



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN INMUNOGÉNICA DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DE  
SUPERFICIE DE *Anaplasma marginale***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

**ANDRES SAUL BECERRO CARRILLO**

**DIRECTOR: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ**

**CODIRECTOR: DRA. ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**Mayo, 2019**

## Contenido

1. Introducción .....	5
2. Marco Teórico .....	7
2.1. Agente causal .....	7
2.2 Mecanismos de transmisión de <i>Anaplasma marginale</i> .....	8
2.3 Signos clínicos .....	9
2.4 Distribución geográfica de la anaplasmosis bovina en México .....	10
2.5 Importancia económica .....	11
2.6 Tratamientos .....	11
2.7 Vacunas contra la anaplasmosis .....	12
2.7.1 Vacunas de organismos vivos.....	12
2.7.2 Vacunas de organismos muertos.....	13
2.8 Análisis del genoma de <i>Anaplasma marginale</i> y proteínas de superficie.....	13
2.9 Nuevas estrategias para el control y prevención de la anaplasmosis bovina .....	17
2.9.1 Péptidos múltiples antigénicos.....	17
2.9.2 Vacunas recombinantes.....	18
2.10 Respuesta inmune en bovinos.....	19
2.11 Antecedentes .....	23
2.11.1 Proteína AM592 .....	23
2.11.2 Evaluación antigénica de los péptidos de MSP1a y MSP5 .....	23
3. Justificación .....	26
4. Hipótesis .....	27
5. Objetivo General .....	28
5.1 Objetivos específicos .....	28
6. Metodología .....	29
6.1 Extracción de ADN plasmídico.....	29
6.2 Amplificación por PCR del gen <i>am592</i> .....	30
6.3 Preparación de células electrocompetentes .....	31
6.4 Transformación en células <i>E. coli</i> TOP10.....	32
6.5 Transformación en células <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	33
6.7 Expresión de la proteína recombinante AM592 .....	33
6.7.1 Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.....	33
6.7.2 Inmunodetección de proteínas por la técnica de Western Blot .....	34
6.8 Purificación parcial de la proteína AM592.....	36

6.8.1 Inmunodetección de proteínas por la técnica de Dot-Blot.....	36
6.8.2 SDS-PAGE y Western Blot .....	37
6.9 Purificación de la proteína AM592 .....	37
6.9.1 Electroforesis de la proteína AM592 en geles SDS-PAGE .....	38
6.9.2 Concentración de la proteína AM592.....	38
6.9.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	39
6.10 Evaluación del potencial antigénico de los péptidos sintéticos mediante ensayos ELISA indirecto .....	39
6.10.1 Sensibilización de placas .....	40
6.10.2 Bloqueo.....	40
6.10.3 1era. Incubación (reacción Ag-Ac).....	40
6.10.4 2da. Incubación (Ac secundario).....	40
6.10.5 Revelado.....	40
6.11 Identificación de anticuerpos IgG1 e IgG2 .....	41
6.12 Estandarización de la extracción y purificación de linfocitos bovinos .....	42
6.13 Evaluación del potencial inmunogénico de la proteína AM592 .....	43
7. Resultados.....	45
7.1 Verificación de la presencia del gen <i>am592</i> en el plásmido pET22B.....	45
7.2 Transformación en células <i>E. coli</i> TOP10.....	45
7.3 Transformación en células <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	47
7.4 Expresión de la proteína recombinante AM592 .....	48
7.5 Purificación parcial de la proteína AM592.....	49
7.6 Purificación de la proteína AM592 .....	52
7.7 Concentración de la proteína AM592.....	54
7.8 Evaluación del potencial antigénico de los péptidos sintéticos mediante ensayos ELISA indirecto .....	55
7.9 Reconocimiento de péptidos sintéticos por los anticuerpos IgG1 e IgG2 mediante ELISA indirecto .....	60
7.10 Reconocimiento de la proteína AM592 por los anticuerpos IgG1 e IgG2 mediante ensayo western blot.....	66
7.11 Establecimiento del cultivo de linfocitos de sangre de bovino.....	69
8. Discusión .....	71
9. Conclusiones .....	74
10. Perspectivas .....	75
10. Anexo 1.....	76

11. Anexo 2.....	77
12. Referencias.....	83

## Índice de figuras

FIGURA 1. GLÓBULOS ROJOS INFECTADOS DE <i>A. MARGINALE</i> (CORTESÍA DR. JESÚS FRANCISCO PRECIADO, UNIDAD DE ANAPLAMOSIS CENID-PAVET/INIFAP). .....	7
FIGURA 2. CICLO DE VIDA DE <i>A. MARGINALE</i> (RODRÍGUEZ <i>ET AL.</i> , 2009).....	9
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN DE PREVALENCIA DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA EN MÉXICO(RODRÍGUEZ, GARCÍA-ORTIZ, <i>ET AL.</i> , 2009).....	10
FIGURA 4. MAPA DEL VECTOR PET-22B(+)	29
FIGURA 5. PRODUCTO DE PCR PARA LA VERIFICACIÓN DEL GEN <i>AM592</i> EN EL VECTOR PET-22B (+). ..	45
FIGURA 6. PRODUCTO DE PCR DE COLONIAS SELECCIONADAS <i>E. COLI</i> TOP10.....	46
FIGURA 7. PRODUCTO DE PCR DEL PLÁSMIDO DE LA CLONA 8( <i>E. COLI</i> TOP10). .....	46
FIGURA 8. PRODUCTO DE PCR DE COLONIAS SELECCIONADAS <i>E. COLI</i> BL21. ....	47
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>AM592</i> EN UN GEL SDS-PAGE AL 12%.....	48
FIGURA 10. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>AM592</i> POR WESTERN BLOT.....	49
FIGURA 11. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>AM592</i> MEDIANTE DOT BLOT.....	50
FIGURA 12. SDS-PAGE AL 12% DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN. ....	51
FIGURA 13. IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA PURIFICADA <i>AM592</i> POR WESTERN BLOT. ....	52
FIGURA 14. SDS-PAGE AL 12% DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN. ....	53
FIGURA 15. SDS-PAGE AL 12% DE LAS FRACCIONES PROTEICAS CONTROL OBTENIDAS DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN. ....	54
FIGURA 16. SDS-PAGE AL 12% (IZQUIERDA) Y WESTERN BLOT ANTI-HIS (DERECHA) DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN.....	55
FIGURA 17. GRAFICA DE ENSAYO IELISA DE IGG TOTALES CON PÉPTIDOS SINTÉTICOS. ....	61
FIGURA 18. GRAFICA DE ENSAYO IELISA DE IGG1 CON PÉPTIDOS SINTÉTICOS. ....	61
FIGURA 19. GRAFICA DE ENSAYO IELISA DE IGG2 CON PÉPTIDOS SINTÉTICOS. ....	62
FIGURA 20. GRAFICA DE ENSAYO IELISA DE IGG TOTALES CON PROTEÍNA <i>AM592</i> .....	63
FIGURA 21. GRAFICA DE ENSAYO IELISA DE IGG1 CON PROTEÍNA <i>AM592</i> .....	64
FIGURA 22. GRAFICA DE ENSAYO IELISA DE IGG TOTALES CON PROTEÍNA <i>AM592</i> .....	64
FIGURA 23. SDS-PAGE AL 12% TEÑIDO CON AZUL DE COOMASSIE (IZQUIERDA) Y WESTERN BLOT (ANTI-HIS) (DERECHA) DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN.....	66
FIGURA 24. WESTERN BLOT (ANTI-IGG TOTALES) DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN. ....	67
FIGURA 25. WESTERN BLOT (ANTI-IGG1) DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN.....	67
FIGURA 26. WESTERN BLOT (ANTI-IGG2) DE LAS FRACCIONES PROTEICAS OBTENIDAS DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN. ....	68
FIGURA 27. GRADIENTE DE DENSIDAD CON FICOLL UTILIZANDO SANGRE DE BOVINO.....	69
FIGURA 28. CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN TINCIÓN GIEMSA (x100). ....	70

# 1. Introducción

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa no contagiosa, provocada por una bacteria del Orden *Rickettsiales* llamada *Anaplasma marginale*, esta es una bacteria intraeritrocítica, Gram-negativa (Ristic and McIntyre, 1981) y está clasificada dentro de la familia *Anaplasmataceae* (Dumler *et al.*, 2001). La anaplasmosis se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica progresiva que provoca abortos, pérdida de condición, disminución en la producción de leche y la muerte del ganado bovino (Ristic and McIntyre, 1981).

Su distribución es endémica en áreas tropicales y subtropicales del mundo (Kocan *et al.*, 2004). En México, los estudios serológicos y moleculares mostraron la presencia de esta enfermedad en más del 50% del ganado muestreado (Rodríguez *et al.*, 2009). Esta enfermedad es la responsable de hasta el 26% de las pérdidas totales de animales comercializados en programas oficiales, teniendo un gran impacto en México tanto en el sector productivo como reproductivo.

Su transmisión de forma biológica es causada por algunos géneros de garrapatas, principalmente, *Rhipicephalus spp.* y *Dermacentor spp.* (Corona *et al.*, 2012). La transmisión de forma mecánica puede ocurrir por artrópodos que se alimentan de sangre o por el uso de fómites con sangre contaminada (Kocan *et al.*, 2003). Una vez que la bacteria entra en el bovino, inicia su multiplicación y durante los primeros 15 a 45 días, los animales no muestran signos clínicos de la enfermedad, *A. marginale* invade y se replica en los eritrocitos maduros y durante la fase aguda de la enfermedad, la rickettsemia intraeritrocítica aumenta dramáticamente (Rodríguez *et al.*, 2003). Si el animal recibe tratamiento oportuno y se controla la infección con antibióticos usados de manera rutinaria como lo son las tetraciclinas e imidocarb, éstos, aún cuando ayudan a disminuir o eliminar los signos clínicos, no eliminan por completo al agente infeccioso (Amaro *et al.*, 2014).

A pesar de que *A. marginale* tiene un gran impacto global en la salud animal, hasta ahora no existe una vacuna que esté mundialmente aceptada. *A. centrale* ha sido utilizada como vacuna de sangre viva (inoculación con sangre) (Pfister *et al.*, 2015) y actualmente se utiliza en Australia, Sudáfrica, algunos países sudamericanos como Argentina, Uruguay y Brasil y del

Medio Oriente como Israel. *A. centrale* brinda protección contra algunas cepas de *A. marginale*, sin embargo, se han realizado estudios demostrando que *A. centrale* proporciona poca o ninguna protección frente a cepas endémicas de diferente país (Bell-Sakyi *et al.*, 2015). En México esta especie no se encuentra presente, además de que su uso está prohibido por las autoridades por considerarse exótica (Vega y Murguía *et al.*, 2010).

Las vacunas inactivadas están basadas en el uso de la bacteria extraída de eritrocitos de bovino. Son consideradas efectivas pero tienen como desventaja la posible contaminación con antígenos de la membrana eritrocítica, es decir con antígenos no asociados con la respuesta inmune, además de que existe una amplia variación antigénica entre cepas geográficas (Ocampo Espinoza *et al.*, 2006). En el caso de las vacunas muertas, es necesario la aplicación de refuerzos anuales y la inmunidad protectora proporcionada por estas vacunas es generalmente más baja que la de las vacunas vivas (Kocan *et al.*, 2010).

Investigaciones realizadas por Kocan *et al.*, (2003) y Palmer *et al.*, (1994), ha proporcionado mucha información sobre la naturaleza de la respuesta inmune del ganado infectado con *A. marginale*, así como características de antígenos claves de ésta. A partir de la secuencia del genoma de *A. marginale*, y de análisis bioinformáticos, se han predicho algunas proteínas putativas de superficie, estas proteínas se proponen como antígenos potenciales de la respuesta inmunoprotectora en el ganado vacuno para el desarrollo de una vacuna recombinante. Para llevar a cabo los objetivos de la vacunología, es necesario entender la estructura global de la respuesta inmune del huésped y los cambios que se producen después de la vacunación, así como los estímulos requeridos para provocar una respuesta inmune protectora (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2016).

## 2. Marco Teórico

### 2.1. Agente causal

*A. marginale* es un patógeno Gram negativo y es el agente causal de la anaplasmosis bovina (Ristic and McIntyre, 1981). *A. marginale* está clasificada dentro de la familia *Anaplasmataceae* que pertenece al Orden *Rickettsiales* de acuerdo a los análisis genéticos con los marcadores 16S rRNA, groELS y genes de proteína de superficie (Dumler *et al.*, 2001). Es un organismo intracelular obligado de forma esférica o cocoide, que infecta al huésped mamífero que posteriormente permanecerá infectado de forma persistente (Eriks *et al.*, 1993). *A. marginale* aparece dentro de los eritrocitos como cuerpos densos y redondos de 0.3-1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, la mayor parte de ellos situados en la zona marginal del eritrocito o en su proximidad (Figura 1). Una vez dentro de éstos, la bacteria se multiplica por fisión binaria para llegar a formar un cuerpo de inclusión que contiene de 8 a 12 cuerpos iniciales (Corona *et al.*, 2012). Al abandonar el eritrocito por un proceso no lítico, los cuerpos iniciales infectan otros glóbulos rojos para repetir el proceso, se estima que también puede infectar a las células endoteliales del bovino y posiblemente éste sea el sitio donde permanezca la bacteria en los animales portadores, aunque no se conoce bien del proceso de replicación dentro de las células endoteliales (Carreño *et al.*, 2007).

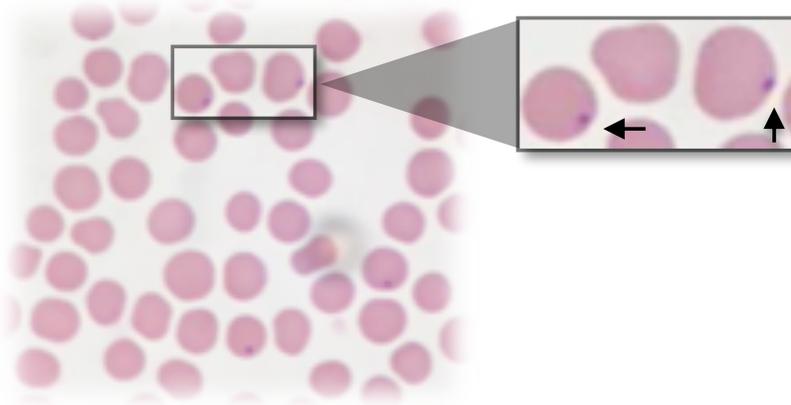


Figura 1. Glóbulos rojos infectados de *A. marginale* (cortesía Dr. Jesús francisco preciado, Unidad de Anaplasmosis CENID-PAVET/INIFAP).

Glóbulos rojos de bovino infectado con *A. marginale* teñidos con colorante Giemsa, se observan como un punto color morado en la zona marginal (flechas).

## 2.2 Mecanismos de transmisión de *Anaplasma marginale*

Los principales vectores que participan en la transmisión biológica de *A. marginale* son las garrapatas de los géneros *Dermacentor* spp., *Ixodes* spp. y la especie *Rhipicephalus microplus*. La transmisión inicia a partir de que la garrapata se alimenta de bovinos infectados y posteriormente inicia un nuevo ciclo de replicación dentro de ésta (Ristic and McIntyre, 1981) (Figura 2).

La transmisión de forma mecánica ocurre por vía de fómites contaminados provenientes de las prácticas veterinarias como: transfusiones de sangre, descornes, castración, marcado, tatuaje y el uso de la aguja hipodérmica de jeringas automáticas utilizadas para la administración masiva de vacunas, antiparasitarios o medicamentos. Estos procedimientos favorecen que los eritrocitos infectados se transmitan de un animal enfermo a otro susceptible cuando no se toman las medidas adecuadas (Aubry and Geale, 2011). La transmisión también puede ocurrir por dípteros hematófagos de los géneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Hematobia* y algunas géneros de mosquitos, como: *Anopheles* y *Psorophora* (Vega y Murguía *et al.*, 2010). La transmisión de forma transplacentaria ocurre si al momento de la infección, cuando la madre está cursando el segundo o tercer tercio de la gestación, las bacterias traspasan la barrera placentaria, provocando el nacimiento de terneros con debilidad general, anemia e ictericia, o muerte a los pocos días de nacer (Calderon-Gonçalves *et al.*, 2005).

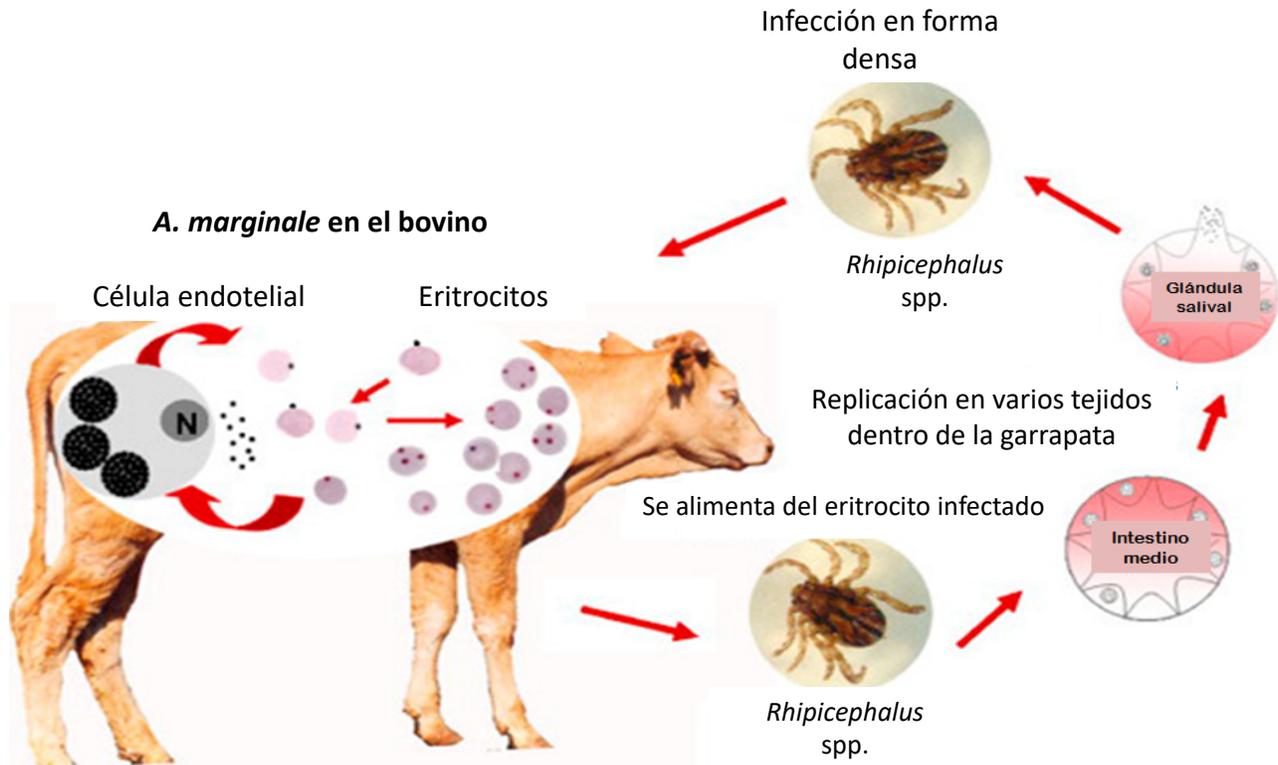


Figura 2. Ciclo de vida de *A. marginale* (Rodríguez *et al.*, 2009).

Una vez que la garrapata se alimenta de glóbulos rojos infectados con *A. marginale*, ésta inicia su replicación en el intestino medio de la garrapata, posteriormente entra en la hemolinfa para su desarrollo y finalmente llega a las glándulas salivales de la garrapata, dando lugar a una infección con *A. marginale* en un hospedero nuevo.

### 2.3 Signos clínicos

Los animales infectados pierden rápidamente la condición, la producción de leche disminuye drásticamente, hay falta de coordinación, provocando un pulso rápido, que suelen ser evidentes en las últimas etapas (Lew-tabor, 2017).

La enfermedad puede presentarse en forma hiperaguda, con estados febriles de hasta 41°C, fallos cardiopulmonares y muerte en periodos de 24 a 32 horas después de la infección, la forma aguda se caracteriza por fiebre de 40°C, respiración acelerada, anemia progresiva, ictericia, deshidratación, heces de color oscuro, debilidad, pelo erizado, pérdida de peso, aborto y muerte. Por otro lado la forma crónica tiene ausencia de signos clínicos típicos (Rodríguez Camarillo *et al.*, 2003).

## 2.4 Distribución geográfica de la anaplasmosis bovina en México

*A. marginale* es la única especie presente en México, siendo la más patógena y distribuida en las áreas tropicales abarcado más de la mitad del territorio nacional. Se sabe que la mayoría del territorio nacional está constituido por áreas tropicales en las que la enfermedad es endémica (García-Ortiz *et al.*, 1999), como son la vertiente del Pacífico, el litoral del Golfo de México y el Sureste, en donde estudios serológicos y moleculares muestran prevalencias superiores a 50% (Rodríguez, García-Ortiz, *et al.*, 2009) (Figura 3). Se ha hipotetizado que la distribución geográfica de la anaplasmosis continuará cambiando como resultado del calentamiento global, por influir sobre la distribución de los vectores, al movilizar a las garrapatas con sus hospederos (Vega y Murguía *et al.*, 2010).



Figura 3. Distribución de prevalencia de la anaplasmosis bovina en México (Rodríguez, García-Ortiz, *et al.*, 2009).

## 2.5 Importancia económica

El impacto económico que tiene la anaplasmosis bovina, puede verse desde el punto de vista productivo (debido al decremento de producción de leche y pérdida de peso en animales de engorda) y reproductivo (aborto como causa secundaria de la infección, además de que los animales de alta productividad son más susceptibles, ya que no han tenido contacto con el patógeno en áreas endémicas) (Rodríguez Camarillo *et al.*, 2003; Vega y Murguía *et al.*, 2010).

Las pérdidas provocadas por la anaplasmosis son difíciles de estimar, excepto cuando ocurre la muerte y se le asigna un valor al animal, el cual variará de acuerdo a la raza, sexo y edad; como es el caso de animales de registro (Vega y Murguía *et al.*, 2010). De acuerdo a la información obtenida de las organizaciones ganaderas del norte de Veracruz, la introducción de este tipo de ganado a esa zona es en promedio de 300 animales por año, con valores por cabeza que oscilan entre los 30,000 y los 60,000 pesos (Amaro Estrada *et al.*, 2014).

En México, tan sólo en 1980, los estudios económicos al respecto estimaron pérdidas por más de tres mil millones de pesos, que en ese entonces representaban más de US\$130,000,000. Por otra parte, en 1995 se le responsabilizó hasta por el 26% de la mortalidad total registrada en bovinos manejados dentro del programa nacional de mejoramiento genético "Ganado Mejor" (Rodríguez Camarillo *et al.*, 2003)

Un estudio que realizó la universidad de Tennessee en 2013, estimó el costo de un caso clínico de anaplasmosis en más de USD\$400 por animal, con el costo total para la industria de la carne en USD\$300,000,000 por año (Whitlock, 2017). En países como Brasil, Colombia y Argentina, tan sólo en las décadas de los años 80's y 90's las pérdidas asociadas con la anaplasmosis y la babesiosis, oscilaban entre 133, 99 y 120 millones de dólares por año, respectivamente (Montero, 1992).

## 2.6 Tratamientos

Se basan principalmente en medicamentos bacteriostáticos que funcionan mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, intercalándose con el ADN o uniéndose de manera reversible a los ribosomas y al ARN mensajero; a través de la unión con la subunidad ribosomal 30S. La clorotetraciclina y oxitetraciclina son los únicos compuestos derivados de la tetraciclina aprobados para su uso en contra de brotes agudos de anaplasmosis bovina en los

Estados Unidos, sin embargo, el tratamiento resulta costoso (Vega y Murguía *et al.*, 2010). Si el animal recibe tratamiento oportuno, el medicamento le ayuda a disminuir o eliminar los signos clínicos, pero no elimina al agente infeccioso, lo que favorece la permanencia del patógeno en el hospedero (Amaro Estrada *et al.*, 2014).

## 2.7 Vacunas contra la anaplasmosis

Se dividen en dos tipos principales: vacunas vivas y muertas. Ambos tipos de vacunas dependen del uso de *A. marginale* de eritrocitos bovinos infectados e inducen inmunidad protectora que reduce o previene la enfermedad clínica. Estas vacunas no impiden que el ganado tenga una infección persistente una vez que ya ha sido infectado, contribuyendo a su propagación y sirviendo como un reservorio para la transmisión o como una fuente de infección (Kocan *et al.*, 2003).

### 2.7.1 Vacunas de organismos vivos

El primer intento de vacunación contra la anaplasmosis fue a principios del siglo XX. Utilizando el aislado de *A. centrale*, ya que es una cepa menos virulenta que induce la protección cruzada a las cepas virulentas. *A. centrale* se ha utilizado como vacuna viva por más de 100 años, y actualmente se utiliza en Australia y en países de África, América del Sur y Medio Oriente. Aunque *A. centrale* ha brindado protección contra algunas cepas de *A. marginale*, en países como Zimbabwe, Paraguay y Argentina, algunos estudios han demostrado que *A. centrale* no proporciona el 100% de protección, a pesar de los beneficios de esta vacuna viva. Por otro lado, su uso representa un riesgo de transmisión de otros patógenos de rumiantes que podrían ser transmitidos por la sangre como el virus de leucosis bovina, además del que las vacunas vivas no están autorizadas para su uso en muchos países, incluidos los Estados Unidos, México y la Unión Europea (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2016).

Las cepas atenuadas también han sido consideradas para uso en vacunas vivas comerciales. La atenuación de *A. marginale* se ha realizado por irradiación o por el paso del organismo en ovejas o ciervos, sin embargo, en algunos países no se ha logrado este tipo de atenuación con éxito. Este tipo de vacunas ya han sido desarrolladas y probadas, en los ensayos de la vacuna atenuada desarrollada por Ristic en 1977, demostró ser efectiva y segura para ganado

de cualquier edad, sexo y raza. Sin embargo, otros autores han observado reacciones post vacunación por el uso de esta vacuna, algunos reportes en Argentina han informado que vacas lecheras inoculadas con esta cepa atenuada, sufrieron reducción en la producción de leche, fiebre, anorexia, ictericia y muerte en las vacas más afectadas (Kocan *et al.*, 2003).

### 2.7.2 Vacunas de organismos muertos

Estas vacunas fueron desarrolladas utilizando una técnica de producción a gran escala de *A. marginale* a partir de sangre infectada, sin embargo, estas vacunas fueron retiradas del mercado ya que algunas vacunas mostraron falta de protección. Por otro lado, se demostró que algunos aislados de *A. marginale* no protegían contra la gran variedad de cepas conocidas, por lo que estas vacunas podrían ser más eficaces cuando se hacen a partir de aislamientos locales (Kocan *et al.*, 2003).

El uso de vacunas con organismos muertos es otra alternativa en la vacunología. Estas vacunas tienen ventajas sobre las demás vacunas mencionadas, ya que el riesgo de contaminación con sustancias indeseables e infecciones es bajo y el costo de almacenamiento es barato. Además de que producen reacciones postinocultivas mínimas, las desventajas de estas vacunas son: el uso constante de refuerzos, el costo de la purificación de *A. marginale*, y la falta de protección cruzada entre los aislamientos geográficamente distintos (Ocampo Espinoza *et al.*, 2006). Por estas razones en México y en muchos otros países incluyendo a los Estados Unidos, no existen alternativas comerciales para el control de la enfermedad (Rodríguez Camarillo *et al.*, 2003).

## 2.8 Análisis del genoma de *Anaplasma marginale* y proteínas de superficie

El genoma circular completo de la cepa St. Maries de *A. marginale* contiene 1,197,687 pb, de las cuales existen 949 regiones codificantes, a partir de éstas se identificaron dos superfamilias que contienen proteínas inmunodominantes, la superfamilia msp2 y la superfamilia msp1 (Brayton *et al.*, 2005).

La **superfamilia msp1** es un heterodímero, es decir la proteína está compuesta de dos polipéptidos heterogéneos no relacionados, MSP1a codificada por el gen *msp1a* y MSP1b codificado por al menos dos genes *msp1β1* y *msp1β2* (Viseshakul *et al.*, 2000). El gen *msp1a* se ha utilizado para la identificación de cepas de *A. marginale* mexicanas y de todo el mundo, ya que se considera un marcador genético conservado. Consta de una región conservada y

una variable, la región variable está conformada de uno o varios polipéptidos muy semejantes, cada uno de estos está compuesto de 23 a 31 aminoácidos, también conocidos como repeticiones, las cuales tienen diferentes clasificaciones de letras griegas, letras del alfabeto y números de acuerdo a su publicación (Ocampo *et al.*, 2012) (Tabla 1). MSP1a ha evolucionado bajo la presión selectiva del sistema inmune del huésped, lo que ha permitido obtener diferencia de peso molecular de los péptidos en diferentes cepas geográficas a nivel mundial (Palmer *et al.*, 2004).

La diversidad genética de *A. marginale* se ha clasificado de acuerdo a las proteínas MSP, utilizando MSP1a, MSP4 y MSP5 que están codificados por un sólo gen. Estos genes han sido ampliamente utilizados para la caracterización molecular de *A. marginale* (Quiroz-Castañeda, Amaro-Estrada and Rodríguez-Camarillo, 2016).

La **superfamilia msp2** se construye de las proteínas abundantes de superficie (MSP, por sus siglas en inglés) MSP2, MSP3, MSP4, MSP5. Existen 15 genes con identidad de secuencia con los miembros centrales de la superfamilia (msp2-4), estos han sido designados OMP1-15. Los restantes miembros de la superfamilia corresponden a pequeños genes llamados orfX y orfY (Brayton *et al.*, 2005). Las proteínas de membrana externa (OMPs, por sus siglas en inglés) que pertenecen a la superfamilia msp2, funcionan principalmente como una interface dinámica entre la célula y su entorno, participando en el mantenimiento de la estructura celular, transporte pasivo y activo, adhesión a otras células, unión a variedad de sustancias y resistencia a los antimicrobianos (Sun *et al.*, 2013).

MSP2 es una proteína codificada por una familia multigénica (36 kDa), la cual consiste de cinco a siete pseudogenes los cuales contienen epitopos B altamente inmunogénicos que recombinan con un gen principal que se encuentra de forma conservada, de manera que se expresa una variante nueva en cada ciclo de rickettsemia, permitiéndole evadir el sistema inmune del bovino (Palmer and Brayton, 2007).

MSP3 es una proteína de aproximadamente 86 kDa que se presenta de forma polimórfica dentro de una misma infección, además de que se especula que parte de la variabilidad se deriva de su posible recombinación con MSP2 (Alleman and Barbet, 1996).

MSP4 tiene un peso aproximado a 31 kDa y es altamente conservada entre distintos aislados de *A. marginale*. Debido a su baja variabilidad es utilizada para realizar estudios

filogeográficos aunque se cree que es de baja capacidad inmunoprotectora (Jiménez-Ocampo *et al.*, 2008).

MSP5, por el contrario, es altamente inmunogénica y extremadamente conservada entre aislados de *A. marginale* y no es filogenéticamente informativo, sino que es más utilizado para el diagnóstico molecular de la infección por *A. marginale* (Torioni De Echaide *et al.*, 1998).

Se han identificado más de 20 proteínas de membrana inmunógenas subdominantes en la fracción de membrana externa protectora de *A. marginale*, entre las que se encontraban varios miembros del sistema de secreción tipo IV (T4SS, por sus siglas en inglés) (Sutten *et al.*, 2010). En bacterias Gram-negativas, algunas proteínas secretadas se exportan a través de las membranas interna y externa en un sólo paso a través de los sistemas de secreción tipo I, III, IV o VI. Los T4SS están relacionados ancestralmente con los sistemas de conjugación de ADN bacteriano y pueden secretar una variedad de sustratos, incluyendo proteínas individuales, así como complejos proteína-proteína y ADN-proteína. Los T4SS segregan sustratos en una amplia gama de células diana, incluyendo otras bacterias (de la misma o diferentes especies) y células eucariotas. Los T4SS son capaces de transferir ADN y proteínas, que pueden servir en una variedad de funciones, incluyendo la transferencia conjugativa, absorción, liberación de ADN, así como la translocación de proteínas efectoras o complejos ADN (Green and Meccas, 2015).

**Tabla 1. Estructura de los repetidos en aislados mexicanos analizados con el marcador *msp1a*.**  
Análisis de los genotipos con base a las secuencias de la región variable de *msp1a* de aislados mexicanos secuenciados en el estudio realizado (\*) y comparados con los ya reportados (Ocampo *et al.*, 2012).

<b>Cepas</b>	<b>Repeticiones</b>							
Florida, E.U <sup>6</sup>	A	B	B	B	B	B	B	B
Mex-31-096-01 Tizimin, Yuc. <sup>10</sup>	T	C	B	B	C	B	$\pi$	
*Mex-30-130-01 Playa Vicente, Ver.	T	C	B	B	C	B	C	
*Mex-30-184-03 Tiapacoyan, Ver.	T	C	B	B	C	C		
Mex-15-099-01 Texcoco, Mex. <sup>10</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$				
Mex-17-030-01 Yautepec, Mor. <sup>10</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$				
Mex-30-193-01 Veracruz, Ver. <sup>10</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$				
*Mex-18-017-01 Tepic, Nay.	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$				
Mex-07-068-01 Pichucalco, Chis. <sup>14</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$	$\beta$	$\Gamma$		
Mex-07-068-02 Sta. Martha, Chis. <sup>14</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$	$\beta$			
Tamaulipas 17 y 18 (G10) <sup>15</sup>	$\alpha$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$			
*Mex-07-065-01 Palenque, Chis.	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$			
*Mex-30-184-02 Tiapacoyan, Ver.	73	$\beta$	$\beta$	$\beta$	$\Gamma$			
Tamaulipas 15 (G9) <sup>15</sup>	$\tau$	57	13	18				
*Mex-14-010-01 Atitalaquia Hgo.	$\tau$	57	13	18				
*Mex-28-037-01 Soto la Marina, Tam.	$\tau$	57	13	18				
*Mex-28-037-02 Soto la Marina, Tam.	28	29	74	29	M	F		
*Mex-30-184-01 Tiapacoyan, Ver.	72	C	F					
*Mex-31-089-01 Ticul, Yuc.	F	M	M					
Mex-17-017-01 Pte. de Ixtla, Mor. <sup>14</sup>	12	13	14					
Mex-01-001-01 Aguascalientes, Ags. <sup>14</sup>	4	9	10	11	9			
Tamaulipas 1 (G1) <sup>15</sup>	56	57	58	59				
Tamaulipas 13 (G2) <sup>15</sup>	4	9	10	10	9			
Tamaulipas 4 (G3) <sup>15</sup>	60	61	61	62	61			
Tamaulipas 7, 9, 10 y 12 (G4) <sup>15</sup>	4	63	63	27	12			
Tamaulipas 11 (G5) <sup>15</sup>	67	68	63	27	12			
Tamaulipas 14 (G6) <sup>15</sup>	69	61	70	71	61			
Tamaulipas 5 (G7) <sup>15</sup>	64	65	D	65	66			
Tamaulipas 6 y 8 (G8) <sup>15</sup>	D	65	D	65	66			

## 2.9 Nuevas estrategias para el control y prevención de la anaplasmosis bovina

La modificación genética de los microorganismos permite el desarrollo de prometedoras vacunas que podrían sustituir a las vacunas tradicionales, las cuales presentan problemas en cuanto a su seguridad (López *et al.*, 2004). Diversos genes de agentes etiológicos han sido clonados, expresados y purificados para ser probados como vacunas. Por otro lado, existe una variedad de sistemas de expresión para proteínas, tales como bacterias, levaduras, células de insecto y células de mamífero, en las que se inserta y expresa el ADN que codifica para determinada proteína. Sin embargo, varios factores deben tenerse en cuenta antes de seleccionar el sistema para la expresión, como: el nivel de expresión obtenido utilizando cada vector de expresión, así como el promotor, la presencia o ausencia de modificaciones post-traduccionales, entre otras, son características esenciales que interfieren en la eficacia de la producción de antígenos recombinantes como vacunas (Nascimento and Leite, 2012). Las proteínas de las membranas externas de los patógenos bacterianos intracelulares determinan las funciones necesarias para la supervivencia, la replicación y la transmisión (Junior *et al.*, 2010). Por lo tanto, las proteínas expresadas en las superficies de estos patógenos son candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas, dirigidas a la inducción de respuestas inmunitarias protectoras en los huéspedes. La caracterización de proteomas de superficie es fundamental para el desarrollo de vacunas y este proceso ha sido acelerado por la secuenciación del genoma de *A. marginale* (Noh *et al.*, 2008).

### 2.9.1 Péptidos múltiples antigénicos

Los péptidos múltiples antigénicos MAP's, (Multiple Antigenic Peptides, por sus siglas en inglés) son péptidos que se ramifican artificialmente, en los que los residuos de lisina son utilizados como núcleo de andamio para soportar una formación de 8 ramas con diferentes o las mismas secuencias de péptidos. Los MAP's, si se usan como inmunógenos, presentan muchas ventajas sobre las vacunas convencionales, ya que pueden incluir uno o más epítomos relevantes de un único o múltiples organismos que proporcionan protección contra uno o más antígenos, los MAP's son altamente inmunogénicos, induciendo así respuestas de anticuerpos capaces de neutralizar receptores o proteínas asociadas a la invasión en virus como el dengue, bacterias como el ántrax, o incluso tumores (Kowalczyk *et al.*, 2011).

### 2.9.2 Vacunas recombinantes

Las vacunas recombinantes dependen de la capacidad de uno o múltiples antígenos definidos para inducir inmunidad contra el patógeno, las vacunas a partir proteínas recombinantes respecto a las basadas en macromoléculas purificadas evitan problemas como el riesgo de co-purificación de contaminantes no deseados o reversión de los toxoides a sus formas toxigénicas. El desarrollo de estas nuevas estrategias de inmunización consiste en diseñar vacunas que produzcan el tipo apropiado de respuesta inmune para conferir inmunidad, en el caso de la anaplasmosis contra patógenos intracelulares, es por esto que se requiere profundizar en el conocimiento biológico de aquellos potenciales antígenos conservados implicados en la patogénesis de distintas cepas de *Anaplasma* y de los mecanismos inmunitarios para la protección (Nascimento and Leite, 2012).

Algunos estudios de las proteínas recombinantes, principalmente las MSP's, han dado lugar a la protección incompleta contra el desafío homólogo y heterólogo, por estas razones actualmente no hay alternativas comerciales disponibles para el control de la anaplasmosis bovina en México (Rodríguez *et al.*, 2003).

Estudios recientes han demostrado que las proteínas recombinantes por sí solas no son lo suficientemente capaces de despertar la respuesta inmune y es necesario adyuvantes o acarreadores para mejorar la activación de las células dendríticas y generar respuestas inmunes fuertes (Zhao *et al.*, 2014), esto se ha demostrado en estudios de proteínas de superficie como las OMP y MSP1a de *A. marginale*, las cuales poseen epítomos tipo B conservados, capaces de ser reconocidas por IgG2 de animales inmunizados y promover la proliferación de los linfocitos T CD4+ bovinos (Deringer *et al.*, 2017; Cangussu *et al.*, 2018). También se han utilizado proteínas como VirB9-1 y VirB9-2 del sistema de secreción tipo IV, las cuales fueron acopladas a partículas de sílice con una pared delgada y un tamaño de poro de 5.8 nm. Una vez acopladas las proteínas, se realizaron pruebas de inmunización en ratones, y pruebas *in vitro* con células T bovinas, de las cuales se obtuvieron resultados positivos en la proliferación (Zhao *et al.*, 2016).

### 2.9.3 Síntesis de péptidos

Las vacunas de péptidos sintéticos representan fragmentos de secuencias de antígeno de proteína, que se sintetizan a partir de aminoácidos y se ensamblan en una sola molécula o un complejo supramolecular o simplemente mezclados mecánicamente. Estos al ser reconocidos inducen la respuesta inmune que puede implicar células T citotóxicas o células B dirigidas a la elaboración de anticuerpos específicos (Moisa and Kolesanova, 2009). Dichas vacunas pueden contener también algunos compuestos individuales o complejos supramoleculares, como: micelas, liposomas, partículas de polímero, que pueden activar de forma no específica o específica ciertas etapas de la respuesta inmune, y por tanto potenciar esta respuesta. El aumento de la estabilidad química de los péptidos se consigue mediante su unión a portadores que actúan simultáneamente como activadores de la respuesta inmune. Estas vacunas peptídicas se caracterizan por tener ventajas sobre las vacunas basadas en patógenos muertos, vacunas subunitarias y recombinantes, como: tecnologías de producción relativamente baratas y seguras, eliminación de fragmentos de antígeno que exhiben alergenicidad y la posibilidad de conjugar varios péptidos de diferentes antígenos (Van der Burg *et al.*, 2006; Moisa and Kolesanova, 2009).

Los requisitos específicos de un péptidos antigénico son (Hancock and O'Reilly, 2005):

- Poseer regiones conservadas
- Presencia de dominios hidrofílicos
- Longitud de 10-20 aminoácidos

## 2.10 Respuesta inmune en bovinos

El sistema inmunológico es responsable de reconocer, resistir y eliminar los problemas de salud causados por patógenos. Este sistema es capaz de reaccionar y trabajar de forma rápida cuando sea necesario para que las funciones productivas del animal no se vean afectadas. Es por esto, que un sistema inmune competente es fundamental para el rendimiento óptimo del ganado. De forma general el sistema inmunológico se puede separar en dos componentes: el sistema innato y el sistema adaptativo.

El **sistema innato** es la primera línea de defensa contra cualquier desafío de salud. Está constituido por barreras físicas como la piel y componentes celulares que no reaccionan específicamente a la enfermedad que el animal adquiera, esto significa que el sistema inmune innato responderá de manera similar a diferentes patógenos, lesiones o factores de estrés, ya

que carece de memoria. Sin embargo, el sistema inmune innato se activa casi inmediatamente después de que el animal está expuesto a problemas de salud. Esta característica del sistema innato proporciona el tiempo requerido por el sistema adaptativo para desarrollar una respuesta específica y más eficiente, que puede tomar hasta varios días. El sistema innato está compuesto principalmente de:

- Barreras físicas: Incluye la piel, mucosas y fluidos como la saliva y lágrimas
- Componentes celulares: Principalmente constituidos por los glóbulos blancos que proporcionan protección mediante la ingestión y la muerte de patógenos que eventualmente entran en el cuerpo

El **sistema adaptativo** constituye una respuesta inmune para cada desafío que el animal encuentra. Sin embargo, toma más tiempo (días o semanas) para ser eficaz en comparación con el sistema inmune innato, a veces hasta varios días después de la infección. El sistema adaptativo se caracteriza por la producción de anticuerpos que son específicos para cada patógeno, y también por su característica de memoria. Si el animal es infectado una segunda vez por un patógeno, el sistema adaptativo recuerda la primera infección y provoca una respuesta más rápida y fuerte para eliminar el patógeno. Esta característica de memoria es la base para el desarrollo de vacunas para proteger a los animales de enfermedades específicas. El sistema adaptativo puede dividirse además en una respuesta de anticuerpo y una respuesta mediada por células.

Los componentes principales del sistema inmune adaptativo son:

- Órganos linfoides: estos órganos son responsable de producir y activar las células inmunes que median el sistema inmune adaptativo. En general, la médula ósea produce células B, mientras que el timo produce las células T. Las células B y T se activan en el bazo o en los ganglios linfáticos, donde se encuentran con el patógeno "presentado" por los glóbulos blancos del sistema inmune innato.

- Células B: son las células que se encargan de la secreción de anticuerpos, cuando la célula B encuentra al patógeno, inicia la producción anticuerpos específicos para ese patógeno, estos se unirán a cada patógeno objetivo que encuentren y lo "marcarán" para destrucción por otras células, como glóbulos blancos, células T e incluso células B.
- Células T: son responsables de eliminar células que contienen el patógeno (respuesta mediada por células). De forma similar a las células B, las células T comienzan a multiplicarse y se vuelven específicas al patógeno presentado, cuando las células T activadas encuentran glóbulos blancos y células B que han ingerido el patógeno blanco, estas atacan y eliminan todo el complejo célula-patógeno (Hairgrove and Hammack, 1914; Cooke, 2010).

La respuesta inmune es la conjugación de un gran número de mecanismos heterogéneos de defensa contra sustancias y agentes extraños, generalmente estas sustancias extrañas se les denomina antígenos (Calderón, 2007). El antígeno se describe como una molécula de procedencia exógena o endógena que resulta extraña al organismo. Puede ser específicamente unida por un anticuerpo o por un receptor de célula T, sin embargo, no necesariamente genera una respuesta inmune, este fenómeno se conoce como antigenicidad de una molécula (Srivastava and Sinha, 2006; Bertha and Robledo, 2009). El inmunógeno, por otra parte, es una sustancia que induce una respuesta inmune específica y el fenómeno se conoce como inmunogenicidad, los inmunógenos son generalmente proteínas o polisacáridos de bacterias, virus y otros microorganismos (Srivastava and Sinha, 2006). Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Igs), permiten el reconocimiento de antígenos y son producidos por células plasmáticas derivadas de células B. Los anticuerpos se localizan principalmente en sangre, bazo y médula ósea, y son utilizados eficazmente por el sistema inmunológico para identificar, matar o neutralizar las bacterias invasoras, parásitos, toxinas y virus y destruir otros compuestos extraños (Houen, 2015).

Estudios realizados de los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas G (IgG) del bovino han comprobado que las IgG2 a diferencia de las IgG1, están relacionada con la resolución de procesos infecciosos. Esta capacidad se ha confirmado para el caso de anaplasmosis bovina, ya que estos anticuerpos producidos por animales inmunes son capaces de opsonizar

eritrocitos infectados para ser fagocitados, a diferencia de la IgG1 que no es capaz de mediar la fagocitosis por neutrófilos o monocitos. (Rodríguez Camarillo *et al.*, 2003).

Diferentes subgrupos de células T ayudan a la generación de la respuesta inmune mediada por células. Las células T cooperadoras de tipo Th1, que estimulan la síntesis de IgM e IgG2 por las células B y activan a los macrófagos. Por otro lado, la respuesta Th2 que promueve citocinas que estimulan también células B pero hacia la producción de IgG1 (Rodríguez Camarillo *et al.*, 2003).

La secreción de citocinas por parte de las células dendríticas que fagocitan los patógenos y presentan sobre su superficie los antígenos, es crucial para la inducción de una respuesta inmune específica. Entre éstas, algunas citocinas de perfil Th1 como el INF $\gamma$ , el factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-2, son importantes en la promoción de la proliferación, maduración y activación de macrófagos y granulocitos. Por otra parte, algunas de las citocinas de perfil Th2 producidas son la IL-4, IL-6 e IL-10, son responsables de la activación de células B y el desencadenamiento de una respuesta de tipo humoral (Rodríguez Calderón, 2012).

## 2.11 Antecedentes

### 2.11.1 Proteína AM592

De acuerdo con un trabajo previamente realizado (Cano-Tavira, 2014), se logró aislar el gen *am592* de *A. marginale* a partir de la secuencia anotada en la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EB), donde se ubicó entre el nucleótido 540,314 hasta el nucleótido 541,048 del genoma de la cepa *St. Maries* con un tamaño de 735 pares de bases (pb), correspondiente a 244 aminoácidos (aa). Mediante los análisis bioinformáticos de epítomos lineales tipo B, se predice que en la secuencia del gen *am592* existen regiones de epítomos tipo B inmunorelevantes que coincidían y prevalecían en posiciones similares. Con la finalidad de contar con una secuencia del gen *am592* que únicamente contenga la región altamente antigénica, dicha secuencia fue reducida a un tamaño de 593 pb, correspondiente a 197 aa. De acuerdo con un análisis de alineamiento de secuencias de aa del gen *am592* obtenidas se cepas mexicanas de *A. marginale*, se observaron mutaciones que no presentaron algún cambio significativo al traducirse (silenciosas) y se determinó la presencia de dominios funcionales: OMP\_b-brl y Surface\_Ag\_2, los cuales se sabe que se encuentran en proteínas de membrana externa y que tienen una función importante en la etapa inicial de la infección.

Un análisis bioinformático más mostró que la proteína AM592 está conformada en su mayor parte por regiones hidrofílicas, que no tiene regiones transmembranales y que es una proteína extracelular. Se demostró que la proteína AM592 está conservada dentro de la especie, ya que, al comparar con cepas de los Estados Unidos, la identidad entre estas de 99-100%, por otro lado, al comparar contra las cepas de *A. centrale*, presenta una identidad del 73%.

En la Unidad de Anaplasmosis del (CENID-PAVET, INIFAP) se cuenta con la construcción recombinante del gen *am592* en el vector de expresión pET22b (NOVAGEN). Los ensayos de expresión de la proteína muestran que AM592 se expresa a partir de la hora 17.

### 2.11.2 Evaluación antigénica de los péptidos de MSP1a y MSP5

En dos trabajos previamente realizados (Tapia Uriza, 2018; Valencia Mujica, 2018) se llevó a cabo la predicción de los péptidos sintéticos de las proteínas MSP1a y MSP5 de *A. marginale* utilizando las siguientes herramientas bioinformáticas:

Predicción de que las proteínas contengan epítomos reconocidos por anticuerpos o células B, con los programas BcePred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>), BEPIPRED (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) y EPITOPIA (<http://epitopia.tau.ac.il/>). Identificación de regiones transmembranales con el servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Una vez identificadas las regiones con potencial antigénico, se diseñaron péptidos que poseían el mayor potencial antigénico e inmunogénico de acuerdo con análisis bioinformáticos previos, estos fueron sintetizados por la compañía Peptide 2.0 con una pureza del 75%.

Péptidos sintetizados de MSP1a y MSP5:

**MSP1a**

ERSRELSRARQEDQQ

**MSP5**

VGDKKPSDGDID

Utilizando estos péptidos en ensayos iELISA y sueros de bovinos infectados, se identificó la cantidad mínima detectable de péptido, siendo 0.25 µg por pozo. Posteriormente se llevaron a cabo más ensayos, concluyendo que los péptidos sintetizados de MSP1a y MSP5 son reconocidos por anticuerpos presentes en los sueros de bovinos natural o experimentalmente infectados con *A. marginale*, es decir, que tienen potencial antigénico (Tabla 3).

**Tabla 2. Índice de positividad de la presencia de anticuerpos contra *A. marginale* en sueros de bovino**

Índice de positividad de la presencia de anticuerpos contra *A. marginale* en sueros de bovino que pueden o no estar infectados con *A. marginale*, utilizando los péptidos MSP1a y MSP5 como antígeno. Como control positivo se utilizó extracto crudo de *A. marginale* y como control negativo, suero del animal 1154 (suero de una cría libre de *Anaplasma*). En color amarillo se observan los sueros positivos (IP>1) y el color blanco los negativos (IP<1).

Nº	Muestra	MSP1a	MSP5
	C +	2.45	1.55
	1154 C-	0.72	0.45
1	1155	0.98	0.75
2	1162	2.38	1.49
3	9919	1.17	0.78
4	9931	1.82	1.33
5	9953	2.31	1.51
6	1171	1.03	0.75
7	6599	1.7	1.09
8	1168	1.35	1.35
9	2899	0.77	0.61
10	9912	1.63	0.91

En la tabla anterior se muestran los resultados obtenidos en los trabajos ya realizados en la Unidad de Anaplasmosis, utilizando los péptidos de MSP1a y MSP5 como antígenos en algunos de sueros utilizados. Se calculó el índice de positividad, en donde las lecturas con un índice de positividad mayor o igual a 1 son considerados positivos y menor a 1 son negativos a la presencia de anticuerpos contra *A. marginale*.

### 3. Justificación

Los agentes causantes de enfermedades a las que se encuentra expuesto el ganado bovino tienen una repercusión directa tanto en el sector productivo como reproductivo, provocando grandes pérdidas económicas anuales.

En México no existen vacunas comerciales contra la anaplasmosis bovina y las vacunas derivadas de cepas de *A. marginale* vivas o muertas de otros países han demostrado no tener efecto contra las cepas mexicanas. En el resto del mundo tampoco existen vacunas comerciales, aunque se producen vacunas gubernamentales que usan a *A. centrale* viva como inmunógeno. Sin embargo, en nuestro país no se permite la introducción y manejo de esta especie por el riesgo que representa para el ganado nacional.

Por otro lado, se ha demostrado que entre las cepas nacionales de *A. marginale* existe una variación antigénica importante que puede explicar algunos de los fracasos en el empleo de inmunógenos provenientes de regiones geográficas distintas. Actualmente el uso de nuevas estrategias de vacunología es de gran importancia para no tener pérdidas económicas importantes en el país.

Por lo anterior, este trabajo propone la evaluar una proteína recombinante y péptidos sintéticos a partir de proteínas de superficie altamente conservadas entre las diferentes cepas de *A. marginale* nacionales y con un potencial antigénico e inmunogénico, lo que permitiría desarrollar una vacuna a nivel nacional contra la anaplasmosis bovina.

## 4. Hipótesis

La proteína recombinante AMP592 y los péptidos sintéticos de las proteínas de superficie MSP1a y MSP5 de *Anaplasma marginale*, son capaces de actuar como inmunógenos en presencia de células T de bovino.

## 5. Objetivo General

Evaluar *in vitro* el potencial inmunogénico de la proteína recombinante AM592 y dos péptidos sintéticos de *Anaplasma marginale*.

### 5.1 Objetivos específicos

1. Expresar y purificar la forma recombinante de la proteína AM592 de *Anaplasma marginale*.
2. Determinar el potencial antigénico de la proteína recombinante AM592 y los péptidos mediante un ensayo de ELISA indirecto.
3. Establecer el ensayo *in vitro* de proliferación de linfocitos T de bovino para evaluar el potencial inmunogénico de la proteína AM592 y los péptidos sintéticos de las proteínas de superficie MSP1a y MSP5 de *Anaplasma marginale*.

## 6. Metodología

### 6.1 Extracción de ADN plasmídico

Se realizaron dos extracciones de ADN plasmídico a partir de células TOP10 sembradas en medio LB sólido (0.015% agar bacteriológico, 0.025% LB broth) las cuales contenían el plásmido pET22b (Figura 4) vacío y pET22b con el gen *am592*, el cual había sido previamente clonado (Cano-Tavira, 2014).

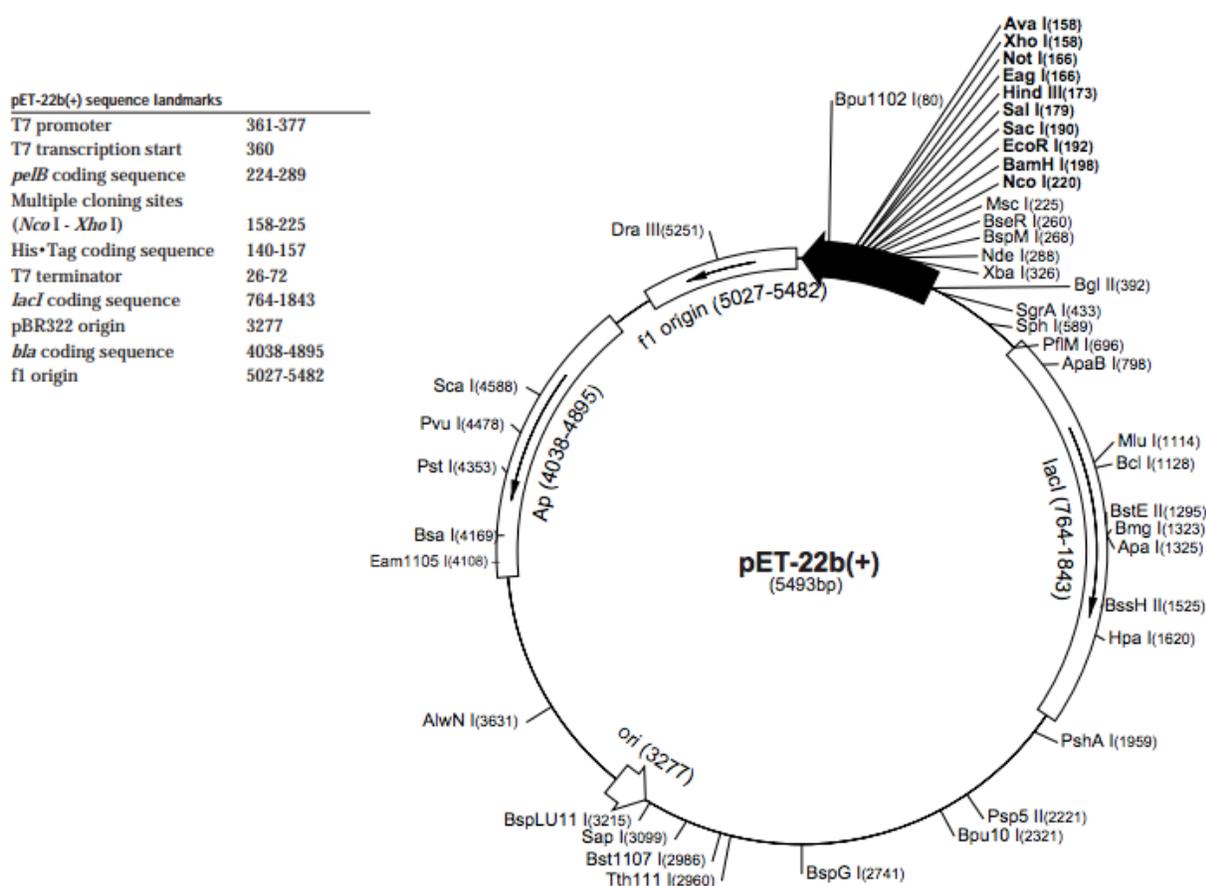


Figura 4. Mapa del vector pET-22b(+)

El vector de expresión pET22b (Novagen), añade una cola de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal, además de que contiene un gen de resistencia a ampicilina para la selección de colonias positivas. El gen *am592* se encuentra en el sitio múltiple de clonación, en los sitios de restricción de las enzimas *Xho*I y *Nco*I.

Se seleccionó una clona con el vector pET22B vacío y una clona del pET22B-*am592*, por duplicado (nombradas 1+, 2+ y 1-, 2-) y se incubaron a 37°C durante toda la noche a 250 rpm en un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL). Al día siguiente, se realizó la extracción del ADN plasmídico con el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep (ZYMO RESEARCH)

Brevemente, las muestras fueron centrifugadas a 15,600 x g por un minuto en tubos eppendorf de 1.5 ml. Una vez que toda la muestra fue centrifugada y se eliminó el sobrenadante, a la pastilla de células se le adicionaron 100 µL del buffer de lisis 7X, se mezcló por inversión de 4 veces y se incubó por 2 minutos. Posteriormente, se adicionaron 350 µL del buffer de neutralización y se mezcló uniformemente para después centrifugar las muestras por 4 minutos a 11,000 x g. Se colectó el sobrenadante y se pasó por la columna Zymo-Spin™ IIN, la cual estaba en un tubo de colección, se centrifugó por 15 segundos, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL del buffer de lavado (Endo-Wash), posteriormente se centrifugó la columna por 30 segundos a 11,000 x g. Al terminar, se agregaron 400 µL del buffer de lavado (Zyppy™ Wash) y se centrifugó por un minuto a 11,000 x g, la columna se transfirió a un tubo de colección nuevo y se adicionaron 30 µL de agua milli Q en la matriz de la columna, esta se dejó incubando a temperatura ambiente por un minuto para posteriormente centrifugar por 30 segundos a 11,000 x g y eluir el DNA plasmídico.

## 6.2 Amplificación por PCR del gen *am592*

Se realizó la siguiente reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador (Biometra, TProfessional Basic Gradient) con las cuatro muestras obtenidas de DNA plasmídico, utilizando oligonucleótidos que se unen a la región de inicio y terminación del promotor T7, éstas amplifican una región de aproximadamente 350 pb, con el fin de verificar la presencia del gen *am592* en el vector pET-22b (+).

Reacción de PCR (25 µL):

1. 4 µL DNA plasmídico (100 ng)
2. 2 µL oligonucleótidos T7 (10 pmol/µL)
3. 12.5 µL Master Mix (MyTaq™ Mix, BIOLINE)
4. 6.5 µL agua milli Q

Oligonucleótidos T7 (5'-3')

Forward: TAATACGACTCACTATAGGG

Reverse: GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Para los controles negativos se realizó una reacción de PCR en la que se utilizó agua milli Q.

Programa PCR por 30 ciclos.

1. Desnaturalización: 94 °C durante 30 segundos
2. Alineamiento: 50 °C durante 30 segundos
3. Elongación: 72 °C durante 35 segundos
4. Elongación final: 70 °C durante 10 minutos (1 ciclo).

Para verificar que la amplificación se llevó a cabo, los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 100 volts por 35 minutos. Se utilizó el marcador de peso de 1kb (ThermoFisher Scientific)

### 6.3 Preparación de células electrocompetentes

Las células competentes de *E. coli* TOP10 y BL21 (DE3) se prepararon con el siguiente protocolo.

Se dejó un preinóculo incubando durante toda la noche a 37°C a 300 rpm, el cual constaba de 4 mL de medio YENB (extracto de levadura 0.075%, caldo nutritivo 0.8%) con una asada de células de *E. coli* TOP10 / BL21 (DE3). Al día siguiente, se utilizaron 2 matraces de 500 mL con 50 mL de medio YENB fresco cada uno, y se inocularon con 150 µL del preinóculo. El cultivo se incubó a las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de 0.5 (2 horas aproximadamente), posteriormente el cultivo se incubó en hielo por 15 minutos para después ser centrifugados en tubos de punta cónica de 50 mL (fríos) a 10,250 x g por 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante por decantación y se resuspendió la pastilla de células con agua fría estéril, pipeteando suavemente para nuevamente centrifugar a las mismas condiciones por duplicado. La pastilla de células obtenida después de los lavados, fue

resuspendida con 2 mL de glicerol frío al 10% y centrifugada nuevamente, eliminado el sobrenadante por completo utilizando una micropunta. Finalmente, la pastilla de células fue resuspendida con 0.25 mL de glicerol frío al 10%, se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ L que se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.4 Transformación en células *E. coli* TOP10

La celda de electroporación (0.2 mm) previamente fue sometida a luz ultravioleta (UV) por 10 minutos para su esterilización y posteriormente se enfrió por 5 minutos en hielo.

En la celda se adicionaron 4  $\mu$ L (120 ng) de plásmido pET-22b con el gen *am592* (muestra 1+), posteriormente se adicionó una alícuota de células competentes, rápidamente se llevaron al electroporador (Eppendorf® Multiporator® Electroporation Systems) y se sometieron a 2500 V por 5 ms, al finalizar este proceso, rápidamente se adicionó 1 mL de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.05%,  $\text{MgSO}_4$  0.12%,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2%, KCl 1.25mM, glucosa 20mM) a la celda para resuspender las células y recuperarlas por una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las células recuperadas fueron sembradas en medio LB sólido con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Al día siguiente, con el fin de descartar la presencia de falsos positivos se realizó un PCR de colonia de 8 clonas obtenidas de la transformación y se resuspendieron en 13  $\mu$ L de agua milli Q, de los 13  $\mu$ L, se sembraron 3  $\mu$ L de en una caja LB-sólido con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y los otros 10  $\mu$ L fueron sometidos a lisis celular (5 min a  $98^{\circ}\text{C}$  y 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ).

Una vez que se tenían las muestras lisadas se procedió a preparar las reacciones de PCR que fueron amplificadas de acuerdo al programa ya mencionado. Finalmente, éstas fueron sometidas a una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 V por 35 minutos.

Reacción de PCR en colonia:

- 10  $\mu$ L lisado celular
- 2  $\mu$ L oligonucleótidos T7 (10 pmol)
- 12.5  $\mu$ L Master Mix (MyTaq™ Mix, BIOLINE)

Se seleccionó una colonia para hacer una minipreparación y posteriormente se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos T7 para corroborar la presencia del gen *am592* en el plásmido.

## 6.5 Transformación en células *E. coli* BL21 (DE3)

Se realizó una transformación en *E. coli* BL21 (DE3) para poder expresar de proteína recombinante con una mayor eficiencia. Siguiendo el protocolo de transformación previamente descrita, en este caso, a diferencia de la transformación en TOP10, se agregaron 2  $\mu$ L (120 ng) del plásmido de la colonia seleccionada.

De la misma forma, se realizó una PCR de 8 colonias, se verificó la presencia de la región del promotor T7 por electroforesis en gel de agarosa 1%, a 100 volts por 35 minutos. Se utilizó el marcador de peso de 100 pb (ThermoFisher Scientific) y se seleccionó una clona que se utilizaría para la expresión de la proteína recombinante.

## 6.7 Expresión de la proteína recombinante AM592

El preinóculo se preparó tomando una asada de la colonia seleccionada (C1), se dejó en incubación toda la noche con 5 mL de medio líquido LB con ampicilina (100  $\mu$ g /mL) a 37°C y 200 rpm.

Al día siguiente se tomaron 25  $\mu$ L de preinóculo que sirvieron para inocular 50 mL de medio LB líquido con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) en un matraz con una capacidad para 200 mL el cual se dejó incubando por aproximadamente 4 horas bajo las mismas condiciones del preinóculo (37°C / 200 rpm), hasta que alcanzó una  $DO_{600}$  de 0.5. El cultivo fue dividido a la mitad en diferentes matraces (25 mL y 25 mL) con capacidad de 100 mL, y uno de estos fue inducido con 1 mM de IPTG (Thermo Fisher Scientific Inc.) y el otro no fue inducido, ambos fueron incubados a 30°C y 200 rpm durante 24 horas. Se tomaron alícuotas de ambos cultivos de 2 mL, a las 17, 20 y 24 horas, las cuales fueron centrifugadas para eliminar el sobrenadante por decantación y almacenar las pastillas a -20°C hasta su uso.

### 6.7.1 Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE

A las 6 muestras colectadas de los dos cultivos (17, 20 y 24 horas) se les adicionó 500  $\mu$ L de buffer Laemmli 2X (65.8 mM Tris-Cl; pH: 6.8, 20% Glicerol, 0.05% 2-Mercaptoetanol, 4% SDS-10%, 0.04% Azul de bromofenol), posteriormente se hirvieron por 5 minutos y se enfriaron en hielo por 5 minutos más. Las muestras fueron cargadas en un gel de acrilamida al 12% (y una réplica) que consta de dos geles, el concentrador (70% H<sub>2</sub>O, 16.6% solución poliacrilamida,

12.6% 1 M Tris; pH 6.8, 1% SDS-10%, 1% APS-10%, 0.1% TEMED) y el separador (34% H<sub>2</sub>O, 40% solución poliacrilamida, 26% 1.5 M Tris; pH 8.8, 1% APS-10%, 1% SDS-10%, 0.04% TEMED), colocados dentro de una cámara de electroforesis (Hoefer™ Mighty Small™ II Mini Vertical Electrophoresis Systems) en presencia del buffer de corrida 1X (0.03% Tris base, 1.44% Glicina, 1% SDS). Se colocó el marcador de peso (ThermoFisher Scientific) en el primer pozo (3 µL) y las 6 muestras en los pozos siguientes del gel (15 µL), como control positivo se utilizaron 5 µL de proteína AM592 (23.3 kDa), obtenida de una purificación parcial previamente realizada en la Unidad de Anaplamosis (CENID-PAVET, INIFAP). Estas fueron sometidas a 45 V por 20 minutos y posteriormente a 100 V por 2 horas (PowerPac Universal Power Supply, Bio-Rad Laboratories Inc.). Uno de los geles fue incubado con solución de tinción (0.02% Coomassie brilliant blue, 50% metanol, 10% ácido acético) por toda la noche y al día siguiente incubado con solución para desteñir (40% metanol, 10% ácido acético) y el otro gel se utilizó para transferirlo a una membrana de PVDF y realizar un Western blot.

### **6.7.2 Inmunodetección de proteínas por la técnica de Western blot**

Una membrana de 0.2 µm de polivinildifluoruro o PVDF (Roche) fue activada con metanol por 5 segundos, posteriormente fue lavada con agua destilada por 5 minutos e incubada (al igual que el gel a transferir) con buffer de transferencia (0.303% Tris base, 1.44% glicina, 20% metanol) por 15 minutos.

En la cámara de transferencia (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories Inc.), se colocó en una almohadilla de transferencia húmeda con buffer de transferencia, posteriormente se colocó la membrana de PVDF, el gel de acrilamida y otra almohadilla. El gel fue sometido a 250 mA por 1.15 horas, una vez que terminó el tiempo de transferencia, la membrana fue incubada durante toda la noche con PBS 1X (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) con 3% de leche descremada en polvo (SVELTY, Nestle) utilizada como solución de bloqueo. Al día siguiente, la membrana fue lavada por triplicado con 5 mL de PBS 1X-Tween20 0.05% por 5 minutos e incubada por 2 horas con el anticuerpo primario 6X His-tag (eBioscience Inc.) en 20 mL en una dilución de 1:5000 en PBS 1X. Al término de la incubación, la membrana fue lavada nuevamente e incubada con el anticuerpo secundario anti-ratón (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) en una dilución 1:5000 en PBS 1X, posteriormente la membrana fue lavada por triplicado con 5 mL de PBS 1X-Tween20

0.05% por 5 minutos, al terminar se dejó incubando protegiendo de la luz con 2 mL de solución NBT-BCIP® (SIGMA-ALDRICH), por aproximadamente 20 minutos para su revelado.

## 6.8 Purificación parcial de la proteína AM592

Utilizando el siguiente protocolo para la purificación de proteínas en condiciones desnaturizantes del proveedor (QUIAGEN), se logró obtener una elución de la proteína AM592, la cual además contenía proteínas inespecíficas.

En un tubo de ensayo, se dejó incubando un preinóculo de 5 mL con una asada de la colonia seleccionada (C1, obtenida en la transformación en *E. coli* BL21 (DE3) durante toda la noche a 37° C y 200 rpm, al día siguiente en 2 matraces de 1.5 L que contenían 500 mL de medio LB se inocularon con 250 µL del preinóculo, al llegar a una DO<sub>600</sub> de 0.5, los cultivos fueron inducidos con 1mM de IPTG (ThermoFisher Scientific) e incubados por 20 horas a 30° C y 200 rpm. Al finalizar el tiempo de expresión, se tomaron muestras de 100 mL y se centrifugaron a 4000 x g por 15 minutos, eliminando el sobrenadante por decantación y recuperando la pastilla bacteriana, la cual fue almacenada a 4 °C.

Se tomó una pastilla almacenada a 4°C y se le adicionaron 10 mL de buffer B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 8.0), ésta se llevó a lisis por sonicación a 40 pulsos por 30 segundos, dejando enfriar la muestra en hielo por 10 segundos (SONIC RUPTOR 400) repitiendo este paso 10 veces, el producto de lisis fue centrifugado a 4,000 xg por 15 min para recuperar el sobrenadante, la pastilla celular lisada se almacenó a 4°C. Por otro lado, a una columna de cromatografía (Poly-Prep®, BIO-RAD) se le adicionaron 500 µL de suspensión de Ni-NTA agarosa (QUIAGEN) y se equilibró con 1 mL de buffer B el cual atravesó la columna por goteo, evitando que la resina se secase. Posteriormente, se adicionó el sobrenadante obtenido de la lisis, y cuando la muestra pasó por completo a través de la columna, se realizó un lavado adicionando 1.5 mL del buffer C (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 6.3) a la columna, al término de este lavado se realizaron dos eluciones utilizando 500 µL de buffer E (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 4.5), para eluir las proteínas con etiqueta de histidinas que se unieron a la columna de níquel. Al finalizar la purificación se obtuvieron cuatro fracciones: la muestra de proteínas que no se unió a la columna (FT), lavado (L) y dos eluciones (E1 y E2), que posteriormente fueron almacenadas a 4°C.

### 6.8.1 Inmunodetección de proteínas por la técnica de Dot blot

En una membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD, 0.2 µm) se colocaron muestras de 10 µL de cada una de las fracciones recuperadas de la purificación (FT, L, E1 y E2) y como control

positivo se utilizaron 3  $\mu\text{L}$  de la proteína AM592 purificada, previamente obtenida. La membrana se dejó incubando durante toda la noche con solución de bloqueo, al día siguiente ésta fue lavada por triplicado por 5 minutos con PBS1X-Tween20 0.05%, al terminar los lavados se dejó incubando por una hora con 20 mL con el anticuerpo anti-His6-Peroxidase (Roche) en una dilución 1:5000 en PBS 1X, al terminar la incubación se realizaron 3 lavados nuevamente con PBS 1X-Tween20 0.05% por 5 minutos y se dejó incubando con 9.954 mL de PBS1X, 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Jaloma) y 6 mg de diaminobencidina (SIGMA-ALDRICH) para su revelado, por aproximadamente 30 minutos y protegiendo de la luz.

### **6.8.2 SDS-PAGE y Western blot**

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada fracción obtenida en la purificación (FT, L, E1 y E2) y de una suspensión de PBS 1X con la pastilla de células lisadas, se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de buffer Laemmli 2X, siguiendo los pasos ya descritos en la metodología anterior (página 31), se realizó una electroforesis y posteriormente un Western blot. Esto se realizó con el fin de identificar en qué fracciones de la purificación se encontraba la proteína AM592.

## **6.9 Purificación de la proteína AM592**

De acuerdo con los resultados obtenidos en la purificación con el protocolo del proveedor (QUIAGEN), las fracciones de elución aun contenían restos de proteínas de *E. coli*. Con el fin de obtener una elución de la proteína AM592 más pura, se realizó la siguiente metodología, adicionando lavados con buffers (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-Cl, 8M Urea) a pH 6.8 y 7.2 en lugar de los realizados con el buffer C, de esta forma se descartaron aquellas proteínas inespecíficas presentes en la elución, y utilizando un buffer a pH 5.9 (buffer D) para eluir la proteína AM592, además del buffer a pH 4.5 (buffer E) utilizado también para la elución.

Se tomó una pastilla almacenada a 4°C, proveniente de una alícuota de 300 mL del cultivo de 0.9 L previamente realizado, se dejó en hielo por 10 minutos, posteriormente ésta fue pesada y se le adicionó 5 mL de buffer B (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 8.0) por gramo, se homogenizó por vórtex y se dejó en agitación basculante por una hora a temperatura ambiente, al término, la muestra fue centrifugada a 10,000 x g por 10 minutos para quedarnos con el sobrenadante de la lisis. Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión de Ni-NTA agarosa (QUIAGEN), se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de buffer B y se dejó incubando con el producto de lisis toda la noche a 4°C. Al día siguiente, el producto de lisis con la resina, se

colocó en una columna de cromatografía (Poly-Prep®, BIO-RAD) y se eliminó por goteo el buffer B con el que activó e incubó la resina. Al terminarse esta muestra, evitando que la agarosa se seque, se realizaron lavados con 15 mL el buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea) a pH 7.2, adicionando 5 mL por vez en la columna, al término de este lavado, se realizó otro de la misma forma pero con buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea) a pH 6.8. Una vez que terminaron los lavados se realizaron las eluciones de la proteína AM592, utilizando 3 mL de buffer D (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 5.9) adicionando 500 µL por vez, y posteriormente otra elución con 3 mL con el buffer E (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 4.5) adicionando 500 µL por vez. Al finalizar el proceso de purificación se obtuvieron cuatro fracciones: la muestra de proteínas que no se unió a la columna (FT), un lavados (L) y dos elución (E1 y E2). Posteriormente estas fueron almacenadas a 4°C.

Este proceso de purificación se también se llevó a cabo utilizando la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET-22b vacío, como controles negativos de la expresión.

### **6.9.1 Electroforesis de la proteína AM592 en geles SDS-PAGE**

Se tomaron 30 µL de cada fracción obtenida en la purificación (FT, L1, L2 Y E) y se les adicionó 30 µL de buffer Laemmli 2X, siguiendo los pasos ya descritos (página 30), se cargaron 10 µL de las muestras de FT y 20 µL del resto de las muestras, en un gel de acrilamida al 12%, y se sometieron a una electroforesis a 45 V por 20 minutos y posteriormente a 90 V por 2 horas.

### **6.9.2 Concentración de la proteína AM592**

Una vez que se confirmó la presencia de la proteína AM592 en el SDS-PAGE, se llevó a cabo una concentración con acetona al 80% de la proteína AM592 para realizar los ensayos iELISA, así como los de linfoproliferación. A un tubo falcón de 15 mL que contiene la proteína AM592 eluída, se le adicionó 4 veces su volumen de acetona, se homogenizó y se dejó incubando por 2 horas a -20 °C. Al término de la incubación se centrifugó la muestra por 20 minutos a 6000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de acetona, para centrifugar la muestra nuevamente bajo las mismas condiciones. Finalmente, se eliminó por completo la acetona con una micropunta y se dejó evaporar la muestra a temperatura

ambiente por aproximadamente 20 minutos, para eluir la pastilla de proteínas con 1 mL PBS 1X (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4).

### **6.9.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Se realizó una curva estándar con diluciones conocidas de albumina de suero bovino (BSA), utilizando concentraciones de 0, 0.01, 0.05, 0.1, y 0.2 µg en un volumen de 160 µL de buffer Tris-Cl 50 mM; pH 7, las muestras (por duplicado) colocaron en una placa de iELISA y se les adicionó 40 µL de la solución Bradford Protein Assay (Bio Rad), se homogenizó con palillos y se dejó incubando por 15 minutos. Al término de la incubación, se realizó una lectura en un espectrofotómetro para placas iELISA (Bio Rad iMark™ Microplate Reader), a una absorbancia de 595 nm.

Se determinó la concentración de las fracciones purificadas, utilizando 160 µL de muestra. De acuerdo a las lecturas obtenidas del espectrofotómetro y a la extrapolación en la curva estándar se determinó la concentración de las fracciones purificadas.

## **6.10 Evaluación del potencial antigénico de los péptidos sintéticos mediante ensayos ELISA indirecto**

Previamente, en la Unidad de Anaplasmosis, se han realizados ensayos para evaluar la antigenicidad de los péptidos sintéticos MSP1a y MSP5 (Tapia Uriza, 2018; Valencia Mujica, 2018). En este trabajo, se realizaron evaluaciones antigénicas utilizando los dos péptidos sintéticos en ensayos iELISA indirecto, utilizando sueros de bovino obtenidos a partir de muestreos de campo, es decir naturalmente infectados y de animales infectados experimentalmente. Cada péptido fue adsorbido de manera electrostática en placas de poliestireno de 96 pozos (Costar, Corning) en presencia de solución amortiguadora de carbonatos (SAC), utilizando la concentración de 0.25 µg de péptido por pozo, como control negativo y positivo se seleccionaron los sueros de los animales 4697 y 1160, respectivamente, según los trabajos ya realizados en la Unidad de Anaplasmosis (Tapia Uriza, 2018; Valencia Mujica, 2018). Las pruebas iELISA se realizaron utilizando diferentes sueros de bovinos que contienen o no, anticuerpos contra *A. marginale* (Banco de sueros de la Unidad de Anaplasmosis (CENID-PAVET/INIFAP), al finalizar se realizó una lectura de la absorbancia de 405 nm para registrar los resultados mediante un lector de placas.

### **6.10.1 Sensibilización de placas**

Para una placa de iELISA (Costar, Corning No. de Cat. 3590), se resuspendieron 25 µg de cada uno de los péptidos liofilizados en 20 mL de una solución amortiguadora de carbohidratos SAC (0.318% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.588% NaHCO<sub>2</sub>; pH 9.6). Por cada pozo de la placa se depositaron 200 µL de esta solución (0.25 µg de péptido) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se eliminó la solución de las placas, y se realizaron 5 lavados a temperatura ambiente con solución PBS 1X/Tween20 (0.05%) por 3 minutos cada uno, eliminando el buffer de la placa en la tarja con una fuerte inversión sobre una toalla de papel.

### **6.10.2 Bloqueo**

Al finalizar los lavados, se depositaron 200 µL de leche descremada en polvo (SVELTY, Nestlé) al 7% en PBS 1X/Tween20 por cada pozo y se incubó por una hora a 37° C, al término de la incubación, se descartó la leche y se realizaron 5 lavados a temperatura ambiente con solución PBS 1X/Tween20 (0.05%) por 3 minutos cada uno.

### **6.10.3 1era. Incubación (reacción Ag-Ac)**

Para este proceso, se depositaron 200 µL por cada pozo de una dilución (1:100) en PBS 1X/Tween20 con suero bovino, incluyendo controles positivos y negativos, a excepción del blanco (todo se realizó por triplicado). Estos se incubaron a 37°C por una hora y al término de la incubación, se descartaron los sueros de bovino y se realizaron 5 lavados a temperatura ambiente con 200 µL de solución PBS 1X/Tween20 (0.05%) por 3 minutos cada uno.

### **6.10.4 2da. Incubación (Ac secundario)**

Se depositaron 200 µL de una dilución (1:5000) en PBS/Tween 20 del anticuerpo secundario Anti-IgG bovina el cual está acoplado a fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), en cada pozo y se dejaron incubar a 37°C por una hora. Al término de la incubación, se descartó la solución del anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados a temperatura ambiente con solución PBS 1X/Tween 20 (0.05%) por 3 minutos cada uno.

### **6.10.5 Revelado**

Una vez finalizados los lavados, se depositaron 200 µL de una disolución de sustrato p-nitrofenilfosfato (SIGAMA-ALDRICH) al 0.075% en solución Tris (100mM pH 9.5), y se dejaron incubando a 37° por una hora. La coloración generada por la reacción de la fosfatasa alcalina con el sustrato p-nitrofenilfosfato fue registrada en un espectrofotómetro para placas ELISA (Bio Rad iMark™ Microplate Reader), a una absorbancia de 405 nm.

### **6.10.6 Cálculo del índice de positividad**

Para poder determinar si un valor fue negativo o positivo, se calculó el índice de positividad (IP) de cada suero utilizado, a partir de los valores obtenidos de las lecturas de los ensayos iELISA, todos los cálculos se realizaron en una hoja de Microsoft Excel. Se obtuvo el promedio de las lecturas de la densidad óptica del control blanco, este valor fue restado a las lecturas de los controles y sueros problema. Se calculó el promedio y la desviación estándar (DE) de los valores de las tres repeticiones y se utilizaron las siguientes fórmulas para conocer el punto de corte (PC) a partir del control negativo utilizado y el índice de positividad (IP) de cada suero, para determinar si eran positivos o negativos. Las lecturas con un índice de positividad mayor o igual a 1 son considerados positivos a anticuerpos contra *A. marginale*.

$$PC = (DE * 3) + \text{Promedio de valores}$$

$$IP = \text{Promedio de } \frac{\text{valores}}{PC}$$

## 6. 11 Identificación de anticuerpos IgG1 e IgG2

Utilizando el protocolo anterior de los ensayos iELISA, se realizaron ensayos con el fin de identificar el tipo de anticuerpos que reconoce a los péptidos y a la proteína AM592. Como control positivo y negativo, se utilizaron los sueros pertenecientes al kit PADIANAVET, el cual permite el diagnóstico serológico de la anaplasmosis utilizando el extracto crudo de *A. marginale*. Además, como control negativo (C--), se utilizó el suero de un animal infestado con garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) las cuales no estaban infectadas con *A. marginale*, es decir, un suero de un animal el cual su sistema inmune ha sido estimulado y ha generado una respuesta de anticuerpos pero no hacia *A. marginale*.

Para llevar a cabo estos ensayos se utilizaron los mismos moles de péptidos así como de proteína AM592 como antígeno unido a la placa, de esta forma se utilizaron 0.25 µg de los péptidos de MSP5 y MSP1a, 5 µg de la proteína AM592, 5 µg de extracto crudo de *A. marginale* como control positivo y como control negativo para la proteína AM592, también se realizó un ensayo con 5 µg proteínas totales de *E. coli*. Como anticuerpo primario se utilizaron 5 sueros de los bovinos 1783, 1756, 9899, 2899 y 135 en las diluciones establecidas (1:5000), así como 2 µg de IgG2 purificado del bovino 135. Como anticuerpo secundario para identificar

inmunoglobulinas de bovino, se utilizaron los anticuerpos anti-IgG totales (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.), anti-IgG1 e IgG2 (BETHYL Laboratories, Inc) en diluciones 1:5000.

Para el caso de la proteína AM592 realizaron ensayos de Western blot para identificar qué proteínas de la fracción concentrada es reconocida por los anticuerpos. Para estos ensayos se utilizó el protocolo ya descrito (pag. 31), utilizando 15 µg de la fracción de elución concentrada y como control negativo, proteínas de *E. coli*. Una vez que se realizó el SDS-PAGE y el Western blot (Anti-His), se realizaron los Western blot, en los que, como anticuerpo primario se utilizó el suero del animal 135 (Bovino hiperinmunizado) en una dilución 1:5000 y como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG totales (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.), anti-IgG1 y anti-IgG2 (BETHYL Laboratories, Inc) en diluciones 1:2500 para cada ensayo realizado.

## 6.12 Estandarización de la extracción y purificación de linfocitos bovinos

Se llevó a cabo la extracción y purificación de los linfocitos a partir de sangre de bovino, esta fue recolecta el mismo día del ensayo, en tubos de punta cónica de 50 mL. Se colectaron 20 mL de sangre en 20 mL de solución Alsever (2.05% dextrosa, 0.42% NaCl, 0.8% Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>), esta muestra se centrifugó a 4,500 x g por 30 minutos a 4 °C (HERMLE, Z 400 k), al finalizar este proceso, se removió parte del plasma con la solución de Alsever sin eliminarlo por completo, utilizando una pipeta de 10 mL, evitando tocar la pastilla formada con los glóbulos rojos con una ligera capa blanca de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Esta pastilla celular con plasma se aforó con PBS 1X a un volumen de 40 mL y posteriormente se homogenizó suavemente por inversión. En un tubo nuevo de 50 mL se colocaron 15 mL de Ficoll-Paque<sup>TM</sup>PLUS (Amersham Biosciences) y 15 mL de la suspensión de glóbulos rojos, evitando mezclar ambas fases, posteriormente la muestra se centrifugó a 900 x g por 30 minutos con desaceleración lenta (Jouan BR4i). Al terminar, se colectó el anillo formado entre el plasma y el Ficoll, evitando tomar los glóbulos rojos. La muestra colectada se colocó en un tubo nuevo y se aforó a 50 mL con PBS 1X y se centrifugó a 250 x g por 15 minutos (Jouan BR4i), al término, se eliminó el sobrenadante y se reservó la pastilla blanca obtenida para después ser resuspendida en 2 mL con PBS 1X. Posteriormente, se llevó a cabo el conteo celular para determinar la viabilidad, para ésto, a 10 µL de muestra (células resuspendidas en

PBS 1X) se le adicionaron 10  $\mu$ L de solución de azul tripano (0.4%), se homogenizó y se colocaron en una cámara de Neubauer. Una vez que se determinó la viabilidad y el número de células obtenidas por mL de sangre, estas se dejaron incubando con medio RPMI (GIBCO™ RPMI Medium 1640) por 72 horas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en el aire, posteriormente, se tomaron muestras del cultivo y se realizaron improntas, para determinar la morfología de las células mediante tinción de Giemsa.

### 6. 13 Evaluación del potencial inmunogénico de la proteína AM592

Para este ensayo se sembró una concentración de  $5 \times 10^5$  células en cada pozo por triplicado para cada una de las muestras a evaluar con 200  $\mu$ L de medio suplementado en placas de 96 pozos (Costar™ Cell Culture Plate, 96 Well). Estas fueron incubadas durante 24, 48 y 72 horas a 37°C, bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando una concentración de antígeno (proteína AM592) de 5  $\mu$ g. Como control positivo se utilizó concanavalina (ConA), ya que es una lectina mitogénica que activa los linfocitos T, como control negativo se utilizaron proteínas de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET-22b vacío, además de un control con células no tratadas. Pasado el tiempo de incubación establecido las células se realizó la cosecha celular colectando el sobrenadante de cada ensayo y se almaceno a 4 °C con 5% V/V de inhibidor de proteasas (cOmplete™ Roche) en cada una, para posteriormente analizar la producción de citocinas de las células linfáticas por citometría de flujo en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNalCit).

Se realizó la cuantificación de la proliferación como resultado de la inducción con el antígeno, así como del control positivo y negativo, utilizando el Kit comercial CellTiter 96® AQueous One Solution Proliferation Assay, este un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación. El reactivo de solución CellTiter 96® AQueous One, contiene un compuesto de tetrazolio (MTS), el cual es biorreducido por las células a un producto de formazán (la cual puede ser medida a 490 nm), esta conversión es realizada por NADPH o NADH producidas por enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas.

Todos los pozos se llevaron a un volumen final de 100  $\mu$ L con PBS 1X, posteriormente se la adicionó 20  $\mu$ L del reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution Proliferation Assay, se

homogenizó suavemente con una micropipeta y se dejó incubando por 2 horas bajo las mismas condiciones, al término de la incubación, se determinó la densidad óptica de las muestras a 490 nm en un espectrofotómetro para placas ELISA (Bio Rad iMark™ Microplate Reader).

Previamente al ensayo de proliferación, siguiendo el protocolo ya descrito de cuantificación y como control de la proliferación, se determinó la DO inicial de las  $5 \times 10^5$  células linfáticas, para conocer el número de células final en cada uno de los ensayos con el antígeno.

## 7. Resultados

### 7.1 Verificación de la presencia del gen *am592* en el plásmido pET22B

Una vez que se realizó la extracción del DN plasmídico que contiene el gen *am592*, se realizó una PCR para amplificar la región de inicio y terminación del promotor T7 (Figura 5), la cual tiene un tamaño aproximado de 350 pb, esta región flanquea al gen *am592*, el cual tiene un tamaño aproximado a 600 pb. Como se observa en la figura 5, la amplificación por PCR generó un producto con un peso aproximado de 950 pb, que corresponde a la fracción recortada del gen *am592* y las regiones del promotor T7. Por la diferencia en el tamaño del producto de PCR de las amplificaciones de la construcción y el plásmido vacío, se corroboró la presencia del gen *am592* en el plásmido pET22b(+).

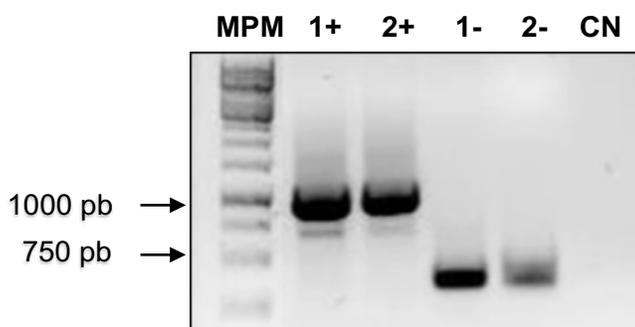


Figura 5. Producto de PCR para la verificación del gen *am592* en el vector pET-22b (+).

MPM: marcador de peso molecular 1 kb; (+): Amplificación por PCR de el gen *am592* en el vector pET22b que corresponde a 950 pb. (-): Amplificación por PCR de la región de inicio y terminación del promotor T7 que corresponde a 350 pb. CN: Control negativo (Agua).

### 7.2 Transformación en células *E. coli* TOP10

Una vez realizada la extracción del plásmido pET22b con el gen *am592* se transformaron células de *E. coli* TOP10 con dicha construcción. Estas células se caracterizan por un alto rendimiento en la extracción de plásmido y una replicación estable del mismo. Una vez que realizó la transformación por electroporación en *E. coli* TOP10 se seleccionaron 8 clonas con resistencia a ampicilina. Con el fin de descartar clonas falsas positivas se realizó una PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos de la región del promotor T7 (Figura 6). Se observó una

banda de aproximadamente 950 pb en cada clona seleccionada, dicha banda corresponde a la versión acortada del gen *am592* y las regiones de inicio y terminación del promotor T7.

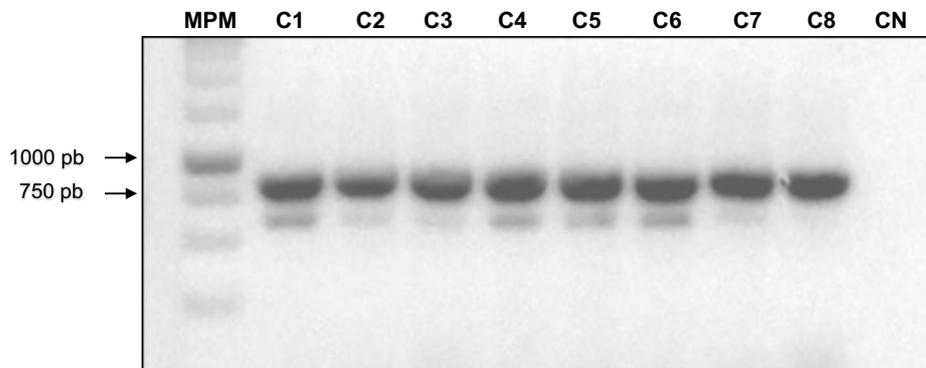


Figura 6. Producto de PCR de colonias seleccionadas *E. coli* TOP10.

MPM: Marcador de peso molecular 1 kb; C1-C8: Colonias seleccionadas; CN: Control negativo (agua). Amplificación por PCR de el gen *am592* en el vector pET22b que corresponde a 950 pb, debajo de las 750 pb se observan amplicones inespecíficos.

De las 8 clonas, se seleccionó la clona 8 y se realizó una nueva extracción de plásmido, para obtener mayor cantidad de DNA. Posteriormente se realizó una PCR para la amplificación de la región de inicio y terminación del promotor T7 (Figura 7), y de esta forma verificar nuevamente la presencia del gen *am592* en la construcción recombinante.

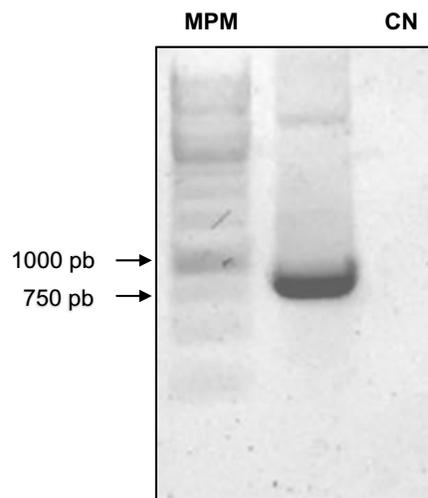


Figura 7. Producto de PCR del plásmido de la clona 8(*E. coli* Top10).

MPM: Marcador de peso molecular 1 kb; CN: Control negativo (agua). Amplificación por PCR de el gen *am592* en el vector pET22b (950 pb) de la colonia 8 seleccionada.

El producto de PCR amplificó una banda con un tamaño aproximado de 950 pb, lo que indica la presencia del gen *am592* en el plásmido.

### 7.3 Transformación en células *E. coli* BL21 (DE3)

Para llevar a cabo la expresión del gen *am592*, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) con el DNA plasmídico que contiene dicho gen. Esta cepa de *E. coli* permite una mejor expresión del gen de interés debido a la deficiencia de proteasas, además de que la expresión está bajo el control del promotor T7. Después de la transformación, se seleccionaron 8 clonas resistentes a ampicilina y con el fin de descartar falsos positivos se realizó un PCR de colonia, utilizando los oligonucleótidos de la región de inicio y terminación del promotor T7. Como se muestra en la Figura 8, se amplificó una banda con un tamaño aproximado de 950 pb.

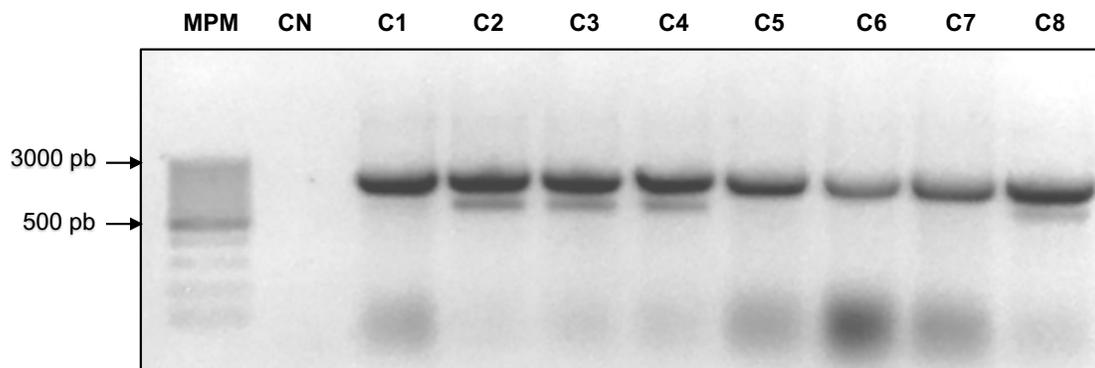


Figura 8. Producto de PCR de colonias seleccionadas *E. coli* BL21(DE3).

MPM: Marcador de peso molecular 100 pb; C: Colonia; CN: Control negativo. Amplificación por PCR de el gen *am592* en el vector pET22b que corresponde a 950 pb, debajo de las 750 pb se logran ver amplicones inespecíficos.

Una vez verificada la presencia del gen *am592*, se seleccionó la clona C1 para llevar a cabo la expresión.

## 7.4 Expresión de la proteína recombinante AM592

Después de la transformación de células de *E. coli* (DE3) y de verificar la presencia del gen *am592*, se procedió a realizar una cinética de expresión de la proteína AM592, evaluando dicha expresión a diversos tiempos. Como control negativo se utilizó el cultivo sin inducir, tomando muestras a los mismos tiempos. Como control positivo se utilizó la proteína AM592 previamente purificada (trabajo ya realizado en la Unidad de Anaplasmosis). Se colectaron las muestras a las 16, 20 y 24 horas y fueron resuspendidas en buffer de Laemmli 2X para ser sometidas a una electroforesis SDS-PAGE (Figura 9).

El peso de la proteína AM592 es de aproximadamente 23.3 kDa. En las tres muestras tomadas del cultivo inducido se observa una banda en el peso esperado, al igual que el control positivo; dicha banda no se observa en los controles no inducidos.

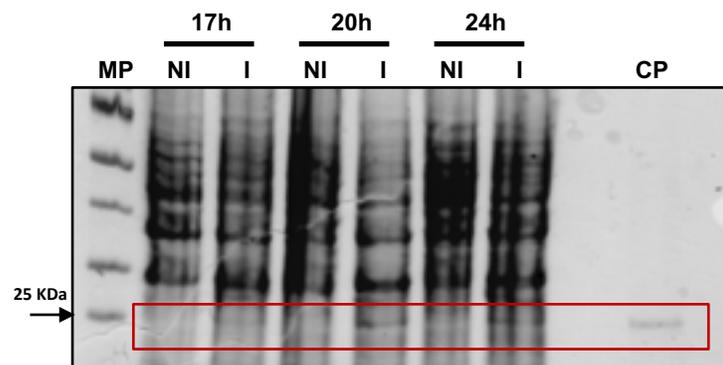


Figura 9. Expresión de la proteína recombinante AM592 en un gel SDS-PAGE al 12%.

MP: Marcador de peso molecular; NI: Control No inducido; I: Muestras Inducidas; CP: control positivo (proteína AM592 purificada). En el recuadro rojo se puede observar una banda en las muestras inducidas, y al igual que el control positivo tiene un peso teórico de 23.3 kDa; dicha banda no se observa en las muestras no inducidas, lo que sugiere la presencia de la proteína AM592.

Una vez que se observó la presencia de la proteína AM592, ésta fue reconocida mediante un Western blot, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo anti-histidinas y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-ratón acoplado a la fosfatasa alcalina (Figura 10).

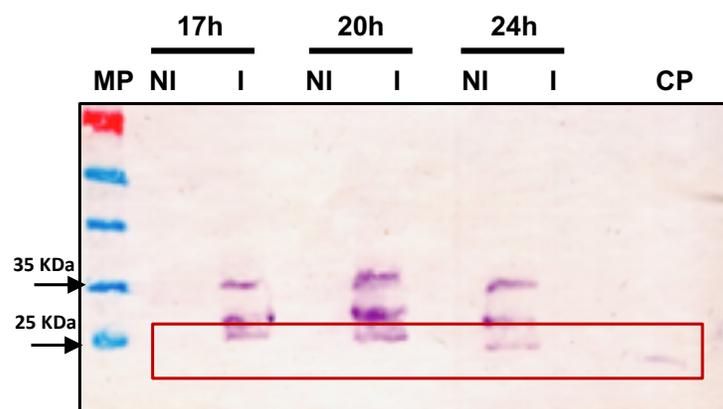


Figura 10. Identificación de la proteína AM592 por Western blot.

MP: Marcador de peso; NI: No inducido; I: Inducido; h: Horas; CP: Control positivo (proteína AM592 purificada). Se puede observar el reconocimiento de proteínas en las muestras inducidas y en el control positivo, sin embargo, se observan dos bandas adicionales, con un peso mayor a los 25 y 35 KDa, que podrían ser resultado de un reconocimiento inespecífico, además del reconocimiento de la proteína AM592 (recuadro rojo).

Como se observa en la figura 10, sólo en las muestras inducidas hubo reconocimiento de la proteína AM592 que tienen un peso aproximado a 23.3 kDa. El anticuerpo también reconoce dos bandas más de proteínas de alrededor de 30 y 35 kDa. En el control positivo, que corresponde a la proteína purificada, reconoce una proteína de aproximadamente 23.3 kDa. Tomando en cuenta estos resultados se decidió tomar la hora 20 como hora final de expresión para proceder a la purificación de la proteína AM592.

### 7.5 Purificación parcial de la proteína AM592

Se partió de un cultivo de 1 L, el cual fue dividido en muestras de 100 ml cada uno. La pastilla que se utilizó proviene de sólo 100 ml del cultivo mencionado. Posteriormente se realizó la purificación siguiendo el protocolo mencionado en la metodología, obteniendo cuatro fracciones: muestra de proteínas que no se unieron a la columna (FT), lavado (L), y dos fracciones de elución (E1 y E2).

Con el fin de evaluar la expresión de la proteína AM592 y determinar en qué fracción de la purificación se encuentra, se realizó un Dot blot utilizando los anticuerpos ya mencionados para el Western blot. (Figura 11).

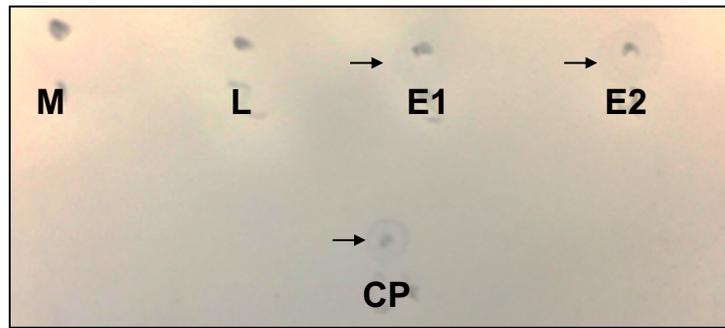


Figura 11. Identificación de la proteína AM592 mediante Dot blot.

FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: Lavado; E1: Primera elución; E2: Segunda elución 2; CP: Control positivo (proteína AM592 purificada). Hay reconocimiento del anticuerpo anti His por la proteína AM592 como se muestra en las fracciones de elución, así como en el control positivo (proteína AM592 purificada). El halo del reocnacimiento por la proteína (flecha) se muestra sobre el punto marcado para identificar las diferentes muestras.

En el Dot blot hubo reconocimiento de proteínas que tienen etiqueta de histidinas en el control positivo y en las fracciones de elución (E1 y E2), fracciones en donde se esperaba que hubiera reconocimiento.

Con la finalidad de evaluar la purificación de la proteína AM592, se realizó una electroforesis con las fracciones correspondiente a las proteínas que no se unieron a la columna (FT), el lavado (L) y las eluciones (E1 y E2).

Para esto, se tomaron 100  $\mu$ L de las fracciones obtenidas de la purificación, así como de la pastilla celular lisada y se las adicionó 100  $\mu$ L de buffer Laemmli 2X, como control positivo se utilizó proteína AM592 previamente purificada (Figura 12).

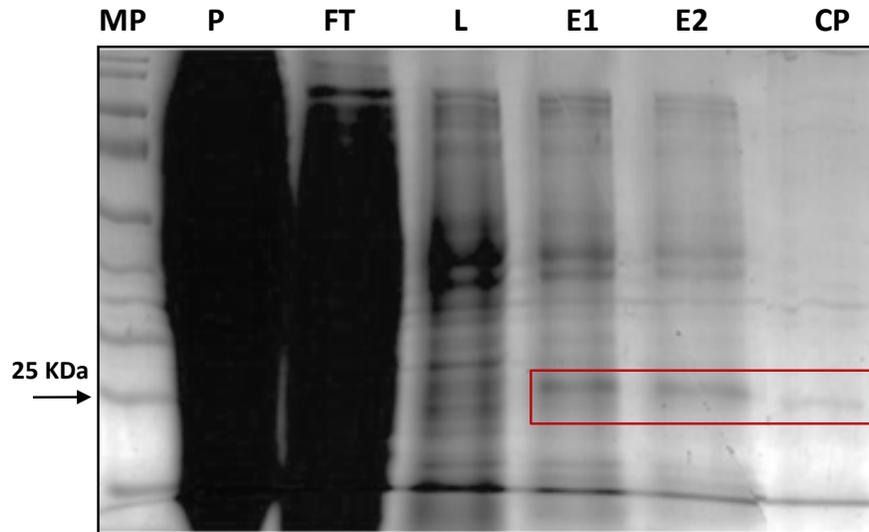


Figura 12. SDS-PAGE al 12% de las fracciones proteicas obtenidas después de la purificación.

MP: Marcador de peso; P: Pastilla celular; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: Lavado; E1: Primera elución 1; E2: Segunda elución 2; CP: Control positivo (proteína AM592 purificada). En el recuadro rojo se observa una banda en las fracciones de elución E1 y E2, que al igual que el control positivo tienen un peso predicho de 23.3 kDa.

En los carriles de las eluciones E1 y E2 se observa una banda con un peso aproximado de 23.3 kDa, en la primera elución se sugiere mayor cantidad de proteína, debido a la intensidad de banda. Sin embargo, aún se observan bandas inespecíficas con pesos distintos a lo largo de todo el carril, indicando que la muestra de elución en donde se encuentra la proteína AM592 no se encuentra completamente pura (Figura 12).

Con el fin de identificar de forma específica la proteína AM592 en las fracciones obtenidas de la purificación se realizó un Western blot utilizando los anticuerpos ya mencionados (Figura 13).

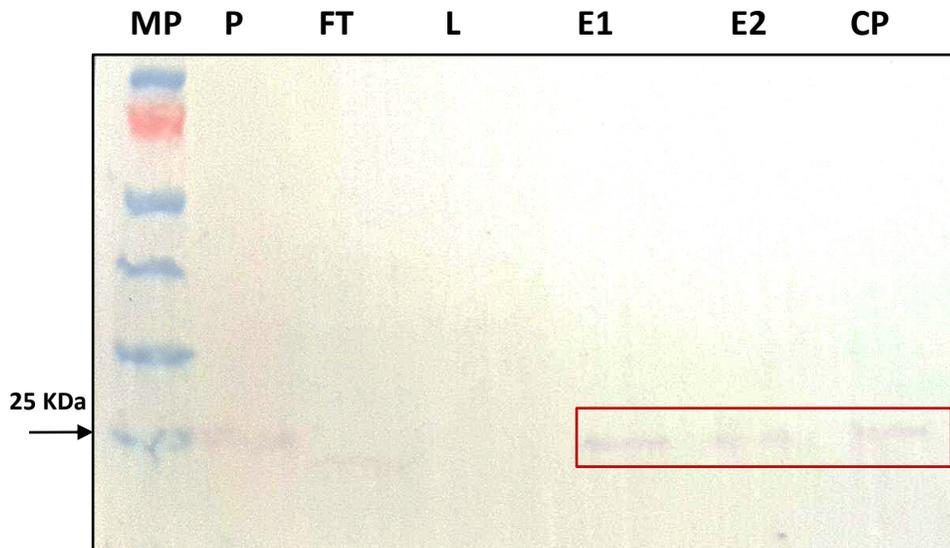


Figura 13. Identificación de la proteína purificada AM592 por Western blot.

MP: Marcador de peso; P: Pastilla celular; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: Lavado; E1: Primera elución 1; E2: Segunda elución 2; CP: Control positivo (proteína AM592 purificada). Reconocimiento obtenido por la proteína AM592 en muestras E 1, 2 y CP. Después de la purificación las bandas reconocidas en la expresión (Figura 12) fueron eliminadas.

Como se observa en la figura 13, se identificó a la proteína AM592 en las muestras de la pastilla (P) y de proteínas que no se unieron a la columna (FT), lo que indica que aún hay proteína AM592 en los restos celulares. Por otro lado, aunque se puede apreciar una banda en el carril perteneciente a la muestra de proteínas que no se unieron a la columna (FT), ésta no coincide en el peso. En las muestras de las dos eluciones, al igual que en el control positivo, sólo se aprecia una banda con el peso aproximado de 23.3 kDa que corresponde a la proteína AM592.

## 7.6 Purificación de la proteína AM592

Utilizando una muestra de cultivo de 300 mL, se realizó la metodología ya mencionada para la purificación de la proteína. Cabe mencionar que en esta purificación se realizaron más lavados con los buffers a pH 7.2 y 6.8 (L), para eliminar la mayor cantidad de las proteínas inespecíficas en la elución, además de que se adicionó una elución de buffer D (E2), obteniendo así dos fracciones de elución más limpias que las mostradas con el protocolo del proveedor (Figura 12)

Una vez que se realizó la purificación se obtuvieron cuatro fracciones: muestra de proteínas que no se unieron a la columna (FT), lavados (L) y dos fracciones de elución (E1 y E2). Se tomaron 10 µL de las muestras FT y L y 20 µL de E1 y E2, y se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 12% (Figura 14).

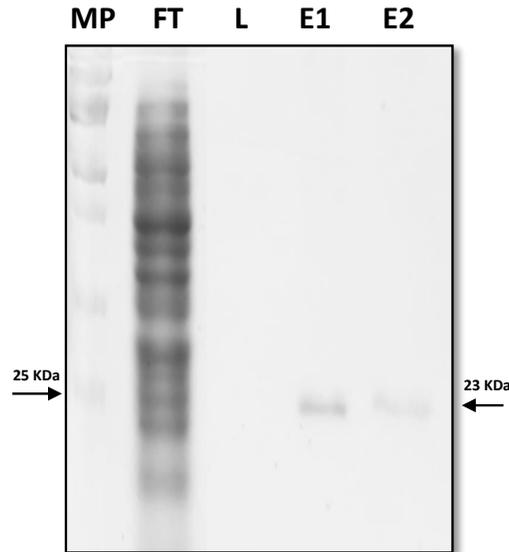


Figura 14. SDS-PAGE al 12% de las fracciones proteicas obtenidas después de la purificación.

MP: Marcador de peso; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: lavados; E: Elución. Después de la tinción con azul de Coomasie sólo se identificó una banda en las dos eluciones obtenidas con un peso predicho de 23.3 KDa en las dos fracciones de elución, en las cuales ya no se logran observar mas bandas como en la purificación anterior (Figura 12). Indicando que los cambios realizados en la metodología fueron eficientes.

Se observa en las muestras E1 y E2 que ambas presentan una banda con un peso aproximado de 23.3 kDa (proteína AM592), sin embargo, para el caso de la fracción E2 se observa una menor intensidad de ésta, lo que indica menor cantidad de proteína eluída. En comparación con las anteriores, en esta purificación ya no se observan bandas de proteínas inespecíficas, lo que indica que los lavados realizados con los buffers de pH 6.8 y 7.2 permiten obtener fracciones más puras.

Para corroborar que esta banda pertenece a la proteína AM592 se utilizaron como controles las purificaciones de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET-22b vacío. Utilizando una muestra de cultivo de 300 mL, se realizó la misma metodología de purificación para estas muestras y se obtuvieron cuatro fracciones: FT, L, E1 y E2. Se tomó el

mismo volumen de muestras que en el gel anterior y se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida al 12% (Figura 15).

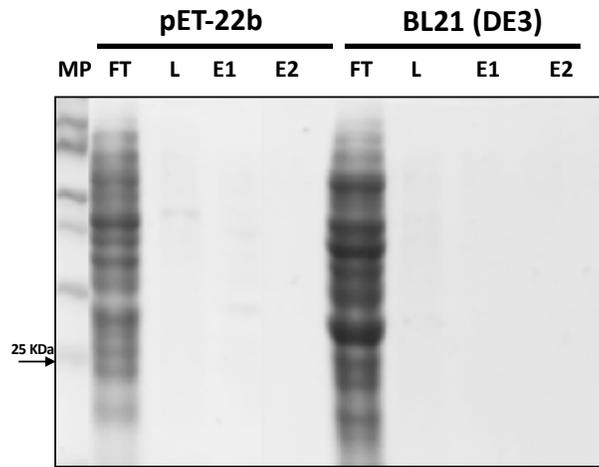


Figura 15. SDS-PAGE al 12% de las fracciones proteicas control obtenidas después de la purificación.

MP: Marcador de peso; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: lavados; E: Elución. Una vez realizada la tinción con azul de Coomasie no se observan bandas en las fracciones de elución.

Como se muestra en la figura 15, las fracciones de E1 y E2 de las muestras tanto de *E. coli* BL21 (DE3) como de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el vector pET-22b, no presentan bandas de proteína con el peso molecular de la AM592, indicando que la banda que se observa en la fracción E de la figura 14 es la proteína AM592.

## 7.7 Concentración de la proteína AM592

Después de llevar a cabo la concentración de las muestras de elución con acetona, se realizó un SDS-PAGE al %12 y posteriormente un Western blot (anti-His) con las muestras obtenidas después de la purificación: muestra de proteínas que no se unieron a la columna (FT), lavados (L) y las fracciones de elución concentradas (E) (Figura 16).

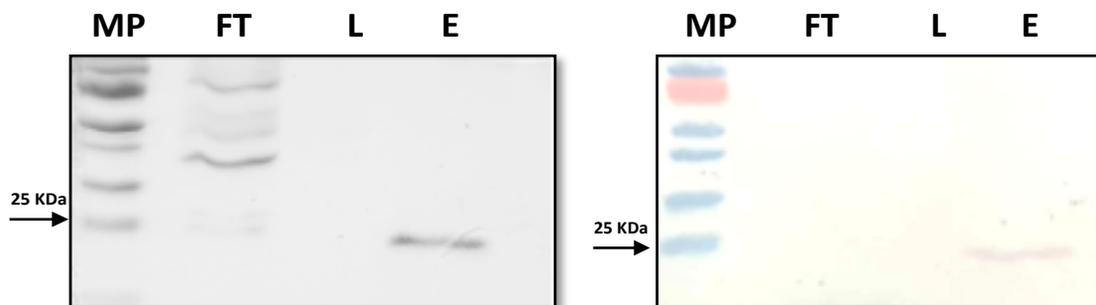


Figura 16. SDS-PAGE al 12% (izquierda) y Western blot anti-His (derecha) de las fracciones proteicas obtenidas después de la purificación y concentración.

MP: Marcador de peso; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: lavados; E: Elución concentrada (Aprox. 1  $\mu$ g). Una vez que se realizó la concentración de la proteína AM592, se identificó una banda teñida con azul de Coomassie (figura izquierda) más intensa la cual tiene un peso aproximado a 23.3 KDa, misma que fue identificada utilizando un anticuerpo anti Histidinas (figura derecha).

En la figura 16, se puede observar en el carril E (elución concentrada) una banda más intensa que a las obtenidas en la figura 14, y que al igual tiene un peso aproximado de 23.3 KDa. Lo que indica una mayor cantidad de proteínas en esta muestra. El reconocimiento de obtenido por el anticuerpo anti-His, sólo muestra una banda en el carril E (elución concentrada), indicando la presencia de la proteína AM592.

Una vez que se realizó la concentración de las muestras de elución de la purificación, se procedió a realizar la cuantificación por el método de Bradford, y se determinó que la concentración de la proteína enriquecida AM592 es de 0.13  $\mu$ g/ $\mu$ L. Obteniendo así 0.86 mg de proteína purificada por litro de cultivo.

## 7.8 Evaluación del potencial antigénico de los péptidos sintéticos mediante ensayos ELISA indirecto

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en el reconocimiento de los péptidos de MSP1a y MSP5, se realizó el análisis de 40 sueros de bovinos en ensayos iELISA (Tabla 3).

Para estos ensayos iELISA, se seleccionaron 20 sueros del banco sueros de la Unidad de Anaplasmosis (CENID-PAVET/INIFAP), algunos de estos utilizados ya previamente (Tapia Uriza, 2018; Valencia Mujica, 2018). Los 20 sueros seleccionados provienen de muestras de sangre de bovinos de Tapalpa, Jalisco colectadas el 30 de agosto del 2017, y corresponden a

animales que pueden estar o no infectados con *A. marginale* de forma natural. De los 20 sueros, 16 ya habían sido probados en ensayos iELISA con estos péptidos, resultando positivos, para los cuatro restantes aún no se contaba con información al respecto (ver resultados en Anexo 1).

Posteriormente, se seleccionaron 20 sueros más de la colección de sueros de la Unidad de Anaplasmosis (CENID-PAVET/INIFAP). Dentro de estos 20 sueros se pueden encontrar animales que ya han sido infectados de forma experimental con cepas de *A. marginale* en la Unidad de Anaplasmosis, otros provenientes de Tapalpa, Jalisco y uno más de un centro de acopio ubicado en Villa de Álvarez, Colima (Anexo 1) que podrían estar o no infectados con *A. marginale*. Cabe mencionar que estos últimos 20 sueros son de diferente día de colección. Trabajos ya realizados en la Unidad de Anaplasmosis con estos sueros, demostraron que los 20 sueros resultaron positivos o negativos al utilizar extractos crudos de *A. marginale* y péptidos de MSP1a y MSP5 como antígeno (ver resultados en Anexo1).

Los resultados marcados con color amarillo corresponden a valores con índice de positividad igual o mayor a 1, considerados como sueros positivos a la presencia de anticuerpos contra *A. marginale*.

**Tabla 3. Evaluación de la antigenicidad de los peptidos de MSP1a y MSP5 mediante iELISA y sueros de animales experimental y naturalmente infectados.**

Índice de positividad de la presencia de anticuerpos contra *A. marginale* en sueros de bovino (colección de sueros de la Unidad de Anaplasmosis CENID-PAVET/INIFAP) en presencia de los péptidos MSP1a y MSP5. Como control positivo y negativo se utilizó el suero de los bovinos 4697 y 1160 (respectivamente). (\*) Sueros de bovinos pertenecientes a la Unidad de Anaplasmosis, (\*\*) sueros de bovinos muestreados en Tapalpa, Jalisco, (\*\*\*) sueros muestreados en Villa de Álvarez, Colima. En color amarillo se observan los sueros positivos (IP>1) y el color blanco los negativos (IP<1).

Nº	Muestra	Fecha	MSP1a	MSP5
	4697 C+		1.395	1.006
	1160 C-		0.561	0.473
1	9953**	04/04/18	2.982	1.954
2	9931**	30/08/17	1.681	1.301
3	9919**	30/08/17	0.619	0.411
4	9916**	30/08/17	1.955	1.403
5	9912**	30/08/17	1.824	1.285
6	9911**	03/04/18	2.195	1.129
7	9899**	30/08/17	2.968	1.408
8	9887**	04/04/18	1.629	1.052
9	9511**	30/08/17	0.895	0.652
10	6964*	27/09/13	2.410	1.436
11	6959*	22/06/13	1.088	0.827
12	6959*	20/07/13	1.293	0.971
13	6959*	14/08/13	1.439	0.930
14	6810**	03/04/18	3.577	2.070
15	6802**	30/08/17	2.294	1.447
16	6760**	30/08/17	1.220	0.823
17	6751**	30/08/17	1.053	0.810
18	6750**	30/08/17	1.205	0.809
19	6749.2**	30/08/17	1.269	1.593
20	6749.1**	30/08/17	1.204	1.181
21	5805**	30/08/17	0.710	0.621
22	5804**	30/08/17	2.223	1.268
23	4705**	03/04/18	2.296	1.314
24	4701**	30/08/17	1.510	1.142
25	4694**	30/08/17	2.593	1.943
26	4232**	30/08/17	0.851	0.833
27	4228**	30/08/17	0.586	0.335
28	3043**	30/08/17	2.612	2.233
29	2902**	30/08/17	1.912	1.386
30	1937***	05/04/18	4.304	2.561
31	1783*	19/08/13	8.168	5.049
32	1775*	24/06/13	1.461	0.937
33	1756*	19/07/13	1.047	0.685
34	1756*	06/08/13	0.661	0.483
35	135*	18/11/03	4.778	2.569
36	135*	18/10/04	16.723	9.822
37	135*	29/10/04	18.696	10.527
38	125**	04/04/18	2.239	1.474
39	27*	07/03/12	6.828	4.432
40	27*	09/10/13	2.593	1.548

De los resultados de la Tabla 3, se muestra que la mayoría de los sueros reconocen a *A. marginale*. Las tres muestras del suero 6959 son positivas sólo para el péptido de MSP1a y presentan un índice de positividad por debajo del punto de corte para MSP5, siendo negativos, indicando un mayor reconocimiento por el péptido de MSP1a que por el de MSP5.

Para asegurar que en las pruebas realizadas no existiera reconocimiento inespecífico de IgG hacia los péptidos de MSP1a y MSP5, se realizaron ensayos iELISA utilizando 10 sueros de cabra, los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de diagnóstico veterinario del Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Colima. En los ensayos (datos no mostrados), estos sueros resultaron ser negativos por el reconocimiento del anticuerpo anti-IgG el cual es purificado a partir de cabra, evidenciando el reconocimiento específico del anticuerpo.

Una vez determinado el potencial antigénico de los péptidos sintéticos, se realizaron ensayos iELISA con la proteína AM592 purificada. Para determinar la cantidad mínima necesaria por pozo de antígeno, se utilizaron diferentes concentraciones de la proteína enriquecida como antígeno, siendo 0.75, 1 y 1.5 µg (Tabla 4), como control positivo del reconocimiento, se utilizaron 5 µg de extracto crudo de *A. marginale* (AM), como control negativo se utilizaron 1.5 µg proteínas de *E. coli* (todos por triplicado) y se seleccionaron los sueros de los bovinos 135, 1756, 9899 y 2899 como sondas del reconocimiento por anticuerpos, ya que en los resultados anteriores estos animales mostraron ser positivos o negativos para el reconocimiento de los péptidos. El bovino 135 es un animal hiperinmunizado con *A. marginale*, es decir que ha generado una gran cantidad de anticuerpos como respuesta al estímulo del sistema inmune, lo que explica los valores tan altos de IP, por el contrario el bovino 1756 es un bovino que no se logró infectar con *A. marginale* y que no generó anticuerpos contra esta. Los bovinos 9899 (positivo) y 2899 (negativo) fueron seleccionados de los ensayos iELISA anteriores con los péptidos de MSP1a y MSP5, siendo bovinos infectados o no de forma natural con *A. marginale*.

**Tabla 4. Evaluación de la antigenicidad de la proteína mediante iELISA, utilizando diferentes concentraciones de antígeno con sueros de animales experimental y naturalmente infectados.**

Índice de positividad de la presencia de anticuerpos contra *A. marginale* en sueros de bovino (sueros seleccionados de la colección de la Unidad de Anaplasmosis (CENID-PAVET/INIFAP) en presencia de la proteína AM592. Como control positivo y negativo se utilizó el suero de los bovinos 4697 y 1160 (respectivamente). En color amarillo se observan los sueros positivos (IP>1) y el color blanco los negativos (IP<1).

Muestra	Cantidad de proteína (µg)			AM	<i>E. coli</i>
	0.75	1	1.5		
4697 C+	0.680	0.971	0.940	1.291	0.964
1160 C-	0.551	0.928	0.938	0.613	0.975
135	1.032	1.576	1.764	3.430	2.123
1756	0.338	0.41	0.45	0.318	0.476
9899	0.824	1.373	1.573	1.883	1.527
2899	0.504	0.833	0.843	0.594	0.638

Los resultados muestran que la proteína AM592 es reconocida por los anticuerpos de los sueros cuando es utilizada en diferentes concentraciones, sin embargo, los anticuerpos de los sueros de los bovinos positivos (135 y 9899), así como de los negativos (1756 y 2899), también reconocen a las proteínas de *E. coli*, lo que sugiere que la fracción de la proteína AM592, está enriquecida pero no completamente pura.

Por otro lado, los valores del índice de positividad de los bovinos 4697 (C+) y 1160 (C-) no permiten distinguir un suero positivo de uno negativo, dado que se trata de valores altamente cercanos.

Se propone el uso de una mayor concentración de la proteína AM592, ya que se podría favorecer el reconocimiento de los anticuerpos del suero por encima del reconocimiento de las proteínas de *E. coli*.

## 7.9 Reconocimiento de péptidos sintéticos por los anticuerpos IgG1 e IgG2 mediante ELISA indirecto

Se ha reportado que para la respuesta contra la infección de *A. marginale* es necesario un mayor título de IgG2 que de IgG1 para brindar una respuesta inmune protectora en el bovino (Barigye *et al.*, 2004). Por esa razón, se realizaron ensayos iELISA para identificar el tipo de anticuerpo reconocen a los péptidos de MSP1a y MSP5. Para esto se utilizaron 0.25 µg de cada péptido y se seleccionaron los sueros de los bovinos 1783, 1756, 9899, 2899, 135 e IgG2 purificada de este último (I135). Los bovinos 1783 y 1756 son animales positivos y negativos correspondientemente, los cuales fueron infectados con *A. marginale* de forma experimental. Los bovinos 9899 y 2899 son animales son positivos y negativos, respectivamente, pero naturalmente infectados con *A. marginale*. El bovino 135 es animal hiperinmunizado con *A. marginale*, es decir que ha generado anticuerpos contra ésta y que en su mayoría son IgG2, lo que indica una respuesta inmune protectora. Además, se utilizaron cuerpos iniciales de *A. marginale* (AM) como control positivo del reconocimiento de las IgG. Una vez que se realizaron los ensayos iELISA de IgG totales, IgG1 e IgG2 de los dos péptidos sintéticos, se realizaron graficas con los resultados obtenidos de su índice de positividad con base en el control negativo (Figura 17, 18 y 19), si las muestra problema son mayores a uno (línea roja) son consideradas positivas.

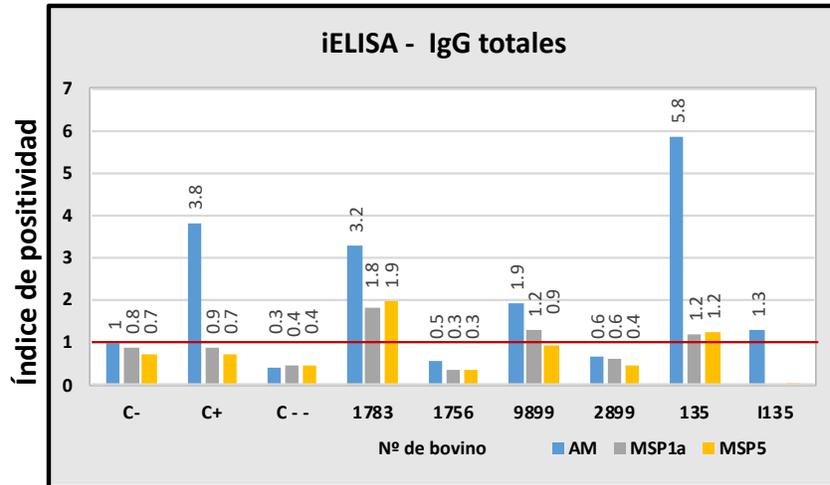


Figura 17. Grafica de ensayo iELISA de IgG totales con péptidos sintéticos.

C-: Control negativo; C+: Control positivo; C--: Bovino control; 1783: Bovino positivo experimental; 1756: B. negativo experimental; 9899: B. positivo naturalmente; 2899: B. negativo naturalmente; 135: B. hiperinmunizado; I135: IgG2 purificado del bovino 135; AM: Extracto crudo de *A. marginale*.

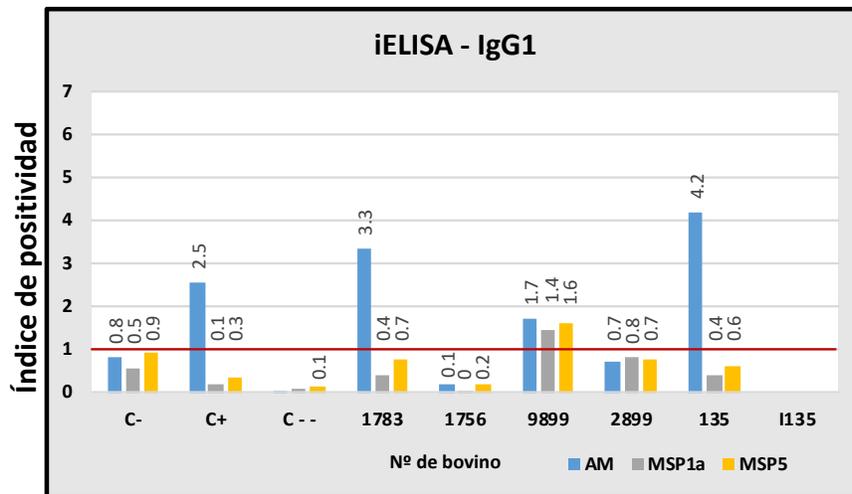


Figura 18. Grafica de ensayo iELISA de IgG1 con péptidos sintéticos.

C-: Control negativo; C+: Control positivo; C--: Bovino control; 1783: Bovino positivo experimental; 1756: B. negativo experimental; 9899: B. positivo de naturalmente; 2899: B. negativo naturalmente; 135: B. hiperinmunizado; I135: IgG2 purificado del bovino 135; AM: Extracto crudo de *A. marginale*.

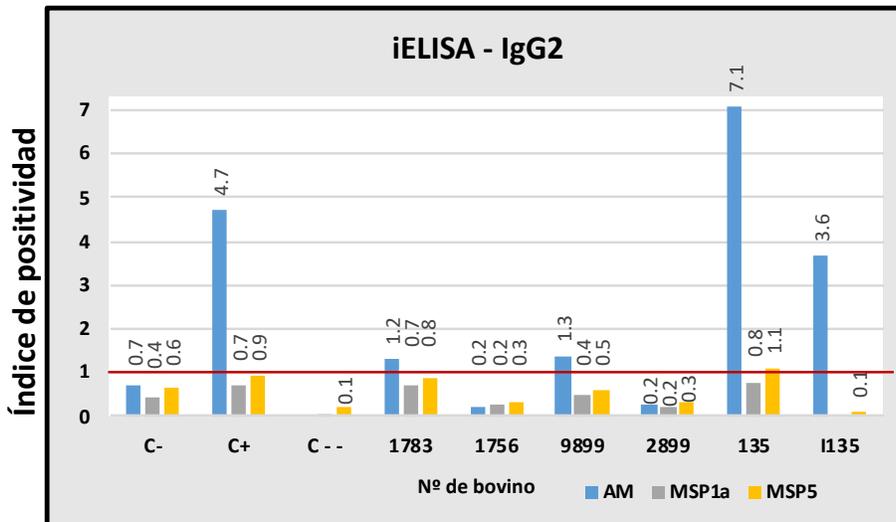


Figura 19. Grafica de ensayo iELISA de IgG2 con péptidos sintéticos.

C-: Control negativo; C+: Control positivo; C--: Bovino control; 1783: Bovino positivo experimental; 1756: B. negativo experimental; 9899: B. Positivo naturalmente; 2899: B. Negativo naturalmente; 135: B. hiperinmunizado; I135: IgG2 purificado del bovino 135; AM: Extracto crudo de *A. marginale*.

En los ensayos iELISA realizadas utilizando los sueros con IgG totales (Figura 17), se observa que los índices de positividad de los sueros de los bovinos (1783 y 9899) y (1756 y 2899) son positivos y negativos para los péptidos, así como para los cuerpos iniciales de *A. marginale*, con IP de 0.9 hasta 3.2 para sueros positivos y para los sueros negativos IP de 0.3 a 0.6.

Para el caso del bovino 135, el reconocimiento de éste es apenas considerado positivo hacia los péptidos sintéticos (IP: 1.2), sin embargo, es mayor para los cuerpos iniciales de *A. marginale* (IP: 5.8), esto también se puede apreciar en la muestra de IgG2 purificada (I135) donde sólo hay reconocimiento para esta muestra y no para los péptidos sintéticos.

En los ensayos de IgG1 e IgG2 (Figura 18 y 19), los sueros de los bovinos positivos (1283 y 9899), así como de 135, sólo reconocen los cuerpos iniciales de *A. marginale* (AM), así como la muestra de IgG2 purificada (I135). Para el caso de los péptidos sintéticos de MSP1a y MSP5, sólo el suero del bovino positivo 9899 es reconocido por IgG1.

Esto sugiere que los péptidos de las proteínas de MSP1a y MSP5 podrían promover una respuesta tipo Th2 mediada por IgG1, respuesta inmune no protectora contra *A. marginale*.

También se evaluó la proteína AM592 (utilizando 5 µg de ésta) con los sueros de animales previamente seleccionados, para estos ensayos se utilizaron cuerpos iniciales de *A. marginale* (AM) como control positivo y como control negativo, proteínas de *E. coli*.

Se realizaron ensayos para la detección de IgG totales (Figura 20) para saber si la proteína AM592 es reconocida por anticuerpos, también ensayos de IgG1 e IgG2 (Figura 21 y 22) para identificar qué tipo de IgG son las que la reconocen.

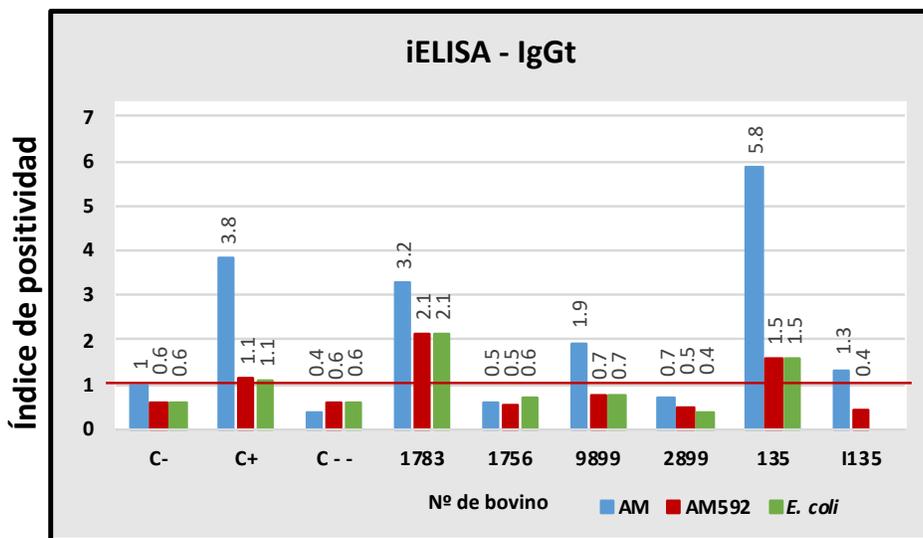


Figura 20. Grafica de ensayo iELISA de IgG totales con proteína AM592

C-: Control negativo; C+: Control positivo; C--: Bovino control; 1783: Bovino positivo experimental; 1756: B. negativo experimental; 9899: B. positivo naturalmente; 2899: B. negativo naturalmente; 135: B. hiperinmunizado; I135: IgG2 purificado del bovino 135; AM: Extracto crudo de *A. marginale*.

En la figura 20, se muestra el reconocimiento obtenido por IgG totales de los sueros seleccionados, tanto la muestra de proteína AM592 y las proteínas control de *E. coli* tienen reconocimiento similar a estos sueros, a diferencia de la muestra de IgG2 purificada que reconoce a la proteína AM592 y el extracto crudo de *A. marginale* (AM).

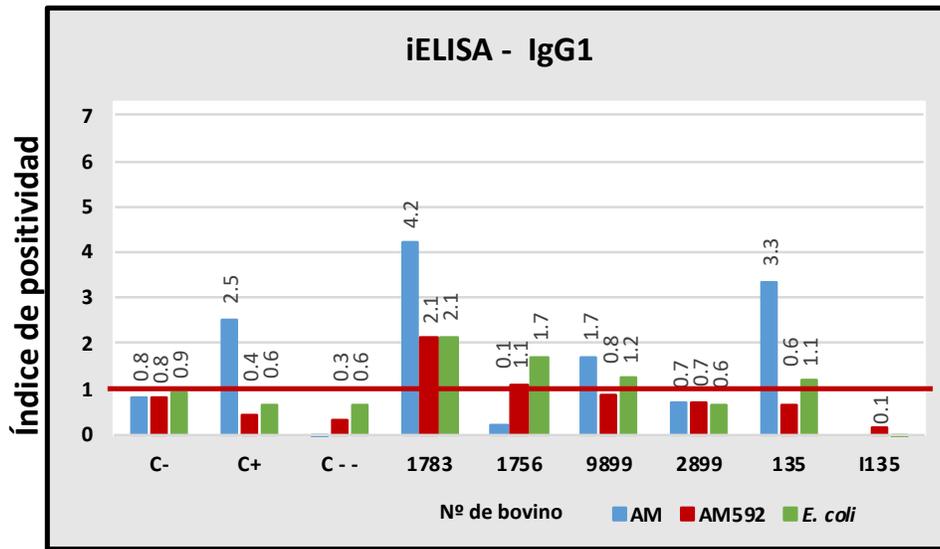


Figura 21. Grafica de ensayo iELISA de IgG1 con proteína AM592

C-: Control negativo; C+: Control positivo; C--: Bovino control; 1783: Bovino positivo experimental; 1756: B. negativo experimental; 9899: B. Positivo naturalmente; 2899: B. negativo naturalmente; 135: B. hiperinmunizado; I135: IgG2 purificado del bovino 135; AM: Extracto crudo de *A. marginale*.

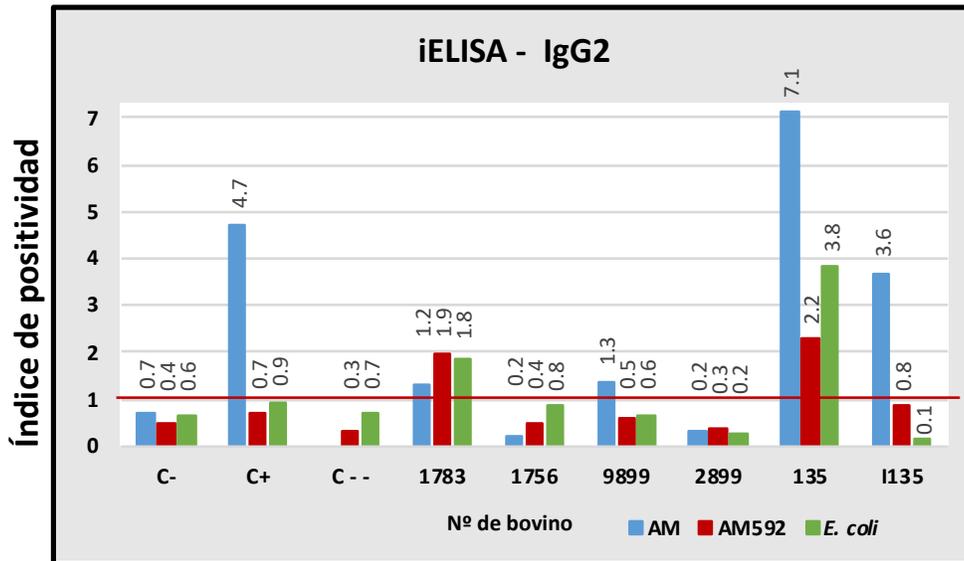


Figura 22. Grafica de ensayo iELISA de IgG totales con proteína AM592

C-: Control negativo; C+: Control positivo; C--: Bovino control; 1783: Bovino positivo experimental; 1756: B. negativo experimental; 9899: B. positivo naturalmente; 2899: B. negativo naturalmente; 135: B. hiperinmunizado; I135: IgG2 purificado del bovino 135; AM: Extracto crudo de *A. marginale*.

El reconocimiento obtenido por IgG1 es evidente en las muestras del extracto crudo de *A. marginale* (AM) con valores superiores a uno, en los sueros 1783, 9899 y 135, este reconocimiento también está presente en las muestras proteicas de *E. coli*, (de igual forma con valores superiores a uno) pero no en todas las muestras de AM592 (Figura 21).

Para el reconocimiento mediado por IgG2, se puede observar en los sueros de los bovinos 1783 y 135, para las tres muestra problema, así en la fracción de IgG2 purificada (Figura 22).

En los resultados obtenidos del ensayo de IgG totales (Figura 20) sólo existió reconocimiento positivo de la proteína AM592 por los sueros de los bovinos 1783, 135 (IP: 2.1 y 1.5) y en menor medida con el bovino 9899 (IP: 0.7), sin embargo, estos valores son los mismo que se obtuvieron con las proteínas de *E. coli* (IP: 2.1, 0.7 y 1.5).

En la muestra de IgG2 purificada (I135) se puede observar que hay un IP positivo para los cuerpos iniciales de *A. marginale* (AM) (IP: 1.3) y un IP negativo para la proteína AM592 (IP: 0.4).

Para el reconocimiento por IgG1 (Figura 21) los sueros de los animales 1783, 1756 y 9899 reconocen a la proteína AM592, así como a las proteínas de *E. coli*. sin embargo, en estos dos últimos animales, están muy cerca del punto de corte (IP: 1.1 y 0.8), lo que indica un bajo reconocimiento por IgG1.

En los ensayos de IgG2 (Figura 22), los sueros de los bovinos 1783 y 135 reconocen la proteína AM592, sin embargo, este reconocimiento también se observa para las proteínas del control negativo de *E. coli*; por otro lado, las IgG2 purificadas no reconocen a la proteína AM592 (IP: 0.8), ni a las proteínas control de *E. coli* (IP:0.1).

Estos resultados muestran que el reconocimiento de los anticuerpos hacia la proteína AM592 puede ser mediada IgG2 más que por IgG1, sin embargo, este reconocimiento de los sueros también se observa hacia las proteínas control de *E. coli* en los tres ensayos realizados (IgG totales, IgG1 e IgG2). Como se muestra en la metodología (Pag. 31) la expresión de la proteína AM592 se realizó en *E. coli*, y es muy probable que en la fracción de elución en donde se detectó esta proteína, aún existan proteínas de esta bacteria lo que explicaría el reconocimiento en las dos muestras proteicas utilizadas (AM592 y *E. coli*).

## 7.10 Reconocimiento de la proteína AM592 por los anticuerpos IgG1 e IgG2 mediante ensayo Western blot

Con el fin de identificar a la proteína AM592 por los anticuerpos bovinos en las fracciones obtenidas durante la purificación, se hizo un Western blot utilizando el suero de un bovino hiperinmunizado (135), que presenta además una respuesta inmunoprotectora (IgG2) hacia *A. marginale*. Cabe mencionar que para realizar estas pruebas se utilizaron aproximadamente 15 µg de la proteína AM592 que tienen un peso aproximado de 23.3 KDa y proteínas totales de *E. coli* como control negativo (C).

Se realizó un SDS-PAGE y un Western blot utilizando un anticuerpo Anti-His (Figura 23) para verificar la presencia de la proteína AM592.

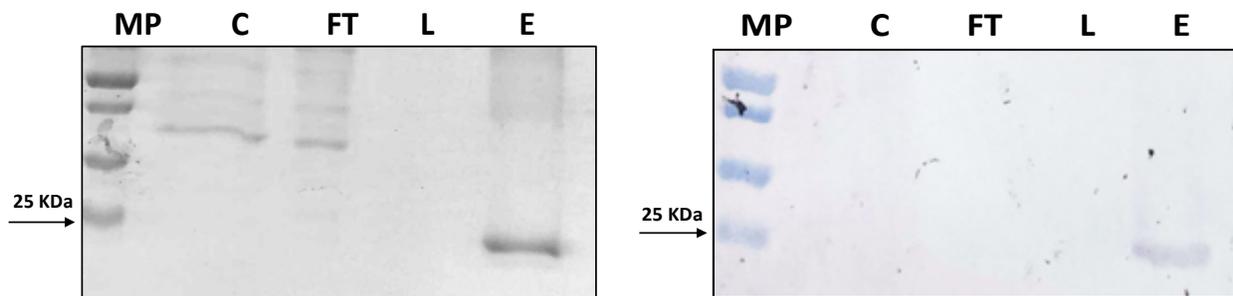


Figura 23. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie (izquierda) y Western blot (Anti-His) (derecha) de las fracciones proteicas obtenidas después de la purificación y concentración.

MP: Marcador de peso; C: Proteínas de *E. coli*; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: lavados; E: Elución concentrada. Para realizar el SDS-PAGE, así como el Western blot, se utilizó 15 µg de de proteína AM592, con un peso aproximado de 23.3 KDa, banda que se observa en la fracción de elución (E), la cual fue reconocida utilizando un anticuerpo anti-His. La fracción de elución muestra más bandas de proteínas con pesos mayores a 23.3 KDa, sin embargo la AM592 se encuentra enriquecida.

En la figura 23, sólo en la fracción de elución (E) se identifica una proteína con un peso aproximado de 23.3 KDa.

Una vez identificada la proteína AM592, se hizo un Western blot con las mismas muestras proteicas, utilizando los anticuerpos IgG totales (Figura 24), IgG1 (Figura 25) e IgG2 (Figura 26).

El anticuerpo anti IgG totales (Figura 24) reconoce proteínas en todas las muestras (C, FT, L y E), sin embargo, en la fracción de elución (E) además de la proteína AM592 también se reconocen otras proteínas.

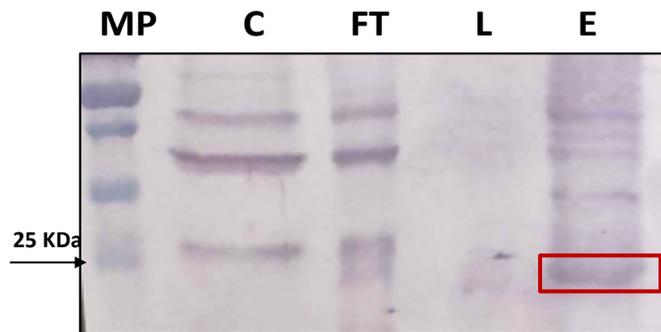


Figura 24. Western blot (Anti-IgG totales) de las fracciones proteicas obtenidas después de la purificación y concentración.

MP: Marcador de peso; C: Proteínas de *E. coli*; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: lavados; E: Elución concentrada. Utilizando un anticuerpo Anti-IgG totales se identificaron proteínas en las muestras C y FT, proteínas pertenecientes a *E. coli*. En la muestra de elución (E) en donde se utilizó 15  $\mu\text{g}$  de esta fracción, se observa un reconocimiento por proteínas de diferentes pesos moleculares, en donde se observa una banda con un peso aproximado de 23.3 KDa, proteína AM592 (recuadro rojo).

Como se muestra en la Figura. 25, el anticuerpo IgG1 reconoce proteínas en todas las muestras. En la muestra que contiene la proteína (E), además de la AM592 (recuadro rojo), se observan dos bandas de proteína que también fueron reconocidas por el anticuerpo.

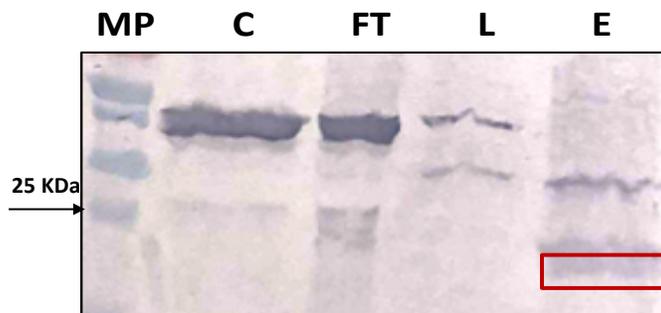


Figura 25. Western blot (Anti-IgG1) de las fracciones proteicas obtenidas después de la purificación y concentración.

MP: Marcador de peso; C: Proteínas de *E. coli*; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: lavados; E: Elución concentrada. Utilizando un anticuerpo Anti-IgG1, al igual que en la figura anterior (Figura 24), se muestra reconocimiento de proteínas en las diferentes muestras (C, FT y L), en la fracción de elución (E) en donde se utilizó 15  $\mu\text{g}$  de esta, predominan tres bandas y una de ellas (recuadro rojo) tiene un peso aproximado de 23.3 KDa, siendo la AM592.

El reconocimiento del anticuerpo IgG2 (Figura 26) al igual que en la figura anterior, es muy similar para los carriles C y FT. En el carril E, el anticuerpo reconoce a la proteína AM592 además de otras bandas.

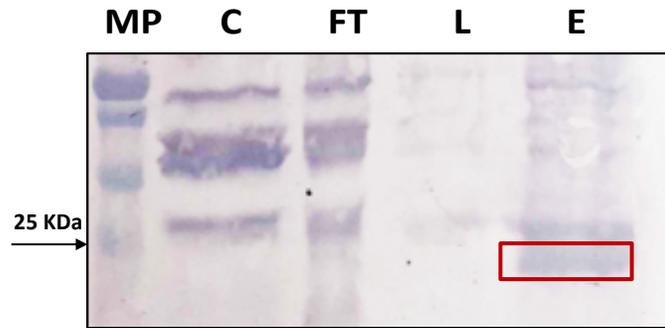


Figura 26. Western blot (Anti-IgG2) de las fracciones proteicas obtenidas después de la purificación y concentración.

MP: Marcador de peso; C: Proteínas de *E. coli*; FT: Muestra de proteínas que no se unieron a la columna; L: lavados; E: Elución concentrada. El reconocimiento por el anticuerpo Anti-gG2 se muestra en las fracciones C y FT en donde se observa el mismo número de bandas, para el caso de la fracción E, en donde se utilizó 15  $\mu$ g de esta muestra, hubo reconocimiento por diferentes bandas, una de estas, además de que predomina, tiene un peso aproximado de 23.3 KDa, siendo la AM592 (recuadro rojo).

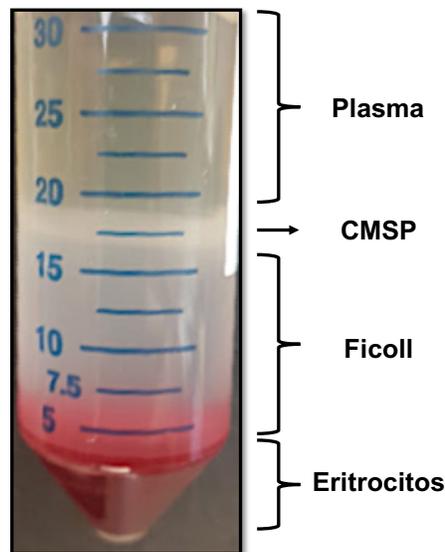
Como se observa en las figuras 24, 25 y 26, los anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2 reconocen proteínas en las fracciones de proteínas de *E. coli* (C), en las proteínas que no se unieron a la columna (FT) y en la fracción de elución (E), además del reconocimiento de la proteína AM592 también se reconocen otras bandas.

Con estos resultados se corrobora el reconocimiento cruzado de los anticuerpos IgG's en los ensayos iELISA realizados, ya que los anticuerpos reconocen tanto a las proteínas de *E. coli*, como a la proteína AM592. Estos resultados indican que la proteína AM592 es considerada antigénica, ya que es reconocida por IgG1 e IgG2.

## 7.12 Establecimiento del cultivo de linfocitos de sangre de bovino

El establecimiento de un cultivo de linfoproliferación en la Unidad de Anaplasmosis del CENID PAVET, es una prioridad para evaluar el potencial inmunogénico de determinadas proteínas. Especialmente si se cuenta con proteínas enriquecidas como la AM592 que tiene un potencial antigénico.

En este primer abordaje se determinó que, a partir de 10 mL de sangre de bovino, se pueden llegar a obtener alrededor de  $4.9 \times 10^7$  células linfoides viables. Esto se logró después de la extracción de linfocitos a partir de gradientes de densidad con Ficoll, donde se obtiene una interfase entre el plasma y el Ficoll (Figura 27), que es donde se encuentran las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), posteriormente estas células fueron retiradas del gradiente y lavadas, para después determinar su viabilidad y realizar su cultivo.



**Figura 27.** Gradiente de densidad con Ficoll utilizando sangre de bovino.

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica. Como se puede observar, una vez que la muestra de sangre es centrifugada con Ficoll (densidad de 1.077 g/mL) este permite formar una interfase con las CMSP (linfocitos y monocitos) del paquete de glóbulos rojos y del plasma.

Con el fin de identificar correctamente mediante microscopía la estructura de los linfocitos, se realizaron improntas del cultivo que se dejaron incubando por 72 horas y posteriormente se tiñeron con el colorante de Giemsa (Figura 28).

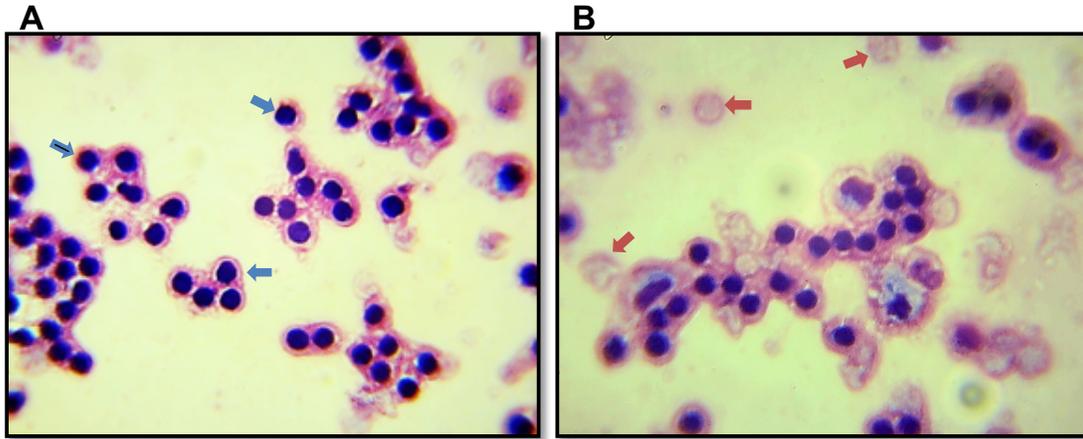


Figura 28. Células mononucleares de sangre periférica en tinción Giemsa (x100).

En el panel A y B se pueden observar células no granulocíticas teñidas con un color azul en el núcleo, definiéndose como células linfoides. En el panel A se pueden observar en su mayoría linfocitos teñidos de color azul por los ácidos nucleicos presentes en su núcleo y de color morado en el citoplasma, definiéndose como células viables (flechas azules), por otro lado en el panel B se pueden observar linfocitos teñidos de color azul con morado, así como en su mayoría teñidos solo de color morado, definiéndose como células no viables (flechas rojas).

Este ensayo tendrá mucha importancia dentro de la evaluación inmunogénica de antígenos, como lo pueden ser la proteína AM592 o diferentes péptidos que se generen en el estudio contra la anaplasmosis. De tal forma que se pueda inferir su papel como antígenos protectores, lo que permitirán tener un mayor panorama sobre su rol inmunogénico.

## 8. Discusión

En este trabajo se llevó a cabo la expresión recombinante y purificación de la proteína anotada como hipotética AM592 de *A. marginale*, partiendo de información y resultados previamente reportados (Cano-Tavira, 2014; Pineda Gutiérrez, 2016).

Esta proteína ya se había purificado parcialmente en la Unidad de Anaplasmosis (CENID-PAVET/INIFAP), sin embargo, la muestra no se encontraba completamente pura, ya que, además de ésta, se observaron otras proteínas después de la purificación.

En este trabajo, se realizaron modificaciones al protocolo de purificación sugerido por el proveedor, lo que permitió obtener una banda del tamaño predicho para AM592. Los cambios realizados fueron: aumentar el número de lavados, utilizando dos buffers con pH básico (6.8 y 7.2), lo que permitió obtener una banda correspondiente a la proteína AM592, al contrario de las purificaciones realizadas anteriormente, en donde la fracción que contiene la proteína purificada presentaba bandas adicionales.

Una vez establecido este nuevo protocolo, la muestra de la proteína AM592 se concentró con acetona y se determinó un rendimiento de 0.86 mg por litro de cultivo. Los trabajos reportados de expresión y purificación de otras proteínas de membrana externa muestran un rendimiento mínimo de 0.25 mg/L y máximos de 170 mg/L (Bannwarth and Schulz, 2003), lo que indica que una expresión baja en este tipo de proteínas es normal, debido a la dificultad para solubilizar y purificar este tipo de proteínas (Bannwarth and Schulz, 2003; Grisshammer, 2006).

En lo que respecta a la evaluación del potencial antigénico de los péptidos sintéticos por iELISA, los valores del índice de positividad (IP) obtenidos del reconocimiento de MSP5 son menores a los obtenidos en MSP1a. Se sabe que MSP5 de *A. marginale* es una proteína altamente conservada que posee epítomos estructurales importantes para el reconocimiento por anticuerpos contra *A. marginale* (Knowles *et al.*, 1996; Munodzana *et al.*, 1998). Esto sugiere que se requiere la presencia no sólo de un péptido, sino de todos los epítomos, incluso destaca la importancia del arreglo tridimensional en el reconocimiento (Moisa and Kolesanova, 2009).

Para el caso de MSP1a, el reconocimiento de este péptido presentó valores del IP más altos. Se ha reportado (Vidotto *et al.*, 1994) que esta proteína, al igual que otras MSP's son reconocidas por IgG específicas que promueven protección ante diferentes cepas, por lo que es posible que el reconocimiento fuera mayor en las pruebas realizadas (Brown, Palmer and Lewin, 2001; Santos *et al.*, 2013).

En los iELISA realizados con los sueros de animales positivos y negativos por serología a *A. marginale*, se obtuvieron diversos valores del IP. Los valores para los animales negativos (1756 y 2899) se mantuvieron por debajo de 1, lo que indica su negatividad. Para el caso de los animales positivos (1783 y 9899) los valores eran superiores a 1, es decir, positivos (Figura 17). El caso del suero del animal 135, es de especial interés debido a que se trata de un animal hiperinmunizado contra *A. marginale* que otorga inmunoprotección. Los valores del IP para este suero fueron muy superiores en comparación con el resto de los sueros, lo que indica una mayor presencia de anticuerpos contra *A. marginale* (Figura 17, 18 y 19).

En los reportes de iELISA (Liu *et al.*, 2012; Jaramillo-Ortiz *et al.*, 2018) con proteínas recombinantes se utilizan concentraciones de 1 µg o incluso menores, sin embargo, en este proyecto se utilizaron 5 µg de proteína AM592, dicha cantidad se empleó para que el número de moles tanto de los péptidos como de la proteína recombinante AM592 fuera la misma. Ya que cuando se emplearon cantidades menores, como 0.25 µg no hubo reconocimiento.

En lo que respecta a los iELISA utilizando AM592 como antígeno, se observó que los sueros problema tienen valores de IP positivos y detectan tanto a la proteína AM592 como a otras proteínas presentes en los extractos de *E. coli*. Este hecho impidió tener resultados concluyentes sobre el reconocimiento específico de la AM592. Por otro lado, los valores del IP para el control negativos eran muy semejantes a los del control positivo, lo que comprometía la confiabilidad de los resultados (Tabla 4).

Para elucidar este punto se hicieron cambios, tales como utilizar los controles positivos y negativos del kit PADIANAVET, en donde el control negativo corresponde a un suero de un bovino negativo a *A. marginale* y el control positivo es una mezcla de sueros de bovinos positivos a *A. marginale*. Habiendo establecido los controles, se realizaron ensayos iELISA con la proteína AM592. En la figura 20 se muestra el reconocimiento de las IgG bovinas, lo que refuerza el papel antigénico de la proteína. Los ensayos iELISA realizados para identificar

qué tipos de IgG son las que reconocen esta proteína mostraron un reconocimiento de las IgG2 superior al reconocimiento de las IgG1 (figura 21 y 22). Sin embargo, también hubo reconocimiento de las IgG por las proteínas de *E. coli*, utilizadas como control negativo del ensayo. El reconocimiento de estas proteínas puede ser común debido a que *E. coli* es una bacteria común en mamíferos, lo que provoca producción de anticuerpos por el sistema inmune.

Por lo anterior, se decidió realizar unos Western blot para determinar si los anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2, son quienes reconocen a la proteína AM592. Lo que muestran estos resultados (figuras 24, 25 y 26) es que la AM592 es reconocida por dichos anticuerpos. Este hecho sugiere que si AM592 es reconocida por IgG2 podría tener un papel protector ante *A. marginale*. Es importante mencionar que los ensayos iELISA mostraron que las IgG2 también reconocían a AM592. Adicionalmente, también se observó que las IgG totales e IgG1 reconocen a la proteína.

De los ensayos iELISA usando como antígenos a los péptidos sintéticos MSP1a y MSP5, se sugiere que éstos tienen un potencial antigénico con un reconocimiento en mayor medida por IgG1, lo que indica que muy probablemente el tipo de respuesta inmune que promueven sea de tipo Th2, la cual no confiere protección. A diferencia de los péptidos sintéticos, la proteína AM592 es reconocida por mayores títulos de IgG2 lo que sugiere que puede promover una respuesta inmune Th1, la cual es protectora en bovinos.

Con los resultados generados en este proyecto, se puede concluir que los péptidos sintéticos de MSP1a y MSP5, así como la proteína AM592 son antigénicas, al ser reconocidos por inmunoglobulinas del tipo G. A pesar del reconocimiento de la proteína AM592 por IgG2, los resultados de este proyecto no permiten concluir su papel como antígeno inmunoprotector. Para ello, se requiere determinar aún el tipo de citocinas que están señalizando de acuerdo a las respuestas Th1 o Th2.

## 9. Conclusiones

La proteína AM592 se logró purificar por medio de cromatografía de afinidad con un rendimiento de aproximadamente 0.86 mg/L, obteniendo una fracción de elución en donde sólo se obtiene una banda con un peso aproximado de 23.3 KDa en los geles SDS-PAGE.

Los ensayos de inmunodetección por Western blot con la proteína AM592, y utilizando el suero del bovino 135 (bovino hiperinmunizado) señalan que la AM592 es reconocida por IgG1 e IgG2, demostrando su potencial antigénico, sin descartar su posible potencial inmunogénico.

Los péptidos de las proteínas de MSP1a y MSP5 por medio de los ensayos iELISA sólo demostraron su potencial antigénico al ser reconocidos por IgG1 en diferentes sueros de bovinos muestreados, de los cuales se pueden encontrar animales infectados de forma natural o experimentalmente con *A. marginale*.

Como parte de los experimentos para demostrar el papel como antígeno inmunoprotector de la proteína AM592, se estandarizó la extracción y purificación de linfocitos bovinos a partir de muestras de sangre por medio de gradientes de densidad con Ficoll, obteniendo células suficientes para realizar los ensayos de linfoproliferación, además de que se ha logrado cultivar estas células hasta por 72 horas.

Aún con los esfuerzos realizados en los laboratorios de Anaplasmosis (CENID-PAVET / INIFAP) y de Estudios Ecogenómicos (CEIB / UAEM), el ensayo para evaluar la inmunogenicidad tanto de los péptidos como de la proteína aún se encuentra en proceso de finalizar. Una vez que los linfocitos T de bovino que ya hayan entrado en contacto con antígenos de *A. marginale*, reconozcan a la proteína AM592 y la población de citocinas producidas por estas células sea determinado por citometría de flujo, se podrá concluir el papel como antígeno inmunoprotector de esta proteína, así como del posible tipo de respuesta que pueda montar *in vivo*.

## 10. Perspectivas

Una vez que la proteína AM592 se ha logrado purificar, identificar si esta proteína efectivamente se encuentra expuesta, es clave para su reconocimiento por el sistema inmune de hospedero, por esto, generar anticuerpos contra la proteína AM592 en modelos como conejos o ratones, permitiría tener un panorama más amplio sobre la naturaleza de la proteína.

A su vez, el desafío con diferentes cepas de *A. marginale* en animales inmunizados con esta proteína, nos permitiría saber qué tipo de respuesta inmune se puede desarrollar *in vivo*, ya sea tipo Th1 o Th2, además de que nos proporcionaría información sobre qué tan conservada se encuentra esta proteína con cepas de diferentes zonas geográficas de México.

Utilizando los péptidos sintéticos de MSP1a y MSP5 se podría estandarizar una prueba de diagnóstico serológico para detectar si el bovino se encuentra infectado con *A. marginale*, debido a que ambos péptidos demostraron tener potencial antigénico con diferentes muestras de bovinos.

Asimismo, se podría generar un arreglo de un MAP utilizando los epítomos de la proteína AM592, así como de otras proteínas (OMPs o MSPs), lo cual sería de gran ayuda como parte del desarrollo de nuevos candidatos vacúnales.

## 10. Anexo 1

**Tabla 5. Información con respecto a los sueros utilizados en los ensayos 1 y 2**

Resultados obtenidos en los ensayos iELISA utilizando MSP1a y MSP5 como antígeno, así como información de la procedencia, fecha de colección y características de cada suero.

Muestra	Fecha	Procedencia	MSP1a	MSP5	Característica
9953	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR positivo para <i>A. marginale</i>
9931	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR negativo para <i>A. marginale</i>
9919	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	-	-	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
9916	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR negativo para <i>A. marginale</i>
9912	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
9911	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
9899	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
9887	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR negativo para <i>A. marginale</i>
9511	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	-	-	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
6964	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
6959	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR positivo para <i>A. marginale</i>
6959	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR positivo para <i>A. marginale</i>
6959	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
6810	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
6802	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR positivo para <i>A. marginale</i>
6760	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR negativo para <i>A. marginale</i>
6751	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	-	-	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
6750	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR positivo para <i>A. marginale</i>
6749.2	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	-	-	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
6749.1	30/08/17	Tapalpa, Jalisco	P	P	PCR negativo para <i>A. marginale</i>
5805	04/04/18	R. "La lagunita"	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
5804	03/04/18	R. "El salitre"	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
4705	04/04/18	R. "La lagunita"	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
4701	27/09/13	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
4694	22/06/13	Unidad de anaplasmosis	N	P	Infectado de forma experimental
4232	20/07/13	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
4228	14/08/13	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
3043	03/04/18	R. "El salitre"	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
2902	03/04/18	R. "El salitre"	N	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
1937	05/04/18	Centro de acopio	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
1783	19/08/13	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
1775	24/06/13	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
1756	19/07/13	Unidad de anaplasmosis	N	N	Infectado de forma experimental
1756	06/08/13	Unidad de anaplasmosis	N	P	Infectado de forma experimental
135	18/11/03	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
135	18/10/04	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
135	29/10/04	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
125	04/04/18	R. "La lagunita"	P	P	Infectado o no de manera natural a <i>A. marginale</i>
27	07/03/12	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental
27	09/10/13	Unidad de anaplasmosis	P	P	Infectado de forma experimental

## 11. Anexo 2

### Soluciones para SDS-PAGE

**Solución Laemmli 2X** (65.8 mM Tris-Cl; pH: 6.8, 20% Glicerol, 0.05% 2-Mercaptoetanol, 4% SDS-10%, 0.04% Azul de bromofenol)

- Tris-HCL 1 M; pH:6.8 : 1.25 mL
- Glicerol: 2 mL
- 2-Mercaptoetanol: 0.5 mL
- SDS (10%): 1 mL
- Azul de bromofenol: 4 mg
- H<sub>2</sub>O M.Q: aforar a 10 mL

**Solución poliacrilamida** (30% Acrilamida, 0.8% Bis acrilamida)

- Acrilamida: 30 g
- Bis Acrilamida: 0.8 g de
- H<sub>2</sub>O M.Q.: aforar a 100 mL, filtrar y almacenar a 4°C

**Gel concentrador** (70% H<sub>2</sub>O, 16.6% solución poliacrilamida, 12.6% 1 M Tris; pH 6.8, 1% SDS (10%), 1% APS (10%), 0.1% TEMED)

- H<sub>2</sub>O M.Q: 2.1 mL
- Solución poliacrilamida: 0.5 mL
- 1 M Tris; pH 6.8: 0.38 mL
- 10% SDS (10%): 30 µL
- 10% APS (10%): 30 µL
- TEMED: 3 µL

**Gel separador al 12%** (34% H<sub>2</sub>O, 40% solución poliacrilamida, 26% 1.5 M Tris; pH 8.8, 1% APS, 1% SDS, 0.04% TEMED)

- H<sub>2</sub>O M.Q: 1.7 mL

- Solución poliacrilamida: 2 mL
- 1.5 M Tris; pH 8.8: 1.3 mL
- 10% SDS (10%): 50  $\mu$ L
- 10% APS (10%): 50  $\mu$ L
- TEMED: 2  $\mu$ L

**Buffer de corrida 10X** (3%Tris Base, 14.4% Glicina, 10% SDS)

\*Disolver en 800 mL de agua destilada

- Tris Base: 30 g
- Glicina: 144 g
- SDS: 10 g
- Ajustar pH a 8.3
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 1000 mL

**Buffer de corrida 1X**

- Buffer de corrida 10X: 100 mL
- H<sub>2</sub>O destilada: 900 mL

**Solución de tinción** (0.2% Coomassie brilliant blue, 50% Metanol, 10% ácido acético)

- Coomassie brilliant blue (R-250): 200 mg
- Metanol: 50 mL
- Ácido Acético: 10 mL
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 100 mL

**Solución para desteñir** (40% Metanol, 10% ácido acético,)

- Metanol: 40 mL
- Ácido Acético: 10 mL
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 100 mL

**Soluciones para Western blot**

**Buffer de transferencia 10X** (3.03% Tris, 14.4% glicina)

\*Disolver en 800 mL de agua destilada

- Tris base: 30.3 g
- Glicina: 144 g
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 1 L

**Buffer de transferencia 1X**

- 100 mL buffer de transferencia 10X
- 200 mL metanol
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 1 L

**Buffer PBS 10X** (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)

\*Disolver en 800 mL de agua destilada

- Cloruro de sodio (NaCl): 80 g
- Cloruro de potasio (KCl): 2 g
- Fosfato de disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 14.4 g
- Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 2.4 g
- Ajustar a pH 7.4
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 1 L
- Esterilizar por autoclave

**Buffer PBS 1X** (0.08% NaCl, 0.002% KCl, 0.0144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0024% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)

- 100 mL buffer PBS 10X
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 1 L

**Solución de bloqueo** (PBS 1x - 3% leche)

- Leche descremada en polvo (SVELTY, Nestle.): 600 µg
- PBS 1X: aforar a 20 mL

### **Solución de lavado (PBS 1X - 0.05% Tween20)**

- Tween20: 10  $\mu$ L

PBS 1X: aforar a 20 mL

### **Soluciones para la purificación de proteínas bajo condiciones desnaturalizantes**

#### **Buffer B:** (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 8)

\*Disolver en 70 mL de agua destilada

- Fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 1.38 g
- Tris-Cl: 0.12 g
- Urea: 48.05 g
- Ajustar pH a 8
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 100 mL

#### **Buffer C:** (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 6.3)

\*Disolver en 70 mL de agua destilada

- Fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 1.38 g
- Tris-Cl: 0.12 g
- Urea: 48.05 g
- Ajustar pH a 6.3
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 100 mL

#### **Buffer D:** (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 5.9)

\*Disolver en 70 mL de agua destilada

- Fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 1.38 g
- Tris-Cl: 0.12 g
- Urea: 48.05 g
- Ajustar pH a 5.9
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 100 mL

**Buffer E:** (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 4.5)

\*Disolver en 70 mL de agua destilada

- Fosfato de sodio monobasico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 1.38 g
- Tris-Cl: 0.12 g
- Urea: 48.05 g
- Ajustar pH a 4.5
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 100 mL
- 

**Buffers de lavado:** (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 7.2)

\*Disolver en 70 mL de agua destilada

- Fosfato de sodio monobasico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 1.38 g
- Tris-Cl: 0.12 g
- Urea: 48.05 g
- Ajustar pH a 7.2
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 100 mL

**Buffers de lavado:** (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea; pH 6.8)

\*Disolver en 70 mL de agua destilada

- Fosfato de sodio monobasico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 1.38 g
- Tris-Cl: 0.12 g
- Urea: 48.05 g
- Ajustar pH a 6.8
- H<sub>2</sub>O destilada: aforar a 100 mL

## **Soluciones para ensayos iELISA**

**Solución amortiguadora de carbohidratos SAC:** (0.318% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.588% NaHCO<sub>2</sub>; pH 9.6)

\*Disolver en 800 mL de agua destilada

- Bicarbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ): 3.18 g
- Carbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_2$ ): 5.88 g
- Ajustar pH a 9.6
- $\text{H}_2\text{O}$  destilada: aforar a 1 L

**Solución de bloqueo:** (PBS 1x - 7% leche)

- Leche descremada en polvo (SVELTY, Nestle.): 1.4 g
- PBS 1X: aforar a 20 mL

**Solución Tris:** (100 mM; pH 9.5)

\* Disolver en 800 mL de agua destilada

- Tris base: 12.114 g
- Ajustar pH a 9.5
- $\text{H}_2\text{O}$  destilada: aforar a 1 L

**Solución de sustrato:** (solución Tris 100mM; pH 9.5 - 0.075% p-nitrofenilfosfato)

- p-nitrofenilfosfato (SIGAMA-ALDRICH): 15 mg
- Solución Tris 100mM: 20 mL

**Soluciones extracción y purificación de linfocitos**

**Solución Alsever:** (2.05% dextrosa, 0.42% NaCl, 0.8%  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )

\*Disolver en 800 mL de agua destilada

- Dextrosa: 20.5 g
- Cloruro de sodio (NaCl): 4.2 g
- Citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ): 8 g
- $\text{H}_2\text{O}$  destilada: aforar a 1 L
- Filtrar y esterilizar en autoclave

## 12. Referencias

- Alleman, A. R. and Barbet, A. F. (1996) 'Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen.', *Journal of clinical microbiology*, 34(2), pp. 270–276.
- Amaro Estrada, I. *et al.* (2014) 'Transmisión de la anaplasmosis bovina'.
- Aubry, P. and Geale, D. W. (2011) 'A review of Bovine anaplasmosis', *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(1), pp. 1–30. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x.
- Bannwarth, M. and Schulz, G. E. (2003) 'The expression of outer membrane proteins for crystallization', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1610(1), pp. 37–45. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00711-3.
- Barigye, R. *et al.* (2004) 'Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas mexicanas de *Anaplasma marginale* Técnica Pecuaria en México Instituto Nacional de Investigaciones Forestales , Agrícolas y Pecuarias', (January).
- Bell-Sakyi, L. *et al.* (2015) 'Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines', *Veterinary Microbiology*, 179(3–4), pp. 270–276. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.008.
- Bertha, G. and Robledo, V. (2009) 'Antígenos e inmunógenos', *Medigraphic*, 52(1), pp. 41–42.
- 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 of the United States of America*, 102(3), pp. 844–849. doi: 10.1073/pnas.0406656102.
- Brown, W. C., Palmer, G. U. Y. H. and Lewin, H. A. (2001) 'CD4  $\alpha$  T Lymphocytes from Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 ( MSP1 ), a Heteromeric Complex of MSP1a and MSP1b , Preferentially Recognize the MSP1a Carboxyl Terminus That Is Conserved among Strains', 69(11), pp. 6853–6862. doi: 10.1128/IAI.69.11.6853.
- Van der Burg, S. H. *et al.* (2006) 'Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(8), pp. 916–930. doi: 10.1016/j.addr.2005.11.003.

- Calderon-Gonçalves, R. *et al.* (2005) 'Anaplasmosse neonatal em bezerro', *Veterinária Notícias, Uberlândia*, 11(1), pp. 95–98.
- Calderón, R. V. (2007) 'Inmunología', *Instituto de Biotecnología UNAM*, p. 54.
- Cangussu, A. S. R. *et al.* (2018) 'A hybrid protein containing MSP1a repeats and Omp7, Omp8 and Omp9 epitopes protect immunized BALB/c mice against anaplasmosis', *Veterinary Research*. BioMed Central, 49(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13567-018-0503-4.
- Cano-Tavira, B. B. (2014) *Caracterización del gen am592 en aislados mexicanos de anaplasma marginale, con respecto de su variabilidad y potencial inmunogénico.*
- Carreño, A. D. *et al.* (2007) 'In vivo Endothelial Cell Infection by *Anaplasma marginale*', *Veterinary Pathology*, 44(1), pp. 116–118. doi: 10.1354/vp.44-1-116.
- Cooke, R. F. (2010) 'Beef Cattle Library', (June), pp. 1–5.
- Corona, B., Rodríguez, M. and Martínez, S. (2012) 'Anaplasmosis bovina (bovine anaplasmosis)', *Manual de la OIE sobre animales terrestres*, VI(Anaplasmosis bovina), pp. 655–667. Available at: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.3.07\\_Anaplasmosis\\_bovina.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.07_Anaplasmosis_bovina.pdf).
- Deringer, J. R. *et al.* (2017) 'Identification of a T-Cell Epitope That Is Globally Conserved among Outer Membrane Proteins (OMPs) OMP7, OMP8, and OMP9 of *Anaplasma marginale* Strains and with OMP7 from the *A. marginale* subsp. *centrale* Vaccine Strain', *Clinical and Vaccine Immunology*, 24(1), pp. 1–12.
- Dumler, J. S. *et al.* (2001) 'Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia with neorickettsia, description of six new species combinations and designatio', *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(2001), pp. 2145–2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145.
- Eriks, I. S., Stiller, D. and Palmer, G. H. (1993) 'Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission', *Journal of Clinical Microbiology*, 31(8), pp. 2091–2096.
- García-Ortiz, M. *et al.* (1999) '*Anaplasma marginale* : diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos', pp. 1–6.
- Green, E. R. and Mecsas, J. (2015) 'Bacterial Secretion Systems – An overview',

*American society for Microbiology*, 4(1), pp. 1–32. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.Bacterial.

- Grisshammer, R. (2006) 'Understanding recombinant expression of membrane proteins', *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), pp. 337–340. doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.001.
- Hairgrove, T. and Hammack, S. (1914) 'Basics of Cattle Immunity', *AgriLIFE EXTENSION*, p. 2.
- Hancock, D. C. and O'Reilly, N. . (2005) 'Synthetic peptides as antigens for antibody production.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 295, pp. 13–26. doi: 10.1385/1592598730.
- Houen, G. (2015) *Peptide Antibodies, Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-4939-2999-3.
- Jaramillo-Ortiz, J. M. *et al.* (2018) 'Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant spike protein', *BMC Veterinary Research*, 14(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12917-018-1570-5.
- Jiménez-Ocampo, R. *et al.* (2008) 'Anaplasma marginale: análisis de las secuencias del fragmento variable del gen msp1  $\alpha$  y del gen msp4 de cuatro nuevas cepas mexicanas', *Téc Pecu Mex*, 46(1), pp. 69–78.
- Junior, D. S. *et al.* (2010) 'Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of Anaplasma marginale.', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(7), pp. 843–9. doi: 10.1590/S0074-02762010000700001.
- Knowles, D. *et al.* (1996) 'Antibody against an Anaplasma marginale MSP5 Epitope Common to Tick and Erythrocyte Stages Identifies Persistently Infected Cattle', 34(9), pp. 2225–2230.
- Kocan, K. M. *et al.* (2003) 'Antigens and Alternatives for Control of Anaplasma marginale Infection in Cattle 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(7), pp. S285–S300. 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.
  - Kowalczyk, W. *et al.* (2011) 'Synthesis of multiple antigenic peptides (MAPs)-strategies and limitations', *Journal of Peptide Science*, 17(4), pp. 247–251. doi: 10.1002/psc.1310.
  - Lew-tabor, A. (2017) *Anaplasmosis, MSD MANUAL*.
  - Liu, Y. *et al.* (2012) 'DEVELOPMENT OF AN ELISA USING RECOMBINANT OMPA PROTEIN FOR THE DETECTION OF *Pasteurella multocida* INFECTIONS IN RABBITS', pp. 1219–1223.
  - López, M. *et al.* (2004) *Vacunas de nueva generación*.
  - Moisa, A. A. and Kolesanova, E. F. (2009) *Synthetic Peptide Vaccines*.
  - Montero, S. H. (1992) 'Distribution, economic importance and control measures for anaplasmosis and babesiosis in South America', in, p. 13.
  - Munodzana, D. *et al.* (1998) 'Conformational Dependence of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 5 Surface-Exposed B-Cell Epitopes †', 66(6), pp. 2619–2624.
  - Nascimento, I. P. and Leite, L. C. C. (2012) 'Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), pp. 1102–1111. doi: 10.1590/S0100-879X2012007500142.
  - Noh, S. M. *et al.* (2008) 'Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization', *Infection and Immunity*, 76(5), pp. 2219–2226. doi: 10.1128/IAI.00008-08.
  - Ocampo Espinoza, V. *et al.* (2006) '*Anaplasma marginale*: Lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4', *Veterinary Microbiology*, 114(1–2), pp. 34–40. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.058.
  - Ocampo, R. J. *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. doi: 10.22319/RMCPV%730.
  - Palmer, G. H. *et al.* (1994) 'The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family', *Infection and Immunity*, 62(9), pp. 3808–3816.
  - Palmer, G. H. *et al.* (2004) 'Stochastic transmission of multiple genotypically distinct

Anaplasma marginale strains in a herd with high prevalence of Anaplasma infection', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), pp. 5381–5384. doi: 10.1128/JCM.42.11.5381-5384.2004.

- Palmer, G. H. and Brayton, K. A. (2007) 'Gene conversion is a convergent strategy for pathogen antigenic variation', *Trends in Parasitology*, 23(9), pp. 408–413. doi: 10.1016/j.pt.2007.07.008.
- Pfister, K. *et al.* (2015) 'THE IMMUNE RESPONSE TO LIVE VACCINES'.
- Pineda Gutiérrez, J. E. (2016) *Tesis*. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Quiroz-Castañeda, R. E., Amaro-Estrada, I. and Rodríguez-Camarillo, S. D. (2016) 'Anaplasma marginale: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach', *BioMed Research International*, 2016. doi: 10.1155/2016/9032085.
- Ristic, M. and McIntyre, I. (1981) 'Diseases of Cattle in the Tropics.', *Curr. Topics Vet. Med*, 6, pp. 1983–1984.
- Rodríguez Calderón, D. M. (2012) *Caracterización inmunológica de péptidos sintéticos de proteínas de superficie de Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Universidad Nacional de Colombia. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/136/7/2348.abstract>.
- Rodríguez Camarillo, S. D. *et al.* (2003) 'Inmunología e inmunoprolifaxis de la anaplasmosis bovina', pp. 123–164.
- Rodríguez, S. D., García-Ortiz, M. A., *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.
- Rodríguez, S. D., García Ortiz, M. A., *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.
- Santos, P. S. *et al.* (2013) 'Epitope-Based Vaccines with the Anaplasma marginale MSP1a Functional Motif Induce a Balanced Humoral and Cellular Immune Response in Mice', *PLoS ONE*, 8(4), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0060311.
- Srivastava, T. and Sinha, S. (2006) *Immunology*.
- Sun, D. *et al.* (2013) 'Identification of a 43-kDa outer membrane protein of Fusobacterium necrophorum that exhibits similarity with pore-forming proteins of other

Fusobacterium species', *Research in Veterinary Science*, 95(1), pp. 27–33. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.01.016.

- Suttén, E. L. *et al.* (2010) 'Anaplasma marginale type IV secretion system proteins VirB2, VirB7, VirB11, and VirD4 are immunogenic components of a protective bacterial membrane vaccine', *Infection and Immunity*, 78(3), pp. 1314–1325. doi: 10.1128/IAI.01207-09.
- Tapia Uriza, T. R. (2018) *Evaluación antigénica de la proteína recombinante MSP5 y del péptido sintético de MSP5 para la detección de anticuerpos contra la anaplasmosis bovina a través de inmunoensayos indirectos ( iELISA )*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- 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. doi: 0095-1137/98/\$04.00+0.
- Valencia Mujica, C. M. (2018) *Evaluación del potencial antigénico de la proteína recombinante y un péptido sintético de MSP1a para el diagnóstico de Anaplasma marginale*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Vega y Murguía, C. A. *et al.* (2010) *Como evitar las pérdidas por la anaplasmosis bovina*.
- Vidotto, M. C. *et al.* (1994) 'Intermolecular Relationships of Major Surface Proteins of Anaplasma marginale', 62(7), pp. 2940–2946.
- Viseshakul, N. *et al.* (2000) 'Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia Anaplasma marginale.', *Department of Pathobiology, University of Florida*, PO Box 110, pp. 45–53.
- Whitlock, B. (2017) *A study to determine the prevalence and economic impact of anaplasmosis in beef herds in the united states*. Available at: <https://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpages/0232569-a-study-to-determine-the-prevalence-and-economic-impact-of-anaplasmosis-in-beef-herds-in-the-united-states.html>.
- Zhao, L. *et al.* (2014) 'Nanoparticle vaccines', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 32(3), pp. 327–337. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.069.

- Zhao, L. *et al.* (2016) 'Immunogenicity of outer membrane proteins VirB9-1 and VirB9-2, a Novel nanovaccine against *Anaplasma marginale*', *PLoS ONE*, 11(4). doi: 10.1371/journal.pone.0154295.



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 8 de Mayo de 2019

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal)  
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda (Co Tutor)  
Dra. Itzel Amaro Estrada  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

**Tesis:** "EVALUACIÓN INMUNOGÉNICA DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE *Anaplasma marginale*

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRES SAUL BECERRO CARRILLO**

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. EDGAR DANTAN GONZALEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 8 de Mayo de 2014

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal)  
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda (Co Tutor)  
Dra. Itzel Amaro Estrada  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Tesis: "EVALUACIÓN INMUNOGÉNICA DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE  
*Anaplasma marginale*

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRES SAUL BECERRO CARRILLO**

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. ROSA ESTELA QUIROZ CASTAÑEDA



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 8 de Mayo de 2019

### CÓMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal)  
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda (Co Tutor)  
Dra. Itzel Amaro Estrada  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

**Tesis:** "EVALUACIÓN INMUNOGÉNICA DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE  
*Anaplasma marginale*

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRES SAUL BECERRO CARRILLO**

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 8 de Mayo de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal)  
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda (Co Tutor)  
Dra. Itzel Amaro Estrada  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Tesis: "EVALUACIÓN INMUNOGENICA DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE  
*Anaplasma marginale*

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRES SAUL BECERRO CARRILLO**

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 8 de Mayo de 2019

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal)  
Dra. Rosa Estela Quiroz Castañeda (Co Tutor)  
Dra. Itzel Amaro Estrada  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dra. María del Rayo Sánchez Carbente

Tesis: "EVALUACIÓN INMUNOGÉNICA DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DE SUPERFICIE DE  
*Anaplasma marginale*

Alumno que la presenta a revisión: **ANDRES SAUL BECERRO CARRILLO**

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. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ