



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Evaluación *in vitro* de péptidos para su potencial uso como inmunógenos
contra *Anaplasma marginale*

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Julián Martínez Salgado

Director de tesis:

Dra. Lidia González Morales

Co-director: **Dra. Itzel Amaro Estrada**

CUERNAVACA, MORELOS

Noviembre, 2019

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Lidia González Morales (CEIB, UAEM) y la Dra. Itzel Amaro Estrada (CENID SAI, INIFAP).

Además de contar con el apoyo del comité tutorial conformado por el Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB, UAEM), la Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB, UAEM) y el Dr. Sabino Pacheco Guillén (IBT, UNAM).

El trabajo fue financiado a través del proyecto SEP CONACYT Ciencia Básica 252577 otorgado a IAE.

El trabajo fue apoyado a través de la beca CONACYT 479679 otorgado a JMS.

CONTENIDO

Tabla de contenido

RESUMEN.....	IV
TABLA DE FIGURAS.....	V
TABLA DE CUADROS.....	VI
TABLA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	VI
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	4
Enfermedad.....	4
Diagnóstico.....	6
Agente Causal.....	6
Transmisión.....	9
Ciclo de Vida.....	10
Control.....	11
Prevención.....	12
Inmunidad adquirida por el bovino contra <i>A. marginale</i>	13
Bacteriófago M13.....	15
Antecedentes del despliegue en fagos.....	18
Vacunas basadas en fagos.....	18
Aplicaciones del despliegue en fagos.....	19
Biblioteca C7C.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24

OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
ELISA de unión al fago	29
Secuenciación del DNA del fago.....	30
Análisis bioinformático	31
Evaluación antigénica de los péptidos (Ensayos ELISA)	31
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIÓN	45
PERSPECTIVAS	45
ANEXOS.....	46
Anexo 1. Soluciones	46
Anexo 2. Gráficas de ELISA completas (evaluación de 88 fago péptidos)	49
Anexo 3. Gráfica de ELISA (evaluación de 20 fagos)	50
REFERENCIAS	51
VOTOS DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS	61

RESUMEN

Anaplasma marginale es una bacteria Gram-negativa intraeritrocítica obligada del orden Rickettsiales, presenta una gran diversidad antigénica entre aislados geográficos, característica que se está estudiando por su importancia en el desarrollo de estrategias de control, cuya infección en bovinos causa anaplasmosis bovina, enfermedad infecciosa, no contagiosa que genera grandes pérdidas económicas en el ganado mexicano. En México no existe una vacuna comercial disponible.

Se ha demostrado la importancia de IgG2 en la respuesta inmune contra la anaplasmosis bovina. El ganado protegido contra el desafío homólogo muestra una respuesta que implica la producción de IgG2 pero no de IgG1, por ende, la IgG2 presente en el suero de bovino protegido puede ser útil para identificar ligandos relevantes. Además, el uso de bibliotecas de péptidos al azar ha permitido la identificación de moléculas relevantes en la respuesta a un patógeno, aun cuando estén en bajas cantidades o incluso que estén presentes solo durante la infección. Por lo tanto, las inmunoglobulinas presentes en el suero de los animales pueden ser útiles para la identificación de ligandos importantes en la respuesta del huésped a la infección.

Siendo el objetivo del presente trabajo, aislar y evaluar péptidos *in vitro* seleccionados por despliegue en fagos para su potencial uso como inmunógenos contra *Anaplasma marginale*.

Utilizamos la biblioteca de péptidos aleatorios Ph.D.™ -C7C del sistema de despliegue en fagos empleando recubrimiento directo con IgG2 purificada y sueros seleccionados de ganado bovino inmunizado contra *A. marginale*, generando una colección de fago-péptidos reconocidos y probados por ELISA.

Seleccionamos algunos candidatos y se determinó su secuencia de ADN; Identificamos siete secuencias de péptidos deducidas de la composición de nucleótidos. Los fago-péptidos seleccionados se evaluaron mediante ELISA realizado con IgG2 purificada de tres sueros inmunes diferentes, sueros inmunizados y sueros con infección positiva.

Diferenciamos tres fago-péptidos por sus propiedades de unión, especificidad, afinidad y estabilidad a los ligandos. Sin embargo, en el caso del desarrollo de vacunas o reactivos de diagnóstico, es importante evaluar las propiedades inmunogénicas y antigénicas de los péptidos.

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la anaplasmosis bovina en México.....	6
Figura 2. Anaplasma marginale dentro del eritrocito.....	7
Figura 3. Ciclo de vida de Anaplasma marginale, desarrollo en el bovino (Rodríguez et al., 2009).	11
Figura 4. Estructura esquemática de la partícula de fago de tipo silvestre Ff.	17
Figura 5. Esquema de una ronda de tamizado usando una librería desplegada en fagos.....	25
Figura 6. Fago péptidos evaluados en presencia de IgG2 y leche al 4%.	34
Figura 7. En esta gráfica se representan los resultados de la evaluación de 12 fago péptidos en presencia de IgG2 y Leche 4%.....	36
Figura 8. En esta gráfica se representan los resultados de la evaluación de 12 fago péptidos en presencia de IgG2 y Leche 4%.....	36
Figura 9. ELISA por duplicado de cada uno de los 6 fago péptidos amplificados en presencia de IgG2, Leche 4% y Gelatina 4%, bloqueada con Leche al 4%.	37
Figura 10. ELISA por duplicado de cada uno de los 6 fagos amplificados presencia de IgG2, Leche 4% y Gelatina 4%, bloqueada con Gelatina al 4%.	38
Figura 11. ELISA de los fago-péptidos seleccionados en presencia de IgG2 de los bovinos 135, 6761 y 6787, sueros hiperinmunizados, leche 4%, gelatina 4% y sueros positivos, bloqueada con Leche al 4%.	40
Figura 12. Evaluación ELISA de 2 rondas de selección. a) Evaluación ELISA de 1ª ronda de selección. b) Evaluación ELISA de 2ª ronda de selección.....	42

TABLA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>A. marginale</i> (Dumler et al., 2001).	8
Cuadro 2. Título de fago péptidos obtenidos en las rondas de selección utilizando IgG2 del Bov. 135.	33
Cuadro 3. Organización de las muestras en las placas de ELISA.	35
Cuadro 4. Secuencia del péptido desplegado en la proteína pIII del fago M13.	39
Cuadro 5. Título de fago péptidos obtenidos en las rondas de selección utilizando IgG2 de los Bov. 135, 6761 y 6787.	41

TABLA DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1. En estas gráficas se representan los resultados de la evaluación de 88 fago péptidos en presencia de IgG2 y Leche 4%.	49
Figura suplementaria 2. En esta gráfica se representan los resultados de la evaluación de 20 fagos en presencia de IgG2 y Leche 4%, bloqueada con Leche 4%.....	50

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados	CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
µg	Microgramo	Cys	Cisteína
µL	Microlitro	DMF	N, N-dimetilformamida
µm	Micrómetro	DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>A. marginale</i>	<i>Anaplasma marginale</i>	DO	Densidad óptica
ABTS	Ácido 2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ala	Alanina	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
BcePred	Servidor de predicción de epítos continuos de células B	Ej	Ejemplo
BCPred	Servidor de predicción de epítos celulares tipo B	ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
BDB	Banco de datos de <i>biopanning</i>	Etc	Etcétera
Bov	Bovino	ExpPASy	Sistema Experto de Análisis de Proteínas, por sus siglas en inglés "Expert Protein Analysis System"
BSA	Albúmina de suero bovino	Gly	Glicina
CD4+	Linfocitos T colaboradores	H ₂ O	Agua
CEIB	Centro de Investigación en Biotecnología	HCl	Ácido clorhídrico
cELISA	Ensayo por inmunoabsorción competitivo ligado a enzimas	Hgo	Hidalgo
CENID-SAI	Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad	Hrs	Horas
		I	IgG2

IgG1	Inmunoglobulina subclase G1	Msp1	Proteína principal de superficie 1
IgG2	Inmunoglobulina subclase G2		
IgM	Inmunoglobulina M	Msp2	Proteína principal de superficie 2
IL	Interleucina		
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias	Msp3	Proteína principal de superficie 3
		Msp4	Proteína principal de superficie 4
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	Msp5	Proteína principal de superficie 5
KCl	Cloruro de potasio		
kDa	Kilodalton	Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
		Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico	NaCl	Cloruro de Sodio
LB	Luria Bertani	NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
LBtope	Servidor de predicción de epítomos celulares lineales tipo B	NaI	Yoduro de sodio
		ng	Nanogramo
M	Molar	nm	Nanometro
mg	Miligramo	PBS	Tampón fosfato salino, por sus siglas en inglés “Phosphate buffered saline”
Min	Minutos		
mL	Mililitro		
mM	Milimolar	PCR	Reacción en cadena de polimerasa
MMP-1	Matrix metaloproteinasa 1	PEG	Polietilenglicol
Mor	Morelos	PepBank	Base de datos de péptidos

pfu	Unidades formadoras de placa, por sus siglas en inglés “plate forming units”
pH	Potencial de Hidrógeno
PhD	Despliegue en fagos, por sus siglas en inglés “Phage display”
pmol	Picomol
rMSP5	Proteína principal de superficie 5 recombinante
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sueros
Ser	Serina
ssDNA	Ácido desoxiribonucleico monocatenario
TC	Tetraciclinas
Th	Linfocitos T helper
Th1	Linfocitos T helper 1
Th2	Linfocitos T helper 2
UAEM	Universidad Autónoma de Estado de Morelos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

Anaplasma marginale es una bacteria Gram negativa del orden de los Rickettsiales, cuya infección en el ganado bovino puede causar la anaplasmosis bovina, enfermedad infecciosa, no contagiosa, caracterizada por inducir fiebre, anemia, debilidad general, abortos, depresión, anorexia, pérdida de peso, palidez de las membranas mucosas, disminución en la producción de leche e incluso la muerte (Araújo *et al.*, 2008; Dark, Al-Khedery & Barbet, 2011).

La anaplasmosis bovina es de distribución mundial, encontrándose una mayor prevalencia en regiones tropicales y subtropicales, e incluso está presente en zonas templadas (Rodríguez *et al.* 2000). Ocasiona severas pérdidas económicas, sobretodo en animales que se mueven de zonas libres a zonas endémicas o viceversa (Rodríguez *et al.*, 2009).

Anaplasma marginale se transmite de forma biológica, ya sea por medio de garrapatas (Rodríguez *et al.*, 2009) o de forma transplacentaria de vaca a becerro (Rey-Valeiron, Aso & Coronado, 2003), además de la transmisión mecánica mediante el uso de instrumentos contaminados con sangre infectada y mordeduras de insectos hematófagos como son las moscas y los mosquitos (Reinbold *et al.*, 2010).

La rickettsia *Anaplasma marginale* presenta alta diversidad antigénica entre aislados geográficos, característica que está siendo estudiada por su importancia en el desarrollo de estrategias de control. La forma más eficiente de prevenir la enfermedad sería con el uso de vacunas, conjuntamente con el control de los vectores y buenas prácticas veterinarias. Sin embargo, las vacunas inactivadas son de uso restringido y sólo producidas regionalmente y por pedido; mientras que las vacunas atenuadas se usan en animales jóvenes (Palmer, Brown & Rurangirwa, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003, 2009). En México no se cuenta con una vacuna comercial disponible y las pérdidas económicas a causa de la anaplasmosis bovina siguen vigentes.

Como parte de las recientes investigaciones acerca del desarrollo de vacunas que cubran un amplio espectro a nivel nacional, se busca que las proteínas cumplan con las características deseables de un agente vacunal, es decir, que sean proteínas expuestas en la superficie, preferentemente que tengan alguna función vital o de virulencia, altamente conservadas entre cepas de distintas regiones y contar con epítomos tipo B inmunorrelevantes (Rodríguez *et al.*, 2003).

Las inmunoglobulinas están presentes en los sueros sanguíneos de los animales y pueden ser de utilidad para la identificación de ligandos importantes en la respuesta del hospedero a la infección. Estudios de los isotipos de las inmunoglobulinas G del bovino muestran que IgG2 participa en la resolución de procesos infecciosos, tales como la anaplasmosis bovina, ya que estos anticuerpos de animales inmunes opsonizan eritrocitos infectados para que estos, sean rápidamente fagocitados, en contraste con IgG1, que no logra mediar la fagocitosis por neutrófilos o monocitos (Rodríguez *et al.*, 2003).

Específicamente, se ha comprobado la importancia de la producción de inmunoglobulinas de subclase G2 (IgG2) en la respuesta inmune contra anaplasmosis, mediante la inoculación de bovinos con extractos de membranas de la rickettsia, los animales protegidos contra desafío homólogo presentan una respuesta de tipo Th1 que involucra inmunoglobulinas IgG2 pero no IgG1, lo que también sucede al vacunar animales con cuerpos iniciales purificados de la rickettsia y desafiados en forma heteróloga, demostrando la importancia de IgG2 en los procesos de respuesta inmune contra *A. marginale* (Brown, Zhu, *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 2012).

El principio básico del despliegue en fagos

La tecnología de despliegue en fagos consiste en exponer péptidos, proteínas o anticuerpos en la superficie de partículas de fagos. Una característica importante de este sistema es la relación directa de la proteína (péptido o anticuerpo) expresada en la superficie de un fago al gen que la codifica mediante la fusión del gen de esta proteína (péptido o anticuerpo) al gen que codifica una proteína de la cápside del fago como la proteína pIII o pVIII. Las partículas de fagos que presentan proteínas en sus superficies pueden ser seleccionadas con una diana de interés (llamado un antígeno) inmovilizada sobre una superficie de poliestireno o acoplada a partículas magnéticas. La diana tiene que tener cierta afinidad a la proteína expuesta en la superficie del fago para capturar esos fagos; aquellas partículas de fagos que no se unan a la diana de interés son eliminadas mediante sucesivos lavados. Las partículas de fagos capturados son recuperadas y utilizadas para infectar *E. coli* y permitir la amplificación de estos fagos que serán utilizados en un nuevo ciclo de tamizado. De esta forma, se puede seleccionar de una gran población de fagos que expresen péptidos en su superficie, uno o varios clones que se unan de forma específica a una diana de interés. Para realizar los pasos de selección o “biopanning” es necesario tener una

biblioteca de péptidos cuando se quiere seleccionar un péptido frente a anticuerpos u otras moléculas.

Posteriormente, las proteínas o péptidos seleccionados son caracterizados evaluando su capacidad de unión a la proteína diana, especificidad, afinidad, estabilidad y otras propiedades de interés. En el caso del desarrollo de vacunas o reactivos de diagnóstico es importante evaluar las propiedades inmunogénicas y antigénicas de las moléculas.

El uso de bibliotecas de péptidos diseñados a partir de una molécula o bien de composición aleatoria (*Random peptides libraries*) ha permitido también la identificación de ligandos reconocidos por antisueros policlonales específicos de alguna infección o enfermedad y ha resultado exitosa para la identificación de epítomos relevantes de diferentes proteínas virales empleando sueros de pacientes infectados (Folgori *et al.*, 1994; Dybwad *et al.*, 1995). Con esta tecnología ha sido posible la identificación de moléculas relevantes en la respuesta a un patógeno, aun cuando estén en bajas cantidades o incluso que estén presentes solo durante la infección (Vispo *et al.*, 2015).

Ante la necesidad de contar con un inmunógeno de uso regional o universal para inducir una respuesta inmune contra la infección por *Anaplasma marginale* se plantea el tamizado de librerías de péptidos aleatorios para la obtención de ligandos que puedan ser útiles en el diseño de vacunas, así como en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina.

MARCO TEÓRICO

Enfermedad

La anaplasmosis bovina es una enfermedad causada por la bacteria Gram negativa *Anaplasma marginale* (Dumler *et al.*, 2001). La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa pero no contagiosa (Aubry & Geale, 2010) que se encuentra distribuida en regiones tropicales, subtropicales (Rodríguez *et al.*, 2000) y regiones montañosas o semiáridas en el mundo (Aboytes, Rodríguez & Vega, 1994).

Esta enfermedad afecta a los bovinos y otros rumiantes, tales como; ovejas, cabras y diversos ungulados salvajes (Kuttler, 1984), estos reportes hacen notar que estas especies son susceptibles a la infección, pero en raras ocasiones desarrollan la enfermedad de forma grave. En el ganado bovino que es susceptible de manera natural, los animales que logran recuperarse de la infección aguda permanecen infectados de por vida (Reinbold, *et al.*, 2010) y sirven como reservorios de la bacteria para transmisión mecánica e infección por garrapata hacia ganado no infectado (De La Fuente, Van Den Bussche & Kocan, 2001; Kocan *et al.*, 2004).

El ganado infectado con *A. marginale* desarrolla una infección aguda que puede alcanzar valores de 10^7 y 10^9 eritrocitos infectados por mililitro de sangre y es en esta fase en donde ocurre la enfermedad clínica, donde se muestran diferentes síntomas y signos clínicos (Aubry and Geale, 2010). El ganado que sobrevive a la infección aguda, queda resistente a la infección clínica, pero mantiene una infección persistente de por vida. En este estado, los niveles de rickettsemia se mantienen muy bajos, entre 10^2 y 10^6 eritrocitos infectados por mililitro de sangre, no obstante, el ganado funge como reservorio del patógeno y puede transmitir la enfermedad a otros bovinos (Scoles, Miller & Foil, 2008; Aubry & Geale, 2010).

La anaplasmosis bovina aguda se caracteriza por anemia severa, ictericia y hemoglobinuria debido a la remoción de células infectadas, algunos síntomas clínicos incluyen fiebre, pérdida de peso, abortos, somnolencia, depresión, debilidad, ictericia, disminución en la producción de leche y en algunos casos la muerte en animales mayores de dos años y en animales con afectaciones severas (De La Fuente *et al.*, 2002; Kocan *et al.*, 2003).

La bacteria invade eritrocitos maduros mediante endocitosis, dentro de ellos se divide por fisión binaria. Está demostrado que *A. marginale* infecta eritrocitos maduros circulantes en rumiantes

domésticos y silvestres e invaden células endoteliales de bovino (Carreño *et al.*, 2007). El periodo de incubación de *A. marginale* varía de acuerdo a la cantidad de material infectado que se inyecta: de 3 a 4 semanas o más si es por transmisión por garrapatas y, de 1 a 5 semanas por inoculación de sangre (Rodríguez *et al.*, 2009).

La anaplasmosis bovina es una de las enfermedades con mayor impacto en la industria pecuaria, es de distribución mundial y la causante de grandes pérdidas económicas en los lugares en los que es altamente endémica (Rodríguez *et al.*, 2009), ocasionando costos de tratamientos, medidas preventivas y de control de vectores, afectando de manera importante la producción mundial ganadera (Rodríguez *et al.*, 2003; Dark, Al-Khedery & Barbet, 2011).

México, es un país donde esta enfermedad es prevalente y el riesgo de contagio hacia animales susceptibles es alto. En nuestro país existen zonas con una prevalencia mayor al 50%, ubicadas principalmente en la zona del Golfo de México, abarcando estados como Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Chiapas, Tabasco y otros estados del Pacífico como Sinaloa y Nayarit. La zona con prevalencia entre 10% y 50% se ubica en el sur, sureste y centro del país. Los estados de Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Sonora, Baja California, Chihuahua, Coahuila y Nuevo León se encuentran en la zona con prevalencia entre 1 al 10%. Las zonas más áridas son las menos afectadas dado que no cuentan con las condiciones ideales para la cría del ganado, es por ello que la zona del norte del país se mantiene con baja prevalencia de la enfermedad (figura 1) (Fragoso-Sánchez, 1991; Rodríguez *et al.*, 2009).

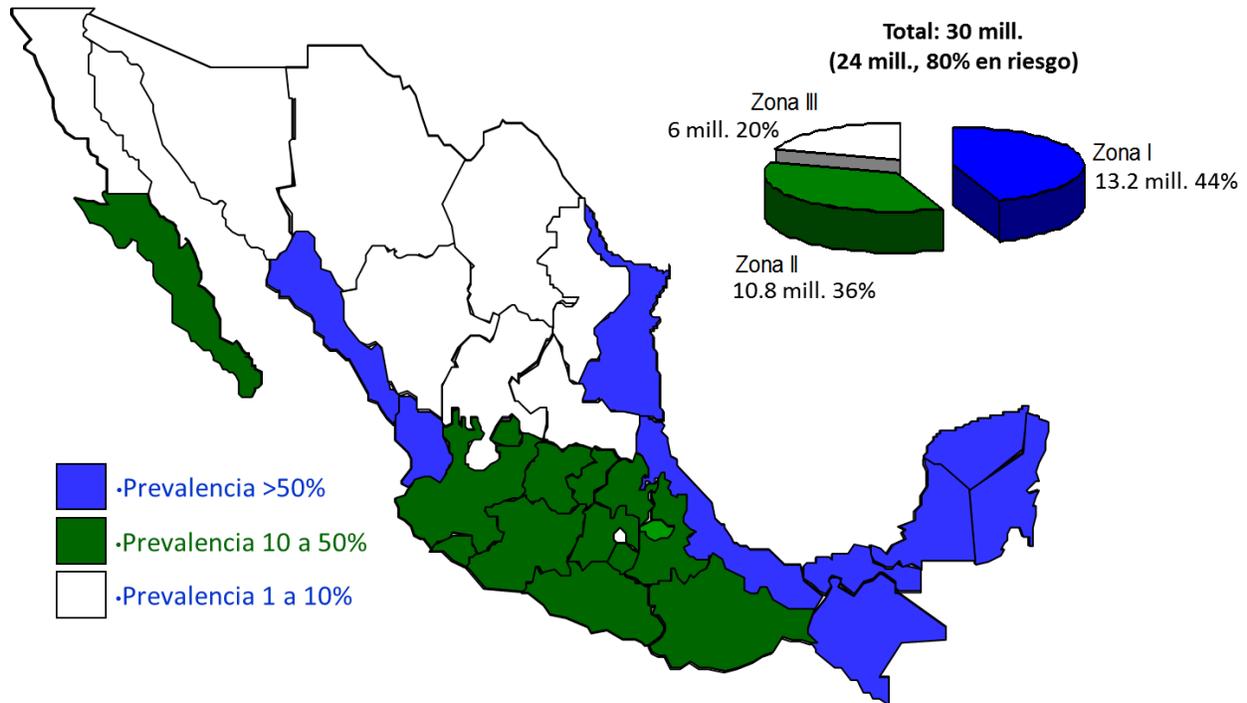


Figura 1. Distribución de la anaplasmosis bovina en México. Distribución de ganado con relación a la endemicidad en el México, considerando 30 millones de cabezas de ganado destinado para carne (Rodríguez *et al.*, 2009).

Diagnóstico

Para el diagnóstico de *A. marginale* en los bovinos, existen métodos directos que identifican a la bacteria mediante pruebas tales como: examen microscópico de sangre con tinción de Giemsa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de DNA genómico. Por otro lado, los métodos indirectos, detectan anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie de *A. marginale*, incluye técnicas como rMSP5-cELISA con un 96% de sensibilidad y 95% de especificidad cuando se realiza de 16 a 27 días posteriores a la inoculación, aglutinación en tarjeta con 84% de sensibilidad y fijación de complemento con 79% de sensibilidad, además de inmunofluorescencia indirecta e inmunoensayo enzimático indirecto (Torioni de Echaide *et al.*, 1998; Fosgate *et al.*, 2010).

Agente Causal

En 1893, Smith y Kilborne, quienes trabajaban con babesiosis, describieron cuerpos de inclusión en la periferia del citoplasma de los eritrocitos, considerándolo como formas de desarrollo de *Babesia bigemina*. En 1908 en Sudáfrica, Sir Arnold Theiler denominó a la bacteria como puntos

marginales y la diferenciación de la babesiosis bovina, dando así, la primera descripción de *A. marginale* como agente etiológico de una enfermedad específica, describiendo las características de la bacteria Gram negativa como rickettsia, con forma esférica, cocoide u oval, mide de 0.2 a 1 µm de diámetro, intraeritocítica obligada (figura 2). La rickettsia se replica por fisión binaria dentro del eritrocito dando lugar hasta 8 cuerpos iniciales llamados cuerpos de inclusión, localizados en el margen del eritrocito. Theiler logró aislar una cepa menos virulenta de *Anaplasma* que llamó *Anaplasma centrale* debido a su ubicación dentro del eritrocito (Theiler, 1910; Palmer, 2009).

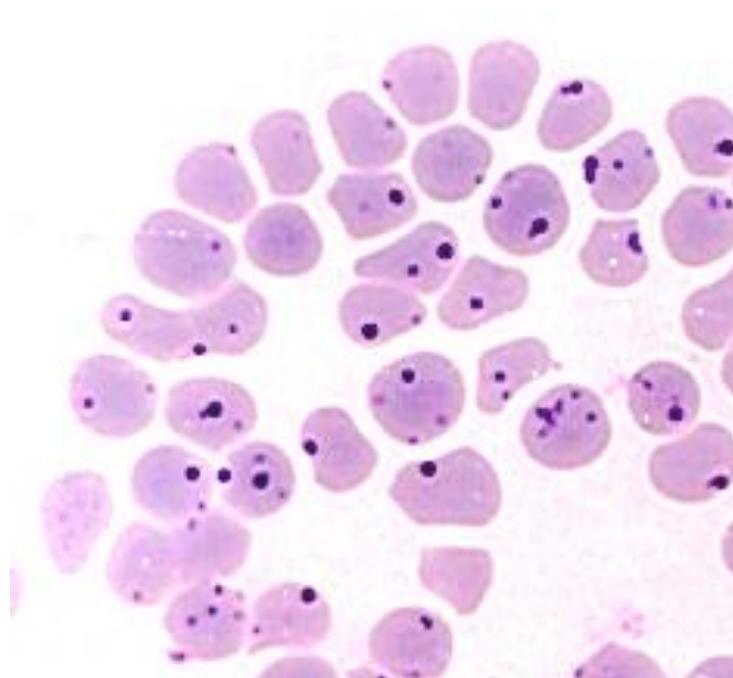


Figura 2. *Anaplasma marginale* dentro del eritrocito. Frotis de sangre con tinción de Giemsa, magnificación 100 X. Imagen de la Unidad de Anaplasmosis, CENID-SAI, INIFAP.

El agente causal, *Anaplasma marginale*, pertenece a la familia Anaplasmataceae (cuadro 1), donde sus miembros son bacterias intracelulares obligadas que se replican dentro de una vacuola derivada de la membrana celular de un hospedero eucarionte (Dumler *et al.*, 2001). Además, consta de un genoma de 1,197,687 pares de bases para la cepa St. Maries, que pueden codificar para 949 proteínas de las cuales 160 contienen dominios transmembranales y 383 permanecen como proteínas hipotéticas. Su cubierta de superficie está dominada por dos superfamilias que contienen proteínas inmunodominantes: las superfamilias Msp1 y Msp2; 62 de estas proteínas son

predichas como proteínas de membrana externa y de éstas, 49 pertenecen a una de estas dos superfamilias (Brayton *et al.*, 2005; Nuñez *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *A. marginale* (Dumler *et al.*, 2001).

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alfa-proteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	Anaplasmataceae
Genero	<i>Anaplasma</i>
Especie	<i>Anaplasma marginale</i>

El primer genoma completo del genero *Anaplasma* se publicó en 2005 y corresponde a la cepa *St. Maries* (Brayton *et al.*, 2005), una cepa virulenta que se conoce por ser eficientemente transmitida por garrapatas del tipo *Rhipicephalus microplus* y *Dermacentor andersoni* (Futse *et al.*, 2003). Permitiendo corroborar la información que ya se tenía de las 6 proteínas de la superficie llamadas proteínas principales de superficie (MSP, por sus siglas en inglés) que son codificadas de manera distinta y tienen diferentes pesos moleculares: Msp1a de 105 kDa, Msp4 de 31 kDa y Msp-5 de 19 kDa, las cuales están codificadas de forma monocistónica; en contraste, Msp1b de 105 kDa, Msp2 de 36 kDa, Msp3 de 86 kDa son codificadas por familias multigénicas, también permitió identificar secuencias de muchas otras proteínas (Palmer & McGuire, 1984; De La Fuente *et al.*, 2001; De La Fuente *et al.*, 2003; Brayton *et al.*, 2005).

En la búsqueda de una función para estas proteínas, se ha encontrado lo siguiente:

MSP-1: Heterodímero formado por MSP-1a (105 kDa) y MSP1b (100 kDa) adhesinas hacia eritrocitos y células de garrapata. Proteínas variables.

MSP-2 (36 kDa): Asociada con infecciones persistentes, hipervariable.

MSP-3 (86 kDa): Protección parcial, 55% similar a MSP-2, recombinación. Hipervariable.

MSP-4 (31 kDa): Muy conservada entre aislados, poco inmunogénica.

MSP-5 (19 kDa): Conservada en todas las cepas, muy antigénica pero no inmunoprotectora (Rodríguez *et al.*, 2009).

Debido a lo anterior, las proteínas principales de superficie, no se utilizan como vacunas, no obstante, en el caso de Msp1a y Msp4, se utilizan para el diagnóstico de la enfermedad o como marcador molecular (Jiménez *et al.*, 2012).

Transmisión

La transmisión de la rickettsia puede ser de tipo mecánica o biológica.

La transmisión mecánica de *A. marginale* puede ser de forma iatrogénica al utilizar agujas, aretadores, narigones, navajas y descornadores, entre otros sin tener en cuenta las medidas correctas de asepsia y esterilización; de esta manera la sangre infectada se transfiere de ganado bovino que presenta la enfermedad o se encuentra como reservorio de la bacteria al ganado susceptible (Palmer, *et al.*, 2000; Reinbold, *et al.*, 2010; Timaran-Rivera & León-Muñoz, 2013), o bien, a través de la sangre contenida en los órganos bucales de insectos hematófagos como moscas, *Tabanus sp*, *Stomoxis calcitrans*, *Hematobia irritans* y mosquitos de los géneros *Siphona spp.*, *Psorophora spp.*, aunque estos últimos no son considerados buenos transmisores (McGuire *et al.*, 1991; Van Kleef *et al.*, 2002; Scoles *et al.*, 2005; Hornok *et al.*, 2008; Aubry & Geale, 2010). Los moscos hematófagos de los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes spp.*, también son considerados como transmisores mecánicos (Scoles, Miller & Foil, 2008; Singh *et al.*, 2012).

La transmisión biológica, es aquella donde se lleva a cabo la replicación de *A. marginale* en el vector, donde los vectores biológicos que la transmiten pertenecen a las especies *Rhipicephalus (Boophilus) spp*, *Dermacentor spp.*, e *Ixodes spp.* (Aubry & Geale, 2010; Kocan *et al.*, 2010) en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo México (Futse *et al.*, 2003; Scoles, Miller and Foil, 2008). El principal vector biológico de *A. marginale* en México son las garrapatas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *R. annulatus* (Rodríguez *et al.*, 2003; Scoles, Miller & Foil, 2008). Una transmisión exitosa se asocia con la inoculación de $\geq 10^4$ bacterias (Ueti *et al.*, 2007), además de considerar que los machos son los principales vectores debido a que son infectados persistentemente y pueden transmitir la bacteria repetidas veces (Connell & Hall, 1972; Zaugg, 1986; Kocan *et al.*, 1992).

Otra forma natural de transmisión de la anaplasmosis y conservación de la rickettsia en el ganado libre de garrapatas, es la transmisión vertical o de tipo transplacentaria de vaca a becerro, la cual sucede cuando la madre sufre de anaplasmosis y/o es portadora asintomática de la bacteria, con lo cual *A. marginale* puede, en el segundo y tercer trimestre de gestación, atravesar la placenta y llegar al feto; además, se postula que esto no ocurre dentro de los eritrocitos, sino que es una fase extraeritrocitaria del parásito, estimándose este medio de infección como factor de riesgo en zonas endémicas (Zaugg, 1990; Rey-Valeiron, *et al.*, 2003; Aubry & Geale, 2010).

Ciclo de Vida

El ciclo de *A. marginale* inicia cuando las garrapatas toman la sangre del bovino infectado. Después de la ingestión en el lumen del intestino medio de la garrapata, *A. marginale* se somete a una primera ronda de replicación dentro de una vacuola de unión a la membrana, formando colonias equivalentes a 10^6 organismos dentro del intestino, continuando con la entrada a la hemolinfa y posterior a ello, la migración de la rickettsia e invasión de células en las glándulas salivales, seguida de varios ciclos de replicación, formas densas “infectivas” son transmitidas una vez que la garrapata ha mudado a un nuevo hospedero mamífero y este es mordido por la garrapata (Ueti *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009; Brayton, 2012). Cuando una garrapata se alimenta de sangre de un huésped infectado, transmite la rickettsia en la siguiente etapa después de la muda de larva a ninfa o de ninfa a adulto, conocido como transmisión interestadial. Una vez en el torrente sanguíneo del huésped mamífero, *Anaplasma* infecta eritrocitos maduros y aparentemente células endoteliales mediante endocitosis por la membrana citoplasmática con la formación de una vacuola y una vez dentro del eritrocito, la rickettsia se replica por fisión binaria formando hasta 8 cuerpos iniciales, además se sabe que al salir la bacteria del eritrocito, esta no lo destruye (Carreño *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009).

En la figura 3, observamos el ciclo de vida de *A. marginale*, que muestra cómo la bacteria se transmite de las garrapatas a los bovinos (Rodríguez *et al.*, 2009).

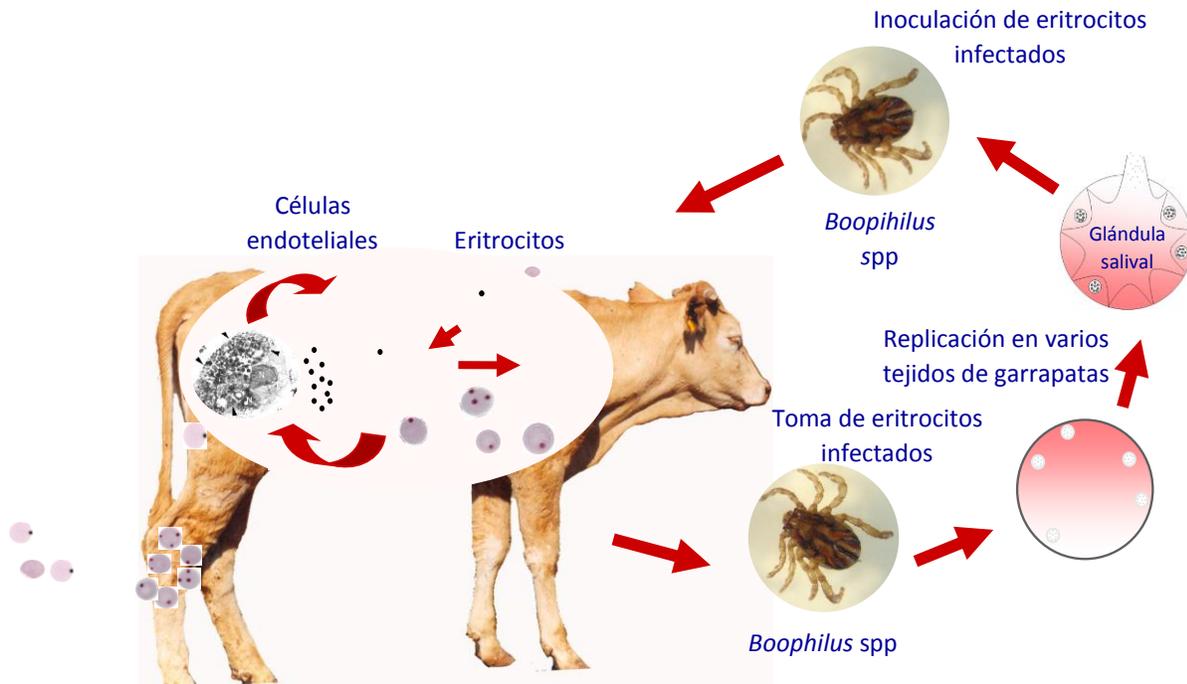


Figura 3. Ciclo de vida de *Anaplasma marginale*, desarrollo en el bovino (Rodríguez *et al.*, 2009).

Control

El control efectivo de la anaplasmosis requiere tanto el control de la enfermedad en el hospedero como la reducción de la infección y transmisión del patógeno a través de las garrapatas y fómites (Rodríguez *et al.*, 2003). El control de la anaplasmosis, incluye el manejo de artrópodos responsables de la transmisión, utilizando ixodicidas organofosforados como coumafos, clorfenvifos, clopyrifos, amidinas y piretroides.

El tratamiento de los animales con antibióticos, hematicidas, la quimioprofilaxis y la vacunación, son formas de control que limitan las pérdidas provocadas por las garrapatas y las enfermedades que transmiten, pero no son del todo efectivos ya que, hay algunas garrapatas que se vuelven resistentes a acaricidas, además, la presencia de residuos en carne y leche limitan el uso de pesticidas y antibióticos. La quimioprofilaxis es eficaz sólo si se lleva a cabo correctamente y sólo por un período de tiempo corto. La vacunación por lo tanto, podría ser el método más eficaz para el control y prevención de la anaplasmosis bovina (Rodríguez *et al.*, 2009; Reinbold, *et al.*, 2010).

Prevención

Una vacuna es una sustancia compuesta por microorganismos completos atenuados o muertos, o bien, formado por fracciones de los mismos, capaces de inducir una respuesta inmunoprotectora y duradera frente a dicho patógeno con la finalidad de prevenir futuras infecciones. En el caso de la anaplasmosis bovina, se han diseñado vacunas atenuadas y vacunas inactivadas para el control de la misma (Kocan *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2008).

Existen ejemplos de vacunas vivas que incluyen el uso de radiaciones para la atenuación de organismos vivos, vacunas atenuadas por diferentes metodologías a partir de cepas de *A. marginale* (Kuttler & Zaugg, 1988) y aún, vacunas heterólogas a partir de cepas de *A. centrale*, las cuales tiene un uso muy difundido en algunos países (Pipano *et al.*, 1986). En México, esta subespecie es considerada como exótica, por lo que no está permitido su uso. En México se han probado vacunas vivas que no han tenido buenos resultados, tal es el caso de una inoculación de eritrocitos de bovino infectados con la rickettsia, la cual se pensaba desataría la respuesta inmune en contra de la bacteria, sin embargo, debido a la gran cantidad de eritrocitos del bovino, se indujo la producción de anticuerpos contra los propios eritrocitos de algunos bovinos, lo que llegó a producir la lisis de los eritrocitos de becerros nacidos de madres vacunadas y choque anafiláctico en otros bovinos (Osorno *et al.*, 1975).

Por otro lado, están las vacunas inactivadas a partir de bacterias completas inactivadas, que son más estables y seguras que las vacunas vivas, capaces de inducir inmunidad y se han utilizado en la prevención de la enfermedad, evitando de esta manera el desarrollo de rickettsias altas y cuadros clínicos agudos (Rodríguez *et al.*, 2000; Orozco-Vega *et al.*, 2007). Sin embargo, debido a la diversidad antigénica que presenta *A. marginale* en regiones geográficas diferentes, estas vacunas han mostrado un espectro de protección limitado (Jiménez-Ocampo *et al.*, 2012).

El uso de vacunas vivas a partir de eritrocitos infectados, incluye el riesgo de transmitir otros patógenos presentes en la sangre de los animales en los que se prepara la vacuna. Una alternativa de solución se ha basado en implementar la vacunología reversa que inicia con el análisis de genomas completos o genes reportados de una especie para la identificación de moléculas involucradas en la invasión, replicación, supervivencia, persistencia y transmisión de patógenos bacterianos. Esta metodología tiene la ventaja de disminuir el tiempo de generación de

inmunógenos para su caracterización en estudios *in vitro* e *in vivo* (Barigye *et al.*, 2004; Hope *et al.*, 2004; Flower *et al.*, 2010; Palmer *et al.*, 2012).

Con esta premisa, se busca diseñar vacunas que cubran un amplio espectro antigénico y se ha establecido la posibilidad de usar proteínas o partes de ellas, que cumplan con las siguientes características: las proteínas deben estar expuestas en la superficie, preferentemente tener alguna función vital o de virulencia, deben de ser altamente conservadas entre cepas de distintas regiones y contar con epítomos inmunorelevantes para inducir la respuesta inmune, además de tener baja o nula diversidad. Se han reportado estudios “*in silico*” e “*in vitro*” que buscan identificar proteínas con potencial vacunal como las proteínas principales de superficie, sin obtener resultados favorables hasta ahora (Palmer *et al.*, 1999, 2012; Aubry & Geale, 2010; Nuñez *et al.*, 2013).

Por lo tanto, para la selección de moléculas con características deseables para una vacuna, se propone el uso de la tecnología de despliegue en fagos, la cual tiene ventajas como la simplicidad, la rentabilidad y la velocidad, sobre los métodos tradicionales de detección utilizados en el descubrimiento de fármacos, pero la mayor fortaleza de esta técnica es generar péptidos enormemente diversos que se exponen en la superficie del fago fusionadas a las proteínas de la cápside viral (Hamzeh-Mivehroud *et al.*, 2013). Dado que los péptidos expuestos en la superficie de los fagos son accesibles y capaces de unirse de manera específica a los anticuerpos (monoclonales o policlonales), receptores, enzimas, células, etc., pueden seleccionarse en base a dicha afinidad (Smith & Petrenko, 1997).

Inmunidad adquirida por el bovino contra *A. marginale*

En el bovino el proceso de infección por *A. marginale* comienza cuando los cuerpos iniciales de la bacteria son inoculados por mecanismos de transmisión biológica o mecánica que infectan al eritrocito, célula que carece de núcleo y de receptores correspondientes al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), hecho que las hace inmune a la acción de linfocitos citotóxicos del CMH de clase I o clase II.

El proceso de invasión del cuerpo inicial es mediado por las proteínas de superficie que fungan como adhesinas: MSP1a (la cual parece tener un papel importante en la adherencia de los cuerpos iniciales en la garrapata) y MSP1b (la cual parece tener afinidad exclusivamente por el eritrocito) (McGarey *et al.*, 1994; Barbet *et al.*, 1999; J. De La Fuente *et al.*, 2001).

Ya en el interior del eritrocito, mediante fisión binaria la bacteria se multiplica hasta ocho cuerpos iniciales, los cuales se agrupan formando uno de mayor tamaño conocido como cuerpo de inclusión, el cual libera los cuerpos iniciales que se multiplican en otros eritrocitos continuando la infección hasta tener altos porcentajes de eritrocitos infectados. Hasta donde se sabe, los eritrocitos no se destruyen por la penetración o liberación de los cuerpos iniciales de la bacteria, sin embargo, las modificaciones ocasionadas por este proceso podría llevar a que los eritrocitos sean reconocidos por macrófagos de los tejidos reticulares y de los sinusoides vasculares que están presentes en la pulpa roja del bazo, siendo que los macrófagos son ineficaces al principio de la infección, pero al existir una alta concentración de eritrocitos infectados alcanzan una actividad óptima. La fagocitosis no específica ha sido demostrada en el bazo y puede explicar la esplenomegalia presente en las infecciones (Palmer *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2003).

Una vez que el eritrocito infectado ha sido fagocitado se inicia el proceso antigénico que consta de la desnaturalización y digestión parcial de las proteínas del *Anaplasma*, de tal forma que las proteínas se rompen en péptidos cortos, de los cuales un número limitado se relaciona con las proteínas del CMH de clase II, los péptidos se transportan a la superficie del macrófago en donde pueden ser detectados por células T cooperadoras CD4+ (Th CD4+). La célula Th CD4+ se activa mediante dos señales, la primera consta de la unión del receptor del antígeno de la célula Th CD4+ al complejo antígeno péptido-CMH en la superficie del macrófago y la segunda dada por otra proteína diferente transmisora de la señal la cual debe de tener contacto con la célula Th CD4+ en la superficie del macrófago. Una vez llevadas a cabo ambas señales, se induce la producción de interleucina 2 (IL2) en la célula Th CD4+ y la expresión de sus respectivos receptores en la superficie del propio linfocito Th CD4+; esta citocina es un factor mitógeno muy potente para los linfocitos Th, necesario para la proliferación de las células Th CD4+ activadas. La IL2 tiene una desintegración muy corta fuera de la célula, razón por la cual solo actúa en la intermediación de las células que la secretan. La interacción entre el macrófago y el linfocito Th CD4+ estimula también al primero para liberar la interleucina 1 (IL1), que actúa sobre el propio macrófago para expresar proteínas de CMH de clase II, así como varias moléculas adhesivas que refuerzan la fijación con la célula Th CD4+ y aumenta la presencia de antígeno. De igual forma la IL1 estimula a la célula Th CD4+ para la secreción de una mayor cantidad de IL2 y para la expresión de su respectivo receptor, de esta forma se potencializa la respuesta proliferativa de las

células T. Los macrófagos producen mayor cantidad de IL1 y en menor cantidad una citocina más como es el factor de necrosis tumoral, que pueden presentar sinergia con la IL-1 (Brown, Shkap, *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2003).

Las células T cooperadoras que participan en la respuesta inmune incluyen células Th1, especializadas en la producción de IL2 e interferón gamma, que estimulan la síntesis de IgM e IgG2 por las células B y activan a los macrófagos, sin embargo, también se presenta una respuesta de las células Th2 que secretan IL4, IL6 e IL10, citocinas que estimulan también células B hacia la producción de IgG1. Las células B se pueden activar al reconocer a un inmunógeno en su forma libre y no transformada, este reconocimiento lo realizan a través de sus receptores de antígeno o anticuerpos de superficie. Las células Th CD4+ poseen un radio de acción muy corto y activan a las células B a través de la IL2, o a través de contacto directo, por medio de sus proteínas de superficie. La fijación de antígeno y los factores cooperadores en conjunto producen señales mitógenas más fuertes que cada estímulo por separado, de esta manera se multiplican los clones específicos a un antígeno dado. Estudios previos han demostrado que el isotipo de las IgG2 está relacionada con la resolución de procesos infecciosos en comparación con las IgG1, capacidad que se ha confirmado en el caso de anaplasmosis bovina ya que estos anticuerpos de animales inmunes son capaces de opsonizar eritrocitos infectados y ser más rápidamente fagocitados, a diferencia de IgG1 que no es capaz de mediar la fagocitosis por neutrófilos o monocitos. Se ha comprobado la importancia de la IgG2 en los procesos de inmunidad contra anaplasmosis, ya que animales vacunados con extractos de membranas de la bacteria, presentan una respuesta de IgG2 en los animales protegidos contra el desafío homólogo, lo que también sucede al vacunar animales con cuerpos iniciales purificados de la bacteria y desafiados en forma heteróloga (Brown, Shkap, *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2003).

Bacteriófago M13

Los virus que infectan bacterias, llamados bacteriófagos o fagos, están presentes en todos los ecosistemas del mundo dentro de sus huéspedes o en forma libre bajo un rango de condiciones ambientales jugando un rol primordial en la evolución de los microorganismos al movilizar DNA entre ellos (Arap, 2005).

Los bacteriófagos filamentosos tienen forma de cilindro delgado y flexible y contienen genomas de DNA de cadena sencilla. Clasificados dentro del género *Inovirus* en la familia *Inoviridae*, la cual agrupa especies que infectan bacterias Gram negativas (Day & Hendrix, 2005).

Los bacteriófagos son considerados bionanopartículas dada su naturaleza, tamaño y forma cuya superficie puede tener diversas funciones por métodos biológicos o químicos con propósitos biomédicos como el desarrollo de vacunas (Bazan, Calkosinski & Gamian, 2012; Kaur *et al.*, 2012).

Luego de su descubrimiento, los bacteriófagos, se empezaron a utilizar para combatir infecciones bacterianas en la llamada terapia fágica, que en nuestros días se encuentra emergiendo como una alternativa de control de enfermedades debido a la fármacorresistencia que presentan las bacterias. La base de la biología molecular fue sentada posteriormente al usarlos para desarrollar vectores de clonación y plataformas de expresión. Más adelante, los bacteriófagos fueron usados para producir las llamadas partículas tipo virus que consisten en una nucleocápside viral carente de material genético, desarrollada para crear nuevas vacunas contra enfermedades virales y después como estrategia en el combate de enfermedades no infecciosas como el cáncer (Solis-Lucero, 2016).

Los bacteriófagos filamentosos no son líticos y son ensamblados en la membrana del huésped, donde las subunidades de la proteína mayor de la cápside pVIII reemplazan a la proteína de unión a DNA de cadena sencilla pV para ser constantemente extruidos al medio sin matar a la célula infectada, por lo que, al dividirse, continúa indefinidamente la replicación viral. Los viriones presentan diámetros de alrededor de 7 nm y longitudes cercanas a los 1000 nm. Cada virión está compuesto por miles de copias de la proteína mayor pVIII (5.2 kDa), que forma un cilindro alrededor del DNA cuya longitud dependerá del tamaño del genoma, y solo cinco copias de cada una de las cuatro proteínas menores pIII (43 kDa), pVI (12 kDa), pVII (3.5 kDa) y pIX (3.3 kDa) en los extremos; las dos primeras permiten el acoplamiento y estabilización durante la infección mientras que las otras dos son responsables del inicio del proceso de ensamblaje en la membrana celular del huésped (Pande, Szewczyk & Grover, 2010; Hodyra & Dąbrowska, 2015; Solis-Lucero, 2016). Los fagos filamentosos como M13, fd o f1 (Smith & Petrenko, 1997) se caracterizan por una forma de barra flexible con un genoma de ssDNA circular e infectan *Escherichia coli* a través del pilus F (Schirrmann *et al.*, 2011).

El despliegue en fagos revela interacciones proteína-proteína que permiten el estudio de patógenos y sus hospederos, la identificación de ligandos de receptores específicos, el descubrimiento de antígenos y epítomos protectores, péptidos antimicrobiales/virales, así como la selección de anticuerpos capaces de detectar o neutralizar patógenos, entre otros. Además, se ha demostrado que puede ser un ventajoso vehículo de administración de péptidos antigénicos (Xiao *et al.*, 2006; González *et al.*, 2011; Youtong *et al.*, 2011; Delhalle, Schmit & Chevignr, 2012). El primer bacteriófago en ser utilizado en la técnica de despliegue en fagos fue el M13, siendo en la actualidad el más usado alrededor del mundo (Schirrmann *et al.*, 2011). Debido a que la cápside M13 está compuesta por 2,700 copias de la proteína de cubierta principal pVIII y está coronada por pIII (5 copias), pVI (5 copias), pVII (5 copias) y pIX (5 copias). Todas las proteínas de la cubierta pueden usarse como dianas de fusión para el despliegue, pero las proteínas más usadas, son la proteína pVIII, aun cuando se limita a mostrar secuencias cortas de péptidos, así como la proteína pIII, que permite el despliegue de inserciones más grandes (Pande, *et al.*, 2010; Hodyra & Dąbrowska, 2015).

Esta característica permite que péptidos foráneos sean desplegados en la superficie exterior del virión en fusión a sus proteínas estructurales (figura 4), para ser aprovechados en la creación de bibliotecas de anticuerpos o péptidos desplegadas en fagos, diseños de fármacos o el desarrollo de vacunas. Además, los bacteriófagos han demostrado provocar una respuesta celular y humoral contra varios agentes patógenos a través del despliegue de anticuerpos en sus proteínas de cubierta (Van Houten *et al.*, 2010; Samoylova *et al.*, 2017).

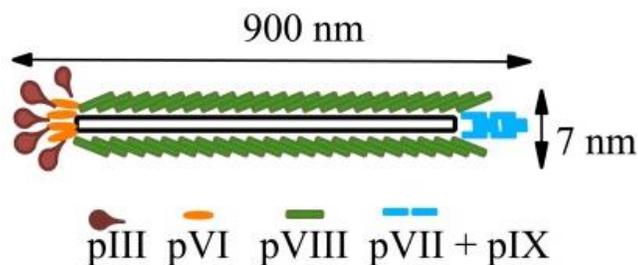


Figura 4. Estructura esquemática de la partícula de fago de tipo silvestre Ff. Los fagos Ff consisten en una capa de proteína tubular que rodea un ADN circular monocatenario. El revestimiento del fago está compuesto por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX). Las proteínas III, VI, VII y IX, presentes en bajos números de copias, constituyen las proteínas de la cubierta secundaria. Las proteínas III y VI forman un límite en un extremo del fago virión, mientras que las proteínas pVII y pIX cubren el otro extremo de la partícula. La proteína VIII es la principal proteína de la cubierta del fago, está presente en números de copia altos (2700 en fagos de tipo silvestre), rodea el ADN del fago y forma el cuerpo tubular de la partícula (Samoylova *et al.*, 2017).

Antecedentes del despliegue en fagos

El despliegue en fagos es una técnica descrita por primera vez por George P. Smith en 1985, considerado el padre de la técnica de despliegue en fagos “*Phage display*” o PhD por sus siglas en inglés, cuando demostró la exhibición de péptidos en el fago filamentoso mediante la fusión del péptido de interés para el gen III del fago filamentoso, es decir, que manipulando el genoma de los fagos se podían obtener partículas con péptidos fusionados a proteínas de su cápside o superficie (Smith & Petrenko, 1997).

Los péptidos que se unen a los objetivos individuales se pueden identificar vía selección por reconocimiento (llamada *biopanning*). Para realizar el *biopanning*, se incuba una biblioteca de despliegue con una diana inmovilizada, seguido de un lavado extenso para eliminar los fagos que no reaccionan, es decir, fagos que no se unen al objetivo. Los aglutinantes generalmente se eluyen usando ácido o altas concentraciones de sal, dando lugar a la amplificación en las células hospedadoras apropiadas para obtener mayor cantidad del fago que reconoce al objetivo. Normalmente se realizan de tres a cinco rondas de *biopanning* para obtener dianas que se unan con gran afinidad. La estructura primaria del péptido puede determinarse secuenciando el ADN de clonas individuales. Facilitando la identificación de péptidos que se unen específicamente a moléculas diana (Wu *et al.*, 2016).

La biblioteca de péptidos presentada en fagos se puede usar en mapeo de epítomos de células B y células T, selección de péptidos bioactivos unidos a receptores o proteínas, selección de mimotopos de antígenos específicos, selección de péptidos unidos a objetivos no proteicos, selección de péptidos específicos de órganos y desarrollo de sistemas de administración de fármacos mediados por péptidos y otras aplicaciones. Los péptidos dirigidos identificados usando bibliotecas de péptidos presentados en fagos tienen un uso potencial en investigación básica y medicina traslacional (Wu *et al.*, 2016).

Vacunas basadas en fagos

Las vacunas basadas en fagos presentan dos enfoques diferentes, uno de ellos en el cual se realiza la clonación de un oligonucleótido que codifica un péptido antigénico deseado en un vector de fago y el otro, que consiste en el uso de bibliotecas de fagos que despliega péptidos de manera aleatoria (Samoylova *et al.*, 2017).

Las bibliotecas de fagos pueden contener miles de millones de clones, de los cuales cada uno muestra un péptido fusionado. Estas difieren de acuerdo al tamaño de los péptidos, tipo de vector de fago utilizado para su construcción y es deseable que contengan muchas más variantes ya que proporcionan más posibilidades para la identificación de fagos específicos al objetivo. Todos los fagos presentes en las bibliotecas de fagos deben ser genéticamente estables y tener buenas características de propagación (Samoylova *et al.*, 2017).

Los fagos filamentosos poseen una serie de características beneficiosas que respaldan su utilidad como portadores de vacuna. Se sabe que la inmunidad humoral del huésped se activa y desencadena los anticuerpos dirigidos, células B y T contra epítomos de proteínas extrañas al encontrarse con el antígeno. Por ello, el saber más acerca de estos epítomos de proteínas ayuda a comprender como el patógeno realiza la infección y/o proporciona información del mismo que puede apoyar al desarrollo de reactivos para diagnóstico, anticuerpos terapéuticos y vacunas efectivas. Los epítomos de los antígenos pueden ser lineales o conformacionales, conforme a como se encuentran estructuralmente. Los epítomos lineales tienen secuencias de aminoácidos correspondientes con su estructura primaria, por otro lado, los epítomos conformacionales tienen secuencias discontinuas de aminoácidos y se basan en la estructura terciaria de las proteínas (Wu *et al.*, 2016).

Hay evidencias de que el uso de partículas de fagos completos, pueden estimular la respuesta inmune y que estos no causan efectos adversos incluso con dosis elevadas y administraciones repetidas de fagos. Además, los fagos pueden estimular respuestas humorales y mediadas por células y son altamente inmunogénicos sin adyuvantes. En la mayoría de las aplicaciones, las partículas de fago eran viables; sin embargo, sí es necesario, el fago puede usarse en forma "muerta" ya que los fagos desactivados retienen la inmunogenicidad (Samoylova *et al.*, 2017).

Aplicaciones del despliegue en fagos

Las bibliotecas se han evaluado frente a diferentes objetivos. Desde las biomoléculas purificadas como un receptor o un anticuerpo, hasta lo que se conoce hoy en día, como el aislamiento de péptidos que podrían unirse a dianas biológicas complejas (Aghebati-Maleki *et al.*, 2016).

Una de las aplicaciones de las bibliotecas de péptidos al azar expuestos en fagos, es identificar nuevos ligandos del receptor que pueden ser agonistas o antagonistas fundamentales para la

señalización bioquímica y eléctrica de células y que además, forman parte en funciones fisiológicas esenciales (Wu *et al.*, 2016).

El despliegue en fagos se ha usado para identificar inhibidores del sustrato peptídico que modulan actividades enzimáticas, dado que los fagos filamentosos son resistentes a una amplia gama de proteasas, se han utilizado para identificar sustratos y generar inhibidores de la proteasa, como el caso de colagenasa-1 (metaloproteinasa 1, MMP-1) (Wu *et al.*, 2016).

Las interacciones proteína-proteína en las células, regulan los mecanismos de varias funciones fisiológicas importantes y debido a que el despliegue en fagos es un método potente y versátil para estudiar la interacción proteína-proteína, puede aplicarse a una amplia gama de interacciones entre proteínas y usarse en una serie de aplicaciones, como lo es un mapeo de interacciones intracelulares entre dominios proteicos (Wu *et al.*, 2016).

Distintas bacterias desencadenan respuestas inmunitarias protectoras a través de antígenos no proteicos (Ej.: polisacáridos) en su superficie celular, como el caso de antígenos tumorales formados por carbohidratos. Los epítomos que imitan polisacáridos inmunogénicos o antígenos de carbohidratos pueden seleccionarse e identificarse mediante el uso de bibliotecas de péptidos al azar expuestos en fagos, estos mimotopos peptídicos acoplados con proteínas transportadoras se pueden usar como posibles moléculas vacunales para estimular respuestas inmunológicas más fuertes (Wu *et al.*, 2016).

Johnston y colaboradores, fueron los primeros en describir el uso de péptidos presentados en fagos para identificar la unión de péptidos a diferentes tipos de células, el despliegue peptídico en fagos a través de la panoramización de células completas ofrece un enfoque para identificar péptidos que se unen específicamente a un tipo celular (Barry, Dower and Johnston, 1996; Wu *et al.*, 2016).

El despliegue en fagos es utilizado para el mapeo de epítomos (Fack *et al.*, 1997), estudios de interacciones proteína-proteína (Xin *et al.*, 2013), determinar la especificidad de inhibidores y enzimas (Diamond, 2007; Hawinkels *et al.*, 2007), en el cribado de agonistas y antagonistas del receptor (Lee *et al.*, 2001) o en el diseño de la vacuna (Ren *et al.*, 1996; Mullaney & Black, 1998; De Berardinis & Haigwood, 2004; Sathaliyawala *et al.*, 2006).

Estudios de inmunogenicidad han demostrado la generación de respuesta inmune específica contra la secuencia peptídica expuesta en el fago empleando fagos portadores de mimotopos en diferentes animales, dicho de esta manera, un mimotopo es a menudo un péptido que imita la estructura de un epítipo, provocando una respuesta de anticuerpos similar a la provocada por el epítipo. Una aplicación más del despliegue en fagos es la identificación de péptidos que actúen como mimétizadores inmunogénicos, siendo estos capaces de inducir una respuesta de anticuerpos “*in vivo*” similar o idéntica a la generada por el epítipo natural (Wang & Yu, 2004; Amin-Blanco, 2014).

Biblioteca C7C

Las bibliotecas de péptidos desplegadas en fagos filamentosos constituyen una fuente de ligandos peptídicos con diferentes actividades biológicas (Smith & Petrenko, 1997; Irving, Pan & Scott, 2001; Haq *et al.*, 2012; Amin-Blanco, 2014). Las estructuras peptídicas expuestas en fagos pueden ser lineales o cíclicas. Los péptidos presentados de forma cíclica, incluyen cisteínas en diferentes regiones para la formación de puentes disulfuro y de esta manera presentar el péptido en forma de lazo. Se han construido bibliotecas de péptidos restringidos conformacionalmente insertando las estructuras peptídicas de interés dentro de la secuencia de una proteína cuya conformación sea restringida, de manera que limite el número de conformaciones que pueda adoptar dicho péptido (Amin-Blanco, 2014).

El despliegue en fagos es aplicado para el diseño y desarrollo de vacunas, ya sea, usando a los fagos directamente como inmunógenos, la identificación de epítipos o mimotopos, así como para evaluar características como la especificidad antigénica de las células T (Gao *et al.*, 2010; Amin-Blanco, 2014).

En la caracterización de mimotopos para el desarrollo de vacunas, dos principales características son de importancia: 1. Capacidad antigénica, cuando un péptido es capaz de interactuar específicamente con el sitio de unión funcional al antígeno presente en el anticuerpo (paratopo) y de competir con el antígeno natural por su unión. 2. Propiedades inmunogénicas, cuando un péptido adicionalmente simula o mimetiza el comportamiento inmunológico del antígeno original, denominándose mimotopo inmunogénico (Regenmortel *et al.*, 2000; Deroo & Muller, 2001; Amin-Blanco, 2014).

La biblioteca Ph.D.-C7C, comprende una biblioteca combinatoria de péptidos aleatorios fusionados a una proteína de cubierta secundaria (pIII) del fago M13. Con la característica de que la secuencia del péptido está flanqueada por un par de residuos de cisteína, los cuales, bajo condiciones no reductoras, formarán espontáneamente enlaces disulfuro, dando como resultado la presentación de péptidos ciclados expuestos en el fago. Los heptapéptidos con restricción de disulfuro se expresan en el extremo N-terminal de pIII, con la primera cisteína precedida de un residuo de alanina, la segunda cisteína seguida de un espaciador corto (Gly-Gly-Gly-Ser) y luego la secuencia de pIII. La estructura es **AC-X7-CGGGS** y la biblioteca consta de aproximadamente 10^9 secuencias electroporadas amplificadas una vez, es decir, para producir aproximadamente 100 copias de cada secuencia en 10 μ L del fago suministrado.

Las bibliotecas de péptidos con restricción de disulfuro han demostrado ser útiles en la identificación de epítomos estructurales, ligandos de imagen especular para objetivos D-aminoácido y conduce a terapias basadas en péptidos (Schumacher *et al.*, 1996; Pande, *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN

La anaplasmosis bovina es un problema que genera grandes pérdidas económicas en el ganado mexicano debido a la prevalencia de *Anaplasma marginale*, y a la movilización de ganado infectado de zonas endémicas a zonas libres y viceversa, sumado a la alta variabilidad antigénica entre diferentes cepas del patógeno.

A pesar de los muchos trabajos para diseñar nuevas estrategias de control, en México aún no existen vacunas comerciales contra la anaplasmosis bovina y, las vacunas experimentales inactivadas son de uso restringido. Por lo tanto, continúa la búsqueda de moléculas que contribuyan a la obtención de una vacuna de amplio espectro y de menor costo. En ese sentido, se considera la idea de realizar la búsqueda de epítomos inmunorelevantes y con potencial inmunogénico sin la necesidad de una proteína completa, aprovechando el hecho de que regiones de diferentes proteínas expuestas por el patógeno fueron reconocidas por el sistema inmune del bovino y podrían ser reconocidas por las inmunoglobulinas encargadas de la protección del animal, lo que permitirá obtener solo epítomos de las mismas y por lo tanto facilitar su caracterización e implementación.

HIPÓTESIS

Es posible aislar péptidos con características inmunorrelevantes en la respuesta inmune hacia *Anaplasma marginale* utilizando una biblioteca desplegada en fagos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* antigénica e inmunogénicamente péptidos aislados por despliegue en fagos para su potencial uso como inmunógenos contra *Anaplasma marginale*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Seleccionar ligandos reconocidos por las IgG2 de bovinos inmunes a *Anaplasma marginale*.
- ❖ Evaluar el potencial inmunogénico de los péptidos seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología para realizar el despliegue en fagos sigue un esquema general (Figura 5):

- I.- Preparación de una biblioteca primaria o amplificación de una biblioteca ya existente.
- II.- La exposición de las partículas de fago a un objetivo para el que se han previsto ligandos específicos para ser identificados.
- III.- La eliminación de aglutinantes no específicos (lavado / perfusión).
- IV.- Recuperación del fago unido al blanco por elución o infección bacteriana directa y la amplificación del fago recuperado.
- V.- Repetir desde el paso uno, dos a cuatro veces.
- VI.- Después de estas rondas de selección / amplificación, las clonas individuales son caracterizadas por secuenciación del DNA.

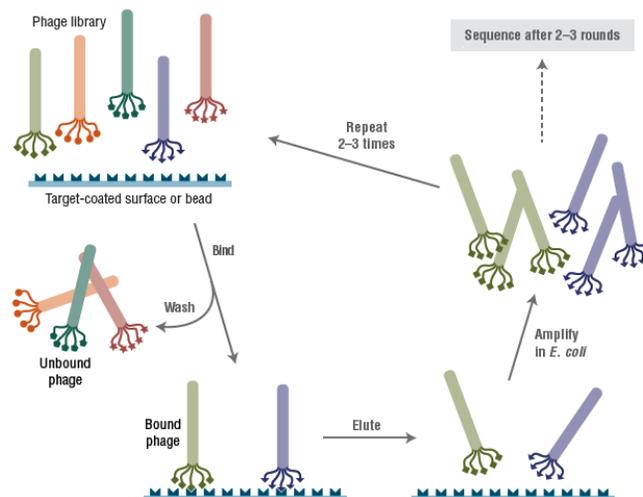


Figura 5. Esquema de una ronda de tamizado usando una librería desplegada en fagos.

Se utilizó la biblioteca Ph.D.TM-C7C Phage Display Peptide Library (New England Biolabs) que tiene una complejidad en el orden de 10^9 clonas independientes, las cuales son suficientes para codificar la mayoría de todas las posibles secuencias peptídicas de 7 aminoácidos (1.28×10^9 secuencias peptídicas).

Para introducir la biblioteca en *E. coli* se utilizó el fago M13, el cual es un fago lisogénico, sin embargo, el crecimiento celular se ve disminuido respecto al uso de fagos líticos, por lo que está recomendado inocular en cultivos con Xgal/IPTG para facilitar la visualización de las placas.

Se utilizaron bacterias *E. coli* ER2738 que tienen fenotipo F+ y están recomendadas para la propagación del fago M13. Los cultivos se realizaron en medio LB adicionando con tetraciclina (15 µg/mL).

IgG2 y sueros

Para los análisis realizados en el presente trabajo se seleccionaron sueros de cuatro bovinos inmunizados y sueros de dos bovinos positivos contra *A. marginale* del banco de sueros de la Unidad de Anaplasmosis CENID-SAI/INIFAP, para realizar las rondas de selección, utilizando 50 µL de cada suero y aforando la mezcla de sueros a 1 mL con PBS. Además, se utilizaron 100 µL de IgG2 concentrada (1 mg/mL), previamente purificada por cromatografía de intercambio iónico del bovino 135 inmunizado con la cepa: Yautepec, Mor., cuyos repetidos analizados para el marcador msp1α son: α β β Γ. Asimismo, este bovino es un animal hiperinmunizado con *A. marginale* por lo que presenta más anticuerpos y una respuesta protectora que fue probada al ser desafiado contra esta bacteria. También, para realizar análisis posteriores a las selecciones se utilizaron las IgG2 purificadas y concentradas del bovino 6787 inmunizado con una mezcla de las cepas: Puente de Ixtla, Mor. y Atitalaquia, Hgo., cuyos repetidos analizados para el marcador msp1α son: 12 13 14 y τ 57 13 18, respectivamente. Y del bovino 6761 inmunizado con la cepa: Yautepec, Mor., cuyos repetidos analizados para el marcador msp1α son: α β β Γ. Por otra parte, se utilizaron los 4 sueros de bovinos inmunizados contra *A. marginale* y las 3 IgG2 purificadas y concentradas para realizar *de novo* una selección como la anteriormente descrita.

Selección en superficie sólida

El proceso para realizar la selección en superficie, implica el recubrimiento directo de una superficie de poliestireno con el objetivo de interés (por interacción hidrófoba y electrostática no específica), lavando el exceso y pasando los fagos sobre la superficie recubierta con la diana de interés, en este caso, con los anticuerpos IgG2 obtenidos del suero de al menos tres bovinos inmunizados contra *Anaplasma marginale*.

Se preparó una solución de 1 mg/mL de IgG2 en PBS, pH 8.6. Cuya fuerza iónica alta se puede utilizar para la estabilización de la molécula objetivo. Con esa solución se fijaron en tubos de poliestireno, incubando a 4°C durante 12 horas.

Se recubrieron los tubos de poliestireno con los anticuerpos objetivos; IgG2, sueros de bovinos inmunizados y leche o BSA, aforados a 1 mL con PBS estéril, los cuales se taparon y se incubaron durante una noche a 4 °C con agitación suave en condiciones de humedad.

Por otra parte, se colocaron 5 µL de la biblioteca de fagos Ph.D.TM-C7C (New England Biolabs) en 1 mL de PBS. Se vació el tubo que contiene la leche y se colocaron los fagos para incubar mínimo durante 30 min a 30 °C. Mientras tanto se bloquearon con leche o BSA los tubos de sueros e IgG2 entre 1 – 2 hrs a 37 °C. Pasado ese tiempo, se retiró la leche del bloqueo de los tubos con sueros e IgG2 para colocar 500 µL de los fagos incubados en el tubo que contenía la leche. Se dejó incubando 1 hora y media a temperatura ambiente. El volumen se llevó a 1 mL con PBS. Posteriormente se retiró este volumen y en ambos tubos se realizaron 5 lavados con PBS + Tween 0.05%, seguido de otros 5 lavados con PBS para el caso de la 1ª ronda, aumentando a 10 lavados con PBS + Tween 0.1%, seguido de otros 5 lavados con PBS para la 2ª ronda y finalmente 15 lavados con PBS + Tween 0.15%, seguido de otros 5 lavados con PBS para la 3ª ronda.

Al término de los lavados se agregó 1 mL de Tris-glicina pH 2.2 a cada tubo y se incubó durante 10 min. Se dispusieron 150 µL de Tris pH 9.1 en tubos de 1.5 mL y en estos tubos se colocó la solución recuperada en pH ácido, para neutralizar la solución donde se encuentran los fagos. Al terminar la neutralización se realizó la titulación y los tubos se almacenaron a 4 °C para su posterior uso.

Se inoculó por asada *E. coli* ER2738 en 5 mL de medio LB + Tetraciclina, para su crecimiento toda la noche a 37 °C, 200 rpm y con este cultivo dejado como preinóculo se realizó la titulación de los fagos obtenidos previamente, este cultivo puede ser utilizado en 5-10 horas. Para llevar a cabo la titulación, se requirió tener listo el Top agar a 45 °C en baño María, 3 mL en cada tubo y las placas a 37 °C con LB/IPTG/Xgal. Se prepararon diluciones 10^x (según fuese el caso de la titulación, se utilizaron diluciones; 10², 10⁴, 10⁶, 10⁸ y 10¹⁰, tanto para IgG2 y para sueros, según correspondiese a la ronda de selección). Se dispusieron las diluciones seriadas en tubos de 1.5 mL, colocando 990 µL de medio LB y 10 µL de los fagos obtenidos, preparando 1000 µL de

volumen final, tomando 10 μL de la dilución anterior para realizar la nueva dilución, las cuales se mezclaron brevemente para garantizar su homogeneidad. Una vez preparadas las diluciones, se tomaron 10 μL de cada dilución 10^X y/o cada muestra de fagos de acuerdo a lo se necesite titular en 200 μL de cultivo de *E. coli* ER2738, $\text{DO}=0.5$ y se incubó 20 min a 37 °C, 200 rpm. Las células infectadas se transfirieron a un tubo que contenía 3 mL de top agar a 45 °C, mezclando breve y rápidamente para homogeneizar y vertiéndose en cajas de Petri con LB/Xgal/IPTG/TC, una vez transcurridos 5 min, se invirtieron las cajas para incubar toda la noche a 37 °C.

Al día siguiente se realizó el conteo de las placas en la caja Petri para obtener el valor de unidades formadoras de placa (pfu, por sus siglas en inglés).

Por otra parte, se amplificó la elución de fagos, inoculando con *E. coli* ER2738 (1:100), 20-50 mL de medio LB + Tetraciclina en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se incubaron dos cultivos a 37 °C con agitación a 200 rpm y se monitoreo el crecimiento del cultivo (20-50 mL) hasta registrar una densidad óptica (DO_{600}) = 0.05-0.1.

Una vez llegado a esta DO, se agregaron los fagos previamente obtenidos (conservando 500 μL de cada uno). Y se incubó entre 4-5 horas a 37 °C. Pasado este tiempo se centrifugó durante 20 min a 4000 rpm y se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a otros tubos, a los cuales se agregó 1/5 parte de la mezcla PEG/NaCl (Anexo 1) y se mezcló para su homogenización. Ej.: 25 mL cultivo: 5 mL de la mezlca PEG/NaCl. Se dejó precipitando el sobrenadante con la mezcla PEG/NaCl toda la noche a 4 °C.

El precipitado se centrifugó 35 min a 4500 rpm y 4 °C. Terminado el proceso de centrifugación se eliminó el sobrenadante y agregaron 5 mL de PBS por tubo, resuspendiendo completamente. Posteriormente, se agregó 1 mL de PEG/NaCl y se dejó en hielo 2 hrs. Una vez pasado este tiempo, se volvió a centrifugar, obteniendo y resuspendiendo el pellet en 1 mL de PBS y centrifugando a 4000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se conservó a 4 °C, siendo esté el que contiene los fagos. De igual manera, se realizó la titulación, variando las diluciones de acuerdo a los cálculos de lo que se espera en esta amplificación.

Este proceso se repitió 3 ocasiones, siendo estos, los tamizados que se realizaron para seleccionar los fagos que son afines a los anticuerpos contenidos en los sueros y más específicamente a la IgG2 obtenida de bovinos inmunizados. Además, se realizó tanto para las rondas de selección

utilizando solamente IgG2 del bovino 135 y las rondas de selección que se realizaron utilizando IgG2 de los 3 bovinos inmunizados.

ELISA de unión al fago

Después de tres rondas de tamizados se realizaron ensayos de unión mediante ELISA utilizando fago-péptidos provenientes de clonas independientes tomadas al azar y amplificadas para la producción de las moléculas. En este procedimiento una placa de ELISA se cubrió con IgG2 y otra placa con leche al 4%, cada clon de fago-péptido será evaluado individualmente. El fago unido se detectó con un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa (GE Healthcare).

Se comenzó con la amplificación en placa de cultivo utilizando un volumen de 300 μ L de medio LB/Xgal/IPTG inoculado con *E. coli* ER2738, esperando una DO = 0.05 – 0.1 para infectar picando cada placa de las obtenidas en las titulaciones anteriores. También se infectó 1 pozo por cada amplificado de 2^a y 3^a ronda, utilizando 5 μ L de cada fago péptido para infectar *E. coli* ER2738. Se incubó por 15 hrs a 30 °C. Pasado este tiempo, las placas se centrifugaron a 4000 rpm por 35 minutos.

Los pozos de una placa de ELISA se cubrieron con 500 ng de IgG2 en 100 μ L de solución de carbonatos (30 mM Na₂CO₃, 70 mM NaHCO₃, pH: 9.6) y otra placa de ELISA fue cubierta con 100 μ L de leche al 4% en solución de carbonatos, ambas se cubrieron con aluminio e incubaron toda la noche a 4 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a retirar el sobrenadante y bloquear con leche al 4% por 2 horas a 37 °C. Se retiró la solución de bloqueo y se lavó 1 vez con PBS, para agregar 25 μ L de fagos obtenidos de cada cultivo a cada placa (Placa IgG2 y Placa leche 4%). Incubando 1 hora a 30 °C. Los pozos se lavaron en tres ocasiones con PBS/Tween-20 al 0.05%, y otras tres ocasiones con PBS, posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-M13 (Dilución 1:5000) en el amortiguador de bloqueo (PBS+Tween 0.05%) en un volumen final de 100 μ L por pozo, incubándose durante 1 a 2 horas a 30 °C. Los pozos se lavaron en tres ocasiones con PBS/Tween-20 al 0.05%, y otras tres ocasiones con PBS, posteriormente se visualizó la unión de los fagos utilizando el ácido 2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) (ABTS, Sigma-Aldrich) en amortiguador de citratos, utilizando un volumen de 100 μ L por pozo, dejando pozos sin agregar fagos y únicamente agregando solución de revelado como control negativo. La absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 405 nm.

Los ensayos con prueba de ELISA se estandarizaron luego de realizar este protocolo y no observar buenos resultados, para ello se adaptó a condiciones menos astringentes, reduciendo el número lavados después de cada incubación, es decir, después de la incubación con los fagos y después de la incubación con el anticuerpo anti-M13, resultando en un lavado con PBS/Tween-20 al 0.05%, seguido de dos lavados con PBS. Condiciones que utilizaron para la realización de las pruebas ELISA.

Secuenciación del DNA del fago

Purificación de ssDNA para secuenciación

Se realizó un cultivo de las clonas infectadas con el fago-péptido y los sobrenadantes se centrifugaron para recuperar los sobrenadantes en un nuevo tubo.

Se inoculó a partir de un precultivo de *E. coli* ER2738 1:100 en medio LB + Tetraciclina (TC), en un volumen acorde al volumen necesario para las muestras que se pretendan mandar a secuenciar y se deja crecer a 37 °C, 200 rpm, hasta llegar a una DO = 0.05-0.1. Se dispensaron 2 mL del cultivo de *E. coli* en tubos de cultivo para cada clona a secuenciar, colocando 12 tubos para las clonas seleccionadas.

Se picaron las placas seleccionadas de las cajas donde se habían resguardado, infectando con fagos a los tubos con crecimiento de *E. coli* ER2738, recogiendo bien las placas separadas para asegurar que cada placa contenga una sola secuencia de DNA. Se dejó incubando los tubos a 37°C con agitación de 200 rpm durante 5 horas. Pasado este tiempo, se transfirieron los cultivos a microtubos y se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 segundos.

Posteriormente, se procedió a realizar una purificación para obtener material para secuenciación, transfiriendo 1000 µL de los fagos contenidos en el sobrenadante a un nuevo microtubo adicionando 400 µL de 20% PEG/2.5 M NaCl, invirtiendo varias veces para mezclar completamente y dejando precipitar entre 20 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se desechó el sobrenadante, se centrifugó brevemente (14000 rpm, 1 min.) y cuidadosamente se eliminó el remanente de sobrenadante.

Se suspendió el pellet en 100 µL de Solución amortiguadora de Yodo, se adicionaron 250 µL de etanol absoluto y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se

centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C y descartó el sobrenadante. Se lavó el sedimento con 0.5 mL de etanol al 70%, centrifugando nuevamente para descartar el sobrenadante y secar la pastilla al aire. El aislado se suspendió en 30 µL de H₂O mili-Q.

Esta solución que contiene el DNA de los fagos y se cuantificó por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y se visualizó el DNA en geles de agarosa 1%. Se estandarizó la concentración del DNA (800 ng) y el material genético obtenido se mezcló con el oligonucleótido -96gIII del cual se añadió 1 µL (10pmol/uL) en un volumen final de 16 µL para su secuenciación.

Las clonas seleccionadas para caracterización fueron secuenciadas por el método de Sanger para elucidar la secuencia de nucleótidos de los insertos del gen III, los cuales fueron ubicados utilizando el programa BioEdit Sequece Aligment Editor, identificando las secuencias que flanquean estos insertos. Posteriormente, se tradujeron las secuencias de nucleótidos a aminoácidos con ayuda del programa *Translate tool* de ExPASy, para conocer la secuencia de los péptidos.

Análisis bioinformático

La estructura primaria de los péptidos obtenidos fue analizada con herramientas bioinformáticas para evaluar sus características fisicoquímicas (ExPASy), diversidad de secuencias, mapeo en bases de datos (PepBank, BDB), así como sus propiedades inmunogénicas teóricas (BCPred, LBtope y BcePred).

Evaluación antigénica de los péptidos (Ensayos ELISA)

En ensayos de ELISA, una batería de sueros negativos y positivos para *Anaplasma marginale* obtenidos de bovinos infectados con aislados caracterizados en laboratorio, así como sueros positivos obtenidos de casos identificados en campo fueron utilizados para evaluar la antigenicidad de los péptidos seleccionados.

Para el caso de ELISA se fijaron IgG2 y leche 4% en placas o tiras de ELISA toda la noche, al día siguiente se retiró el sobrenadante y bloqueó con leche 2 hrs a 37 °C. Posterior a eso, se retiró la solución de bloqueo y lavó 1 vez con PBS. Se agregaron 25 µL de cada cultivo a cada placa de ELISA (placa IgG2 y placa de leche 4%). Se dejó incubando 1 hr a 30 °C.

Se realizaron 3 lavados con PBS + Tween 0.05% y posteriormente 3 lavados únicamente con PBS. Se agregaron 100 μ L por pozo del anticuerpo para la realización de la ELISA en dilución 1:5000 (1 μ L de anticuerpo y el resto de PBS + Tween 0.05%). Dejando incubar 2 hrs a 30 °C, se repitieron los 3 lavados con PBS + Tween 0.05% y 3 lavados solamente con PBS.

Para finalizar, se agregaron 100 μ L de sustrato esperando máximo 60 minutos para leer a 405 nm. Para determinar la concentración del fago, se compararon las señales con y sin IgG2.

RESULTADOS

Tamizado de los fago péptidos

La biblioteca utilizada Ph.D.TM-C7C Phage Display Peptide Library (New England Biolabs) que tiene una complejidad de 10^9 clonas independientes, con una concentración de 1×10^{13} pfu/mL fue sometida a un proceso de tamizado usando IgG2 y sueros de bovinos inmunizados, como ligando para el fago péptido desplegado de la biblioteca. Durante cada ronda de tamizado se obtuvieron los títulos de los fagos al inicio y los fagos recuperados en la elución. Como se refleja a continuación (cuadro 2), los títulos de la amplificación se encuentran en el orden de 10^8 - 10^{14} pfu/mL, los cuales se estandarizaban para tener un título de entrada en el orden 10^9 pfu/mL, mientras que los de salida obtenidos después de los lavados se encontraron en el orden de 10^2 - 10^5 pfu/mL.

La simbología utilizada para representar la molécula con la cual fueron seleccionados los fagos, el número de ronda de selección al que pertenecen y el número de clona es la siguiente: Cada letra indica una ronda y la molécula con la que fue seleccionada en esa ronda, donde I = IgG2 y S = Sueros. Ej.: II=1^a y 2^a selección con IgG2, IS=1^a selección con IgG2 y 2^a selección con sueros, ISI=1^a selección con IgG2, 2^a selección con sueros y 3^a selección con IgG2. Los números que aparecen a la derecha de cada descripción corresponden al número de clona seleccionada en la placa de titulación. Ej.: ISI-1= 1^a selección con IgG2, 2^a selección con sueros, 3^a selección con IgG2 y corresponde a la clona 1 de esa titulación.

Cuadro 2. Título de fago péptidos obtenidos en las rondas de selección utilizando IgG2 del Bov. 135. Resultados después de realizar la selección en los inmunotubos (fagos de salida) y después de realizar el amplificado para iniciar la siguiente ronda de selección (fagos de entrada).

Ronda de selección	Condiciones de selección	Fagos de salida (pfu/mL)	Fagos de la amplificación (pfu/mL)
1 ^a	I	5.52×10^3	4.49×10^{10}
	S	3.79×10^5	5.98×10^8
2 ^a	II	6.40×10^3	1.56×10^{10}
	IS	3.21×10^4	2.94×10^{10}
	SI	1.40×10^3	4.29×10^{10}

	SS	3.26×10^4	3.11×10^{10}
3^a	III	1.00×10^2	2.36×10^{12}
	ISI	3.30×10^3	2.09×10^{10}
	SII	Sin crecimiento	Sin crecimiento
	SSS	3.00×10^2	3.22×10^{12}

ELISA

Realizadas las tres rondas de selección, se llevaron a cabo los ensayos ELISA para analizar los fago péptidos que superaron las tres rondas de selección. A continuación, se analizaron 12 clonas seleccionadas (III-1, SSS-1, SSS-2, SSS-3, ISI-1, ISI-2, ISI-3, ISI-4, ISI-5, ISI-6, SI-1 y SI-2) y los 8 fagos recuperados y conservados de la segunda y tercera ronda de selección (III, ISI, SII, III, II, IS, SI y SS). Evaluando cada fago péptido con IgG2 y leche 4% en la placa de ELISA.

Los resultados del análisis de las 20 muestras anteriores no fueron representados en esta gráfica (figura 6) debido a que los valores obtenidos de densidad óptica (DO) son similares para los fago péptidos evaluados con IgG2 y con leche 4%. Por lo cual, solo se seleccionaron las cuatro clonas que mostraron diferencias significativas en la ELISA en cuanto a su evaluación con ambos sustratos.

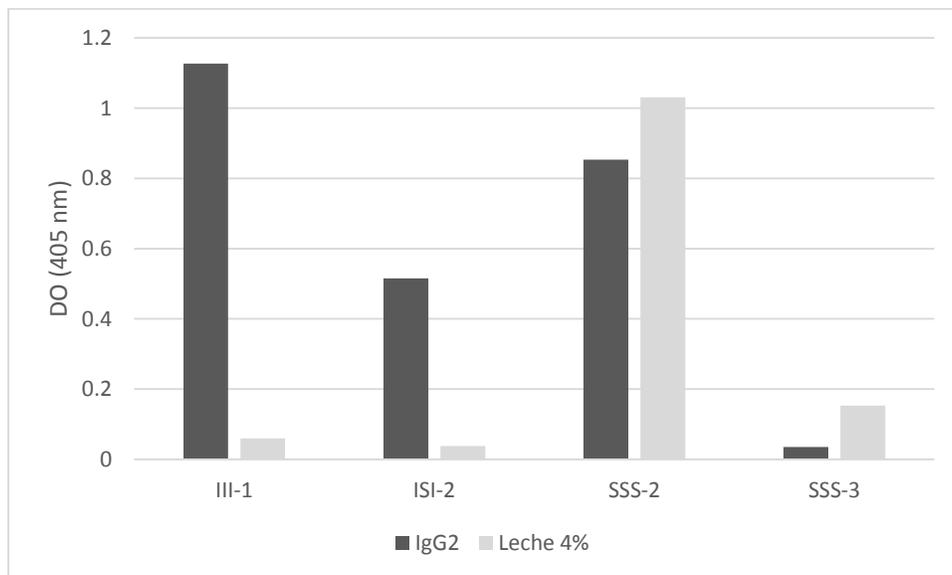


Figura 6. Fago péptidos evaluados en presencia de IgG2 y leche al 4%. Se observan 4 fagos de los 20 evaluados en presencia de IgG2 y Leche 4%, donde III-1 e ISI-2 muestran mayor especificidad a IgG2 respecto a la leche 4%.

Los resultados anteriores, sugieren que las clonas derivadas de las rondas de selección III-1 e ISI-2 son específicos para la IgG2, respecto a la leche 4%, contrario al caso de SSS-2 y SSS-3, que resultan con mayor reconocimiento a la leche 4%. Sin embargo, estos resultados solo son sugerentes, dado que no fueron estandarizadas las concentraciones de los fagos.

Posteriormente, se realizó otro ensayo de ELISA, en el cual evaluamos una mayor cantidad de muestras, para tratar de seleccionar un mayor número de fagos específicos a IgG2 (cuadro 3). Para esto se realizó una amplificación de todos los fagos en *E. coli* ER2738, utilizando un volumen de 3 mL de medio LB/Xgal/IPTG/TC, siguiendo el protocolo mencionado en la metodología, adaptándola al nuevo volumen.

Cuadro 3. Organización de las muestras en las placas de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	III	III-1	ISI-5	ISI-13	ISI-21	ISI-29	ISI-7	ISI-15	ISI-23	ISI-31	ISI-39	ISI-47
B	ISI	SSS-1	ISI-6	ISI-14	ISI-22	ISI-30	ISI-8	ISI-16	ISI-24	ISI-32	ISI-40	B
C	SII	SSS-2	ISI-7	ISI-15	ISI-23	ISI-1	ISI-9	ISI-17	ISI-25	ISI-33	ISI-41	B
D	SSS	SSS-3	ISI-8	ISI-16	ISI-24	ISI-2	ISI-10	ISI-18	ISI-26	ISI-34	ISI-42	B
E	II	ISI-1	ISI-9	ISI-17	ISI-25	ISI-3	ISI-11	ISI-19	ISI-27	ISI-35	ISI-43	ISI-51
F	IS	ISI-2	ISI-10	ISI-18	ISI-26	ISI-4	ISI-12	ISI-20	ISI-28	ISI-36	ISI-44	ISI-52
G	SI	ISI-3	ISI-11	ISI-19	ISI-27	ISI-5	ISI-13	ISI-21	ISI-29	ISI-37	ISI-45	SI-1
H	SS	ISI-4	ISI-12	ISI-20	ISI-28	ISI-6	ISI-14	ISI-22	ISI-30	ISI-38	ISI-46	SI-2

El cuadro número 3 indica a que ronda de selección pertenece y bajo qué objetivo se realizó la selección del fago péptido, donde I = IgG2 y S = Sueros, los números corresponden al número de clona seleccionada y B indica que estos pozos fueron utilizados como blancos para el ensayo, es decir, solo se colocó la solución de revelado ABTS.

Acorde a los resultados anteriores, se decidió utilizar esos 4 fagos como controles, positivos para IgG2; III-1 e ISI-2 y para leche 4%; SSS-2 y SSS-3. Con lo que al realizar la nueva ELISA, se probaron todas las muestras antes mencionadas (cuadro 3), buscando los fagos que nos brinden mayor información.

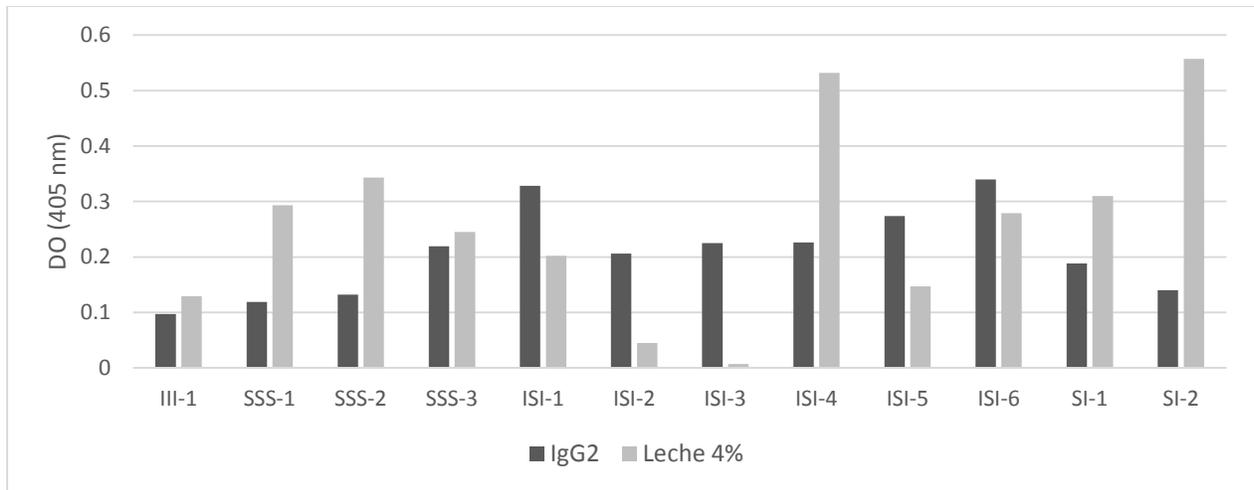


Figura 7. En esta gráfica se representan los resultados de la evaluación de 12 fago péptidos en presencia de IgG2 y Leche 4%. El resto de los fagos no fueron representados en esta gráfica, ver anexo 3.

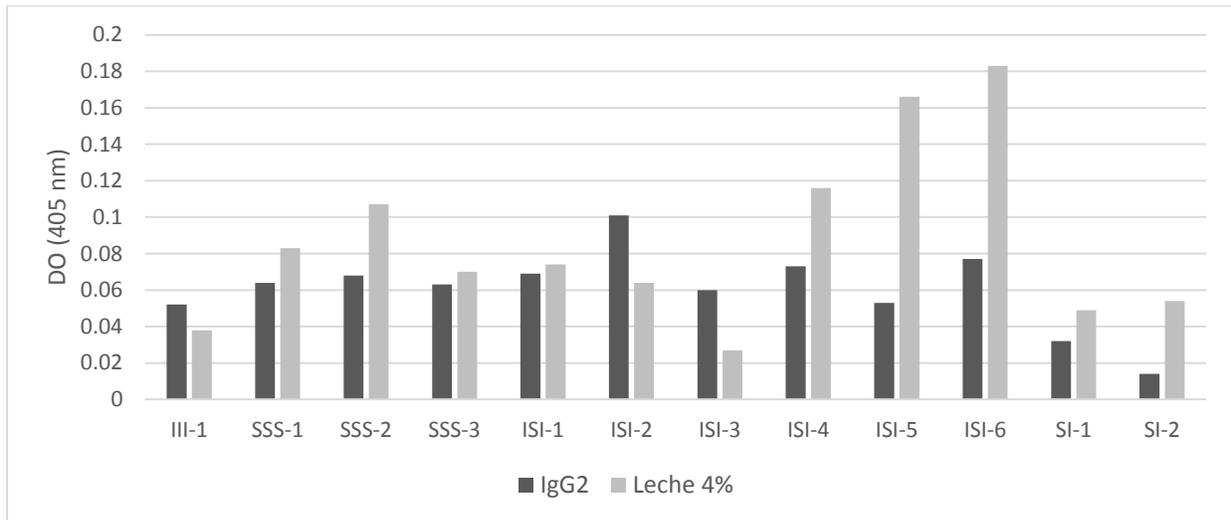


Figura 8. En esta gráfica se representan los resultados de la evaluación de 12 fago péptidos en presencia de IgG2 y Leche 4%. El resto de los fagos no fueron representados en esta gráfica, ver anexo 3.

Al igual que en la ELISA anterior (figura 6), los resultados mantuvieron densidades ópticas bajas (Figuras 7 y 8, figura suplementaria 1), lo que nos indica que no son fagos con importante interacción con el antígeno utilizado o que tienen una baja concentración de fagos colocados en la placa de ELISA. El hecho de que III-1 mostrase una diferencia en cuanto a la unión de IgG2 o leche 4% (figura 7), puede deberse a algún error o una baja concentración del fago, sin embargo, los otros tres fagos seleccionados como controles (ISI-2, SSS-2 y SSS-3) mantienen el mismo comportamiento en los ensayos de ELISA. Esta última ELISA se realizó nuevamente (figura 8) y

cuyos resultados referentes a III-1, ISI-2, SSS-2 y SSS-3 corresponden con los datos obtenidos en la primera ELISA (figura 6).

Debido a lo anterior, se evaluaron una vez más los fagos seleccionados en la primera ELISA (figura suplementaria 2). Una vez realizada esta evaluación, se procedió a seleccionar y amplificar en *E. coli* ER2738, únicamente 6 fagos (III-1, SI-1, SI-1, SSS-2, SSS-3 e IS que proviene de la conservación de fagos obtenidos de la segunda ronda de selección y no de una sola clona), utilizando un volumen de 25 mL cultivo en medio LB/IPTG, siguiendo el protocolo mencionado en la metodología, escalando volumen utilizado.

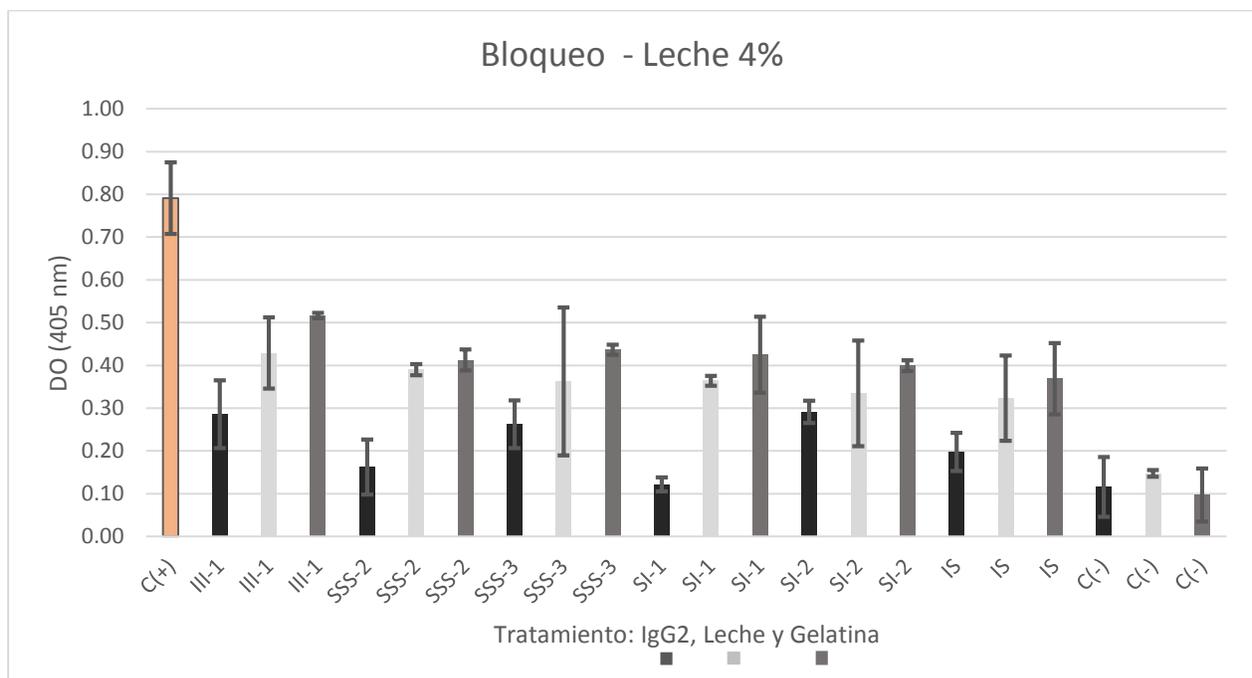


Figura 9. ELISA por duplicado de cada uno de los 6 fago péptidos amplificados en presencia de IgG2, Leche 4% y Gelatina 4%, bloqueada con Leche al 4%. En esta gráfica se representan las evaluaciones realizadas, utilizando como control positivo el fago M13 sin péptido desplegado. Las barras representan la desviación estándar obtenida de los valores de DO obtenidos de cada fago evaluado en las mismas condiciones por duplicado.

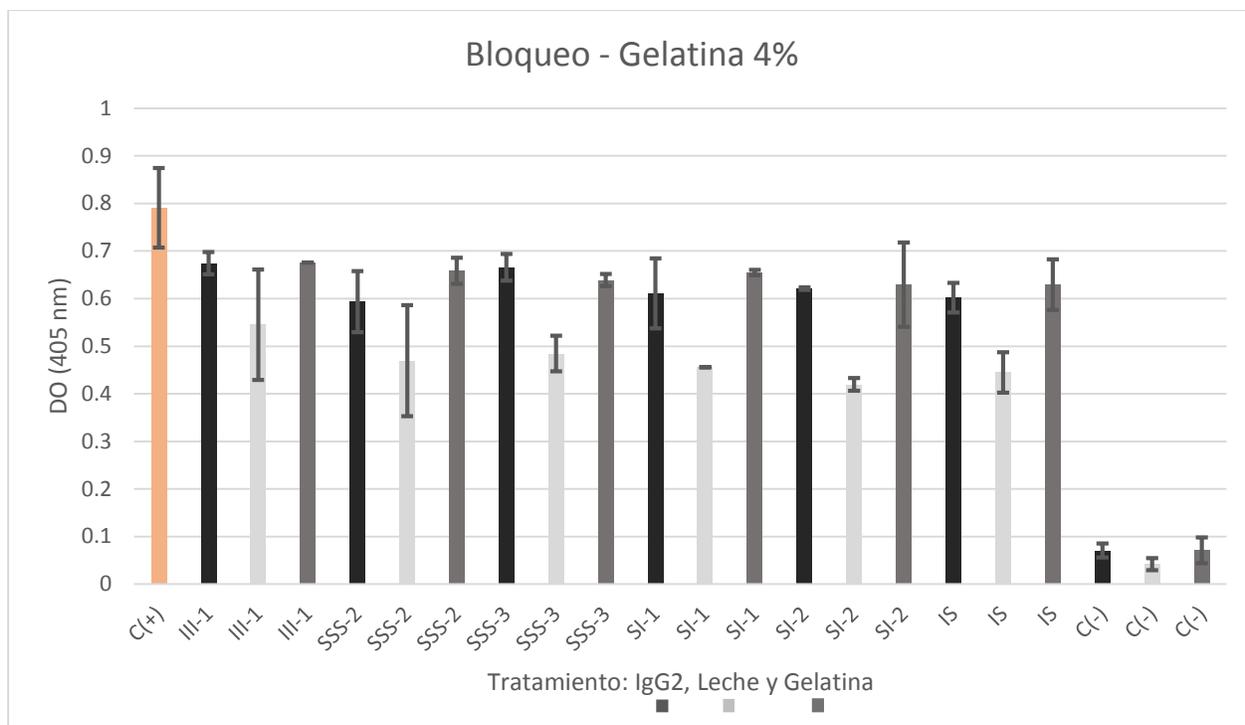


Figura 10. ELISA por duplicado de cada uno de los 6 fagos amplificados presencia de IgG2, Leche 4% y Gelatina 4%, bloqueada con Gelatina al 4%. En esta gráfica se representan las evaluaciones realizadas, utilizando como control positivo el fago M13 sin péptido desplegado. Las barras representan la desviación estándar obtenida de los valores de DO obtenidos de cada fago evaluado en las mismas condiciones por duplicado.

Se evaluaron por duplicado los 6 fagos seleccionados (10 μ L en cada pozo), cubriendo la placa de ELISA con IgG2, Leche 4% y Gelatina 4%. Siguiendo el protocolo establecido previamente y bloqueando con leche 4% o gelatina 4%, según sea el caso. Esta ELISA se realizó para determinar si los fago péptidos seleccionados con los datos previos son específicos para IgG2 o pueden interactuar con un sustrato diferente como lo es la leche o la gelatina (figuras 9 y 10). Se observa que en los fagos bloqueados con gelatina 4% se conserva una mayor cantidad de fagos ligados, contrario a los que fueron bloqueados con leche 4%. Esto sugiere que los fagos no solo se ligan a IgG2, sin embargo, aún falta revisar otras condiciones como es el cambio en el número de lavados, la concentración de cada fago e inclusive conocer si despliega o no un péptido.

Una vez obtenidos estos datos de ELISA, se seleccionaron los fagos que tuvieron mayor afinidad a las IgG2 para amplificar y purificar el DNA del mismo. Una vez que se tiene el DNA, se visualizó en un gel de agarosa 1% y se prepararon las muestras para determinar la secuencia del péptido evaluado.

Se enviaron a secuenciar 24 muestras de DNA, sin embargo, al analizar las secuencias se observó que solo 10 muestras tienen una secuencia insertada en su genoma, que al momento de traducir la secuencia resulta en un péptido de 7 aminoácidos con sus respectivos residuos de cisteínas (cuadro 4).

Cuadro 4. Secuencia del péptido desplegado en la proteína pIII del fago M13.

Clona seleccionada	Secuencia de aminoácidos
SSS-2	ACE SMKAL ACGGG
ISI-7, ISI-31, I-1, I-2	AC SGYTSKL CGGG
II-1	AC KDHIHKR CGGG
IS-1	AC GTPPGSM CGGG
IS-2	AC NRMTLNY CGGG
SI-1	AC IHSPTAL CGGG
SI-2	AC NSHTQGK CGGG

Se realizó una búsqueda de las 7 secuencias de aminoácidos de los fago-péptidos seleccionados en las bases de datos PepBank, la cual es una base de datos de péptidos basada en la minería de textos de secuencia y las fuentes públicas de datos de péptidos, además de realizar la búsqueda en BDB (Biopanning Data Bank) que es una base de datos que colecciona los péptidos que han sido seleccionados de bibliotecas aleatorias, en las cuales, solo la secuencia del péptido SI-1 (IHSPTAL) muestra registro en el servidor BDB (Biopanning Data Bank) como mimotopo de una enzima que degrada la insulina, además se realizó la búsqueda de propiedades inmunogénicas teóricas en las bases de datos BCPred, LBtope y BcePred, esta última predice que la secuencia del péptido II-1 (KDHIHKR) corresponde a un péptido polar expuesto en superficie.

Por otra parte, los fago-péptidos seleccionados se evaluaron mediante ELISA utilizando IgG2 purificada de los tres diferentes sueros inmunes, sueros inmunizados y sueros positivos a la infección por *A. marginale*, diferenciando tres fago-péptidos por sus propiedades de unión, especificidad, afinidad y estabilidad a los ligandos, corroborando que los fago-péptidos con la misma secuencia tales como ISI-7 e I-1 mantienen el mismo comportamiento con los diferentes objetivos utilizados en el ensayo (figura 11).

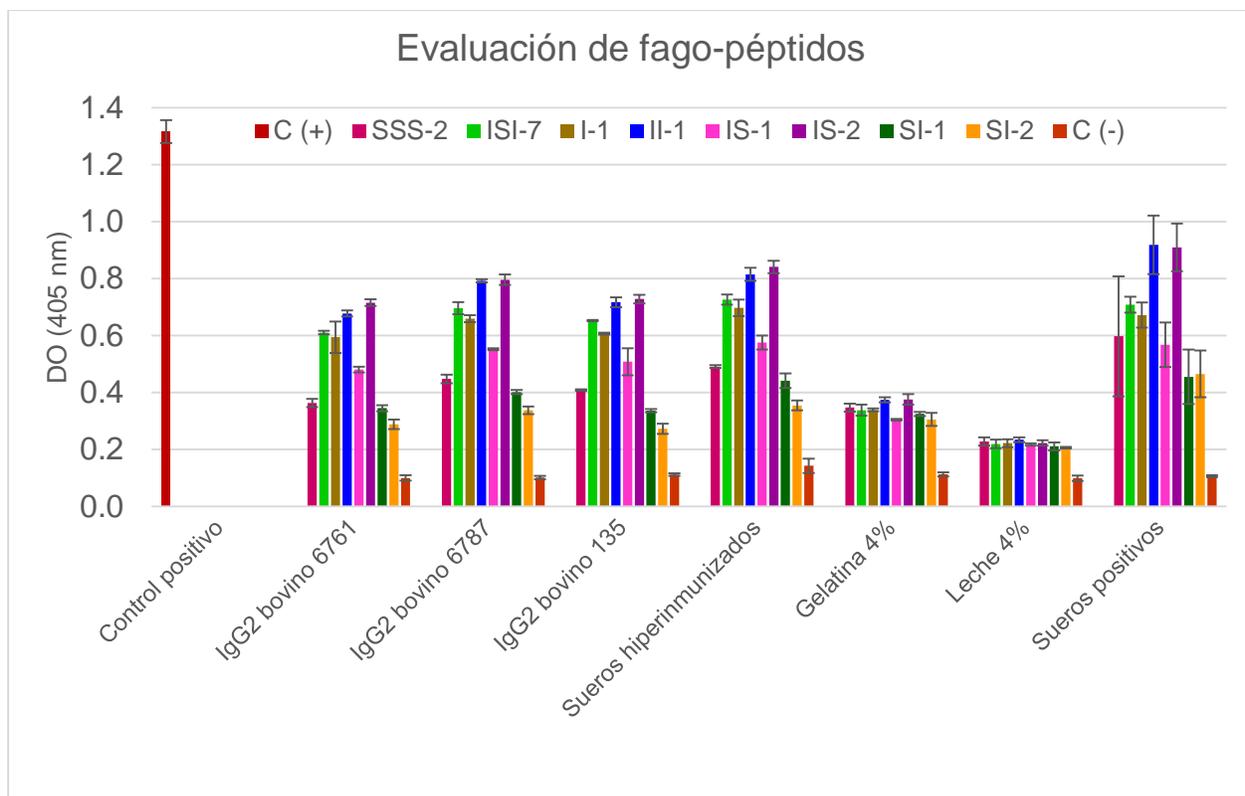


Figura 11. ELISA de los fago-péptidos seleccionados en presencia de IgG2 de los bovinos 135, 6761 y 6787, sueros hiperinmunizados, leche 4%, gelatina 4% y sueros positivos, bloqueada con Leche al 4%. En esta gráfica se representan los resultados de cada fago-péptido evaluado en el ensayo, utilizando como control positivo el fago M13 sin péptido desplegado. Las barras representan la desviación estándar obtenida de los valores de DO obtenidos de cada fago evaluado en las mismas condiciones por triplicado.

Se realizaron las pruebas ELISA de los fago-péptidos seleccionados en la primera y segunda ronda de selección realizadas con la biblioteca Ph.D.TM-C7C Phage Display Peptide Library (New England Biolabs) que tiene una complejidad de 10^9 clonas independientes, con una concentración de 1×10^{13} pfu/mL la cual fue sometida a un proceso de selección usando IgG2 purificada y concentrada de los tres bovinos hiperinmunizados y sueros de bovinos inmunizados, como ligando para el fago péptido desplegado de la biblioteca. Durante cada ronda de selección se obtuvieron los títulos de los fagos que entraban y los fagos que salían al recuperar la elución (cuadro 5). Se estandarizaban los títulos de la amplificación para tener un título de entrada en el orden 10^9 pfu/mL. La simbología utilizada para representar la molécula con la cual fueron seleccionados los fagos, el número de ronda de selección al que pertenecen y el número de clona es la misma que se utilizó para las primeras rondas de selección.

Cuadro 5. Título de fago péptidos obtenidos en las rondas de selección utilizando IgG2 de los Bov. 135, 6761 y 6787. Resultados después de realizar la selección en los inmunotubos (fagos de salida) y después de realizar el amplificado para iniciar la siguiente ronda de selección (fagos de entrada).

Ronda de selección	Condiciones de selección	Fagos de salida (pfu/mL)	Fagos de la amplificación (pfu/mL)
1^a	I	4.28×10^3	2.95×10^8
	S	3.17×10^4	3.87×10^8
2^a	II	3.75×10^3	3.25×10^8
	IS	2.16×10^3	2.83×10^{10}
	SI	3.10×10^4	5.38×10^{10}
	SS	2.45×10^3	4.85×10^{10}
3^a	III	2.1×10^2	3.4×10^8
	ISI	2.7×10^3	5.89×10^{10}
	SII	3.1×10^2	4.16×10^8
	SSS	1.7×10^3	3.35×10^{10}

Acorde a los títulos ya obtenidos, se realizó la evaluación ELISA utilizando una mezcla de las tres IgG2 purificadas de los tres bovinos aforando a 500 ng previamente se ha realizado y utilizando leche 4% para seleccionar los que mejor afinidad tengan por las IgG2 y descartar las menos afines, es decir aquellas que se unan a la leche 4%. Utilizando como control positivo al fago M13 sin péptido desplegado fijado e incubado como las IgG2 y la leche 4%, como control negativo también se utilizó el fago M13 sin péptido desplegado, con la diferencia de que en la placa previamente se habían fijado las IgG2 y le leche 4%, además, se utilizaron los fagos policlonales obtenidos de la primera y la segunda ronda de selección, evaluando entonces 20 clonas de cada selección de la primera ronda y 12 clonas de cada selección de la segunda ronda (figura 12).

Los resultados de las densidades ópticas de los fago-péptidos evaluados sugieren que existe un mejor reconocimiento por las IgG2 que por la leche, garantizando así un mayor espectro de péptidos que sean ligados de estos anticuerpos (figura 12).

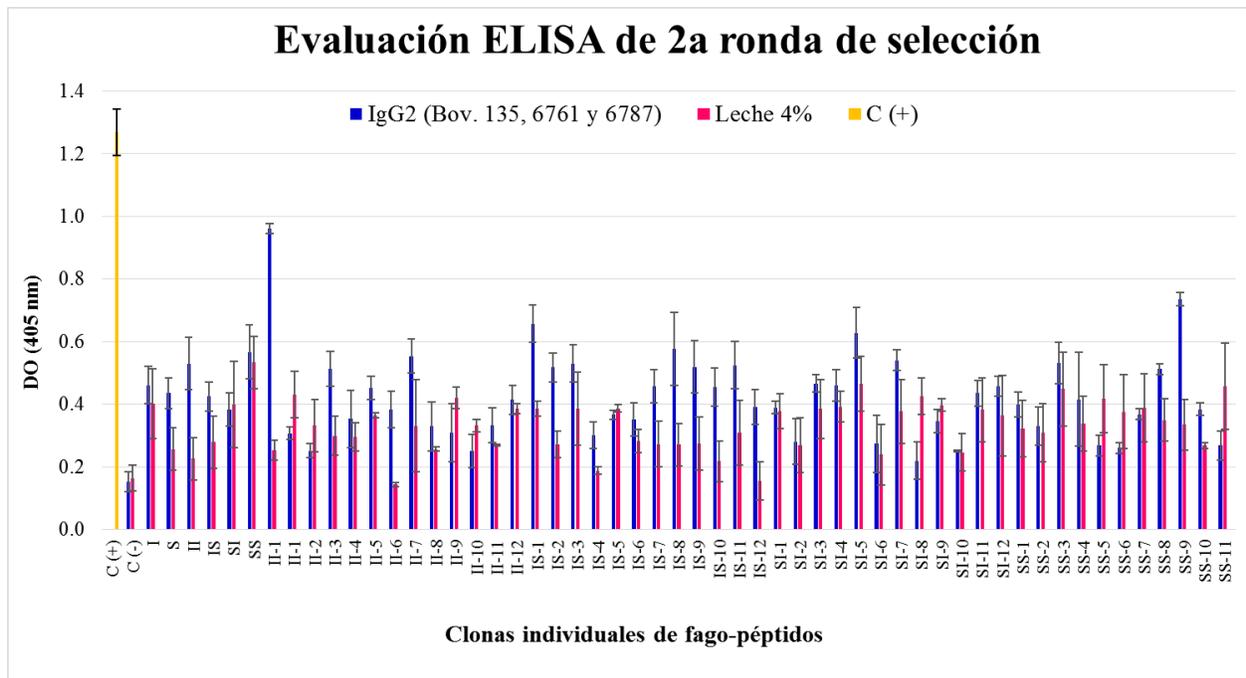
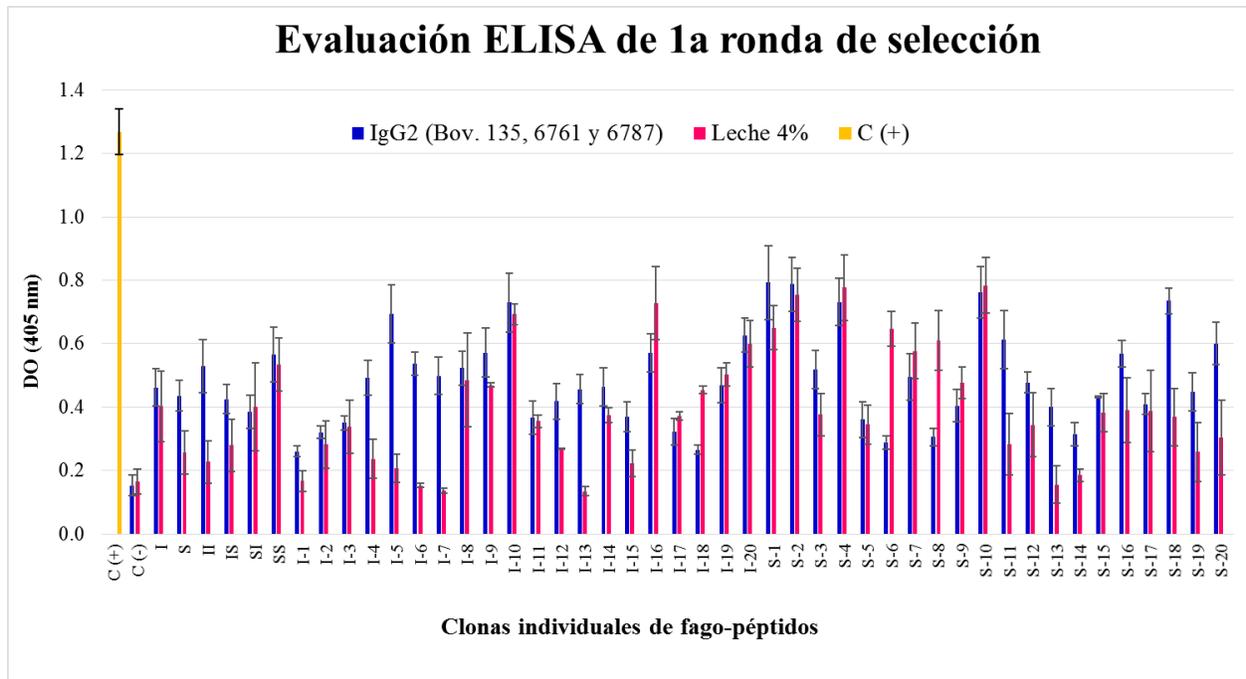


Figura 12. Evaluación ELISA de 2 rondas de selección. a) Evaluación ELISA de 1ª ronda de selección. b) Evaluación ELISA de 2ª ronda de selección. Se representan 2 gráficas con los resultados de la evaluación de 88 fago-péptidos en presencia de una mezcla de las tres IgG2 utilizadas y Leche 4%, bloqueadas con Leche al 4%. Se fijó como control positivo el fago M13 sin péptido desplegado adicionando el anticuerpo anti-M13 y la solución de revelado, y como control negativo también se utilizó el fago M13 sin péptido desplegado, evaluándolo como al resto de los fago-péptidos. Las barras representan la desviación estándar obtenida de los valores de DO obtenidos de cada fago evaluado en las mismas condiciones por duplicado.

DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizó la tecnología de despliegue en fagos, utilizando la biblioteca de péptidos aleatorios Ph.D.TM-C7C (New England Biolabs), la cual expone en la superficie de fagos filamentosos M13, residuos de 7 aminoácidos que forman un *loop* debido a la formación de un puente disulfuro formado por dos cisteínas que flanquean este péptido de 7 aminoácidos. Esta tecnología se ha convertido en una herramienta útil para la identificación de péptidos reconocidos por diferentes moléculas de selección, tales como los anticuerpos IgG2 utilizados en el presente trabajo.

Por esta razón, la selección de péptidos con capacidad de reconocimiento específico para el anticuerpo IgG2, es de fundamental importancia en el desarrollo de nuevas estrategias que nos permitan contribuir al desarrollo de un candidato vacunal para el control de la anaplasmosis bovina. Como sabemos, los fagos filamentosos exponen en su superficie secuencias peptídicas fusionadas a las proteínas de la cápside viral; siendo la pIII la responsable de exponer los péptidos de 7 aminoácidos en esta biblioteca.

Después de realizar las rondas de selección empleando el anticuerpo IgG2 del bovino 135 y sueros de bovinos inmunizados contra *A. marginale*, y seleccionar candidatos mediante ensayos ELISA para mandar a secuenciar, se lograron aislar siete secuencias que fueron deducidas de la secuencia de nucleótidos del fago que lo expone.

Ya que, las bibliotecas de despliegue en fagos han sido usadas exitosamente para la selección de mimotopos empleando anticuerpos para la localización de epítomos inmunológicamente activos, los fago péptidos seleccionados fueron evaluados en ensayos ELISA de fagos, dado que es una prueba inmunodiagnóstica específica, sensible, de bajo costo y fácil de realizar. Cabe resaltar que se presentaron algunas dificultades en los ensayos ELISA, debido a que mostraron variaciones en los resultados obtenidos de la evaluación de un mismo fago péptido. Lo que podría explicarse por las diferencias en los niveles de expresión del fago en *E. coli* ER2738 y dado que la cantidad de diana recubiertos en la placa no es cuantificable y está presente en densidad suficientemente alta para permitir la unión multivalente al fago, este método no determinará si el fago seleccionado se une con alta o baja afinidad, pero servirá para determinar la especificidad de la unión.

De las 7 secuencias elucidadas, se obtuvo un péptido específico común en cuatro fagos diferentes, localizado en clonas obtenidas después de la primera ronda de selección realizada con IgG2 del bovino 135 y en la tercera ronda de selección IgG2 (Bov. 135): Sueros: IgG2 (Bov. 135). Este péptido pudo ser conservado por tener una alta afinidad con el anticuerpo o ser resultado de un péptido que se puede ligar a alguna molécula utilizada durante las rondas de selección como puede ser la leche.

Diferenciamos tres fago-péptidos por sus propiedades de unión, especificidad, afinidad y estabilidad a los ligandos. Sin embargo, en el caso del desarrollo de vacunas o reactivos de diagnóstico, es importante evaluar las propiedades inmunogénicas y antigénicas de los péptidos.

Se obtuvieron varios candidatos a evaluar y mandar a secuenciar de las tres rondas de selección utilizando las tres IgG2 purificadas de los bovinos 135, 6761 y 6787. Sin embargo, resta evaluar por ELISA para seleccionar las clonas que deberán mandarse a secuenciar y realizar su posterior análisis correspondiente de estos fago-péptidos seleccionados.

Debido a los resultados obtenidos hasta la fecha, se pretende continuar con la evaluación en ensayos ELISA para seleccionar algún otro fago-péptido que resulte de interés para el presente trabajo, en lo que se refiere a identificar péptidos que mimetizan epítomos de antígenos reconocidos por anticuerpos IgG2 del bovino inmunizado.

En la parte correspondiente a la evaluación inmunogénica de los fago-péptidos, nos encontramos con algunos problemas en la obtención de células mononucleadas, esto puede deberse a los bovinos de los cuales hemos tomado nuestras muestras recientemente, ya que, los mismos pueden tener una baja concentración de leucocitos al no ser bovinos estimulados recientemente, lo que dificulta obtener una gran cantidad de estas células en la capa flogística.

CONCLUSIÓN

Se identificaron siete secuencias de una biblioteca de péptidos aleatorios de siete aminoácidos, de los cuales tres de ellos muestran mayor afinidad al evaluarlos contra cada una de las tres IgG2 purificadas disponibles, sueros inmunizados y sueros positivos, lo que sugiere que estos fago péptidos mimetizan características de un antígeno reconocido por las inmunoglobulinas de bovinos inmunizados.

PERSPECTIVAS

La generación de fago-péptidos específicos para IgG2 se seguirá evaluando para observar si mimetizan las características estructurales de ligandos reconocidos por los anticuerpos IgG2 de bovinos inmunes a *A. marginale*, esto para probar y validar esos péptidos y localizar otros péptidos que resulten de interés para su posterior evaluación del potencial inmunogénico. Además de lograr una correcta estandarización del protocolo para la purificación de los linfocitos y linfoproliferación para probar la estimulación de los mismos.

ANEXOS

Anexo 1. Soluciones

PEG/NaCl

20% (w/v) polietilen-glicol-8000, 2.5 M NaCl. Autoclave, mezclar bien para combinar los componentes separados (fases) mientras está caliente (recién salido de la autoclave). Conservar a guardar a 4 °C.

Preparación de la mezcla PEG/NaCl (250 mL):

Polietilen-glicol-8000

NaCl

Solución amortiguadora de carbonatos

Na₂CO₃

NaHCO₃

pH: 9.6

LB sólido

25g de medio LB con agar

Aforar a 1000 mL de agua destilada

LB líquido

35g de medio LB

Aforar a 1000 mL

Top agar

Bacto triptone 10g

Yeast extract 5g

NaCl 5g

Bacto agar 7g

Aforar a 1000 mL con agua destilada

X-gal/IPTG

IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) 1.25g

Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) 1g

Disolver en 25 mL DMF (N, N-dimetilformamide).

Tetraciclina (20 mg/mL)

Disolver 100 mg de tetraciclina en 5 mL de etanol 30%

PBS 10X

NaCl (58.44 g mol^{-1}) 80g

KCl (74.55 g mol^{-1}) 2g

Na₂HPO₄ ($141.96 \text{ g mol}^{-1}$) 14.4g

KH₂PO₄ ($136.09 \text{ g mol}^{-1}$) 2.4g

Aforar los reactivos en un volumen final de 1000 mL con agua destilada, pH 7.4

1 M Tris-HCl pH 9.1

Tris-HCl 121.14g

Aforar a 1000 mL de agua destilada, pH 9.1

Tris-Glicina

0.2 M Glycine-HCl (pH 2.2)

Leche o BSA 4%

4 g de leche Svelty Nestle o BSA

Aforar a 100 mL de PBS

Filtrar

Solución amortiguadora de yodo

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA

4 M sodium iodide (NaI)

Conservar a temperatura ambiente protegiendo de la luz.

Anexo 2. Gráficas de ELISA completas (evaluación de 88 fago péptidos)

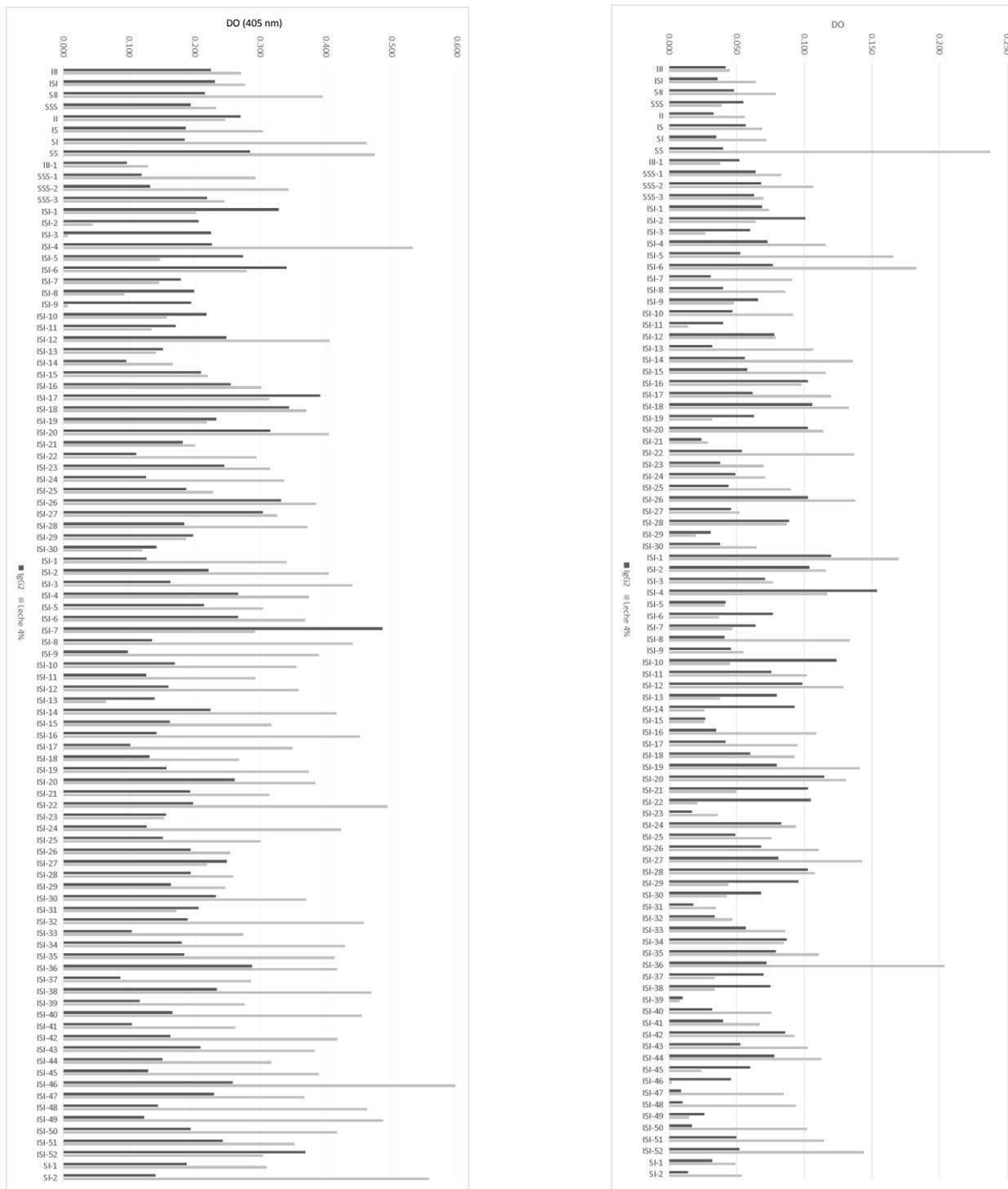


Figura suplementaria 1. En estas gráficas se representan los resultados de la evaluación de 88 fago péptidos en presencia de IgG2 y Leche 4%.

Anexo 3. Gráfica de ELISA (evaluación de 20 fagos)

Debido a lo anterior, se evaluaron una vez más los fagos seleccionados en la primera ronda, para ello se amplificaron una vez más los fagos seleccionados en *E. coli* ER2738, utilizando un volumen de 3 mL de medio LB/Xgal/IPTG/TC, siguiendo el protocolo mencionado en la metodología, adaptándola al nuevo volumen para tener muestra suficiente y realizar el ensayo.

En esta ELISA, podemos visualizar más valores que nos ayudan a la selección de varios fago péptidos para enviar a secuenciar y con ello conocer la secuencia del péptido evaluado.

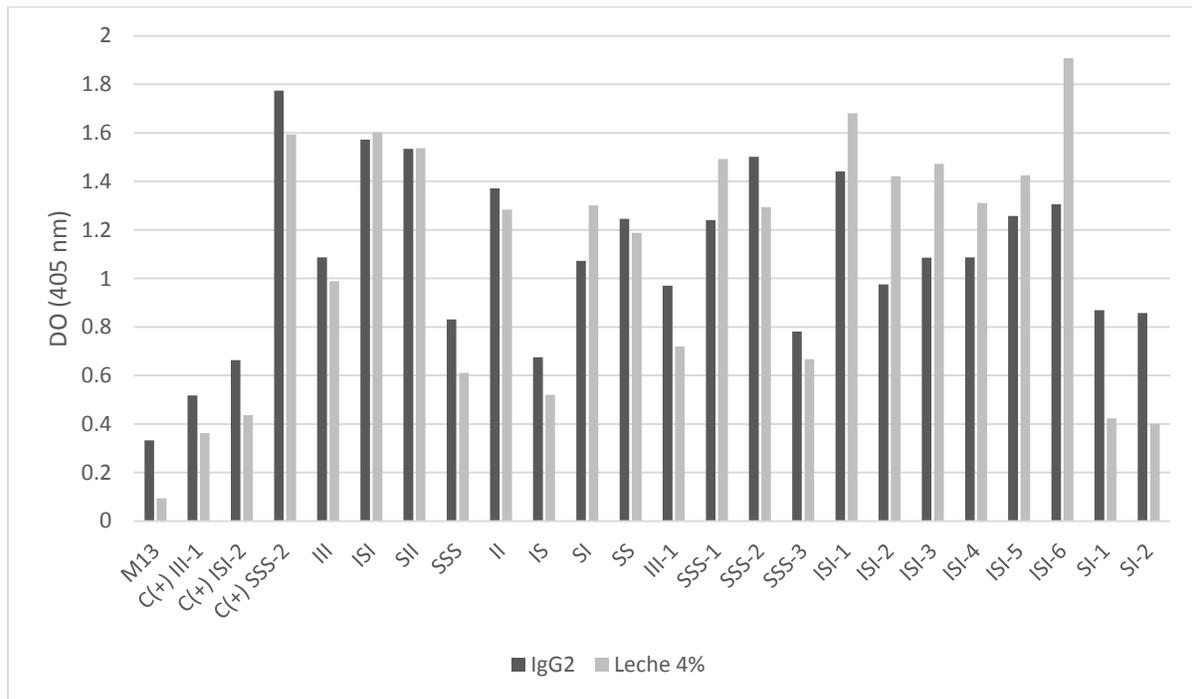


Figura suplementaria 2. En esta gráfica se representan los resultados de la evaluación de 20 fagos en presencia de IgG2 y Leche 4%, bloqueada con Leche 4%. Donde SSS-2 como control positivo para Leche 4% resulta positivo para IgG2, y el caso de ISI-2, no concuerdan los valores del utilizado como control y del evaluado en la ELISA, sin embargo, III-1 resulta positivo para IgG2 tanto en el control positivo como en el evaluado.

REFERENCIAS

Aboytes-Torres, R., Rodríguez, S. D. and Vega, C. A. (1994) 'Molecular Epidemiology of Bovine Anaplasmosis', *Archives of Medical Research*, 25(2), pp. 247–252.

Aghebati-Maleki, L. *et al.* (2016) 'Phage display as a promising approach for vaccine development', *Journal of Biomedical Science*. *Journal of Biomedical Science*, 23, pp. 1–18. doi: 10.1186/s12929-016-0285-9.

Amin-Blanco, N. (2014) 'Identificación de epítomos de proteínas del virus Dengue utilizando una biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos'.

Arap, M. A. (2005) 'Phage display technology - Applications and innovations', *Genetics and Molecular Biology*, 28(1), pp. 1–9. doi: 10.1590/S1415-47572005000100001.

Araújo, F. R. *et al.* (2008) 'IgG and IgG2 antibodies from cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* recognize the recombinant vaccine candidate antigens VirB9 , VirB10 , and elongation factor-Tu', 103(March), pp. 186–190.

Aubry, P. and Geale, D. W. (2010) 'A Review of Bovine Anaplasmosis', *Transboundary and Emerging Diseases*, pp. 1–30. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x.

Barbet, A. F. *et al.* (1999) 'Comparison of Surface Proteins of *Anaplasma marginale* Grown in Tick Cell Culture, Tick Salivary Glands, and Cattle', *Infection and Immunity*, 67(1), pp. 102–107.

Barigye, R. *et al.* (2004) 'Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas mexicanas de *Anaplasma*', *Técnica Pecuaria en México*, 42(1), pp. 219–236.

Barry, M. A., Dower, W. J. and Johnston, S. A. (1996) 'Toward cell-targeting gene therapy vectors: selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries.', *Nature medicine*. United States, 2(3), pp. 299–305.

Bazan, J., Calkosinski, I. and Gamian, A. (2012) 'Phage display - A powerful technique for immunotherapy', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(12), pp. 1817–1828. doi: 10.4161/hv.21703.

De Berardinis, P. and Haigwood, N. L. (2004) 'New recombinant vaccines based on the use of prokaryotic antigen-display systems', *Expert Review of Vaccines*. Taylor &

Francis, 3(6), pp. 673–679. doi: 10.1586/14760584.3.6.673.

Brayton, K. A. *et al.* (2005) 'Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), pp. 844–849. Available at: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0406656102.

Brayton, K. A. (2012) 'Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas', *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(Supl 1), pp. 41–50.

Brown, W. C., Shkap, V., *et al.* (1998) 'CD4+ T-Lymphocyte and Immunoglobulin G2 Responses in Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Outer Membranes and Protected against Homologous Challenge', *Infection and Immunity*, 66(11), pp. 5406–5413.

Brown, W. C., Zhu, D., *et al.* (1998) 'The Repertoire of *Anaplasma marginale* Antigens Recognized by CD4+ T-Lymphocyte Clones from Protectively Immunized Cattle Is Diverse and Includes Major Surface Protein 2 (MSP-2) and MSP-3', *Infection and Immunity*, 66(11), pp. 5414–5422.

Carreño, A. D. *et al.* (2007) 'In vivo Endothelial Cell Infection by *Anaplasma marginale*', 44(1), pp. 116–118.

Connell, M. and Hall, W. (1972) 'Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*', *Aust Vet J*, 48(8), p. 477.

Dark, M. J., Al-Khedery, B. and Barbet, A. F. (2011) 'Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 29(31), pp. 4923–4932. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.131.

Day, L. A. and Hendrix, R. W. (2005) 'Family Inoviridae: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses', in Fauquet, C. M. *et al.* (eds) *Elsevier Inc.* Eighth Rep, pp. 279–287. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.

Delhalle, S., Schmit, J. C. and Chevignr, A. (2012) *Phages and HIV-1: From display to interplay*, *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms13044727.

Deroo, S. and Muller, C. P. (2001) 'Antigenic and immunogenic phage displayed

mimotopes as substitute antigens: Applications and limitations', *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 4, pp. 75–110. doi: 10.2174/1386207013331309.

Diamond, S. L. (2007) 'Methods for mapping protease specificity', *Current Opinion in Chemical Biology*, 11, pp. 46–51. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.11.021.

Dumler, J. S. *et al.* (2001) 'Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combi', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, pp. 2145–2165.

Dybwad, A. *et al.* (1995) 'Peptide phage libraries can be an efficient tool for identifying antibody ligands for polyclonal antisera.', *Clinical and experimental immunology*, 102(2), pp. 438–42.

Fack, F. *et al.* (1997) 'Epitope mapping by phage display: Random versus gene-fragment libraries', *Journal of Immunological Methods*, 206, pp. 43–52. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00083-5.

Flower, D. R. *et al.* (2010) 'Computer aided selection of candidate vaccine antigens', *Immunome Research*. BioMed Central Ltd, 6(Suppl 2), pp. 1–16. doi: 10.1186/1745-7580-6-S2-S1.

Folgori, A. *et al.* (1994) 'A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera.', *The EMBO journal*, 13(9), pp. 2236–43.

Fosgate, G. T. *et al.* (2010) 'Diagnostic accuracy of methods for detecting *Anaplasma marginale* infection in lactating dairy cattle of Puerto Rico', *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, pp. 192–199.

Fragoso-Sánchez, H. (1991) 'La anaplasmosis bovina en México. Garrapatas y enfermedades que transmiten', *Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal*, pp. 153–160.

Futse, J. E. *et al.* (2003) 'Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*:

Retention of Vector Competence in the Absence of Vector-Pathogen Interaction', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), pp. 3829–3834. doi: 10.1128/JCM.41.8.3829.

Gao, J. *et al.* (2010) 'Phage display and its application in vaccine design', *Annals of Microbiology*, 60, pp. 13–19. doi: 10.1007/s13213-009-0014-7.

González, A. M. *et al.* (2011) 'Epidermal Growth Factor Targeting of Bacteriophage to the Choroid Plexus for Gene Delivery to the Central Nervous System via Cerebrospinal Fluid', *Brain Research*, 1359, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.brainres.2010.08.044.Epidermal.

Hamzeh-Mivehroud, M. *et al.* (2013) 'Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 18(23–24), pp. 1144–1157. doi: 10.1016/j.drudis.2013.09.001.

Haq, I. U. *et al.* (2012) 'Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review', *Virology journal*. BioMed Central Ltd, 9, p. 9. doi: 10.1186/1743-422X-9-9.

Hawinkels, L. J. A. C. *et al.* (2007) 'Efficient degradation-aided selection of protease inhibitors by phage display', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, pp. 549–555. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.032.

Hodyra, K. and Dąbrowska, K. (2015) 'Molecular and Chemical Engineering of Bacteriophages for Potential Medical Applications', *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 63, pp. 117–127. doi: 10.1007/s00005-014-0305-y.

Hope, M. *et al.* (2004) 'A novel antigen from *Anaplasma marginale*: characterization, expression and preliminary evaluation of the recombinant protein', *Vaccine*, 22, pp. 407–415. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.07.006.

Hornok, S. *et al.* (2008) 'Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae)', *Veterinary Parasitology*, 154(3–4), pp. 354–359. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.03.019.

Van Houten, N. E. *et al.* (2010) 'Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides', *Vaccine*, 28(10), pp. 2174–2185. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.12.059.Engineering.

Irving, M. B., Pan, O. and Scott, J. K. (2001) 'Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics', *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, pp. 314–324. doi: 10.1016/S1367-5931(00)00208-8.

Jiménez-Ocampo, R. *et al.* (2012) 'Diversidad genética de la región variable de los genes msp1a y msp4 en cepas de *Anaplasma marginale* de México', *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(3), pp. 373–387.

Kaur, T. *et al.* (2012) 'Immunocompatibility of bacteriophages as nanomedicines', *Journal of Nanotechnology*, 2012. doi: 10.1155/2012/247427.

Van Kleef, M. *et al.* (2002) 'Low molecular weight proteins of *Cowdria ruminantium* (Welgevonden isolate) induce bovine CD4+-enriched T-cells to proliferate and produce interferon-gamma', *Veterinary Microbiology*, 85(3), pp. 259–273. doi: 10.1016/S0378-1135(01)00516-8.

Kocan, K. M. *et al.* (1992) 'Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle', *American Journal of Veterinary Research*, 53(4), pp. 499–507.

Kocan, K. M. *et al.* (2003) 'Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle', *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), pp. 698–712. doi: 10.1128/CMR.16.4.698.

Kocan, K. M. *et al.* (2004) '*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia', *Parasitology*, 129, pp. 285–300. doi: 10.1017/S0031182003004700.

Kocan, K. M. *et al.* (2010) 'The natural history of *Anaplasma marginale*', *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), pp. 95–107. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.012.

Kuttler, K. L. (1984) '*Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: A review', *Journal of Wildlife Diseases*, 20(1), pp. 12–20.

Kuttler, K. L. and Zaugg, J. L. (1988) 'Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine', 20, pp. 85–91.

De La Fuente, J. *et al.* (2001) 'Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells', 31, pp. 145–153.

De La Fuente, José *et al.* (2001) 'Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*', *International Journal for Parasitology*, 31(14), pp. 1705–1714. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00287-9.

De La Fuente, J. *et al.* (2002) 'Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks', *Veterinary Microbiology*, 89, pp. 239–251.

De La Fuente, J. *et al.* (2003) 'Characterization of *Anaplasma marginale* Isolated from North American Bison', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), pp. 5001–5005. doi: 10.1128/AEM.69.8.5001.

De La Fuente, J., Van Den Bussche, R. A. and Kocan, K. M. (2001) 'Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae)', *Veterinary Parasitology*, 97, pp. 65–76.

Lee, S. C. *et al.* (2001) 'Phage display mutagenesis of the chimeric dual cytokine receptor agonist myelopoietin.', *Leukemia*. England, 15(8), pp. 1277–1285.

McGarey, D. J. *et al.* (1994) 'Putative Adhesins of *Anaplasma marginale*: Major Surface Polypeptides 1a and 1b', *Infection and Immunity*, 62(10), pp. 4594–4601.

McGuire, T. C. *et al.* (1991) 'Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3', *Journal of Clinical Microbiology*, 29(4), pp. 788–793.

Mullaney, J. M. and Black, L. W. (1998) *GFP:HIV-1 protease production and packaging with a T4 phage expression-packaging processing system.*, *BioTechniques*. England.

Nuñez, P. A. *et al.* (2013) 'Immunogenicity of Hypothetical Highly Conserved Proteins as Novel Antigens in *Anaplasma marginale*', *Current Microbiology*, 68(3), pp. 269–277. doi: 10.1007/s00284-013-0475-6.

Orozco-Vega, L. E. *et al.* (2007) '*Anaplasma marginale* field challenge: Protection by an

inactivated immunogen that shares partial sequence of msp1 α variable region with the challenge strain', *Vaccine*, 25, pp. 519–525. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.07.049.

Osorno, M. B. *et al.* (1975) 'Study of an Attenuated *Anaplasma marginale* Vaccine in Mexico - Natural Challenge of Immunity in an enzootic Area', *American Journal of Veterinary Research*, 36(5), pp. 631–633.

Palmer, G. H. *et al.* (1999) 'Molecular Basis for Vaccine Development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*', *Parasitology Today*, 15(7), pp. 281–286.

Palmer, G. H. (2009) 'Sir Arnold Theiler and the discovery of anaplasmosis: A centennial perspective', *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 79, pp. 75–79.

Palmer, G. H. *et al.* (2012) 'Genome-wide screening and identification of antigens for rickettsial vaccine development', *Federation of European Microbiological Societies. Immunology & Medical Microbiology*, 64, pp. 115–119. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00878.x.

Palmer, G. H., Brown, W. C. and Rurangirwa, F. R. (2000) 'Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*', *Microbes and Infection*, 2, pp. 167–176.

Palmer, G. H. and McGuire, T. C. (1984) 'Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle', *The Journal of Immunology*, 133(2), pp. 1010–1015.

Pande, J., Szewczyk, M. M. and Grover, A. K. (2010) 'Phage display: Concept, innovations, applications and future', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 28, pp. 849–858. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.004.

Pipano, E. *et al.* (1986) 'Frozen *Anaplasma centrale* vaccine against anaplasmosis in cattle', *British Veterinary Journal*, 142(6), pp. 553–556.

Regenmortel, M. H. V. Van *et al.* (2000) *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by I. C. on T. of Viruses. San Diego: Academic Press.

Reinbold, J. B., Coetzee, J. F., Hollis, L. C., Nickell, J. S., Riegel, C. M., *et al.* (2010)

'Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques', *American Journal of Veterinary Research*, 71(10), pp. 1178–1188.

Reinbold, J. B., Coetzee, J. F., Hollis, L. C., Nickell, J. S., Riegel, C., *et al.* (2010) 'The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infection', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 145(1–2), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.02.031.

Ren, Z. J. *et al.* (1996) 'Phage display of intact domains at high copy number: A system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4', *Protein Science*, 5, pp. 1833–1843. doi: 10.1002/pro.5560050909.

Rey-Valeiron, C., Aso, P. M. and Coronado, A. (2003) 'Prevalencia de *Anaplasma marginale* y anticuerpos', *Acta Científica Venezolana*, 54, pp. 121–126.

Rodríguez, S. D. *et al.* (2000) '*Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge', *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 23, pp. 239–252.

Rodríguez, S. D. *et al.* (2003) 'Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina', *Ciencia Veterinaria*, 9, pp. 123–164.

Rodríguez, S. D. *et al.* (2008) '*Anaplasma marginale* Yucatan (Mexico) Strain. Assessment of Low Virulence and Potential Use as a Live Vaccine', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, pp. 98–102. doi: 10.1196/annals.1428.067.

Rodríguez, S. D. *et al.* (2009) 'Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico', *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), pp. 1092–1101. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.007.

Samoylova, T. I. *et al.* (2017) 'Immunocontraception: Filamentous Bacteriophage as a Platform for Vaccine Development', *Current Medicinal Chemistry*, 24, pp. 3907–3920. doi: 10.2174/0929867324666170911160426.

Sathaliyawala, T. *et al.* (2006) 'Assembly of human immunodeficiency virus (HIV) antigens on bacteriophage T4: a novel in vitro approach to construct multicomponent

HIV vaccines.', *Journal of virology*, 80(15), pp. 7688–7698. doi: 10.1128/JVI.00235-06.

Schirrmann, T. *et al.* (2011) 'Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy', *Molecules*, 16(1), pp. 412–426. doi: 10.3390/molecules16010412.

Schumacher, T. N. *et al.* (1996) 'Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display', *Science (New York, N.Y.)*, 271(5257), pp. 1854–1857. doi: 10.1126/science.271.5257.1854.

Scoles, G. A. *et al.* (2005) 'Relative Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Compared with Mechanical Transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae)', 42(4), pp. 668–675.

Scoles, G. A., Miller, J. A. and Foil, L. D. (2008) 'Comparison of the Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with Mechanical Transmission by the Horse Fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae)', 45(1), pp. 109–114.

Singh, H. *et al.* (2012) 'Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3, pp. 55–58. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.10.002.

Smith, G. P. and Petrenko, V. A. (1997) 'Phage display', *Chemical Reviews*, 97(2), pp. 391–410. doi: 10.1021/cr960065d.

Solis-Lucero, M. G. (2016) 'Estrategia bionanotecnológica para el combate del síndrome de la mancha blanca basada en la técnica de phage display'.

Theiler, A. (1910) '*Anaplasma marginale*. The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease', *Report of the Government Veterinary Bacteriologist 1908-1909*, pp. 7–29.

Timaran-Rivera, A. and León-Muñoz, B. R. (2013) 'Anaplasmosis bovina aguda: Reporte de caso', *Revista Investigación Pecuaria*, 2(1), pp. 70–78.

Torioni de Echaide, S. *et al.* (1998) 'Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5', *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), pp. 777–782.

Ueti, M. W. *et al.* (2007) 'Identification of Midgut and Salivary Glands as Specific and Distinct Barriers to Efficient Tick-Borne Transmission of *Anaplasma marginale*', *Infection and Immunity*, 75(6), pp. 2959–2964. doi: 10.1128/IAI.00284-07.

Vispo, N. S. *et al.* (2015) 'Tecnología de presentación sobre fagos filamentosos en la búsqueda de agentes biológicos antiinfectivos', *Bionatura*, 1(1), pp. 22–29. Available at: <http://www.revistabionatura.com>.

Wang, L.-F. and Yu, M. (2004) 'Epitope identification and discovery using phage display libraries: Applications in vaccine development and diagnostics', *Current drug targets*, 5, pp. 1–15. doi: 10.2174/1389450043490668.

Wu, C. H. *et al.* (2016) 'Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science', *Journal of Biomedical Science*. *Journal of Biomedical Science*, 23(8), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12929-016-0223-x.

Xiao, N. *et al.* (2006) *Isolation and identification of a novel WSSV nucleocapsid protein by cDNA phage display using an scFv antibody*, *Journal of virological methods*. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.06.027.

Xin, X. *et al.* (2013) 'SH3 interactome conserves general function over specific form', *Molecular Systems Biology*, 9(652), pp. 1–17. doi: 10.1038/msb.2013.9.

Youtong, W. *et al.* (2011) 'WSSV: VP26 binding protein and its biological activity', *Fish and Shellfish Immunology*. Elsevier Ltd, 30(1), pp. 77–83. doi: 10.1016/j.fsi.2010.09.008.

Zaugg, J. L. (1986) 'Experimental anaplasmosis in american bison: Persistence of infections of *Anaplasma marginale* and non-susceptibility to *A. ovis*', *Journal of Wildlife Diseases*, 22(2), pp. 169–172.

Zaugg, J. L. (1990) 'Seasonality of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert mountain range conditions', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196(7), pp. 1106–1109.

VOTOS DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS:

Dra. Lidia González Morales (Tutor)

Dra. Itzel Amaro Estrada (Co-tutor)

Dr. Fernando Martínez Morales

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Dr. Sabino Pacheco Guillén

TESIS: “Evaluación *in vitro* de péptidos para su potencial uso como inmunógenos contra *Anaplasma marginale*”.



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 25/Octubre/2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Lidia González Morales (Tutor)
Dra. Itzel Amaro Estrada (Co Tutor)
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dr. Sabino Pacheco Guillén

Tesis: "Evaluación *in vitro* de péptidos para su potencial uso como
inmunógenos contra *Anaplasma marginale*."

Alumno que la presenta a revisión: **JULIAN MARTINEZ SALGADO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. LIDIA GONZALEZ MORALES



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 25/Octubre/2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Lidia González Morales (Tutor)
Dra. Itzel Amaro Estrada (Co Tutor)
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dr. Sabino Pacheco Guillén

Tesis: "Evaluación *in vitro* de péptidos para su potencial uso como
inmunógenos contra *Anaplasma marginale*."

Alumno que la presenta a revisión: **JULIAN MARTINEZ SALGADO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. ITZEL AMARO ESTRADA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 25/Octubre/2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Lidia González Morales (Tutor)
Dra. Itzel Amaro Estrada (Co Tutor)
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dr. Sabino Pacheco Guillén

Tesis: "Evaluación *in vitro* de péptidos para su potencial uso como
inmunógenos contra *Anaplasma marginale*."

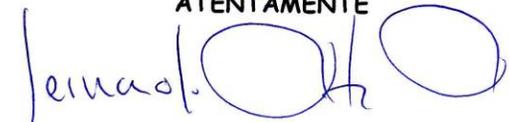
Alumno que la presenta a revisión: **JULIAN MARTINEZ SALGADO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DR. FERNANDO MARTINEZ MORALES



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 25/Octubre/2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Lidia González Morales (Tutor)
Dra. Itzel Amaro Estrada (Co Tutor)
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dr. Sabino Pacheco Guillén

Tesis: "Evaluación *in vitro* de péptidos para su potencial uso como
inmunógenos contra *Anaplasma marginale*."

Alumno que la presenta a revisión: **JULIAN MARTINEZ SALGADO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 25/Octubre/2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. Lidia González Morales (Tutor)
Dra. Itzel Amaro Estrada (Co Tutor)
Dr. Fernando Martínez Morales
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente
Dr. Sabino Pacheco Guillén

Tesis: "Evaluación *in vitro* de péptidos para su potencial uso como
inmunógenos contra *Anaplasma marginale*."

Alumno que la presenta a revisión: **JULIAN MARTINEZ SALGADO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. SABINO PACHECO GUILLEN

