Desde dosis agudas en intervalos de tiempo espaciados, hasta concentraciones a dosis elevadas, resultan en efectos crónicos a nivel de individuo y de colmena (Johnson et al., 2010).



**Figura 6.** Compuestos químicos usados para combatir la varroosis. a) Amitraz, b) Cumafó, c) Fluvalinato.

Los cumafós y el tau-fluvalinato tienen efectos negativos en la memoria, retención de señales, movimiento y orientación en las castas de abejas adultas (Teeters et al., 2012), también provocan disfunciones en sus ciclos biológicos y en sus rutinas (Mitton, 2019). Mientras que en el estado larvario, son capaces de detener y variar su crecimiento (Zhu et al., 2014). Por otro lado, estos pesticidas pueden disminuir la capacidad reproductiva de los zánganos al debilitarlos y con el tiempo las crías se reducen y hay un declive de población en las colmenas (Burley et al., 2008); en cambio a las reinas las afecta en su peso adulto, su capacidad para reservar grandes cantidades de esperma, la cantidad de óvulos que producen en el tiempo y termina alterando a los ovarios (Haarmann et al., 2002; Mitton, 2019).

#### 4.2.2. Resistencia genética de *Varroa destructor* a acaricidas.

La enfermedad de la varroosis, producida por *V. destructor*, provoca pérdidas millonarias al sector apícola y agrícola alrededor del mundo. Para controlarla, en varios países productores de miel, incluido Ecuador se aplica como mínimo un tratamiento sistemático por año a las colmenas de *A. mellifera* (MAPA, 2019; MAGAP & AGROCALIDAD, 2020). Y aunque los tratamientos orgánicos son bien aceptados entre los apicultores, les resulta más ventajoso la aplicación de sustancias químicas debido a su bajo costo, fácil aplicación y acumulación dentro de las colmenas tras varias dosis, asegurando la eliminación del ácaro a lo largo del año (MAPA, 2019; Mitton, 2019). Entre los principales medicamentos para combatir la varroosis, están las amidinas (amitraz) y piretroides (flumetrina, tau-fluvalinato) (Mitton, 2019). Pero diversas investigaciones revelan que la varroa se ha adaptado a las sustancias xenobióticas (Floris et al., 2001; Thompson et al., 2002), lo que se evidencia a través de su resistencia a compuestos organofosforados (cumafós) (Rodríguez-Dehaibes et al., 2005), inhibidores irreversibles de la enzima AChE y cuyos efectos en insectos, aves y otros vertebrados (Fishel, 2018), van desde pérdida de la motricidad y afecciones en el sistema nervios hasta envenenamiento (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008).

Esta resistencia se atribuye a una alteración específica en el gen *VdAChE*, cuyo resultado es la emisión de enzimas perturbadas capaces de soportar las concentraciones de pesticidas organofosforados. En *Varroa* este gen es único y en sus nucleótidos se encuentra el sitio clave que le otorga la capacidad de inhibir las acciones enzimáticas de los pesticidas y evitar sus contraindicaciones (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008; Fishel, 2018), provocando que las

dosis de acaricidas aumenten cada año. En otras especies de insectos, ácaros y arácnidos, las mutaciones genéticas que afectan a *AChE* se dan cuando se reemplaza la fenilalanina 331 con triptófano en el genoma de la enzima, lo que la hace invulnerable a los OPs (Kwon et al., 2010). Pero en *V. destructor*, no se ha identificado el mecanismo o la mutación específica para la resistencia y más bien se sugiere una combinación de procesos y enzimas para que se den adaptaciones (Sammataro et al., 2005).

#### 4.3. Diseño y producción de proteínas recombinantes

Una proteína recombinante, es el resultado de la expresión de una secuencia de ADN específica o de un gen de proteína clonado en una línea celular distinta (vector, plásmido) a su especie celular original y que tras este procedimiento puede replicarse en células vivas y producir la proteína deseada (Bernabeu, 2015; Cajachagua, 2018). La obtención de una proteína recombinante se logra insertando el gen en un vector por medio de enzimas de restricción específicas, establecidas la creación de constructos genéticos (Cajachagua, 2018).

Las proteínas recombinantes son ampliamente usadas en medicina, para la elaboración de vacunas y para el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades (Lara, 2011). Ya que obtener proteínas de manera natural es un proceso complicado, que se facilita a través de técnicas de biotecnología e ingeniería genética que introducen moléculas de ADN en un plásmido, para manejarlas de manera sencilla, y en este caso obtener proteínas específicas y puras (Rueda, 2013; Bernabeu, 2015). Para el diseño y producción de proteínas recombinantes, existen algunos protocolos básicos que sirven como guía y que se modifican de acuerdo a la proteína buscada, a los plásmidos de clonación y expresión y al método de purificación y análisis de actividad proteica que se usarán para verificar el éxito de la producción de la proteína (Bernabeu, 2015).

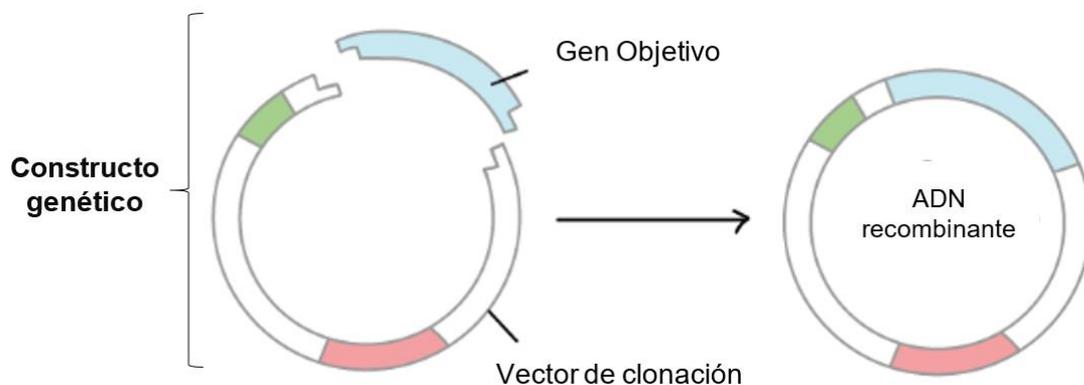
La fabricación de proteínas recombinantes, comienza con la selección del gen o secuencia nucleotídica problema de la proteína que se desea recrear, continúa con el diseño del constructo a través de la selección adecuada de un plásmido o vector de clonación (generalmente de origen bacteriano), la elaboración de los cebadores (*primers*) y la elección de las enzimas de restricción para la digestión (Bernabeu, 2015). Cuando las células hospederas han clonado y expresado adecuadamente la proteína recombinante se llevan a cabo

los ensayos de purificación y actividad enzimática para evaluar el éxito de la fabricación del ADN recombinante (Sandoval et al., 2013).

#### 4.3.1. *Diseño de constructos genéticos para la obtención de proteínas recombinantes: selección del vector de clonación.*

- **Constructo genético**

Los constructos genéticos o *gene construct*, son genes sintéticos clonados y diseñados en laboratorio a partir de la unión entre una secuencia nucleotídica problema o secuencia nucleotídica guía de un gen específico que sirve como base del diseño, y un vector de clonación (Figura 7) que se usa para transfectar o transformar a las células hospedadoras (Claros & González, 2022). Los constructos se usan con el objetivo de deleccionar un gen, agregarlo o expresar solublemente proteínas recombinantes (Beker et al., 2016; Cajachagua, 2018) gracias a que célula hospedadora viva que contiene o recibe adecuadamente al vector combinado con el ADN extraño. Los vectores pueden ser de clonación o de expresión (Claros & González, 2022).



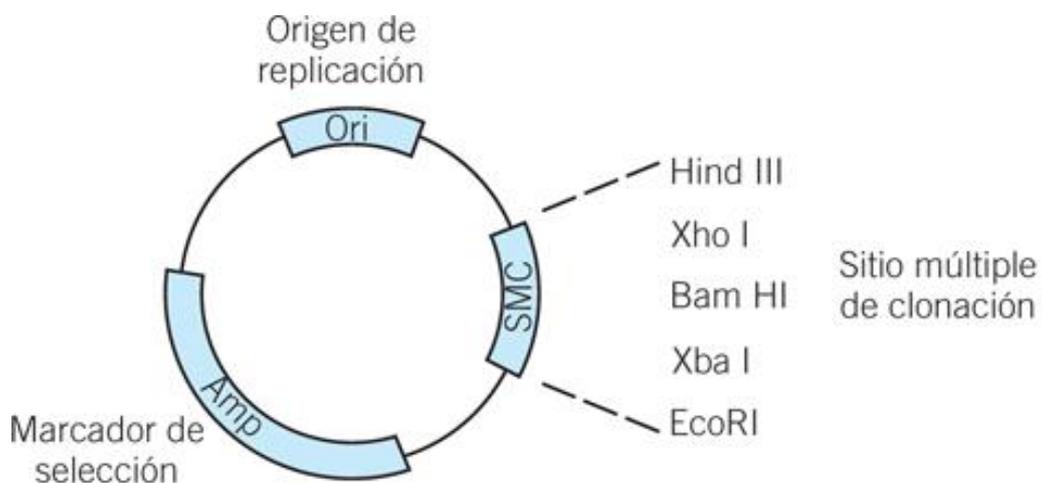
**Figura 7.** Constructo genético formado por un gen objetivo y un vector de clonación.

- **Vectores de clonación: plásmidos bacterianos**

Los vectores de clonación son herramientas esenciales en el campo de la biología molecular para la clonación de ADN. La clonación es el proceso que permite obtener múltiples copias exactas de una secuencia específica de ADN o de un gen (Sandoval et al., 2013). Este procedimiento se logra insertando un fragmento de ADN (perteneciente a cualquier

organismo) que se conoce como **inserto**, dentro de otra molécula de ADN de doble cadena, que se conoce como **vector de clonación** y que es capaz de incorporar secuencias nucleotídicas exógenas (Serrano, 2014). El vector de clonación forma parte de una célula hospedera pero tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma e independiente de esta. Como consecuencia de este proceso se producen millones de copias de la molécula que contiene tanto el ADN del inserto como el ADN del vector, y se denominada “molécula recombinante” o “clona molecular” (Sandoval et al., 2013).

Los vectores de clonación pueden ser plásmidos, fagos, fagémidos, cósmidos y cromosomas artificiales provenientes de bacterias o levaduras (Sandoval et al., 2013). Y constan de 3 partes importantes que permiten que los procesos de replicación se lleven a cabo (Reece et al. 2011), el primero es el origen de replicación (ORI), el sitio múltiple de clonación (SMC) y un marcador de selección (Figura 8).



**Figura 8.** Estructura de un vector de clonación: plásmido bacteriano (Sandoval et al., 2013).

El origen de replicación del vector, es la secuencia de ADN encargada de señalar un sitio específico para que las proteínas de replicación reconozcan los nucleótidos e inicien con el proceso de replicación (ORI). Es característico de los plásmidos bacterianos solo posean un ORI y replica el ADN en un solo sentido. El sitio de múltiple clonación (SMC) es una secuencia nucleotídica específica, capaz de ser reconocida por diferentes enzimas de restricción, que se encargan de insertar el fragmento de ADN del gen de interés; los SMC más

comunes en los vectores de clonación son para las enzimas representadas en la Figura 8. Finalmente, el marcador de selección es un gen que le otorga al vector la peculiaridad de resistir a un antibiótico, mismo que es inoculado en los cultivos celulares para que solo las células que incorporaron el constructo correctamente sobrevivan, también el marcador de selección puede producir una característica física que sea distintiva en el cultivo celular. Es común que haya solamente un marcador en el plásmido, pero pueden haber dos, los más usados son los genes de resistencia a la ampicilina y a la kanamicina (Sandoval et al., 2013; Wilkin, 2016).

El vector de clonación seleccionado para esta investigación es un plásmido bacteriano de *E. coli*. Los plásmidos son vectores que permiten, la clonación de un gen de interés al introducirlo en su molécula de ADN (Stryjewska et al., 2013; NIH, 2022). Estas pequeñas porciones circulares de ADN pueden replicarse por su cuenta, aun cuando han sido separados del cromosoma bacteriano y al contrario de este, poseen únicamente un par de pocos genes (NIH, 2022) generalmente relacionados con la capacidad de resistir a antibióticos (Green, 2022). Los plásmidos pueden intercambiarse entre bacterias, y ellas pueden hacer varias réplicas del plásmido exógeno, permitiendo que el ADN nuevo se transmita a su descendencia, lo que no sucede con su propio cromosoma, del que existe solo la molécula original y no se auto-replica (NIH, 2022). Entre los plásmidos más usados se encuentran los provenientes de *E. coli*, que sirven como instrumentos indispensables para el estudio del ADN recombinante y para investigaciones ligadas a la biotecnología (Green, 2022), debido a la información bien documentada que se ha desarrollado sobre su genoma, biología molecular y actividades bioquímicas (Gómez-Arias et al, 2018).

El plásmido Twist Amp High copy (también en Addgene como plasmid #133933) usado en este trabajo, es un vector de clonación con resistencia a la ampicilina, de alto número de copias. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, posee un tamaño de 2 221 pb, contiene el origen de replicación pMB1 y los puntos de inserción son Not1\_BamH1 y EcoR1\_BamHi. Este plásmido fue creado con tecnología SnapFast por *Oxford Genetics Biology Engineered* en conjunto con la empresa Twist BioScience, misma que se encarga de producirlo para distribución mundial, con fines de investigación. El vector se puede modificar gracias a que sus cebadores (*primers*) hacia delante y en reversa flanquean el sitio de inserción

para facilitar la amplificación y el sitio de cebado M13 permite la secuenciación del gen (Twist Bioscience, South San Francisco, CA, USA).

En esta investigación se usaron las células competentes TOP 10 de *E. coli* como hospedadoras para la clonación y células HEK 293F como hospedadoras para la expresión genética. Las células HEK como también son conocidas, son células embrionarias de riñón humano 293 ampliamente usadas en procesos biotecnológicos y en investigaciones moleculares, debido a que son fáciles de cultivar y transfectar con el gen de interés (Shaw et al., 2022) y tras una semana de incubación con aproximadamente, se les produce una lisis celular para que las proteínas salgan de las HEK y se acumulen en el sobrenadante de las muestras.

- **Diseño de cebadores**

Los cebadores o *primers*, son pequeñas secuencias de ADN monocatenarias que se usan para procedimientos como la reacción en cadena polimerasa (PCR) (NIH, 2022). Tienen gran utilidad en este procedimiento y en la clonación de genes en general, ya que los cebadores son los que se encargan de definir los extremos con nucleótidos que recrean la secuencia objetivo, porque los cebadores se hibridan con un ADN molde y permiten la amplificación del fragmento de ADN señalando el sitio de inicio para que la ADN polimerasa añada nucleótidos en el orden adecuado para producir millones de copias del ADN objetivo de forma rápida (Serrano, 2014; NIH, 2022). Estas copias luego pueden ser digeridas con enzimas de restricción y ser clonadas a través de un plásmidos. Es necesario crear los cebadores teniendo en cuenta que la polimerasa solamente agrega nucleótidos al extremo 3' de la secuencia de ADN, por lo que se deben diseñar dos cebadores para que se lleve a cabo la hibridación de las dos cadenas que conforman al ADN. Se diseña un cebador *forward* para para la dirección 5' → 3' y el cebador *reverse* para la dirección 3' → 5'. Para el diseño de cebadores es necesario considerar 3 puntos básicos (Reece et al. 2011; Serrano, 2014), con el fin de que se incorporen adecuadamente al ADN molde y se amplifiquen de manera correcta:

1. Las parejas de cebadores deben tener temperaturas de alineamiento o conjugación (*T<sub>m</sub>*) cercanas entre sí (para maximizar el rendimiento). *T<sub>m</sub>* del cebador es la temperatura óptima (50°C a 70°C) que provoca que el 50% de la molécula de ADN construya una doble hélice estable y que el otro 50% se separe en cadenas de una sola

hebra. Se puede establecer una  $T_m$  apropiada determinando la cantidad de nucleótidos GC del cebador (óptimo entre 50% y 60% de la secuencia nucleotídica).

2. Los cebadores no deben favorecer la formación de horquillas, ni ser complementarios porque pueden formar dímeros.
3. Evitar secuencias de ADN que terminen en GGG, GGT, ATT, CGA, TAA o TTA, porque estas terminaciones son más fáciles de desnaturalizar, además forman aminoácidos de membrana o de parada de replicación. Preferentemente los cebadores deben terminar en GC.

- **Enzimas de restricción**

El descubrimiento de las enzimas de restricción revolucionó el estudio del ADN a partir de la década de 1970, ya que hasta ese momento solo era posible el análisis de pequeñas porciones de ADN (Sandoval et al. 2013). Las enzimas de restricción posibilitaban el fraccionamiento de moléculas largas de ADN, para estudiar cada fragmento por separado y al mismo tiempo realizar copias específicas del fragmento de interés gracias a la técnica de reacción en cadena polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, o secuenciar al fragmento para conocer los nucleótidos que contiene la proteína (Cajachagua, 2018; NIH, 2023).

Las enzimas de restricción son importantes porque reconocen los nucleótidos de secuencias de ADN específicas que indican el lugar para cortar en dos la cadena de ADN (Sandoval et al. 2013), dejando en los extremos un patrón de nucleótidos, que se empareja con el SCM del vector para que los extremos de ambas secuencias se complementen y el inserto se una al plásmido para hacer posible la identificación, aislamiento y clonación del gen objetivo, y con ello construir moléculas recombinantes de cualquier secuencia de ADN (NIH, 2022). La aplicación de enzimas de restricción a la cadena de ADN se conoce como digestión enzimática (Sandoval et al. 2013), y la molécula recombinante que se obtiene tras la digestión debe ser purificada y separada del constructo, en este trabajo se realiza a través de una electroforesis en gel de agarosa, las bandas se cortan del gel y se purifican mediante el protocolo descrito en el apartado de metodología (Sandoval et al. 2013; Wilkin, 2016).

#### 4.3.2. Purificación de proteínas.

La purificación de una proteína se realiza con la intención de extraer, con la mínima pérdida de actividad y perturbación, una proteína específica de entre todas las especies moleculares de algún organismo, que se sabe cumple una función de interés científico (Ramírez-Carreto et al., 2021). Para localizar y obtener una proteína hay una serie de protocolos específicos de acuerdo con su naturaleza y el medio que requiere para ser funcional (García et al, 2013). Pero también existen protocolos estándar con pasos en común para conseguir resultados con éxito aceptable (Ramírez-Carreto et al., 2021).

Los pasos elementales que se deben seguir para purificar una proteína inician con la definición de un ensayo específico para identificar la proteína en cuestión, luego se elige la fuente o matriz biológica, para posteriormente extraerle la proteína deseada, finalmente se estabiliza la molécula y se procede con el aislamiento para evaluar su concentración, pureza y calidad (García et al., 2013; Ramírez-Carreto et al., 2021). De forma sintética, la obtención de proteínas inicia con un constructo genético incorporado con un plásmido de clonación y expresión, capaz de sintetizar la proteína recombinante de forma autónoma en células competentes hospedadoras (Gebel, 2013), luego de un proceso de lisis celular se extrae a la proteína de la célula hospedera y se aplican protocolos para purificación con el uso de resinas afines a la molécula de ADN recombinante que atrapa a la proteína, luego con eluciones se lavan las muestras y se eliminan los residuos que no se adhirieron a la resina y que se entienden como moléculas que no son tienen el ADN de interés (Sandoval et al., 2013; Cajachagua, 2018).

#### 4.4. Relación del proyecto con los Objetivos de Desarrollo Sostenible

De cara a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) agenda 2030 (ONU, 2021), el impulso de inhibidores enzimáticos para combatir *V. destructor* se alinea al Objetivo 2: *Hambre cero*, por el impulso a mejores prácticas agrícolas con sistemas de polinización sanos y sostenibles para los organismos involucrados y para los cultivos con destino comercial, con lo que se contrarrestan los riesgos de desnutrición y hambre mundial y se impulsa y promueve la seguridad alimentaria (Sosenski & Domínguez, 2018). Objetivo 12: *Consumo y producción sostenible*, pues los productos apícolas podrán ser obtenidos con menos insumos químicos

nocivos para los sistemas bióticos y abióticos y ligándose a procesos de economías verdes y al uso eficiente de los recursos naturales. Objetivo 13: *Acción por el clima*, ya que obtener compuestos específicos para la varroosis, permitirá la mínima aplicación de pesticidas organofosforados que alteran el equilibrio ecológico de los ecosistemas y los ciclos biogeoquímicos del planeta (Sosenski & Domínguez, 2018; MAPA, 2019), y al mismo tiempo se viabilizan sumideros de carbono y fuentes de oxígeno (Medellín, 2012), necesarios para enfrentar cambios climáticos (Sosenski & Domínguez, 2018). Y Objetivo 15: *Vida de ecosistemas terrestres*, debido a que la principal función de las abejas es el equilibrio de los ecosistemas a través de la polinización, *V. destructor* representa una amenaza para la biodiversidad, el ambiente y el ser humano, por lo que es relevante combatirla con respuestas innovadoras basadas en la ciencia e investigación.

## 5. Metodología

### 5.1. Enfoque metodológico, técnicas y tipo de diseño de investigación.

Esta investigación experimental forma parte de la ciencia de base, cuyos procedimientos se llevaron a cabo en los laboratorios del Instituto de Genética Molecular IGM-CNR “*Luigi Luca Cavalli-Sforza*”, en la ciudad de Pavía-Italia. Las condiciones de laboratorio fueron controladas, con el fin de diseñar y obtener sustancias con propiedades específicas para a futuro, usar los resultados en la ciencia aplicada para el desarrollo de compuestos químicos precisos. Para llevar a cabo la investigación, se requiere de conocimientos teóricos y prácticos de genética, bioquímica y biología molecular que serán específicamente empleados bajo un enfoque cualitativo.

Como parte de la metodología aplicada durante este trabajo, se emplearon técnicas analíticas de purificación sugeridas por Faravelli et al. (2021), así como los protocolos de NucleoSpin, NucleoBond, tanto para la purificación de plásmidos y para la extracción de ADN a pequeña y gran escala, así como la metodología estándar de Faravelli et al. (2021), como protocolo de transfección en células eucariotas del material genético a través de los plásmidos obtenidos. Todos estos procesos con el fin de obtener una proteína recombinante capaz de expresarse para purificarla y clonarla.

## 5.2. Unidad de estudio, criterios de inclusión y criterios de exclusión.

**Ob1:** Para la obtención de las unidades de estudio, que en este proceso son las secuencias nucleotídicas del gen de la AChE de *Apis mellifera* (*AmAChE*) y *Varroa destructor* (*VdAChE*), fue necesario realizar una búsqueda bibliográfica en artículos científicos, donde se haya caracterizado y aislado el gen. En el caso de *A. mellifera*, se analizó la investigación de Kim et al. (2012), que evalúa las propiedades de dos acetilcolinesterasas, en donde se propone la secuencia de *AmAChE2* que tiene un papel clave en la neurotransmisión y es principal objetivo de los insecticidas organofosforados y de acuerdo al objetivo de la investigación se seleccionó como secuencia sujeto - *subject sequence*. Por otro lado, la secuencia problema - *query sequence* fue la *AmAChE* propuesta por Ohara et al. (2005) y sobre la que Dulin et al. (2014) también realiza investigaciones de neurotransmisión, que confirma la producción de la enzima AChE. En cambio, para *V. destructor*, se usó la investigación de Dulin et al. (2014), mencionada anteriormente como referencia, debido a la similitud de la secuencia propuesta por este autor con la secuencia *AmAChE* de Ohara et al. (2015), y aunque la *VdAChEe* se caracterizó de manera parcial, esta secuencia cuenta con el sitio aniónico esencial, así como con el subsitio esterásico que permiten la catálisis de la ACh, por lo que se usó como secuencia sujeto - *subject sequence* la propuesta por Dulin et al. (2014).

Todas las secuencias mencionadas están disponibles en la Librería Nacional de Medicina de los Estados Unidos - NIH por sus siglas en inglés – (NIH, 2022), el repositorio con la mayor base de datos de secuencias genéticas en internet. Al no existir caracterizaciones del gen completo de *VdAChE*, fue necesario usar el gen *AChE* de *Homo sapiens* (Linnaeus, 1758) como molde de alineamiento - *query sequence*, en búsqueda de coincidencias o de regiones bien conservadas entre las secuencias de *AChE* de *H. sapiens* y *V. destructor* y comprobar que tiene la *VdAChE* seleccionada tiene la parte codificante para la enzima. Se compararon las secuencias en el software online, gratuito BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), provisto también por NIH que se encarga de alinearlas y encontrar regiones con similitudes significativas y establecer si poseen las partes de interés codificantes para la *AChE* en cada especie (Tabla 2). Entre los parámetros para hallar secuencias homólogas, se analizó el parámetro correspondiente al valor E o *e-value*, que se refiere al número de alineamientos que se podrían esperar para nuestra secuencia y que les otorga un puntaje máximo, sabiendo que se seleccionarán ciertas secuencias al azar de acuerdo a la frecuencia del valor indicado y que tendrán la misma longitud y

composición que la secuencia problema, además, el *e-value* depende de la base de datos usada y de la longitud de la secuencia y se espera encontrar muchos alineamientos al azar con puntuaciones bajas, pero pocos con puntuaciones altas (COMAV, 2018). Las secuencias con el valor E más alto (por ejemplo, entre 1E-10 y 1E-1, el valor más alto es 1E-10), fueron las seleccionadas para el desarrollo de este trabajo.

**Tabla 2.** Nombres de las secuencias del gen *AChE* usadas para la comparación en BLAST.

Secuencia problema (Query sequence )	Secuencia sujeto (Subject sequence)
Locus: AAA68151.1 ( <i>Homo sapiens</i> acetilcolinesterasa secuencia lineal). 1842 pb. (Soreq et al., 1990).	Locus: KJ499538 ( <i>Varroa destructor</i> acetilcolinesterasa mRNA, secuencia parcial lineal). 1833 pb. (Dulin et al., 2014).
Locus: Q4LEZ2_APIME ( <i>Apis mellifera</i> acetilcolinesterasa secuencia lineal). 1884 pb (Ohara et al., 2005)	Locus: NP_001035320.1 ( <i>Apis mellifera</i> acetilcolinesterasa 2 precursor, AmAChE2) 1884 pb. (Glavan et al., 2018)

Al obtener las posibles secuencias, fue necesario reconocer de manera precisa a la región codificante (CDS: *coding regions*) de la enzima AmAChE y VdAChE, para únicamente usar esa porción de nucleótidos. Para ello, se las comparó en el programa virtual de libre acceso CLUSTAL OMEGA (EMBL-EBI), capaz de generar alineamientos entre múltiples secuencias, en donde se alinearon los aminoácidos y se localizaron posibles puntos de inicio o la existencia de dominios conservados entre las tres especies. Luego se realizó un nuevo alineamiento en el mismo programa, pero usando los nucleótidos de cada secuencia para precisar sus regiones codificantes.

### 5.3. Equipos, materiales y reactivos utilizados.

#### 5.3.1. *Obtención de plásmidos con las secuencias nucleotídicas AmAChE y VdAChE*

Una vez identificadas las secuencias apropiadas, se optimizaron en el programa online *Twist Bioscience*, en donde se ingresaron y el editor de genes detectó posibles errores en las líneas de nucleótidos como caracteres incorrectos o solapamientos, las enzimas de restricción para cada fragmento objetivo y luego se eligieron los plásmidos que permitirían tener resultados de expresión y clonación óptimos (también sugerido por el programa) y finalmente se

compraron estos vectores a la empresa BioScience (propietaria del programa *Twist Bioscience*).

### 5.3.2. *Diseño de cebadores*

Los dos vectores diseñados anteriormente fueron ingresados en la plataforma virtual de libre acceso Benchling, esta se encarga de generar una nube de datos, para entre otras cosas visualizar los mapas de las secuencias nucleotídicas, la composición del plásmido e información adicional de una manera didáctica, facilitando la comprensión de la estructura de los vectores: en la nube la secuencia de *AmAChE* fue nombrado como *Apis\_ACHE\_FL\_Sf9* y *VdAChE* como *Varroa\_ACHE\_FL\_Humanaized*.

Generalmente, los vectores suelen contener un segmento transmembranal (TMS) o señales peptídicas (SP) que no necesitamos considerar porque afectarían el comportamiento de la proteína de interés, por lo que a través del mapa de secuencia de la plataforma Benchling se localizaron las enzimas de restricción necesarias en las células en donde se insertan los plásmidos para su reproducción, con el fin de limitar la secuencia y omitir manualmente los aminoácidos que representan SP y TMS, estos se reconocieron debido a que están codificadas por aminoácidos hidrofóbicos ubicados en los extremos de las secuencias, como: valina, prolina, glicina, alanina, metionina, triptófano, lisina, fenilalanina, isoleucina, serina, treonina, tirosina, cisteína. Pero además, la *AmAChE* y *VdAChE*, limitadas por las enzimas de restricción BamH1 (inicio) y Not1 (parada), que indican los límites de los segmentos, se analizaron en el servidor libre Signal P 6.0 (DTU *Health Tech*), que predice la presencia de SP. Signal P, requiere que las secuencias sean transformadas a formato FASTA y de forma automática el servidor indicó el conjunto de aminoácidos que emitieron SP. Con los resultados, se etiquetaron las secuencias de SP en los mapas plasmídicos de Benchling para evitarlas en el diseño de cebadores y minimizar los errores de secuenciación.

Los cebadores son necesarios para la amplificación por PCR de las regiones codificantes para la *AmAChE* y *VdAChE*, para diseñarlos se usó el programa *Nep TM calculator with Q5* (para usar Q5 como la polimerasa de la PCR, porque evita mutaciones, favorece a cadenas con *Tm*

altos y tiene mejores resultados), y se verificó que se cumplieran con las condiciones de diseño óptimo establecidas para los cebadores.

Para *AmAChE* y *VdAChE*, el diseño de los cebadores *forward* (5' → 3') inició con la sección de los nucleótidos de la enzima de restricción BamH1, se omitieron las regiones con SP y TMS, y se tomaron los primeros 16 a 21 pares de bases ubicadas inmediatamente a continuación de las regiones omitida, hasta que el número de pares de bases del cebador cumpliera con las condiciones antes establecidas. Además para aumentar el *Tm* del cebador *forward* y que esté a menos de 5°C de diferencia del *Tm* del cebador *reverse*, se agregaron antes de BamH1 tres nucleótidos más (CAC, que es un codón fuerte de histidina) que no afecta al el funcionamiento del cebador. Mientras que para los cebadores de reversa (3' → 5') primero se usó la herramienta virtual *Reverse Complement Tool* (Bioinformatics.org), para invertir la posición de los nucleótidos, se agregó la enzima de parada Not1 también invertida, para que no pierda el sentido 3' → 5', se omitieron las partes con SP y TMS y se agregaron entre 16 y 20 nucleótidos hasta cumplir con las condiciones mínimas de diseño, y de ser necesario se agregó al final del cebador un solo nucleótido (C o G), porque es la cantidad de nucleótidos que se pueden añadir a este cebador sin que afecte su función (analizado en [Tmcalculator.neb.com](http://Tmcalculator.neb.com)). Una vez diseñados, los cebadores fueron fabricados y enviados por *Eurofins - agrosience*.

#### 5.4. Procedimiento.

Tras obtener las secuencias optimizadas y los plásmidos idóneos para su transformación se prosiguió con la parte experimental de la investigación dentro del laboratorio:

##### 5.4.1. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

**Ob 2:** Para conseguir la amplificación por PCR, primero se suspendieron los plásmidos en agua libre de actividad *RNase* (H<sub>2</sub>O *RNase-free*), adquiridos con concentración inicial de 2000 ng c/u. Los tubos con los plásmidos en sólido se centrifugaron a 3 000 rpm por 10 segundos a temperatura ambiente, luego se agregaron 10 µl H<sub>2</sub>O *RNase-free* a cada tubo para conseguir una concentración de 200 ng (concentración inicial 2000 ng), de ellos se tomaron 0,5 µl y se pasaron a nuevos microtubos con 9,5 µl de H<sub>2</sub>O *RNase-free* c/u, para obtener una nueva

concentración de 10 ng/μl. Se pipeteó la nueva solución y se refrigeraron los 10 μl resultantes de cada plásmido a -20°C.

Los cebadores también fueron disueltos en H<sub>2</sub>O *RNase-free*, para manejarlos adecuadamente y obtener los moldes de ADN plasmídico, a través de un ciclo de centrifugación a 3 000 rpm por 10 segundos a temperatura ambiente, luego se agregó a cada cebador el volumen indicado en la Tabla 3, de H<sub>2</sub>O *RNase-free*, para obtener una concentración de 100 pmol/μl, antes de almacenarlos se pipeteó la mezcla y se guardó a -20°C hasta su uso para la PCR.

**Tabla 3.** Características de los cebadores (oligonucleótidos) para su transformación.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Largo (nucleótidos)	Vol. para 100 pmol/ μl
Apis FW	ACGCGGATCCCACCTAGTCATCGTTCGCGTC	31	119
Apis Rev1	TGCGGCCGCGTTTACTCGTACCCGCCACC	29	125
Apis Rev2	TGCGGCCGCCAGGTTTCCTTGGGTTCGAG	29	124
Var Fw	GCCCGGATCCCAAGATAGCGAGGTCATTGCTAC	33	125
Var Rev	TGCGGCCGCCATTCTTATACCGCCCTTCCAG	31	128

**Transformación 1:** Para llevar a cabo el proceso de captación genética, es necesario realizar una transferencia horizontal de genes en células procariotas, porque las células son capaces de crecer y clonarse con el ADN extraño, pero no son capaces de expresarlo. Para las transformaciones, se requieren los moldes de ADN plasmídico que se obtuvieron anteriormente y células competentes de *Escherichia coli* TOP 10, almacenadas a -80°C (cada alícuota contenía 200 μl de células). En microtubos de 1,5 ml (uno para *AmAChE*: Apis y otro para *VdAChE*: Varr), se colocaron 90 μl de las células TOP 10 (c/u). Al microtubo de Apis se le agregaron 2 μl del plásmido líquido de *AmAChE* transformado inicialmente. Se realizó lo mismo en el microtubo de Varr. Ambas muestras se incubaron en hielo de 20 a 30 minutos, y a continuación, se sometieron a choque térmico por 1 minuto en el calentador previamente programado a 42°C, luego se volvieron a incubar en hielo por 1 minuto (el cambio de temperatura rápido produce que las células competentes creen poros que permitan el paso del ADN extraño), y se añadieron 500 μl de medio líquido Luria-Bertani (LB) Broth sin antibiótico (preparación en Anexo 1) a cada microtubo. Luego se colocaron a baño maría por 1 hora a 37°C, se centrifugaron a 6 000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos. Se descartó entre 300 y 400 μl del sobrenadante de cada microtubo y se re-suspendieron los *pellets* con aproximadamente 200 μl del sobrenadante restante. Se tomó 20 μl del re-suspendido de cada

especie y se pusieron en 180  $\mu$ l del medio LB Broth (c/u). Los 200  $\mu$ l resultantes se sembraron en las cajas de agar (preparación del medio sólido en Anexo 1), y se incubaron a 37°C o/n (overnight).

**Preparación de los cebadores para la amplificación por PCR**, de acuerdo al protocolo para el uso de la polimerasa Q5, se realizó una mezcla con los reactivos de la Tabla 4, tanto para el plásmido de *AmAChE* con sus respectivos cebadores *forward* y *reverse*, como para el plásmido de *VdAChE* con su cebador *forward* y *reverse*.

**Tabla 4.** Proporciones de reactivos y ADN molde para la PCR con la Q5 polimerasa.

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)
5X Buffer	10
dNTPS 2,5 $\mu$ M	4
Cebador <i>forward</i> 10 $\mu$ M	2,5
Cebador <i>reverse</i> 10 $\mu$ M	2,5
ADN molde 10ng/ $\mu$ l (plásmidos)	1
5X GC Enhancer	10
H <sub>2</sub> O RNase-free	19,5
Enzima Q5	0,5
<b>TOTAL</b>	50 $\mu$ l para cada cebador (A1, A2, V)

De acuerdo al **protocolo para la reacción PCR**, los tres cebadores preparados para la reacción se sometieron a desnaturalización a 98°C por 30 segundos, luego a hibridación por 30 ciclos de 98 °C por 10 segundos, 66 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto y finalmente a elongación a 72 °C por 2 minutos, cuando el proceso acabó, las muestras permanecieron a 4°C o/n. Se comprobaron los resultados al identificar el peso de las bandas a través de la electroforesis del ADN en un gel de agarosa al 1% (preparación del gel en Anexo 2).

Para cargar el gel se prepararon las muestras sometidas a la PCR (A1, A2, V), colocando 5  $\mu$ l de cada una en microtubos, para añadirles 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O RNase-free y 2  $\mu$ l de *buffer* GLB 6X, para obtener un total de 12  $\mu$ l de cada muestra para la corrida del gel por electroforesis, al primer pocillo del gel se le añadió el marcador *Bench top 1 Kb DNA*, como marcador del peso molecular, y a continuación los 12  $\mu$ l de cada muestra de PCR, iniciando con A1, A2 y V. Se

cubrió el gel con *buffer* TAE 1X (40 mM Tris- base, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA, pH 8.3) y se sometieron a electroforesis a 90 V y 67-68 mA.

#### 5.4.2. Digestión con enzimas de restricción

Para digerir el ADN obtenido en la reacción PCR de las tres muestras, es necesario realizar una purificación del resultado de la PCR, por lo que se usó el protocolo “*PCR clean-up*” para reacciones enzimáticas (SDS < 0,1 %), que consistió en el ajuste de las condiciones de enlace del ADN para cada muestra (A1, A2, V), luego a la unión del ADN, lavado y secado de la membrana sílica y en la elución del ADN (protocolo detallado en Anexo 3).

Cuando se purificó el ADN de las muestras, es decir, se eliminaron todos los reactivos y sustancias que se agregaron antes de someterse a la PCR, se pudo continuar con la digestión (**adición de las enzimas de restricción**): a 5 µl de la reacción de PCR purificada de cada muestra se agregaron 7,5 µl de H<sub>2</sub>O *RNase-free*, 1,5 µl de *buffer* D 10X por c/u (*buffer* óptimo para las condiciones de incubación de Not1, incluido en el kit de Promega: 10 mM Tris-HCl pH 7.4; 0,1% Triton® X-100; 500 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,5 mg/ml BSA; 50% glicerol), luego 0.5 µl de Enzima Not1 (c/u) y se incubaron a 37°C o/n. Al siguiente día se centrifugaron los tubos por 10 segundos y se adicionó 0.5 µl de Enzima BamH1 a c/u. Se incubaron las muestras por 2 horas a 37°C. El volumen total de cada muestra de ADN digerido fueron 15 µl.

Post digestión fue necesario **correr un gel de agarosa** con los resultados para verificar la **presencia de las enzimas**, por lo que a cada muestra de ADN digerido de 15 µl, se le agregaron 3 µl de *Orange Loading Dye Solution*, se cargó el gel de agarosa con el primer pocillo conteniendo el marcador, un pocillo libre, muestra de A1, pocillo libre, muestra de A2, pocillo libre y V. Se corrió el gel hasta la mitad y se cortó el gel que contenía a las bandas deseadas para purificarlas y recuperar los tres fragmentos con las secuencias de ADN objetivo después de la electroforesis. Se usó el protocolo “*Clean-up kit*” (NucleoSpin) (Protocolo detallado en Anexo 3). A la elución final de cada muestra se le agregaron 10 µl de H<sub>2</sub>O *RNase-free*, y las muestras con el ADN recuperado quedaron listas para clonación.

**Ob 3:** Las muestras A1 y V, fueron enviadas para la transfección de las proteínas al Laboratorio de Biología Estructural “Lazzaro Spallanzani” de la Universidad de Pavia, Italia, en donde se

usaron células mamíferas modificadas (HEK293- F) para la expresión de la proteína AmAChE y VdAChE, se usó el protocolo de transfección propuesto por Faravelli et al., (2021) y tras seis días de cultivo se lisaron las células, con lo que se obtuvieron dos muestras del proceso: una muestra con el lisado y otra con el sobrenadante resultante de este procedimiento.

#### 5.4.3. Verificación de la concentración de la proteína AmAChE y VdAChE.

Como comprobación de la concentración de la proteína en cada muestra para garantizar que existirán resultados positivos en la expresión de las células, se realizó una **inoculación** de los resultados de la *Transformación 1*: a cuatro tubos de 15 ml, se les agregó 4 ml de medio líquido LB Broth (c/u), 4 µl de ampicilina (debido a la relación 1:1000). Luego se extrajeron las colonias y se sembraron en el medio, y sin cerrar completamente los tubos se incubaron toda la noche a 37°C. Los tubos obtenidos fueron: Ap 1, Ap 2, Var 1, Var 2

Para verificar la existencia de la proteína en las muestras se realizó una extracción de ADN post inoculación (**Mini-prep**) con el protocolo *NucleoSpin Plasmid EasyPure*: en cuatro microtubos de 2 ml se agregó parte del volumen obtenido en la inoculación (siendo el volumen total aproximadamente de 3 700 µl de cada muestra) para centrifugarlos a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 °C, luego se descartó el sobrenadante y se repitió hasta usar el volumen restante de la inoculación de cada muestra, se eliminó el sobrenadante y se conservó únicamente el *pellet*, luego se agregó a cada microtubo 250 µl de *buffer* A1 (agitar con el uso del *vortex* hasta disolver el *pellet*). A continuación a cada microtubo se le adicionaron 350 µl de *buffer* A2, se invirtió cada tubo 5 veces y se incubaron por 2 minutos a temperatura ambiente (sin agitar con *vortex*). Por último, se agregaron 450 µl de *buffer* A3 y se invirtieron los tubos hasta que se volvieron transparentes, luego se incubaron por 10 minutos en hielo y se cargó el sobrenadante en la columna de extracción, después se centrifugaron a 13 000 rpm por 1 minuto a 4 °C. Se eliminó el flujo y se repitió este paso porque aún existía sobrenadante sin purificar. Se agregó a la columna 450 µl del *buffer* AQ, y se centrifugaron a 13 000 rpm por 1 minuto a 4 °C. Se cambió la columna a un microtubo de 1,5ml y se le añadió a c/u 50 µl de *buffer* AE, se centrifugaron a 11 000 rpm por 1 minuto a 4 °C, y se eliminó la columna cuando estuvo completamente seca. Tanto los *buffers*, como la columna de extracción empleados en la mini-prep, fueron proporcionados por el Kit de *NucleoSpin Plasmid EasyPure* de Macherey-Nagel, 2019.

Al comprobarse la concentración de ADN en las bacterias inoculadas a través de espectrofotometría, se realizó una **extracción de ADN** post inoculación en un volumen mayor (protocolo **Midi-prep/NucleoBond®**): en dos matraces se colocaron 120 ml de medio LB Broth con 12 µl de ampicilina (c/u) (para concentración 1:1000), tanto para apis como para varroa. Se agregaron 100 µl de la inoculación de ambas especies con 10 µl de antiespumante. Permanecieron a 37°C o/n en agitación constante a 180 rpm. Para la purificación de los plásmidos se utilizó el kit y el protocolo Nucleobond® Xtra EF *Plasmid Purification* (Protocolo detallado en Anexo 3). Y se comprobaron los resultados de concentración de la midi-prep a través de espectrofotometría.

A los plásmidos purificados en la midi-prep se les añadieron las enzimas de restricción (BamH1 y EcoR V) para comprobar que las colonias aceptaron correctamente al plásmido y que estos cortan la secuencia en el lugar esperado. Se preparó un gel de agarosa al 1% para visualizar el resultado. Las enzimas se agregaron a los plásmidos con la siguiente preparación:

*AmAChE:*

- $DNA = \frac{1\ 000\ ng}{concentración\ AmAChE\ (ng/\mu l)}$
- BamH1 = 0,5 µl
- *Buffer* E = 1.5 µl
- H<sub>2</sub>O *RNase-free* = hasta que el volumen total de la muestra sea de 15 µl.

*VdAChE:*

- $DNA = \frac{1\ 000\ ng}{concentración\ VdAChE\ (ng/\mu l)}$
- BamH1 = 0,5 µl
- EcoR V = 0,5 µl
- *Buffer* E = 1,5 µl
- H<sub>2</sub>O *RNase-free* = hasta que el volumen total de la muestra sea de 15 µl.

Para cargar el gel, a cada muestra se le agregaron 3 µl de *buffer* GLB 10X y el marcador se cargó con 3 µl de Bench Top.

#### 5.4.4. Expresión de la acetilcolinesterasa

Para verificar que las células mamíferas HEK 293-F consiguieron expresar la proteína, se usó el método de separación de las proteínas por su peso molecular, a través de la electroforesis por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) o gel de poliacrilamida para electroforesis al 10% (preparación del gel en Anexo 2). Se cargaron dos geles, para detectar la ubicación de las proteínas por tinción con *Coomassie blue* (detalles del protocolo de tinción en Anexo 5) y otra detección con la técnica de *Western blot* (Wb), (detalles del protocolo en Anexo 5).

Con el fin de ubicar a la proteína en las muestras de sobrenadante o lisado, enviados por el Laboratorio de Biología Estructural tras la transfección, se prepararon ambas muestras (AmAChE y VdAChE), con el siguiente procedimiento: los sobrenadantes de cada especie se combinaron con una proporción de volumen 1:1 con *buffer* TCA 20% (1 ml de sobrenadante + 1 ml de TCA), inmediatamente se incubaron 30 minutos en hielo, luego se centrifugaron las muestras a 13 000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió cada *pellet* con 60 µl de *Simple Buffer* (SB) 2X con beta-mercaptoetanol. Finalmente se modificó la acidez de la muestra, porque se necesitan muestras básicas, por lo que se añadió 4 µl de TRIS-*base* hasta que la coloración cambiase de amarilla a azul intensa.

En cambio, para los lisados se resuspendieron los *pellets* de cada proteína con 150 µl de SB 2X con beta-mercaptoetanol, luego se incubaron durante 5 minutos en hielo y luego se pipetearon las muestras (de estar demasiado viscosas se pueden volver a calentar por 30 segundos o hasta que la mezcla sea fácil de manejar) y permanecieron en hielo por 5 minutos. Antes de cargar el gel con las muestras de sobrenadantes y lisados, las preparaciones pasaron por un proceso de desnaturalización, entonces se las calentó a 96°C por 5 minutos y luego se centrifugaron a 3 000 rpm por 10 segundos.

Ambos geles fueron cargados con diez muestras, sin embargo, para el gel usado con el *Coomassie blue* las muestras fueron: marcador (3,5 µl), sobrenadante apis (30 µl), sobrenadante varroa (30 µl), control del lisado (15 µl), lisado apis (30 µl), lisado varroa (30 µl), y X (15 µl H<sub>2</sub>O *RNase-free* + 15 µl SB 2x) en las últimas cuatro posiciones.

El gel para *Western blot* fue cargado con: marcador (3,5  $\mu$ l), sobrenadante apis (30  $\mu$ l), sobrenadante varroa (30  $\mu$ l), control del lisado (15  $\mu$ l), lisado apis (30  $\mu$ l), lisado varroa (30  $\mu$ l), control para Wb de  $\alpha$ -Histidina (15  $\mu$ l SB 2X + 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O *RNase-free* + 5  $\mu$ l control de His), X (15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O *RNase-free* + 15  $\mu$ l SB 2X) en las últimas tres posiciones.

Se realizó un segundo Wb con un sobrenadante de control para evaluar la actividad de los sobrenadantes de apis y varroa y contrastar con el primer Wb, para ello: se centrifugaron los sobrenadantes de la transfección en HEK293-F a 1 500 rpm por 5 minutos a 4°C, luego se dispensaron los 5 ml del sobrenadante en 5 microtubos de 1.5ml (1ml c/u). Se congelaron los 4 microtubos a -20°C hasta usarlos como control inicial del sobrenadante. Para cargar las muestras en el gel SDS-PAGE al 10% y efectuar el Wb, se colocaron en el siguiente orden: marcador (3,5  $\mu$ l de marcador + 11.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O *RNase-free* + 15  $\mu$ l de SB 2X), control del sobrenadante (44  $\mu$ l), sobrenadante preparado de apis (44  $\mu$ l), sobrenadante preparado de varroa (44  $\mu$ l), control del lisado (30  $\mu$ l), lisado de apis (30  $\mu$ l), lisado de varroa (30  $\mu$ l), control para Wb de  $\alpha$ -Histidina (15  $\mu$ l SB 2X + 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O *RNase-free* + 5  $\mu$ l control de His), X (15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O *RNase-free* + 15  $\mu$ l SB 2X) en las últimas dos posiciones.

#### 5.4.5. Pruebas de purificación de las proteínas recombinantes AmAChE y VdAChE.

##### ❖ **Cromatografía de afinidad: purificación por lotes**

Se iniciaron las pruebas de purificación con una cromatografía de afinidad por lotes (*Batch purification*), mediante un metal inmovilizado (IMAC), en este caso el níquel, contenido en la resina Ni-NTA (ácido níquel-nitrilotriacético) ya que es un método rápido, simple y con resultados confiables. Se tomaron los sobrenadantes de AmAChE y VdAChE expresadas (aproximadamente 45 ml c/u) y se almacenaron 200  $\mu$ l de cada sobrenadante a -20°C, para usarlos como material inicial (Load) en los siguientes procesos.

- **Preparación de la Resina de Equilibrio:**

Se tomó 1 ml de la resina Ni-NTA y se la colocó en un tubo plástico de 15 ml para la muestra de cada proteína recombinante, se les agregó 10 ml de *buffer* (PBS) 1X frío y se invirtió varias veces cada tubo. Se los dejó en incubación en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 1 500 rpm a 4°C por 3 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento de la

adición de 10 ml de *buffer* PBS 1X frío, por tres veces. A cada *pellet* de resina final se le agregó 1 ml de *buffer* PBS 1X frío para resuspenderla y transferir todo al tubo plástico con el sobrenadante inicial (1ml de resina para AmAChE y 1ml de resina para VdAChE). Se dejaron los dos sobrenadantes preparados en el agitador rotativo a 4°C (o/n).

- ***Preparación de las muestras:***

Se prepararon 150 ml de *buffer* de equilibrio para los lavados, con 15 ml de *buffer* PBS 10X + 1,5 ml de Imidazol 2M y 133,5 ml de H<sub>2</sub>O miliQ (concentraciones finales: PBS 1X; Imidazol 20 mM). Además, se prepararon 20 ml de *buffer* de elución, con 2 ml de *buffer* PBS 10X + 2,5 ml de Imidazol 2M y 15.5 ml de H<sub>2</sub>O miliQ (concentraciones finales: PBS 1X; Imidazol 250 mM). Al siguiente día, se centrifugaron los dos sobrenadantes a 1 500 rpm por 5 a 10 minutos a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante de cada muestra, que fue usado como control inicial en los geles (FT – Flow Through), permaneciendo en hielo hasta su uso. Posteriormente, se transfirió cada resina a un tubo de plástico de 15 ml y se agregaron 10 ml de la preparación de PBS + 20 mM Imidazol (añadir primero 1 ml, pipetear y añadir los otros 9 ml lentamente), esto para el sobrenadante de apis y sobrenadante de varroa. Se incubaron las dos muestras a 4°C en cuarto frío por 5 minutos y se centrifugaron a 1 500 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante [considerado como lavado (W), se repitió el lavado 3 veces y se obtuvieron 200 µl de cada lavado nombrado como: W1, W2 y W3, se recomienda conservar el total de cada lavado en hielo]. Los *pellets* finales serán usados para las eluciones.

- ***Preparación de las eluciones:***

Se resuspendió cada *pellet* con 1 ml de la preparación de PBS + 250 mM en microtubos de 2 ml, se invirtieron los tubos varias veces, y se incubaron por 5 minutos a 4°C, se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos y se recolectó el sobrenadante, que fueron la elución 1 para cada muestra. Con el *pellet* resultante se repitió el proceso completo desde la adición del *buffer* de elución, por tres veces más para conseguir 3 eluciones (E2, E3 y E4) de cada muestra. Se guardó el residuo de resina (R) de cada muestra para utilizarlo en el gel.

- ***Análisis de las muestras:***

Se prepararon 2 geles SDS-PAGE al 10% y se usaron las muestras L y FT, para el FT se requirió una preparación previa antes de cargarlo en el gel, por lo que a 1ml de FT de apis y a 1 ml de

FT de varroa, se le agregó 1 ml de *buffer* TCA al 20% y se incubó en hielo por 30 minutos, luego se centrifugaron ambos FT a 13 000 rpm a 4°C por 15 minutos y luego se descartó el sobrenadante. A continuación se resuspendió cada *pellet* con 70 µl de SB 2X, se añadió 4 µl de TRIS-base o hasta que las muestras se volvieron básicas (cambiaron de color amarillo a azul).

En cambio, a las muestras de lavados (W1, 2, 3) eluciones (E1, 2, 3, 4) y a la resina también se les realizó una preparación previa, por lo que a 20 µl de cada lavado se le añadieron 20 µl de SB 2X. A 10 µl de cada elución se le añadieron 10 µl de SB 2X. Se resuspendieron 40 µl del residuo de resina de apis y varroa con 40 µl de SB 2X. Todas estas preparaciones, fueron calentadas 96°C por 5 minutos y centrifugadas a 3 000 rpm por 10 segundos. Luego se cargó el gel de apis en el siguiente orden: marcador (*HyperPage Prestained Protein marker* 3,5 µl), L (44 µl), FT (38 µl), E1 (20 µl), E2 (20 µl), E3 (20 µl), E4 (20 µl), W1 (40 µl), W3 (40 µl), R (30 µl). Y el gel de varroa se cargó en el siguiente orden: marcador (*HyperPage Prestained Protein marker* 3,5 µl), L (44 µl), FT (38 µl), E1 (20 µl), E2 (20 µl), E3 (20 µl), E4 (20 µl), W1 (40 µl), W3 (40 µl), R (30 µl). Luego de la electroforesis ambos geles se trataron con *Coomassie blue*.

A partir de los resultados obtenidos, se decidió realizar un *Western blot*, solamente con las muestras de varroa, para ello a 200 µl de las eluciones de varroa se le añadieron 300 µl de H<sub>2</sub>O *RNase-free* y 500 µl de *buffer* TCA al 20%. A 200 µl de W1, L y R de varroa se le añadieron 200 µl de *buffer* TCA al 20% (c/u). A 1 ml de FT de varroa se le añadió 1ml de *buffer* TCA al 20%. Las ocho muestras resultantes de los procedimientos anteriores se incubaron en hielo por 30 minutos y luego se centrifugaron a 13 000 rpm a 4°C por 25 minutos.

Para cargar las muestras en el gel SDS-PAGE al 10% se preparan de la siguiente manera: al *pellet* de cada una de las cuatro eluciones de varroa se les agregó 35 µl de SB 2X y 4 µl de TRIS base. A la resina se le añadieron 60 µl de SB 2X. A las muestras L y FT se les agregó 70 µl de SB 2X y 4 µl de TRIS base. A 3,5 µl de marcador, se le agregó 11,5 µl de H<sub>2</sub>O *RNase-free* y 15 µl de SB 2X. Y se cargó el gel en el siguiente orden: marcador -M- (30 µl), L (37 µl), FT (37 µl), E1 (39 µl), E2 (39 µl), E3 (39 µl), E4 (39 µl), W1 (37 µl), control para Wb de α-Histidina (15 µl SB 2X + 10 µl H<sub>2</sub>O *RNase-free* + 5 µl control de His), R (30 µl). Y se realizó el mismo proceso de los *Western blots* anteriores, pero en esta ocasión se agregaron 700 µl de solución de peróxido y 700 µl de luminol sobre la membrana para la quimio-luminiscencia.

### ❖ **Cromatografía líquida de proteínas rápida (fplc)**

Para llevar a cabo la purificación de la acetilcolinesterasa de *Varroa destructor*, mediante la cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC por sus siglas en inglés) se usó el sistema AKTA™ *Start*, para lo cual se realizó un fraccionamiento cromatográfico de corrida a presión intermedia (50 bar), en donde se requirió de la preparación de 1 L *buffer* de Equilibrio de columna (20 mM de fosfato de sodio, 150 mM de cloruro de sodio y 25 mM de Imidazol con pH 7.4) y 500 ml de *buffer* de Elución (20 mM fosfato de sodio, 150 mM de cloruro de sodio y 500 mM de Imidazol con pH 7.4).

Se ingresaron en la columna 45 ml del sobrenadante varroa, luego se equilibró la resina con el *buffer* de Equilibrio, se hizo un lavado y luego se agregó el *buffer* para eluciones, finalmente se obtuvieron un total de 30 microtubos con 1ml de elución de las proteínas cambiando la composición de la fase móvil continuamente. Finalmente se regeneró la corrida de la columna HiTrap para que pueda ser reutilizada. Con la curva de absorbancia UV que se registró en las fracciones obtenidas a partir del sistema AKTA *Start*, se seleccionaron las de mayor absorbancia para correrlas en un gel SDS-PAGE al 10%, y se prepararon 25 µl de cada fracción, al control inicial (L) y al *flow through* (FT) y se les agregó 5 µl de *buffer* crack. Se calentaron las muestras a 96°C por 5 minutos y luego se centrifugaron a 13 000 rpm por 1 minuto. Para cargar el gel se usaron 3,5 µl del marcador en la primera posición, L, FT y las fracciones en las siguientes posiciones (25 µl de cada muestra). Finalmente se realizó una tinción de *Coomassie blue*.

### ❖ **Cromatografía por intercambio iónico- purificación por lotes:**

Para el intercambio iónico, fue necesario eliminar las sales adquiridas en las purificaciones anteriores, por lo que se realizó un proceso de diálisis, con una membrana de diálisis y 3L del *buffer* de Diálisis con pH 6 (considerando que el punto isoeléctrico -PI- teórico de la VdAChE es de 7.5), compuesto de 50 mM de NaCl y de 20 mM de Tris-HCl, que también fue necesario para el lavado de la resina (*Wash buffer*).

La membrana pasó toda la noche con 45 ml del FT de varroa a 4°C en diálisis con los 3 L del *buffer* de Diálisis. Tras la remoción de las sales gracias a este mecanismo, se tomaron 50 µl para ser considerados como el nuevo material inicial (L) y se inició el intercambio iónico al día

siguiente, primero se equilibró la resina, por lo que se resuspendieron 500  $\mu$ l de resina con 3 a 5 ml de *Wash buffer* y se centrifugó la muestra a 750 g por 3 minutos. Luego se la agregó al volumen total del FT post diálisis y se incubó a 4°C por 2 horas en el agitador rotativo. Posteriormente se centrifugaron a 750 g por 3 minutos y se descartó el sobrenadante en otro tubo plástico para ser considerado como el nuevo FT, el *pellet* fue diluido con el *buffer* de eluciones, entonces a la misma receta del *buffer* de Diálisis se le cambiaron las concentraciones de sal, para que eluyan a la proteína: **buffer de Elución 1** = 250 mM NaCl + 20 mM Tris-HCl + 9,3 H<sub>2</sub>O miliQ; **buffer de Elución 2** = 500 mM NaCl + 20 mM Tris-HCl + 8,8 H<sub>2</sub>O miliQ; **buffer de Elución 3** = 1 M NaCl + 20 mM Tris-HCl + 7,8 H<sub>2</sub>O miliQ; y **buffer de Elución 4** = 1,5 M NaCl + 20 mM Tris-HCl + 6,8 H<sub>2</sub>O miliQ).

Entonces el *pellet* de resina se resuspendió con el *buffer* de Elución 1 (1 ml de *buffer* de Elución 1 por cada 500  $\mu$ l de resina), centrifugado a 750 g por 3 minutos, se colocó el sobrenadante en un microtubo para cargar el gel (E1) y se repitió el mismo procedimiento con el *pellet* resultante (en total 2 muestras de elución con 250 mM de NaCl: E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>). El mismo procedimiento de resuspensión del *pellet* de resina se realizó con los *buffers* de elución 2, 3 y 4 (por ende, se obtuvieron 2 muestras de elución con 500 mM de NaCl, E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>, 2 muestras de elución con 1 M de NaCl, E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> y 2 muestras de elución de 1,5 M de NaCl, E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>).

Se cargó un gel SDS-PAGE al 10%, para lo que se prepararon todas las eluciones, L y el FT tomando 25  $\mu$ l de cada uno y agregándoles 5  $\mu$ l de *buffer* crack, mientras que el marcador se preparó con 11  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O *RNase-free*, 15  $\mu$ l de SB 2X y 4  $\mu$ l del marcador. En el gel se cargaron las muestras en el siguiente orden: marcador (25  $\mu$ l), L (25  $\mu$ l), FT (25  $\mu$ l), E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> de 250 mM NaCl (25  $\mu$ l c/u), E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> de 500 mM NaCl (25  $\mu$ l c/u), E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> de 1 M NaCl (25  $\mu$ l c/u) y E<sub>2</sub> de 1,5 M NaCl (25  $\mu$ l). Con un gel se realizó una tinción de *Coomasie blue*.

## 6. Resultados

Los resultados obtenidos con esta investigación se basan en el cumplimiento del objetivo general del proyecto que busca la obtención de la secuencia nucleotídica de la Acetilcolinesterasa (AChE), a partir del genoma de *Apis mellifera* y de *Varroa destructor*, para así identificar los genes ortólogos del gen de la AChE de *Homo sapiens* en *AmAChE* y *VdAChE*. Con esto se posibilita la inserción de genes de *AmAChE* y *VdAChE* en un vector de

clonación para luego realizar pruebas de expresión de AmAChE y VdAChE recombinante en células bacterianas/humanas/de insectos.

Tras la búsqueda en la NIH, se encontraron secuencias de la acetilcolinesterasa lo suficientemente bien caracterizadas en ambas especies, para tomarlas como modelos de referencia y comparar alineaciones. Con los procesos en BLAST y CLUSTAL y el análisis de los nucleótidos, de dominios posiblemente bien conservados y de los errores en la secuenciación se seleccionó la secuencia del locus NP\_001035320.1 de *Apis mellifera* (Tabla 5), descrita en Kim et al. (2012) y analizada en Glavan et al. (2018), como la secuencia objetivo, que se alineó perfectamente con la *AmAChE* caracterizada en Ohara et al. (2005), con lo que se corrobora su uso para este proyecto. Y se seleccionó la secuencia del locus XP\_022663630 de *Varroa destructor* (Tabla 5), como la secuencia de aminoácidos apropiada para el proyecto.

**Tabla 5.** Resultado de las secuencias genómicas (aminoácidos y nucleótidos), seleccionadas para este proyecto.

<b>Especie</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>	<b>Secuencia nucleotídica</b>
<i>Varroa destructor</i>	XP_022663630 (aa)	XM_022807895.1 (pb)
<i>Apis mellifera</i>	NP_001035320.1 (aa)	XM_393751.7 (pb)

Posteriormente se optimizaron las secuencias y se eliminaron los posibles errores en la escritura de los nucleótidos en la plataforma TwistBioscience, además de encontrar el vector de clonación ideal para insertos de 1 500 pb, que posee un gen de resistencia al antibiótico ampicilina y reconoce las enzimas de restricción de inicio y fin, BamH1 y Not1, respectivamente. Las secuencias con tan solo la porción codificante de la proteína resultaron con un tamaño de aproximadamente 1 985 y 1958 pb (*AmAChE* y *VdAChE*, respectivamente), y al añadirles el vector los constructos finales rodearon los 4 2016 y 4 179 pb (*AmAChE* y *VdAChE*, respectivamente) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Resumen de las secuencias elegidas junto con el vector de clonación.

<b>Vector de colnación</b>	<b>Largo vector (pb)</b>	<b>Secuencia a insertar</b>	<b>Largo secuencia (pb)</b>	<b>Constructo final</b>	<b>Largo constructo (pb)</b>
pTwist Amp High Copy	2 221	Apis_AChE	1 985	Apis_ACHE_FL_Sf9	4 206
pTwist Amp High Copy	2 221	Varroa_Humanizada_AChE	1 958	Varroa_ACHE_FL_Humanized	4 179



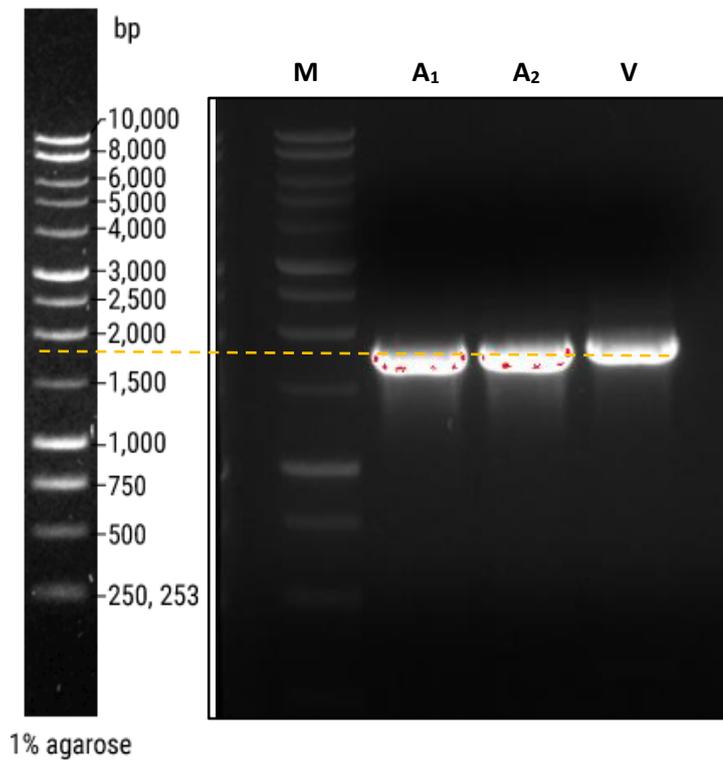
y para reducir los errores se optó por dos secuencias en reversa (el mismo *forward* para ambas posibilidades de *reverse*). Mientras que para *VdAChE* se eligió a la mejor secuencia *forward* y *reverse* posible, que cumplieran con las condiciones indicadas en la metodología, en la Tabla 6 hay un resumen de los cebadores diseñados para unirse a los plásmidos a través de un proceso de PCR.

**Tabla 7.** Cebadores diseñados en sentido 5' → 3', para Q5 como polimerasa.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Largo	Vol. Para 100 pmol/ µl	TM (°C)	GC (%)
Apis_FW	ACGCGGATCCCACCTAG TCATCGTTCGCGTC	31	119	73,5	61
Apis_Rev1	TGCGGCCGCGTTTACTC GTACCCGCCACC	29	125	75,2	69
Apis_Rev2	TGCGGCCGCCAGGTTTC CTTGGGTTCGAG	29	124	73,8	66
Var_Fw	GCCCGGATCCCAAGATA GCGAGGTCATTGCTAC	33	125	73,2	58
Var_Rev	TGCGGCCGCCATTCTTA TACCGCCCTTCCAG	31	128	73,5	61

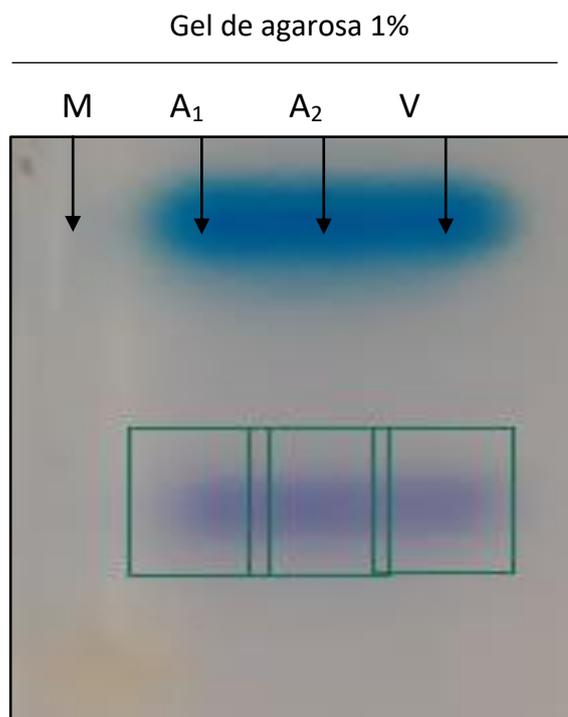
Como resultado de la amplificación por PCR de los plásmidos para *AmAChE* (Figura 10) y *VdAChE* (Figura 11), con sus respectivos cebadores, se obtuvieron las siguientes muestras: *AmAChE* con los cebadores Apis\_FW y Apis\_Rev1 (A1), el mismo plásmido con los cebadores Apis\_FW y Apis\_Rev2 (A2); y el plásmido para *VdAChE* con el cebador Var\_Fw y Var\_Rev (V). En la Figura 12, se aprecia el tamaño - largo de la secuencias de ADN obtenidas (como valor referencial el largo de *AmAChE* es de 1 984 pb y *VdAChE* de 1 857 pb, aproximadamente).





**Figura 12.** Resultados de la amplificación por PCR de las secuencias objetivo con los cebadores. A1: cebador Apis FW y Apis Rev1 (correspondientes a *AmAChE*); A2: cebador Apis FW y Apis Rev2 (correspondientes a *AmAChE*); y V: cebador Var Fw y Var Rev (correspondientes a *VdAChE*).

Debido a la ubicación de las bandas frente al marcador de pb, se infiere que las *AmAChE* están en la misma posición, por lo que ambos cebadores trabajan de la misma manera y cumplen la función de replicar la secuencia para la que fueron diseñados. El tamaño de la *VdAChE* es ligeramente mayor o igual a las bandas de apis. Los ADNs obtenidos, se sometieron al proceso de digestión con las enzimas de restricción BamH1 (inicio), Not1 (parada). Con el gel de agarosa se comprobaron los tamaños de los cortes de las enzimas (Figura 13), y se realizó una purificación de las bandas con la porción de gel que las contenía. Tras esto se almacenaron a -20 °C hasta su uso en la clonación de la proteína.



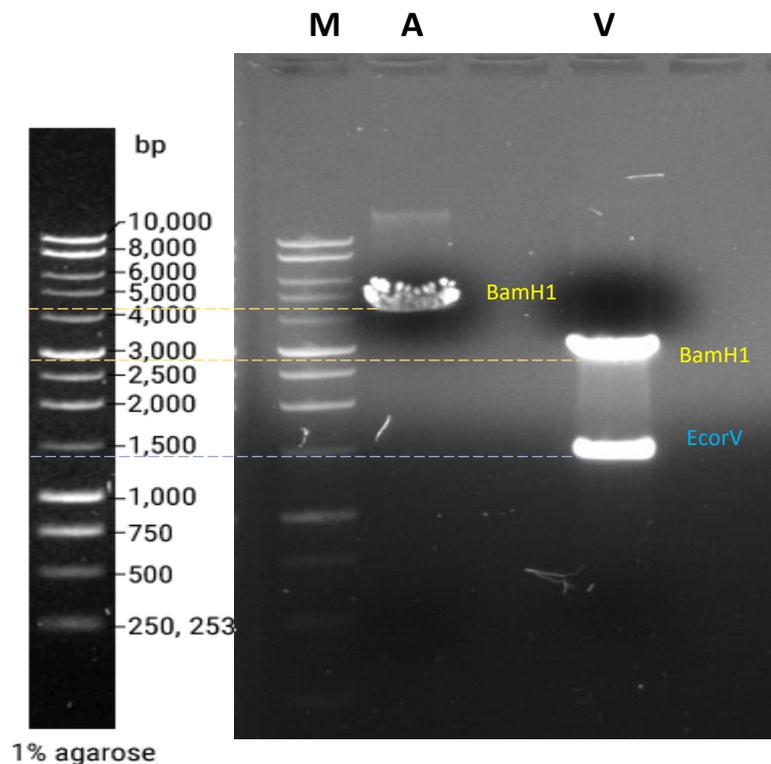
**Figura 13.** Gel de agarosa para purificar las secuencias de *AmAChE* y *VdAChE* digeridas con las enzimas BamH1 y Not1, contenidas en las bandas del gel. M: marcador, A1 y A2: *AmAChE*, V: *VdAChE*.

Al mismo se comprobó si la cantidad de ADN que se puede extraer de los inóculos hechos con *AmAChE* y *VdAChE*, es considerable o hay baja presencia de la misma. Para ello se cuantificó la presencia del ADN de la proteína objetivo en cada especie, después del tratamiento de tres preparaciones de inóculos. Al primer inóculo (para ambas especies) se lo consiguió tras agregar 200  $\mu$ l del resuspendido final en agar sólido; el segundo inóculo se consiguió al mezclar 20  $\mu$ l del resuspendido con 180  $\mu$ l de medio líquido LB Broth; y al último inóculo se lo consiguió con el protocolo de midi-prep (*Plasmid EasyPure*) con muestras de la inoculación 2, pero cultivadas en 120 ml de medio líquido LB Broth (Tabla 8).

**Tabla 8.** Concentración de ADN de las muestras de *AmAChE* y *VdAChE* en cada preparación de inóculos.

Mini-prep				Midi-prep	
Primera inoculación		Segunda inoculación		Tercera inoculación	
ADN	Concentración ( $ng/\mu$ l)	ADN	Concentración ( $ng/\mu$ l)	ADN	Concentración ( $ng/\mu$ l)
Apis	316,05	Apis 1	143,5	Apis	2 894,3
Varroa	235,35	Apis 2	177,65	Varroa	770
		Varroa 1	230,13		
		Varroa 2	226,65		

Para obtener las concentraciones del ADN resultante tras las inoculaciones, se analizó un microlitro de cada sustancia en el espectrofotómetro, para medir la concentración media del ADN en cuestión. A las muestras con la mayor concentración, es decir las logradas con la midi-prep, se le agregaron las enzimas de restricción, para *AmAChE*: BamH1 (corte esperado 4 206 pb) y para *VdAChE*: BamH1 (inicio con corte esperado a 2 861 pb) y EcorV (parada con corte esperado a 1 318 pb) y se corrió un gel de agarosa para comprobar y reconocer si las enzimas cortan las porciones correctas de pares de bases (Figura 14).



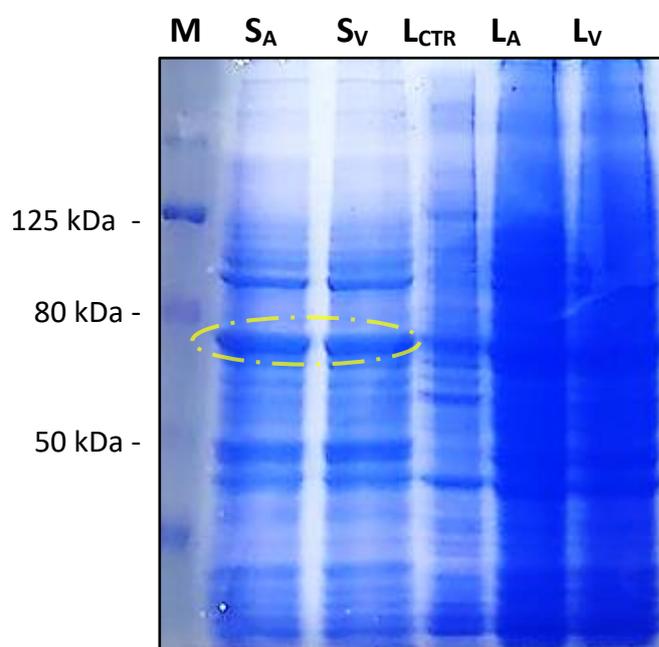
**Figura 14.** Tamaño del corte de las enzimas añadidas al ADN del plásmido con *AmAChE* (A) y *VdAChE* (V); marcador (M).

Se consigue una transfección a células de mamíferos (HEK293-F) de tipo estable por un método de transfección químico con el uso de moléculas catiónicas. Para la transfección del ADN de *AmAChE* y de *VdAChE* se usa un bote de 100 ml de HEK293-F (c/u), con un total de  $100 \times 10^6$  de células con un total de 100  $\mu$ g de ADN. El reactivo de transfección usado es el polímero sintético polietilenimina (PEI) y se evalúa la eficiencia de la transfección tras seis días de proceso. La evaluación de la viabilidad se realizó con el contador automático Celldrop con el análisis *Trypan Blue*. La información relevante sobre la transfección se expone en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Información sobre los resultados de la transfección de AmAChE y VdAChE recombinantes, tras seis días de cultivo.

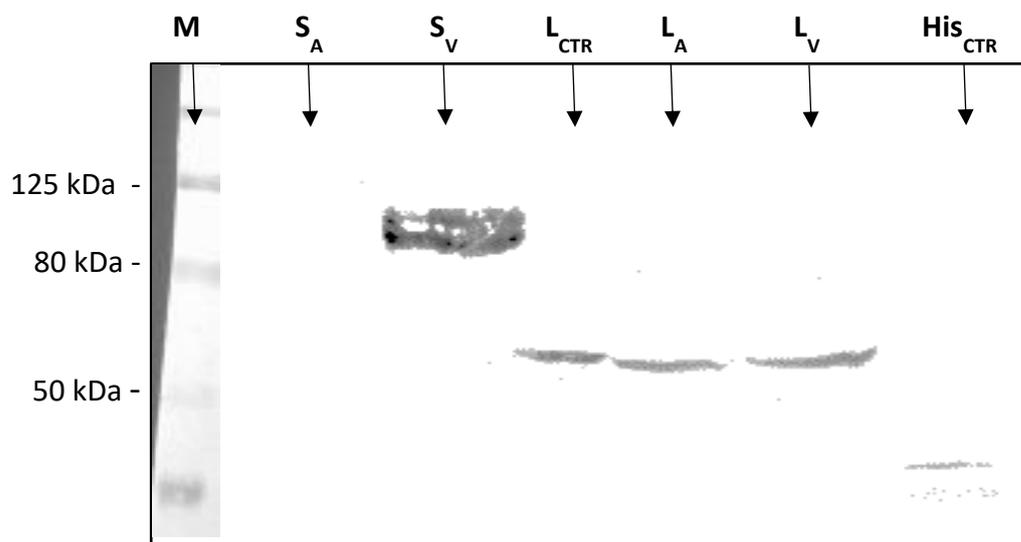
Resultados	<i>Apis mellifera</i>	<i>Varroa destructor</i>
% Viabilidad	80,1676	87,0683
Células totales/ ml	6,30 x 10 <sup>6</sup>	7,98 x 10 <sup>6</sup>
Células vivas/ ml	5,05 x 10 <sup>6</sup>	6,95 x 10 <sup>6</sup>
Células muertas/ ml	1,25 x 10 <sup>6</sup>	1,03 x 10 <sup>6</sup>

Con una viabilidad de células mayor al 80 %, tras el proceso de transfección de la proteína recombinante en las células HEK-F93, se evaluó la expresión y presencia de la acetilcolinesterasa en el sobrenadante y el lisado, tanto para la muestra de AmAChE como para VdAChE. Después de preparar los sobrenadantes y los lisados se corrieron las muestras en el gel SDS-PAGE al 10 %, tras la aplicación de una tinción *Comassie blue* se observa la presencia y expresión de la proteína con el peso esperado, pues la *AmAChE* y *VdAChE* tiene alrededor de 1 980 pb (Dulin et al., 2014), y conforme a las secuencias usadas en Benchling, por lo que entonces el peso aproximado de las proteínas es de 72 600 kDa, ubicados en el sobrenadante de cada transfección, como se aprecia en la Figura 15.

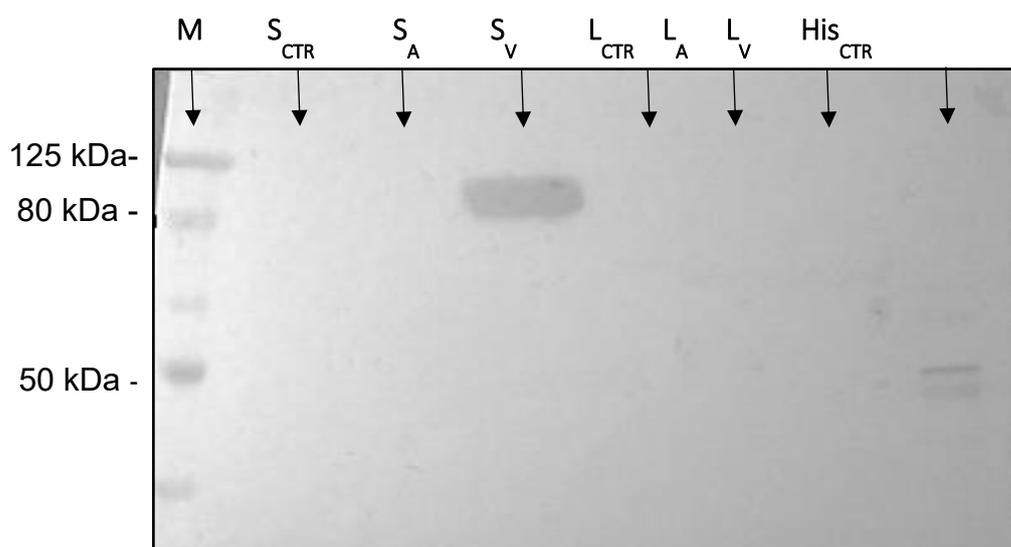


**Figura 15.** Tinción con *Comassie blue* para visualizar la expresión de las AChE recombinantes presentes luego de las transfecciones. Se aprecian cerca de los 80 kDa (círculo amarillo). M (marcador), S<sub>A</sub> (sobrenadante apis), S<sub>V</sub> (sobrenadante varroa), L<sub>CTR</sub> (lisado de control), L<sub>A</sub> (lisado de apis), L<sub>V</sub> (lisado de varroa).

Para comprobar los resultados y localizar solo a las proteínas de interés se realizó un *Western blot*, en donde únicamente se detecta la presencia de la AmAChE y VdAChE (Figura 16). Para corroborar este resultado, se realiza un segundo Wb, pero esta vez con el control del sobrenadante de las células utilizadas para la transfección, en donde se confirma únicamente la presencia de la VdAChE (Figura 17).

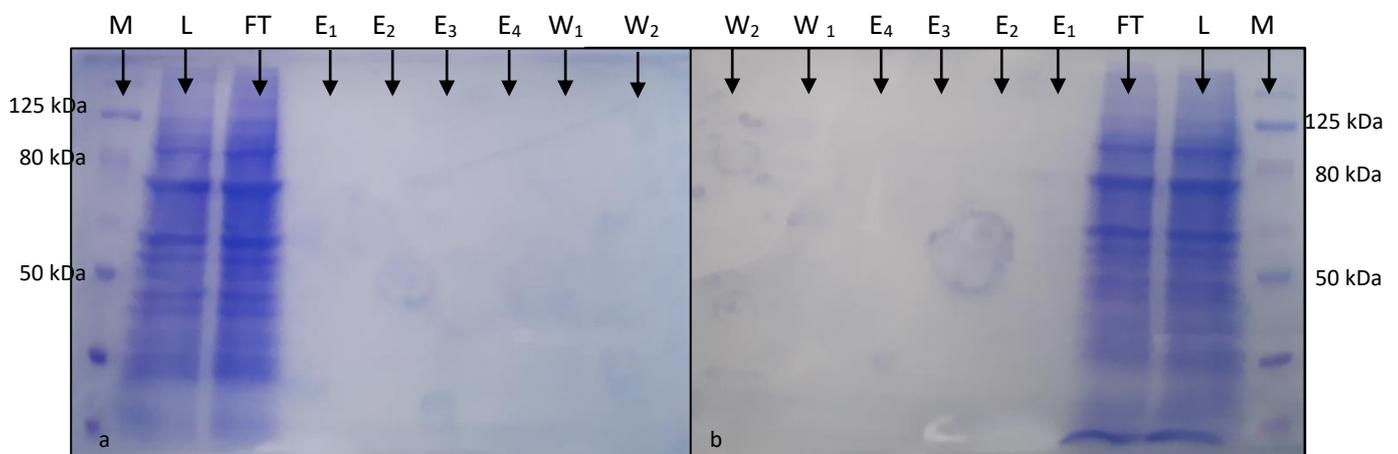


**Figura 16.** Resultados del segundo Western blot con la presencia del control del sobrenadante para visualizar la presencia y expresión de las proteínas objetivo. M (marcador), S<sub>CTR</sub> (sobrenadante de control), S<sub>A</sub> (sobrenadante apís), S<sub>V</sub> (sobrenadante varroa), L<sub>CTR</sub> (lisado de control), L<sub>A</sub> (lisado de apís), L<sub>V</sub> (lisado de varroa), His<sub>CTR</sub> (control de proteína con un tag de histidina).



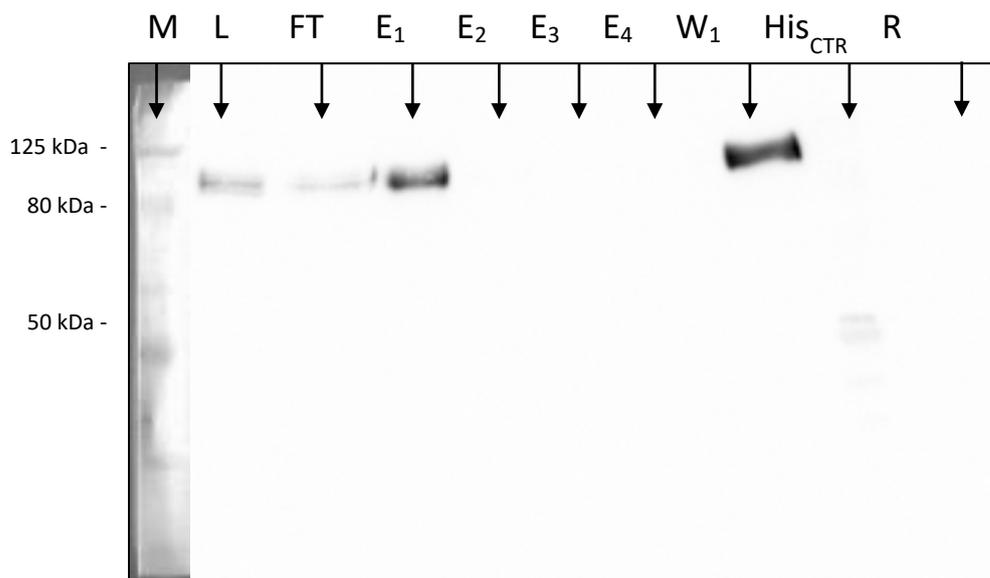
**Figura 17.** Resultado del segundo Western blot con la presencia del control del sobrenadante para visualizar la presencia y expresión de las proteínas objetivo. M (marcador), S<sub>CTR</sub> (sobrenadante de control), S<sub>A</sub> (sobrenadante apís), S<sub>V</sub> (sobrenadante varroa), L<sub>CTR</sub> (lisado de control), L<sub>A</sub> (lisado de apís), L<sub>V</sub> (lisado de varroa), His<sub>CTR</sub> (control de proteína con un tag de histidina).

Las purificaciones se realizaron para ambas proteínas, aunque tras los *Wb* no se verificó la presencia de AmAChE, ya que en la aplicación de *Coomassie blue* se constató la presencia de ambas proteínas recombinantes. Tras el proceso de purificación por cromatografía por afinidad al níquel de ambas proteínas se realizó un *Coomassie blue* para detectar la presencia de las proteínas. Sin embargo, la técnica no tiñó bandas del peso esperado en las eluciones, dando indicios de que la proteína no pudo ser aislada mediante este procedimiento, ya que existen otras proteínas y residuos tras la purificación, en las muestras de L y FT para apis y varroa (Figura 18).



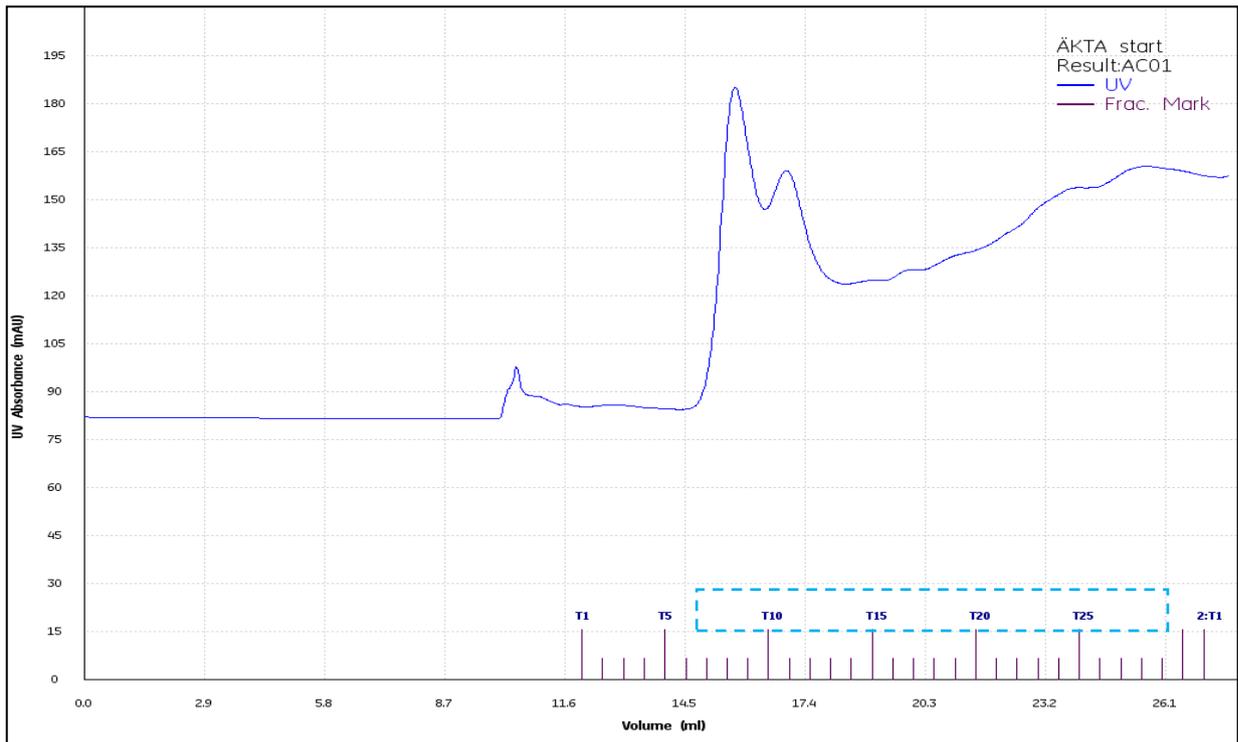
**Figura 18.** Resultados de la purificación por cromatografía de afinidad por lotes, con aplicación de *Coomassie blue* para localizar a la proteína en las eluciones. a) Gel con las muestras de AmAChE. b) Gel con las muestras de VdAChE. M (marcador), L (control inicial), FT (*flow through*), E<sub>1-4</sub> (eluciones), W<sub>1-2</sub> (lavados de la resina, se consideraron para esta prueba tan solo los dos primeros lavados).

La proteína detectada en las primeras pruebas de purificación (Figura 16 y 17) fue VdAChE recombinante, por lo que se decidió hacer únicamente un *Wb* con control de histidina para la muestra purificada de VdAChE. Con este nuevo *Wb* se verificó la presencia de proteína VdAChE en las muestras del primer lavado. Esto sugiere que la proteína se diluye rápidamente por la concentración de iones de sal del *buffer* de lavado de la resina, ya que en la elución 1 (E1) se detecta débilmente la presencia de la VdAChE recombinante (Figura 19).

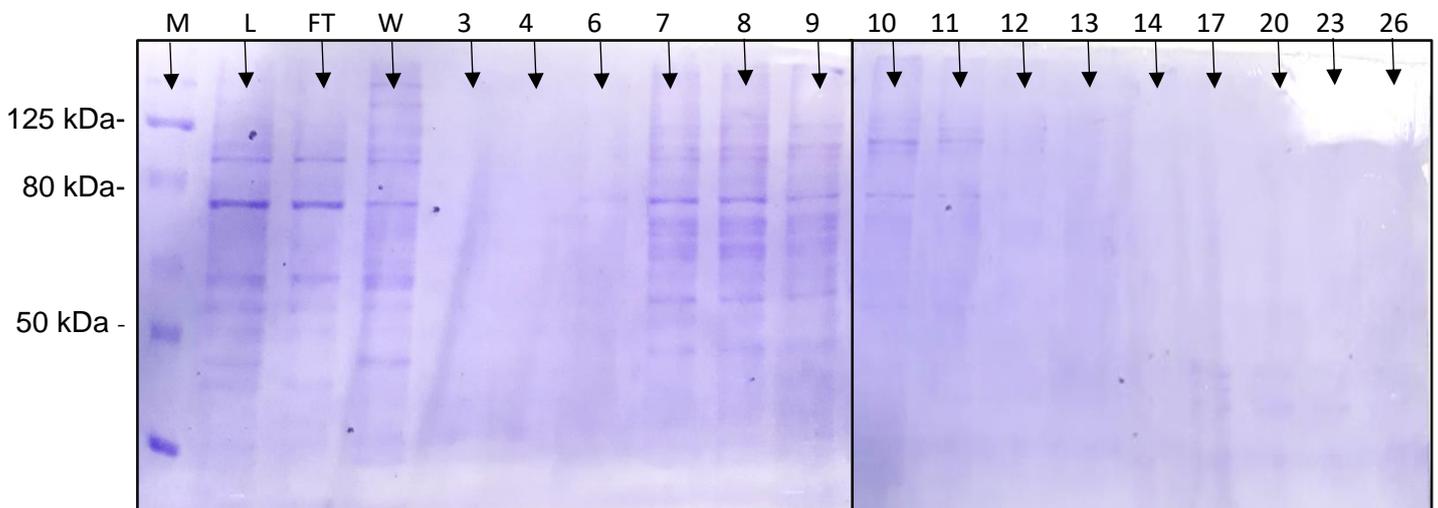


**Figura 19.** Resultados del *Wb* de la cromatografía de afinidad con perlas de níquel para VdAChE. M (marcador), L (control inicial), FT (*flow through*), E<sub>1-4</sub> (eluciones), W<sub>1</sub> (lavado de la resina, se consideró solo el primero), HIS<sub>CTR</sub> (control de histidina), Resina (*pellet* de la resina).

En los resultados de la cromatografía líquida se obtuvieron las bandas donde existe mayor concentración de proteínas en todo el sobrenadante de la muestra de VdAChE (Figura 20), que representan las fracciones de la muestra con proteínas. Se seleccionó desde la fracción 6 hasta la fracción 26 para evaluar la presencia de VdAChE y se realizó un proceso de *Comassie blue* (Figura 21).



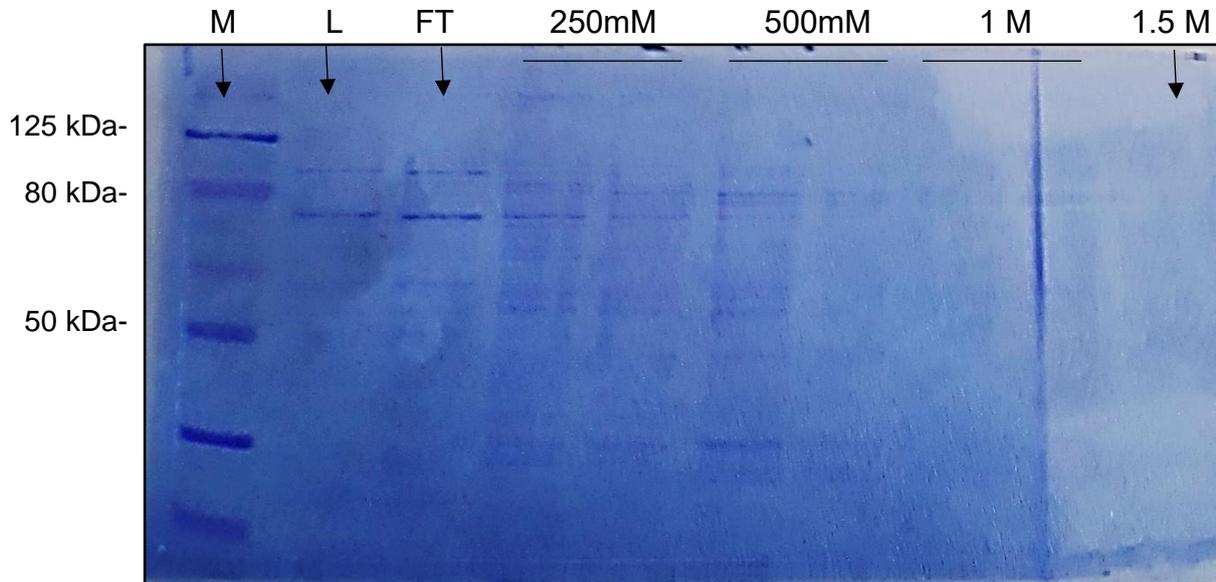
**Figura 21.** Fracciones con concentraciones de proteína en el sobrenadante de varroa, con respecto a la absorbancia de luz UV



**Figura 20.** Fracciones en las que se detectaron concentraciones de proteínas durante la cromatografía por afinidad. M (marcador), L (control inicial), FT (*flow through*), W (lavado), 3-14, 17, 20, 23, 26, (fracciones).

Ante la pureza obtenida con las purificaciones de la VdAChE, y la obtención de otras proteínas junto con ella, se realiza una purificación por cromatografía de intercambio iónico, con una diálisis previa. Cuando se obtuvieron las eluciones de la resina se elaboró un *Coomassie blue*

(Figura 22) para observar las eluciones, en donde se encuentran rastros de la proteína en L y FT, y levemente con concentración de 250 mM NaCl y 500 mM NaCl.



**Figura 22.** Coomassie blue de la purificación por cromatografía de intercambio iónico del sobrenadante de *Varroa*, con distintas concentraciones de sal (NaCl). M (marcador), L (control inicial), FT (*flow through*), 250mM, 500mM, 1M, 1.5M (concentraciones de NaCl) para las eluciones.

## 7. Discusión

La purificación de la Acetilcolinesterasa de *Apis mellifera* (AmAChE) y *Varroa destructor* (VdAChE), a partir de las secuencias nucleotídicas que codifican para este gen en ambas especies, revela su homología con la secuencia de AChE de *Homo sapiens* y demuestra que es posible diseñar y obtener las proteínas de manera recombinante a través de técnicas de clonación y expresión de ADN. Esto con el propósito de obtenerlas de forma funcional y someterlas a futuras pruebas con compuestos que inhiban la función catalítica específicamente de VdAChE y no afecten la actividad en AmAChE, y con ello contribuir a las nuevas generaciones de acaricidas biológicamente diseñados que actúen de forma específica con la especie de interés, con lo que las planificaciones en cuanto a frecuencia y dosis de uso disminuirán y los impactos ambientales que tienen los organofosforados en las fuentes de agua, suelo y aire se reduzcan, y los riesgos en la salud de las personas que también poseemos a la acetilcolinesterasa en nuestros sistemas nerviosos no se vean afectados por acumulación en el organismo. Con ello se busca garantizar de forma sostenible la supervivencia de las abejas

productoras de miel y polinizadoras, cuya estabilidad es imprescindible no solo para la economía de miles de productores, sino también para mantener el equilibrio ecológico de los ecosistemas y evitar cuantiosas pérdidas de biodiversidad alrededor del mundo.

Para la creación de las proteínas recombinantes, se analizaron estudios previos en donde se secuenciaba el genoma completo de las especies en cuestión, así como la secuenciación específica del gen de su acetilcolinesterasa, además artículos de caracterización fisicoquímica y de la actividad enzimática en distintas especies, así como los protocolos apropiados para las pruebas de purificación. Por ejemplo, para la obtención de las secuencias nucleotídicas de la *AmAChE* se analizó la investigación de Kim et al. (2012), que evalúa las propiedades de dos acetilcolinesterasas en esta especie: AmAChE2 que es la enzima objetivo de los insecticidas organofosforados y carbamatos, gracias al papel clave de la enzima que produce este gen en la neurotransmisión de las abejas, y AmAChE1 que tiene una actividad enzimática más baja que AmAChE2 y aparentemente no posee funciones neuronales en *Apis* spp., pero se une de forma específica a diferentes xenobióticos. Por estas razones y debido a los propósitos de este proyecto, se eligió a *AmAChE2* como la secuencia a usarse (secuencia sujeto - *subject sequence*), mientras que la secuencia de referencia (secuencia problema o *query sequence*) fue la *AmAChE* caracterizada por Ohara et al. (2005) y sobre la que Dulin et al. (2014) también realiza investigaciones de neurotransmisión.

Para seleccionar la secuencia sujeto de *VdAChE*, se usó la investigación de Dulin et al. (2014) mencionada anteriormente como punto de partida, ya que los autores caracterizaron la *AmAChE* y *VdAChE*, encontrando pocas diferencias entre ambas secuencias, y aunque la de *Varroa* se caracterizó de manera parcial cuenta con el sitio catalítico esencial en el subcentro esterásico, aunque con una pequeña mutación que no altera sus funciones, de acuerdo a los autores. Esto se confirmó con el proyecto del USDA-2019 (Cook, 2022) enfocado en la caracterización de la *VdAChE*, en donde usan el genoma parcial y que fue actualizado en 2017 (con aproximadamente 1 600 pb). Al no existir caracterizaciones del gen completo de la AChE en *Varroa*, fue necesario usar el gen de AChE de *Homo sapiens* como molde de alineamiento (o secuencia problema) en búsqueda de coincidencias o de regiones bien conservadas entre las secuencias de ambas especies y comprobar que tiene la parte codificante para la enzima. La

homologación entre secuencias no representó problemas al momento de la clonación y expresión de la proteína recombinante y garantizan la obtención de una secuencia estable.

La metodología usada para la obtención de la *AmAChE* y *VdAChE* fue empleada por primera vez en cuanto a las secuencias, y de acuerdo a los resultados obtenidos, la alta semejanza estructural entre las secuencias de la *AmAChE*, *VdAChE* y la AChE en *Homo sapiens*, sugiere que la enzima en las tres especies es codificada por un gen altamente conservado a partir de un ancestro en común (Flores, 1998). Por la relación y similitud entre las secuencias analizadas y basándonos en el modelo de *H. sapiens* como referencia, se asume que así como en todos los vertebrados existe una parte específica en la secuencia completa del gen de *AChE*, conocida como secuencia *FGESAG* (Jansz et al. 1959), en los organismos invertebrados que cuentan con AChE también podría existir *FGESAG*, que participa directamente con la acción catalítica de la enzima (Flores, 1998) y que ha sido sometida a distintas pruebas con sustancias como la prostigmina y fisostigmina (Fournier et al., 1992), para evaluar su capacidad de acción como inhibidores competitivos y que, ante su eficacia para evitar la unión con su sustrato, han rebelado el segundo subsitio (subsitio aniónico) de la enzima y han dejado sin actividad a la acetilcolinesterasa (Wilson y Bergmann, 1950; Flores, 1998).

Uno de los aspectos importantes por el cual los tratamientos actuales que emplean acaricidas para combatir la varroosis en las colmenas ya no son eficaces, se debe a que *V. destructor* genera resistencia a los compuestos organofosforados, y de acuerdo con Fournier et al. (1992) se debe al reemplazo de la fenilalanina por la tirosina en el “hueco del acilo” de la colinesterasa de algunos invertebrados, lo que les confiere ventajas evolutivas en cuanto a su fisiología y genética en comparación con ácaros que no son sometidos a sustancias químicas (Flores, 1998). Estas ventajas evolutivas se deben a la plasticidad del genoma y dichas mutaciones serán contempladas en la posteridad del proyecto, cuando el enfoque sea testear los inhibidores diseñados y su eficiencia ante las proteínas recombinantes creadas en esta parte de la investigación y ante individuos resistentes. Para ello será necesario contemplar las pruebas de Wilson y Bergmann (1950) como punto de partida, además de otros inhibidores competitivos como el edrofonio, tacrina, decametonio, propidio y BW284C551 (1,5-bis-(4-alildimetilamoniofenil) pentano-3-1 dibromuro), que también tienen efecto sobre la AChE (Changeux, 1966), el donepezilo, la galantamina y la rivastigmina usados en *H. sapiens* para

controlar enfermedades neuronales degenerativas (Birks, 2006). O como la proteína fasciculina proveniente del veneno de la serpiente *Dendroaspis angusticeps* (Smith, 1849) cuya bioquímica genera afinidad con la enzima y reemplaza al sustrato normal (Flores, 1998) y sería la línea más sustentable de desarrollar inhibidores con la menor cantidad de compuestos químicos nocivos para otras especies y para el ambiente.

Por otro lado, luego de la transfección de la proteína recombinante tanto de *A. mellifera* como de *V. destructor* en células HEK293-F fusionadas en el extremo N-terminal a una cola de seis histidinas (poli histidina) para facilitar su ubicación y purificación (Faraveli et al., 2021), únicamente fue detectable la VdAChE en el sobrenadante celular con el método de *Western blot*, pese a que en las pruebas de tinción de azul de *Coomassie* ambas proteínas pudieron ser observadas. Se descarta que la proteína de Apis se haya fraccionado, que la síntesis se haya truncado y dejado porciones de proteína con cola de histidina, o que existiera algún tipo de proteólisis en la expresión ya que no existen otras fracciones detectables en el Wb (Santo-Costa, 2015). Esto se podría atribuir a que la proteína correspondiente a Apis perdió su cola de polihistidina en el proceso de expresión o traspaso a la membrana durante el Wb, por ende los anticuerpos que están diseñados para detectar la poli histidina no funcionarían de ninguna forma (Riguero et al., 2020).

Cuando se realizó la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad IMAC (Figura 19), se puede observar una banda en la Elución 1, lo que significa que la proteína VdAChE está presente y que pudo adherirse a la resina, aunque débilmente, y que la mayor parte de la proteína se perdió en los lavados (Hernández, 2007), ya que el *buffer* de PBS usado para lavar las perlas de níquel de la resina con la proteína, contenía 137mM de NaCl, lo que posiblemente diluyó la proteína antes de la aplicación del Imidazol (Hernández, 2007; Riguero et al., 2020 ). En cambio, según el *Coomassie blue* de las fracciones de la purificación con el sistema AKTA Start, existen otras proteínas contaminantes que también son eluidas, posiblemente debido a la baja expresión de AChE, entonces estas compiten por los sitios de unión con el Ni<sup>+</sup> en la columna de afinidad y se eluye todo en presencia del Imidazol (Santos-Costa, 2015). Para evitar los contaminantes es importante eliminar el exceso de sales, a través de un *buffer* de Equilibrio con menor concentración de NaCl (Santos-Costa, 2015), hasta encontrar las condiciones apropiadas para mantener a AChE en su forma soluble. De igual

manera en la purificación por intercambio iónico de VdAChE, se observan contaminantes copurificados, posiblemente extractos pertenecientes a enzimas y proteína de las células HEK293-F con puntos isoeléctricos (PI) generales (7,5), muy cercanos al PI teórico de VdAChE (7.3) lo que dificulta la exactitud de la purificación (Paz, 2016). Todos los contaminantes y residuos que se expresan junto con la acetilcolinesterasa deberán ser eliminados con algún otro paso de purificación previo; por ejemplo, por exclusión molecular previo a la cromatografía por afinidad IMAC (Santos-Costa, 2015). Además, según lo mencionado por Abyntek (2017), que indica que las proteínas recombinantes con poli histidina expresadas en células de mamíferos, alcanzan no más de un 80% en la pureza de la purificación, precisamente porque las enzimas, proteínas y otras partículas presentan restos de histidina que también pueden interferir en la purificación, confirma y aporta con otra causa para la presencia de contaminantes en los resultados de las purificaciones por cromatografía líquida y por intercambio iónico.

Al emplearse las células modificadas y competentes TOP 10 de *Escherichia coli*, se verificó que el constructo se clona adecuadamente, la clonación del ADN recombinante se logró con excelentes resultados. Por otro lado, la expresión de las proteínas recombinantes en cepas modificadas de *E. coli*, pudiera encontrar algunas dificultades por la diferencia entre sistemas eucariotas y procariontes, ya que las AChE tienen pesos moleculares elevados (alrededor de 73 kDa) y son proteínas poco afines con los vectores bacteriológicos, más bien se visualiza para una expresión exitosa y la reducción del riesgo de degradación de las proteínas, optar por células de insecto, levaduras u otras células de mamíferos de bajo costo y fácil almacenamiento y preservación (Abyntek, 2017).

Al obtener una purificación aceptable de las proteínas, es necesario analizar y verificar que tengan actividad enzimática, que es el siguiente paso tras la purificación junto con las pruebas de inhibidores enzimáticos y su ajuste para lograr la especificidad. Y en caso de no lograr una producción de la proteína con una pureza aceptable para pruebas específicas, se podría considerar y testear la actividad y reacciones de la enzima AChE directamente en cada sobrenadante, a modo de comprobación de la presencia y expresión de la proteína.

## 8. Conclusiones

Se diseñaron proteínas recombinantes para la Acetilcolinesterasa de *Apis mellifera* y *Varroa destructor* (AmAChE y VdAChE, respectivamente), capaces de expresarse en células mamíferas (HEK 293-F) y clonarse en células bacterianas (TOP 10). Se confirmó la presencia del gen en las células a través de su ubicación por peso molecular en gel de agarosa 1%, de igual manera la espectrofotometría de masa contribuyó a calcular la concentración de ADN por cada microlitro del total de las muestras.

La *VdAChE* se obtuvo a partir de la homologación de la secuencia nucleotídica de su gen codificante para la enzima con el gen en *Homo sapiens*, y que tras los resultados obtenidos no tuvo ningún inconveniente para clonarse y expresarse, pero, pese a que está presente y puede unirse a la resina de níquel, no se logró purificar correctamente por cromatografía de afinidad, debido a que se pierden cantidades considerables de proteína, probablemente por la concentración de NaCl del *buffer* de lavado y la forma de lavado usada para este procedimiento. Para tratar nuevamente este método es necesario disminuir la cantidad de sal del *buffer* o cambiarlo completamente. En cambio, en la purificación por sistema AKTA Start y por intercambio iónico, existe la presencia de otras bandas, que generan contaminación ya sea con proteínas propias de las células mamíferas u otras proteínas, enzimas o moléculas, que son detectadas con pruebas como *Coomassie blue* y que disminuyen la calidad y pureza de la proteína para futuras pruebas.

Para la proteína recombinante AmAChE, el panorama actual es distinto, porque no se descarta que las células no hayan asimilado bien la secuencia nucleotídica o que en los procesos de adaptación celular, transferencia, asimilación y expresión la cola de poli histidina se haya perdido, volviendo a la proteína indetectable ante métodos como Wb. Pero, características como su punto isoeléctrico (PI) teórico (5.3), ofrecen una buena alternativa de purificación, que no dependen de la presencia de la cola de histidina. Ante cualquier método de purificación que se le aplique, es absolutamente necesario controlar la cantidad de sal a la que estará expuesta la proteína y desnaturalizar completamente su estructura secundaria.

Con un mejor grado de pureza, es necesario evaluar la calidad funcional de las proteínas recombinantes, según su capacidad de acción enzimática, y al mismo tiempo analizar si las estructuras proteicas están bien definidas. Estas pruebas quedan pendientes, previo a la aplicación de posibles inhibidores enzimáticos como segunda parte y continuación de este proyecto. Los resultados de las purificaciones permiten generar nuevas características y modificaciones en los protocolos a usarse para futuras cromatografías, así como experiencia en el diseño y manejo de proteínas recombinantes y en los procesos de purificación estándar.

Obtener las proteínas con un grado de pureza aceptable, permitirá continuar con la creación o diseño de inhibidores de su actividad enzimática, con el fin de determinar mecanismos que actúen únicamente sobre el ácaro *Varroa destructor* y que excluyan de reacciones secundarias a las abejas, insectos, artrópodos en general e incluso al hombre, garantizando sistemas de control eficientes y sostenibles con menor impacto ambiental y social, que permitan la conservación de las especies imprescindibles para el equilibrio ecológico, de sus servicios ecosistémicos y que al mismo tiempo represente ganancias económicas para el sector apícola mundial, para el sector agrícola y con ello se procure alcanzar una soberanía alimentaria incluso en lugares actualmente vulnerables.

## **9. Perspectivas a futuro y recomendaciones**

- Para la transfección en células mamíferas es importante que el constructo no tenga ATG, sitios de anclaje, ni señales peptídicas transmembranales.
- Al manejar proteínas recombinantes, es importante definir el uso que se le dará y el tipo de pruebas a las que necesitará someterse, para determinar el grado de pureza ideal y que la proteína cumpla con el objetivo de su construcción.
- La elección del tag de afinidad debe guardar relación con las células hospederas encargadas de la expresión, para garantizar la adaptación y expresión de la proteína recombinante y facilitar su purificación.
- Para continuar con las pruebas de purificación y encontrar el protocolo que mejor se adapte a las características de las proteínas recombinantes y de las células de transfección, se pretende purificar AmAChE y VdAChE usando sobrenadante fresco de la transfección

celular, y a través de una nueva prueba de *Western blot* y tinción con *Ponceau*, verificar que las bandas observadas en las pruebas anteriores, corresponden las proteínas de interés.

- Además hay dos maneras de mejorar la purificación por afinidad: reduciendo la concentración de cloruro de sodio (NaCl) en los nuevos *buffers* de lavado, aunque esto involucre la reducción en la calidad de la purificación; o clonando un enlazador entre la proteína y la cola de polihistidina, que permitirá una mejor exposición de la histidina para que interactúe correctamente con la resina de níquel, lo que probablemente reducirá la interacción molecular entre todas las proteínas presentes que pueden interferir en la purificación como en las pruebas realizadas por este proyecto. Una alternativa a la segunda opción, puede ser también el reemplazo de la cola de histidina por otro tag apropiado para proteínas secretadas.
- En caso de que AmAChE continúe presentando dificultades en la purificación por afinidad de la proteína, y antes de realizar cualquier modificación en el enlazador, se realizará otra purificación por intercambio iónico tomando en cuenta que su PI teórico es de 5,3 y mejora las condiciones y resultados de esta purificación. Además, para la purificación de cromatografía por afinidad, añadiremos 7 M de urea al *buffer Laemmli*, para desnaturalizar completamente la estructura secundaria de la proteína y mantenerla desplegada, que se cree que fue uno de los problemas para no detectar la poli histidina en el *Wb*.

## 10. Bibliografía

- Abyntek (2017). Tags para la purificación de proteínas recombinantes. <https://www.abyntek.com/tags-purificacion-de-proteinas-recombinantes/>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry ATSDR. (2007, 16 de octubre). *Cholinesterase Inhibitors: Including insecticides and chemical warfare nerve agents*. <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/cholinesterase-inhibitors/inhibitors.html>
- Aizen, M., Garibaldi, L., Cunningham, S. & Klein, A. (2008). Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current Biology*, 18, 1572–1575.
- Beker, M., Boari, P., Burachik, M., Cuadrado, V., Junco, M., Ledo, S., Lema, M., Lewi, D., Maggi, A., Meoniz, I., Noe, G., Roca, C., Robredo, C., Rubinstein, C., Vicien, C., & Whelan, A. (2016). Development of a construct-based risk assessment framework for genetic engineered crops. *Transgenic Res*, 25, 597–607.
- Benabent, M.R. (2015). Carboxilesterasas y Colinesterasa de cerebro de pollo: Interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Birks, J. (2006). Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews 2006*, Issue 1. Art. No.: CD005593.
- Burley, L., Fell, R., & Saacke, R. (2008). Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *J Econ Entomol*, 101: 1081-1087.
- Cajachagua, C.L. (2018). Elaboración de constructos genéticos para la expresión soluble de FimH de Salmonella entérica serovar Typhimurium. [Tesis de pregrado, Universidad Ricardo Palma], Lima, Perú. Repositorio [https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1676/Cajachagua\\_cl.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14138/1676/Cajachagua_cl.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Changeux, J. (1966). Responses of acetylcholinesterase from *Torpedo marmorata* to salts and curarizing drugs. *Mol. Pharmacol*, 2: 369-392.
- Claros, M., & González, G. (2022). Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular. <http://www.biorom.uma.es/contenido/Glosario/>
- COMAV (Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana). 2018. Bioinformatics and genomics.
- Cook, S. (2022). Honey bee (*Apis mellifera*) and Varroa mite (*Varroa destructor*) toxicity data. <https://doi.org/10.15482/USDA.ADC/1524789>.
- Del Puerto-Rodríguez, A., Suárez, S., & Palacio, D. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y epidemiología*, 52(3), 372-387.
- Dmitryjuk, M., Żółtowska, K., Frączek, R., & Lipiński, Z. (2014). Esterasas of Varroa destructor (Acari: Varroidae), parasitic mite of the honeybee. *Experimental and applied acarology*, 62(4), 499-510.

- Dulin, F., Zatylny-Gaudin, C., & Ballandonne, C. (2014). Protecting honey bees: identification of a new varroacide by in silico, in vitro, and in vivo studies. *Parasitol Res* 113, 4601–4610. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4150-z>
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3), 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>
- Faravelli, S., Campioni, M., Palamini, M., Canciani, A., Chiapparino, A., & Forneris, F. (2021). Optimized recombinant production of secreted proteins using human embryonic kidney (HEK293) cells grown in suspension. *Bio-protocol*, 11(8), e3998. 10.21769/BioProtoc.3998
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2018). Es hora de apreciar la labor de los polinizadores: Seis formas de mostrar nuestra gratitud a las abejas, las mariposas y otros polinizadores imprescindibles. <https://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1129811/>
- Fishel, F. (2018). Pesticides and Cholinesterasa, *Agronomy*, PI242.
- Flores, C. (1998). Purificación, disociación de subunidades e interacción con el anticuerpo AE-1 de la Acetilcolinesterasa de suero fetal bovino. Ensayos con proteína Quinasa A. <http://hdl.handle.net/10803/10734>
- Floris I., Cabras P., Garau V., Minelli E., Satta A., & Troullier J. (2001). Persistence and effectiveness of pyrethroids in plastic strips against *Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) and mite resistance in a Mediterranean area. *J Econ Entomol*, 94(4): 806–810.
- Fournier, D. & Mutero A. (1994). Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicol Pharmacol*, 108:19-31
- Fournier, D., Bride, J.M., Hofmann, F., & Karch, F. (1992). Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.* 278: 14270-14274.
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J. & Vaissière, B. E. (2008). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68, 810–821.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), 30-39.
- Gebel, E. (2013). Making insulin: A behind the scenes look at producing a lifesaving medication. *Diabetes forecast*
- Ghazoul, J. (2005). Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 367–373.
- Gisder, S. & Genersch, E. (2017). Viruses of commercialized insect pollinators. *Journal of Invertebrate Pathology*, 147, 51–59.
- Glavan, G., Kos, M., Božič, J., Drobne, D., Sabotič, J., & Kokalj, A. J. (2018). Different response of acetylcholinesterases in salt-and detergent-soluble fractions of honeybee haemolymph, head and thorax after exposure to diazinon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 205, 8-14.

- Gómez-Arias, L., Gómez, S., & Núñez, V. (2018). Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia en desarrollo*, 9(2), 9-16.
- González-Varo, J., Biesmeijer, J., Bommarco, R., Potts, S., Schweiger, O. & Smith, H. (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in Ecology and Evolution*, 28, 524–530.
- Green, E. (2022). Plásmido. Natinal Human Genoma Research Institute.
- Haarmann, T., Spivak, M., Weaver, D., Weaver, B., & Glenn, T. (2002). Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J Econ Entomol*, 95: 28-35.
- Hernández, M. (2007). Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli*.
- Jack, C., Kleckner, K., Demares, F., Rault, L., Anderson, T., Carlier, P. & Ellis, J. (2022). Testing new compounds for efficacy against *Varroa destructor* and safety to honey bees (*Apis mellifera*). *Pest Management Science*, 78(1), 159-165.
- Jansz, H., Brons, D., & Warrigan, M. (1959). Chemical natura of DF-binding sire of pseudocholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* 34: 573-575.
- Johnson, R. (2015). *Honey Bee Toxicology*. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434.
- Johnson, R., Ellis, M., Mullin, C., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, 41: 312-331.
- Kearns, C., Inouye, D., & Waser, N. (1998). Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 83–112.
- Kim, YH., Cha, DJ., Jung, JW., Kwon, HW., & Lee, SH. (2012) Molecular and Kinetic Properties of Two Acetylcholinesterases from the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7(11): e48838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048838>
- Klein, A., Vaissière, B., Cane, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S., & Kremen, C. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences*, 274, 303–313.
- Kwon D., Im J., Ahn J., Lee J., Clark J., & Lee S. (2010). Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the twospotted spider mite. *Pestic Biochem Physiol*, 96: 36-42.
- Lara, A. (2011). Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223.
- Medellín, R. (2012). Impacto del cambio climático en la apicultura. Campaña de Varroasis en México. UNAM, México.
- MAGAP (Ministerio de Agricultura y Ganadería) & AGROCALIDAD (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario). (2020). Manual de procedimientos para la atención de eventos sanitarios. Coordinación General de Sanidad Animal. (Programa Nacional Sanitario Apícola). <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/01/21.01.20-MANUAL-DE-PROCEDIMIENTOS-PARA-LA-ATENCION-DE-EVENTOS-SANITARIOS-1.pdf>

- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2019). Guía Técnica para la lucha y control de la Varroosis y uso responsable de medicamentos veterinarios con la varroa. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. España.
- Mitton, G. (2019). Resistencia a xenobióticos y procesos de detoxificación. Estudios moleculares en *Varroa destructor* y *Apis mellifera*. Centro de Investigación en Abejas Sociales. Universidad Nacional de Mar del Plata – CONICET
- NIH (National Human Genome Research Institute). (2022). Cebador. Glosario genético. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/cebador>
- NIH (National Human Genome Research Institute). (2022). Enzima de restricción. Glosario genético. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Enzima-de-restriccion>
- NIH (National Human Genome Research Institute). (2022). Plásmidos. Glosario genético. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Plasmido>
- National Research Council (USA). (2007). Status of pollinators in North America. Washington, DC: National Academy Press.
- Ohara, M., Takeuchi, Y., Asahina, K., Takeuchi, H., & Kubo, T. (2005). Gene expression of AChE gene in honeybee. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). (2021). Objetivos y metas de Desarrollo Sostenible 2030. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/>
- Paz, M. (2016). Expresión, purificación y caracterización de peroxirredoxinas recombinantes de *Fasciola hepática* y humanas: Clonado direccional de los genes codificantes para las triparredoxina peroxidasas de *Trypanosoma cruzi*.
- Pérez, J. (2005). Las abejas y el medio ambiente. *Ecologista*, 45.
- Rader, R., Bartomeus, I., Garibaldi, L. A. & Winfree, R. (2016). Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 146–151.
- Ramírez-Carreto, S., Miranda, B., & Rodríguez, C. (2021). Purificación de proteínas. Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM.
- Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. & Jackson, R.B. (2011). DNA tools and biotechnology. En *Campbell biology* (10° ed.), 408-435. San Francisco, CA: Pearson.
- Riguero, V., Clifford, R., Dawley, M., Dickson, M., Gastfriend, B., Thompson, C. & O'Connor, E. (2020). Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. *Journal of Chromatography A*, 1629, 461505.
- Rodríguez-Dehaibes, S., Otero-Colina, G., Sedas, V., & Jiménez, J. (2005). Determinación de la Resistencia de *Varroa destructor* a dos plaguicidas en Veracruz, México. *J. Apicult Res*, 44(3), 124-125.
- Rodríguez-Vivas, R., Hodgkinson, J., & Trees, A. (2012). Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3, 9-24.

- Rosenberry, T. (1975). Acetylcholinesterase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 103–218. doi:10.1002/9780470122884.ch3
- Rueda, P. (2013). Proteínas Recombinantes, ¿Cómo y para qué? VLPs: un ejemplo interesante. *Revista Sociedad española de Bioquímica y Biología Molecular*, 2. DOI: [http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_RPC.2013.07.1](http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2013.07.1)
- Sánchez-Chávez, G., & Salceda, R. (2008). Enzimas Polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), 44-51.
- Sandoval, A., Mena, M., Márquez, A. (2013). Capítulo 14: Vectores de clonación y expresión. En McGraw-Hill (Ed.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en la ciencia de la salud* (Capítulo 14). McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473&sectionid=102743892>
- Santos-Costa, L. (2015). Regulación redox de la actividad e interacción proteína-proteína de sirtuinas nucleares.
- Serrano, I. (2014). Estudio de las interacciones entre proteínas anti y proapoptóticas de la familia Bcl-2 en células vivas mediante BiFC. [Trabajo de fin de grado, Universidad de Zaragoza]. Repositorio <http://zaguan.unizar.es>
- Sharma, D. & Abrol, D. P. (2014). Role of pollinators in sustainable farming and livelihood security. En R. K. Gupta, W. ReyBroeck, J. W. van Veen y A. Gupta (Eds.), *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security* (pp. 379–411). Netherlands: Springer
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., & Graham, F. (2022). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 2293 cells. *The FASEB journal*, 16(8), 869-871. <https://dx.doi.org/10.1096%2Ffj.01-0995fje>
- Sobhani, D.V.M., Shojaii-Tehrani, M.D., Nikpour, M.D., & Noroozi-Rad, N. (2000). Drug and Chemical Poisoning in Northern Iran.
- Sammataro D., Untalan P., Guerro F., & Finley J. (2005). The resistance of Varroa mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *Internat J Acarol*, 31(1): 67-74.
- Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(4), 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>.
- Soreq, H., Ben-Aziz, R., Prody, C. A., Seidman, S., Gnatt, A., Neville, L. & Lipidot-Lifson, Y. (1990). Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G+ C-rich attenuating structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9688-9692.
- Sosenski, P., & Domínguez, C. A. (2018). El valor de la polinización y los riesgos que enfrenta como servicio ecosistémico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(3), 961-970
- Stout, J. & Morales, C. (2009). Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie*, 40, 388–409.
- Stryjewska A. Kiepurka K. Librowski T. & Lochyński S. (2013). Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological Reports*. 65: 1075- 1085.
- Teeters, B., Johnson, R., Elli, M., & Siegfried, B. (2012). Using video-tracking to

- assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environ Toxicol Chem*, 31: 1349–1354.
- Thompson, H., Brown, M, Bal, R., & Bew, M. (2002). First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in U.K. *Apidologie*, 33: 357–366.
- Vidal, C.J. (1981). Colinesterasas séricas. *Anales de la Universidad de Murcia (Ciencias)*, 235-252. <https://revistas.um.es/analesumciencias/article/download/102481/98041>
- Wilkin, D. (2016). Gene cloning-advanced. *En CK-12: conceptos avanzados de biología*.
- Wilson, L., & Bergmann, F. (1950). Studies on cholinesterase. VII. The active surface of acetylcholinesterase derived from effect of pH on inhibitors. *J. Biol. Chem.* K185: 479-489.
- Zhu, W., Schmehl, D., Mullin, C., & Frazier, J. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS One*, 9(1), e77547.

## 11. Anexos

### Anexo 1: Preparación de medios de cultivo

#### 1.1. Medio Líquido LB broth

- 12,5 g LB broth
- 500 ml agua miliQ.
- El agar se distribuye en 7 platos de cultivo (dos platos para cada plásmido y un plato para control).
- Concentración final de un plásmido en el agar = 200 ng/ 1µl.

#### 1.2. Medio Sólido Agar

*Para suspensión de muestras:*

- 12,5 g LB broth.
- 7,5 g Agar bacteriológico.
- 500 ml agua miliQ.

*Para resuspensión de muestras:*

- 250 ml del medio sólido agar.
- 250 µl ampicilina.
- Proporción de antibiótico = 1:1000.

### Anexo 2. Preparación de geles

#### 2.1. Gel de agarosa 1%

Concentración para aproximadamente 2 000 pb.

- 0,6 g de agarosa.
- 60 ml de *buffer* TAE, calentar.
- En la preparación tibia, agregar 3 µl de *Ethidium bromide*.

#### 2.2. SDS (Dodecilsulfato sódico)-PAGE (Gel de poliacrilamida para electrtoforesis) 10%

Se prepara en placa vertical, primero el running gel hasta que solidifique y luego se carga el stacking gel con la peinilla y se deja solidificar.

### 2.2.1. Stacking gel 5% (Gel concentrador)

S. Gel 5%	3 ml (1 gel)	6 ml (2 geles)
H <sub>2</sub> O milli-Q	2,1 ml	4,1 ml
30 % acrilamida mix	0,5 ml	1 ml
1 M TRIS (pH 6.8)	0,38 ml	0,75 ml
10 % SDS	0,03 ml	0,06 ml
10 % Persulfato de amonio (APS)	0,03 ml	0,06 ml
TEMED	0,003 ml	0,006 ml

### 2.2.2. Running gel (Gel separador)

R. Gel 10%	10 ml (1 gel)	20 ml (2 geles)
H <sub>2</sub> O milli-Q	4 ml	7,9 ml
30 % acrilamida mix	3,3 ml	6,7 ml
1.5 M TRIS (pH 8.8)	2,5 ml	5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,2 ml
10 % Persulfato de amonio (APS)	0,1 ml	0,2 ml
TEMED	0,004 ml	0,008 ml

## Anexo 3. Protocolos

### 3.1. Protocolo “PCR clean-up”

1. Ajuste de las condiciones de enlace del ADN para cada muestra (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, V). La cantidad de *buffer* NTI debe ser el doble del volumen de muestras de PCR a purificarse. En este caso a 45 µl de cada extracto de PCR se le agregaron 45 µl de H<sub>2</sub>O *RNase-free*, y a estos 90 µl de muestra resultante, se le añadieron 180 µl de NTI *buffer*, para un total de 270 µl de muestra a purificarse por cada extracto de PCR.



200 µL NTI/  
100 µL PCR

<p>2. <b>Unión del ADN:</b> La preparación anterior es vertida en cada columna, centrifugadas por 1 minuto a 10 000 rpm, luego se elimina el sobrenadante recolectado en cada microtubo.</p>	 <p>11,000 x g 30 s</p>
<p>3. <b>Lavado de la membrana sílica:</b> Se añaden 700 µl de <i>buffer</i> NT3 y se centrifuga a 10 000 rpm por 30 segundos. Se descarta el sobrenadante.</p>	 <p>700 µL NT3 11,000 x g 30 s <b>Recommended:</b> 2<sup>nd</sup> wash 700 µL NT3 11,000 x g 30 s</p>
<p>4. <b>Secado de la membrana sílica:</b> En seco se centrifuga nuevamente a la columna 10 000 rpm por 1 minuto. Se cambia cada columna a nuevos microtubos.</p>	 <p>11,000 x g 1 min</p>
<p>5. <b>Elución del ADN:</b> Agregar 15 a 30 µl de <i>buffer</i> NE, incubar las muestras a 37°C (baño María) por 1 minuto. Centrifugar todas las muestras a 10 000 rpm por 1 minuto.</p>	 <p>15–30 µL NE RT 1 min 11,000 x g 1 min</p>

### 3.2. Protocolo “Extracción de ADN de geles de agarosa” con *clean-up kit*.

<p>1. <b>Solubilizar el gel de agarosa:</b> Colocar las porciones de gel de agarosa con las bandas de ADN post digestión en nuevos microtubos. Para geles que contienen &lt; 2 % de agarosa, se dobla el volumen del <i>buffer</i> NTI. Por cada 100 mg de gel de agarosa, agregar 200 µl de <i>buffer</i> NTI (A<sub>1</sub> = 1 ml NTI + 500 mg gel; A<sub>2</sub> = 400 µl NTI + 200 mg gel; V = 800 µl NTI + 400 mg gel). Incubar las muestras por 5 a 10 minutos a 50 °C, y luego pasar por el vortex.</p>	 <p>200 µL NTI/ 100 mg gel 50 °C 5–10 min</p>
<p>2. <b>Unión del ADN:</b> En cada columna NucleoSpin, añadir 700 µl de las muestras derretidas y centrifugar a 10 000 rpm por 1 minuto. Descargar el sobrenadante. Cargar la columna con el volumen de muestra restante, en caso de ser necesario.</p>	 <p>11,000 x g 30 s</p>

<p>3. <b>Lavado de la membrana sílica:</b> Se añaden 700 µl de <i>buffer</i> NT3 y se centrifuga a 10 000 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante. Dependiendo del resultado, repetir el lavado.</p>	 <p>700 µL NT3 11,000 x g 30 s</p> <p><u>Recommended:</u> 2<sup>nd</sup> wash</p> <p>700 µL NT3 11,000 x g 30 s</p>
<p>4. <b>Secado de la membrana sílica:</b> En seco se centrifuga nuevamente a la columna 10 000 rpm por 1 minuto. Se cambia cada columna a nuevos microtubos de 1,5 ml.</p>	 <p>11,000 x g 1 min</p>
<p>5. <b>Elución del ADN:</b> Agregar 15µl de H<sub>2</sub>O <i>RNase-free</i> incubar las muestras a 37 °C por 1 minuto. Centrifugar todas las muestras a 10 000 rpm por 1 minuto. Agregar 10 µl de H<sub>2</sub>O <i>RNase-free</i> a cada tubo. Las muestras quedan listas para clonación.</p>	 <p>15–30 µL NE RT 1 min 11,000 x g 1 min</p>

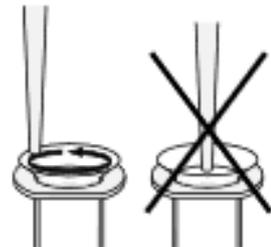
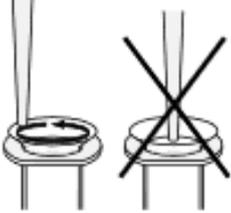
### 3.3. Protocolo “Nucleobond Xtra EF Plasmid Purification” (Mini – prep)

<p>1. <b>Cultivar y cosechar las células de la inoculación:</b> En 2 microtubos de 2 ml, colocar 1,75 ml de cada la muestra (uno para Apis y otro para Varroa). Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 °C y eliminar el sobrenadante. Repetir el proceso en los mismos tubos con el inóculo restante pero conservar aproximadamente 250 µl de inóculo sin purificar en sus respectivos tubos.</p>	
<p>2. <b>Lisis celular:</b> Agregar 250 µl de <i>buffer</i> A1 y resuspender el <i>pellet</i> completamente a través del vortex. Luego agrego 350 µl del <i>buffer</i> A2 (sin precipitados blancos, sino calentar y disolver), invertir gentilmente cada tubo 5 veces (evitar vortex). Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos o hasta que el lisado esté claro. Agregar 450 µl del <i>buffer</i> A3 e invertir cada tubo hasta que la muestra se vuelva transparente (No usar vortex).</p>	 <p>+ 150 µL A1 Resuspend</p> <p>+ 250 µL A2 Mix RT, 2 min</p> <p>+ 350 µL A3 Mix</p>

<p>3. <b>Clarificación del lisado:</b> Incubar las muestras 10 minutos en hielo, luego centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 °C.</p>	  <b>&gt; 12,000 x g, 3 min</b>
<p>4. <b>Unión del ADN:</b> Colocar la columna de purificación dentro de un microtubo de 2 ml y decantar el sobrenadante del paso 3 dentro de la columna, centrifugar por 30 segundos o 1 minuto a 13 000 rpm a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.</p>	  <b>Load supernatant</b>  <b>1,000– 2,000 x g, 30 s</b>
<p>5. <b>Lavado y secado de la membrana sílica:</b> Agregar 450 µl de <i>buffer</i> AQ en la columna, centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto a 4 °C. Descartar el sobrenadante y volver a centrifugar a 13 000 rpm por 1 minuto a 4 °C.</p>	  <b>+ 450 µL AQ</b>  <b>&gt; 12,000 x g, 1 min</b>
<p>6. <b>Elución del ADN:</b> Colocar la columna de purificación en un microtubo de 1.5 ml y agregar 50 µl de <i>buffer</i> AE (previamente calentado a 70°C hasta usarse). Centrifugar a 11 000 rpm por 1 minuto y eliminar la columna.</p>	  <b>+ 50 µL AE</b> <b>RT, 1 min</b>  <b>&gt; 12,000 x g, 1 min</b>

### 3.4. Protocolo “*Nucleobond Xtra EF Plasmid Purification*” (Midi – prep)

<p>1. <b>Cosechar las células bacterianas inoculadas:</b> Luego de pasar toda la noche en agitación a 37 °C, se traspasan las dos muestras de 120 ml c/u a tubos de plástico de 50 ml (en total tubos: Apis 1,2,3 y Varroa 1,2,3). Centrifugar todos los tubos a 4 000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante y almacenar los <i>pellets</i> a -80 °C hasta el día siguiente.</p>
<p>2. <b>Resuspensión:</b> Añadir 8 ml de <i>buffer</i> de resuspensión (<i>Resuspension Buffer RES-EF + RNase A</i>) a un tubo de Apis y 8 ml a un tubo de varroa, luego resuspender cada <i>pellet</i> y pasarlo a otro de los tubos, hasta resuspender los tres <i>pellets</i> de cada muestra y obtener un solo <i>pellet</i> resuspendido. Evitar aglomerados en el suspendido final.</p>
<p>3. <b>Lisis celular:</b> Añadir a cada tubo 8 ml de <i>buffer</i> para lisis (<i>Lysis Buffer LYS-EF</i>) a temperatura ambiente, entre 18 y 25 °C. Invertir gentilmente cada tubo 5 veces (No usar vortex). Incubar la mezcla a temperatura ambiente por 5 minutos.</p>

<p>4. <b>Equilibración:</b> Se deben equilibrar las columnas de purificación, junto con la columna de filtración con 15 ml de <i>buffer</i> de Equilibración (<i>Equilibration Buffer EQU-EF</i>). Se aplica el <i>buffer</i> en las paredes del filtro, no dentro de la columna y se deja vaciar el líquido.</p>	
<p>5. <b>Neutralización:</b> Añadir 8 ml de <i>buffer</i> para neutralización (<i>Neutralization Buffer NEU-EF</i>) al resuspendido e inmediatamente invertir cada tubo hasta que las muestras azules pierdan el color completamente (no usar vortex). Incubar en hielo por 5 minutos.</p>	
<p>6. <b>Clarificación y carga:</b> Asegurarse de tener una suspensión homogénea del precipitado invirtiendo cada tubo 3 veces directamente antes de aplicar el lisado a la columna de equilibrio, llenar la columna las veces que sea necesario y dejar que se vacíe por gravedad.</p>	
<p>7. <b>1er. Lavado de columnas:</b> Lavar las columnas y el filtro con 5 ml del <i>buffer</i> de lavado (<i>Filter Wash Buffer FIL-EF</i>). Y permitir que la columna se vacíe por gravedad.</p>	
<p>8. <b>Remoción del filtro.</b></p>	
<p>9. <b>2do. Lavado de la columna:</b> Lavar la columna de purificación con 35 ml del <i>buffer</i> de lavado (<i>Wash Buffer ENDO-EF</i>) y dejar a la columna vaciarse por gravedad.</p>	
<p>10. <b>3er. Lavado de la columna:</b> Lavar la columna de purificación con 15 ml del <i>buffer</i> de lavado (<i>Wash Buffer WASH-EF</i>), permitir que la columna se vacíe por gravedad.</p>	
<p>11. <b>Elucion:</b> Eluir el ADN cada plásmido con 5 ml del <i>buffer</i> de elución (<i>Elution Buffer ELU-EF</i>), previamente calentado a 50 °C hasta su uso. Colectar la elución en un tubo de 15 ml.</p>	
<p>12. <b>Precipitación:</b> Añadir 3,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente para precipitar la elución del ADN plasmídico. Usar vortex. Centrifugar cada muestra a 13 000 rpm por 30 minutos a 4 °C y cuidadosamente descartar el sobrenadante.</p>	
<p>13. <b>Lavado y secado:</b> Añadir 2 ml de <i>Endotoxin-free</i> 70 % EtOH a temperatura ambiente al <i>pellet</i>. Centrifugar a 11 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, cuidadosamente quitar completamente el etanol del tubo y permitir que el <i>pellet</i> se seque a temperatura ambiente.</p>	
<p>14. <b>Reconstitución:</b> Disolver los <i>pellets</i> de ADN <i>Buffer</i> TE-EF o H<sub>2</sub>O-EF, y disolver gentilmente el <i>pellet</i>. Se determina la concentración de ADN por espectrofotometría UV y se se confirma la integridad</p>	

del plásmido mediante una electroforesis en gel de agarosa 1 % cortando los plásmidos con las enzimas BamHI y EcoRV.

#### Anexo 4. Secuencias nucleotídicas utilizadas

Espece	Secuencia de aminoácidos	Secuencia nucleotídica
<i>Varroa destructor</i>	mvavmnrqfi caailvamaa vvsqgdsevi atatgpiqgk ilefegkkve tffgipyakp plgdlrfrkp vqvdausdvm mtkefskpcv qatyihgenv tidykdssed cltinvwkpw ggaekkpvmv flyggafqyg dsslfmndgl pfsaltdvif vsfnrvvgvf gflstrhnda pnegfydql lalkwvkqna nkfegdpeai tlyghsagaf svglhmyspl skglfkrvif esgtalslvt fqmknisrf htligltnes hsvysedkyk etmeclrkad ahdmidgish lglfadmflp iyddefipih plmpedvevl ngeevligtv tdegthfist plqnllaqgv dtaktqykvv pstiyprlfd apfgaiyhnf dqyfenalds ypdetaynli gqtygdavft cpanlfgef1 akrghavyry qfthrssmkl wpawmgvva tdlpymigsm ltqeknledp rynytpewfr khkftaeevk fskqlvrmig hfvktgkpti pdstgewpny saanqkyvnl apenisiaad gpkrdkcelw rpylirknet mtsststtkk pisfgpmkka ppkstkkskf aksnnyrkrl egrykndsfs avlstywtfs mimlmvtafs lyvrasac	atggtagcggatgatgatgcccgaattcata tgtgccgctatattagtggtatggcagcg gttgttagtgagcaggacagtgaagtgata gccacagcaactgggcccattcagggcaag attctggagtttgaaggtaaaaaggttgag accttctttggatcccttacgcgaagccg cccttaggggacctcgtttcagaaagcct gtgcaggctcagcgcctggagcgtatgcatg atgacgaaggagttctcaaagccctgcgta caggcagcgtatattcacggcgaaaatgta accatagactacaaagattcaagcgaagat tgtttgacgatcaatgtgtggaaacctcaa ggtggtgcagagaagaagcctgttatggct tttctttatggaggggctttcaataggt gactcaagcctgttatgaatgacggctctt ccgttttcggcacttacggatgtgatcttt gtgctgtttaactatcgtgtgggtgctttt ggctttttgagtacgcgacacaatgacgct cctggaaaacgaaggcttctacgatcagttg cttgcattaaagtgggtgaaacagaacgcg aataaatttgaaggatcctgaagcaata acgctatatggccatagcgtgggtgcattt tcagttggattgcacatgtattccccactg tcaaagggcctcttcaagcagtgatcttc gagtcaggtagcagcccttctgctcgttacc ttccagatgaagaacgaaatctctcgtttt cacacgcttattggtttgaccaactgtagt cacagcgtatattccgaggataaatacaaa gaaacgatggaatgcctccgtaaggccgac gcacatgatatgatcgtatggaatctccac cttggtctttttgctgatatgtttctgct atttacgacgatgagttcatcccattcac ccgctaagcccgaagacgtagaggtcctt aacggtgaggaggttcttataggcacagtg acggatgagggcactctattcattagtagc cctctacagaatcttctcgcacagggagtc gatacggccaagactcagtacaaaagtggtt ccgctgaccatttaccgagactgtttgat gcaccctttggagcgtatcaccataatttc gatcaatactttgagaacgcgcttgacagt taccocgatgaaaccgcttacaatttgatc ggtcagacgtacggagacgcccgttttcacc tgtccagcgaatttgttcggtgagtttctg gctaaacgtgggtcacgctgtctatcgttac cagtttactcaccgctcatcaatgaaacta
[XP_022663630 (aa)]		
[XM_022807895.1 (pb)]		

		<p>tggccagcatggatgggtgtcgtgcacgca  actgatttaccatataatgattggctcgatg  ctaaccaggaaaaaatcttgaggatcct  cgctacaattacacgccagaatggttccgt  aaacacaaattcactgctgaagaagtgaag  ttctcaaaacagctcgtccgaatgatagg  catttcgtgaagaccggcaaaccgacgatc  cctgactcgactggtagtgccctcggat  tcagcggctaatacagaagtacgtgaaccta  gccccgaaaatataatccatcgcggctgat  ggaccgaagagggacaagtgtgaactatgg  agaccctaccttatacgaaaaaacgaaacg  atgacatcgtcgacatctacaaccaagaag  ccgatttcttttgggccatgaagaaggct  ccacaaaatccacaaaaagtgcgaaattt  gctaaaagcaacaactaccgcaaacgactc  gagggacgctacaagaacgactcgttcagc  gctgtcttgagcacatattggacattctct  atgataatgcttatggtagacagcgttttcg  ctttatgtcagggctagtgcgtgtag</p>
<p><i>Apis mellifera</i></p> <p>[NP_001035320.1  (aa)]</p> <p>[XM_393751.7  (nucl)]</p>	<p>mttrilllff lllsctrps rgnavpssqr  gnvhndplvv ettsglvrgf prtvlidkev  vfygipfakp pigplrfrkp lpiepwhgvl  natvlpnscy qeryeyfpgf pgeemwnpnt  nisedclyln iwvpqkyrlr hkgdgsppgn  ggprngllpl lvwiygggfm sgtatldvyn  adimaatsnv iiasmqyrvg afgflylnkh  ftnseeapgn mglwdqalal rwlrdnaeaf  ggdpelitif gesaggssvs lhispvtrg  lvrrgilqsg tlnapwsyms gekanevati  lvddcgcnst mlnenparvm acmrsvdakt  isvqqwnsyw gilgfpsapt idgiflpkhp  ldllreadfk dteilignne negtyfilyd  fndifekdqa sflererflg iinnifknms  qiereaitfq ytdweevyng yiyqkmvad  vgdyfficps ihfaqlfadr gmkvyyffft  qrtstnlwge wmgvlhgdev eyvfghplnk  slkysdkerd lsrlmilyfs efaylgkptk  edsewpsysr depkyfifda ektglgkqpr  ttycafwnef lpklkgipdp xpntckvias  svsageeglg nslaitalss ilvlsvri</p>	<p>atgccgagaaaccgaaattccttgaccaag  ttcgaggtgctgatgggtgctaagcttaacg  gtgcttgttcagctggatgtgtgcaggtgc  accccgccccacagaagcagacatcacgcg  gacatgctcgtacgaagatacgtatgagctt  cgaagcggcgaggaattgcccagaccggcc  gccctcaattcgaacgacgatccactgatt  gttcagacaagaaagggaaggtcaggggt  aagaccatgaccgccaccacgggaaaggag  gtcgacacctggttcgggatcccttacgcg  cagaaacctctcgaatccctgaggtttcgg  catccaaggccagcggaaacgttggtcgggt  atattgaacgccaccacgttgccaacagc  tgcgtacaaattctggacaccgtgttcgggt  gagttcgcgggcgcgactatgtggaatccg  aacacgccgttgagcggaggattgcctttac  gtgaacgctcgtcgttccacgtcccaggcct  accaacgctgctgttatggatggatattc  ggtggtggtttctattccggatcggcaacc  ctggacgtttacgatcacaaaaccctgggtg  tccgaggagaaagtgtacctggtctcgtatg  cagtatcgcgtgcccagcctcgtttcctc  tacttcggaaccgccagacgttccctgggaac  gcaggcctcttcgatcaggtgatggcctc  gagtgggtccgcgacaatatcgccgcgttc  ggcggcaatcctgacaacgtcacgctgttc  ggggagagcgtggtgccgtttcagtttcc  atgcaccttcttcgcctctctcaaggcat  ctgttcaaccaggcgtatcatgcaatcgggt  tcgccgacggcaccctgggcgatcatctcg  cgcgaggagtcgatcgtgcgagggatcagg  ttggcagaggcggctcggttgtcctcacgat  cgggacaacctgcaggaggtgatcgattgc  ctccgcgtcaaggaccggctcagactgggtg  aagaacgagtggtgggacgcttggtatctgc  gagttcccgttcgtcccagtgatcgacggc  gctttcctcgacgagacgccgcaacgatcg  ttggccacctcctcgttcaaaaaggcgaac</p>

		<pre> atcatgatgggatcgaacaccgaggaaggt ttctactttatcatttattatctgaccgag ttgttccacatcgacgggtccgaggtaaag gtgagcagggagcagttcattagcgcggtt tccgaattaaaccgtagctcaatcaattc gggagggcgtgccattatctacgagtacacc gactggctccgccccgacgatccgcacgcg aatcgcgacgcgctggacaaaatcgtcggc gattatcagttcacttgcaacgtgaacgag ttcgccggccgttacaccgacactgggaac accgtttacatgtattattataagcacaga tcgatgaacaatccgtggccgagatggacc ggcgtgatgcacgctgacgagatcagctac gtgttcggcgaaccgttgatccgaccaag ggttacacgcccaggagggtgaatctgtcg aagaaaatgatgaggtattggggaatttc gcaaaaacgggggatccgaacgtaggggac gtggacgtgtggacgcaggcgtactggcca cctcacactgccgcgaagaaggaatacatg acgctggacacgaacagctcggaaatcggg aatgggcctagagtgaggcagtgcatat tgaaaaactatcttccccactggtcgcc ggcacttcgaagctggagccgaaagagacg tgcagcggtagagagtgaacgacggcgga cgggtgttgttgggttgagcctgggtgtg atcggcacgctgttcagccacaggatcgcg acccgcgcgtacgacgaggtaccggagata ttcgatccgaaagggttcgtctag </pre>
--	--	--

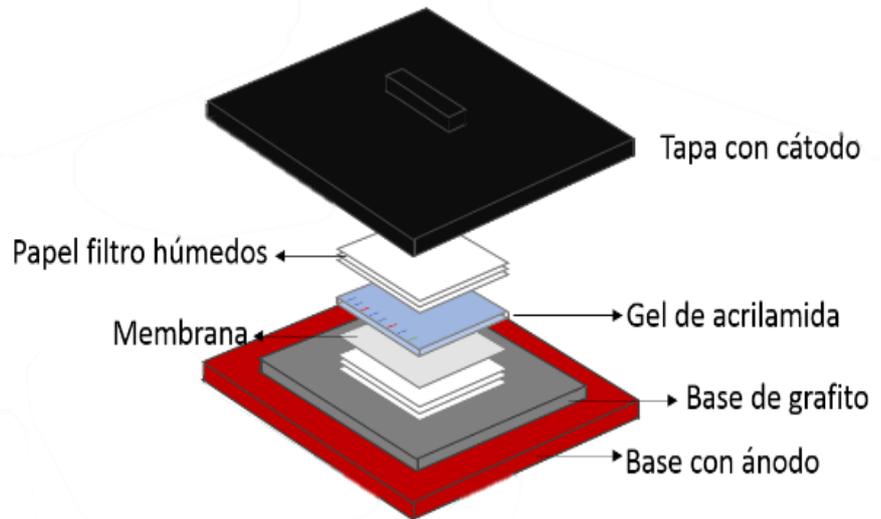
## Anexo 5. Técnicas para identificación de proteínas

### 5.1. Protocolo para la tinción *Coomassie blue*.

Una vez terminada la electroforesis de las muestras en SDS-PAGE 10 %, se transfiere el gel a una placa, para cubrirlo totalmente con solución *Coomassie blue brilliant*, durante 1 hora en agitación constante. Tras la hora se descarta el *Coomassie* (puede usarse 3 veces distintas), y se cubre al gel con la solución de desteñido por 1 hora y 30 minutos. Se elimina la solución y se agrega otra capa de solución de desteñido para que permanezca en agitación constante *overnight* (o/n)

### 5.2. Protocolo para Western blot.

Una vez terminada la electroforesis de las muestras en SDS-PAGE 10%, se transfiere el gel a una membrana, para facilitar la transferencia se arma un sánduche (Figura 13) con esponjas, papel y la membrana. Las esponjas deben haber sido lavadas con agua y agua destilada previamente, para iniciar se alinea la primera esponja en la tapa de color negro, humedecida con el *buffer* de transferencia, luego los dos papeles empapados en *buffer* de transferencia, luego la membrana hidratada en agua destilada, el gel sin burbujas, encima dos papeles humedecidos con el *buffer* de transferencia y finalmente la esponja humedecida con *buffer* de transferencia,



**Figura 23.** Estructura del sánduche de transferencia para *Western blot*.

todo debe quedar alineado y sin burbujas en ninguna capa. Luego se cierra la base y se conecta la tapa negra con la pared roja que es la que recibe la electricidad para que las proteínas pasen del gel hacia la membrana, la caja se llena con el *buffer* de transferencia, un imán y hielo, y luego se inicia la transferencia a 100 V, 230 A durante 1 hora.

Cuando la transferencia termina, se desarma el sánduche y se coloca la membrana en una placa pequeña para bloquearla con SM 5 % en *magic buffer* 1X (proteína de leche) por 1h en agitación constante. Luego se retira la leche y se corta la membrana para traspassarla a una caja más pequeña y se le agrega 5 ml de Anticuerpo primario Ab I Anti-his (Rabbit) 1:1000. La caja se cubre con *parafilm* y aluminio para permanecer a 4 °C en agitación o/n. Al siguiente día se retira el Ab I (puede ser reciclado), y se realizan 3 lavados, por lo que se aplica una capa de PBST 1X por 10 minutos en agitación, se elimina el *buffer* y se repite el lavado dos veces más.

Al finalizar los lavados, se agregan 5ml del anticuerpo secundario *Rabbit* HRP (anti-rabbit) en *magic buffer* 1:5000 por 2 horas. Luego se repiten los tres lavados con PBST 1X por 10 minutos c/u. Finalmente se coloca la membrana semiseca sobre un cristal, se la cubre gota a gota con

1200  $\mu$ l de solución para la inmunodetección (600  $\mu$ l de solución de peróxido + 600  $\mu$ l de luminol-enhacer), reposa 5 segundos con el líquido y tapado, luego se seca la mayoría y entra a quimioluminiscencia.

## **Anexo 6. Certificación de traducción del Abstract.**

Loja, 8 de octubre del 2022.

Yo, **Nohely Daniela Pullaguari Cano**, con cédula de identidad **1105899668**, en calidad de Licenciada en Idiomas Extranjeros, certificada por el Ministerio de Trabajo del Ecuador, certifico que la traducción del resumen del Trabajo de Integración Curricular con título **Pruebas tempranas para la purificación de la enzima recombinante Acetilcolinesterasa (AChE) de las especies *Varroa destructor* y *Apis mellifera*, para el desarrollo de acaricidas de precisión**, es precisa en mis capacidades como traductora certificada.

La tesis en mención es de autoría de la señorita **Fernanda Carolina Jaramillo García**, con cédula de identidad **1105805038**, estudiante de la carrea de **Ingeniería Ambiental** de la Universidad Nacional de Loja.

- I. Nohely Daniela Pullaguari Cano, certify that I am fluent in the English and Spanish Language and that the abstract of the thesis belonging to **Fernanda Carolina Jaramillo García**, is an accurate translation of its original Spanish version.

**Firma:**



---

**Lic. Nohely Pullaguari C.**