

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA  
PROTEÍNA Am28 DE *Anaplasma marginale*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA  
AURORA HIDALGO CASTILLO.

TUTOR  
DR. SERGIO D. RODRÍGUEZ CAMARILLO.

COMITÉ TUTORAL  
DR. ROGELIO ALONSO MORALES.  
DR. JULIO V. FIGUEROA MILLÁN.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

Le dedico este escrito a Damián, por ser mi amuleto.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto CONACYT para la realización de este trabajo, así como a la Fac. MVZ UNAM.

Le agradezco al Dr. Sergio Rodríguez por permitirme ser su alumna, por su apoyo, comentarios y su amistad. Al igual agradezco a su familia por hacerme pasar buenos momentos durante mi estancia en el Estado de Morelos.

Al Dr. Julio Figueroa y al Dr. Rogelio Alonso por los comentarios y sugerencias durante los tutorales.

Al Dr. Juan Mosqueda por preocuparse por mí y en mis avances en el laboratorio, por su confianza, su amistad y los buenos ratos.

A los doctores de la Unidad de Anaplasma en el CENID-PAVET (Dr. Miguel Garcia, Dr. Edmundo Rojas y Dr. Francisco Preciado), por su apoyo en las tomas de muestras, por su confianza, sus chascarrillos y la sonrisa amable de todos los días.

A mis padres y hermanos que aún en la distancia siempre me han apoyado.

A mis amigos.

A Gina por ser una clave en este trabajo, al apoyarme en el laboratorio y en ratos difíciles, su confianza, su amistad y un montón de cosas. ¡Te las seguire debiendo!

A Gabi chiapas por las risas y los malos ratos, tu amistad es única.

A Vichido por preocuparse por mí, su amistad sincera y su aportación para las risas.

A todos mis demás compañeros del CENID (Gabi Granjeno, Diego y Mela) por su amabilidad, comentarios tan acertados y las risas.

Luis no podía quedarse atrás, ya que su apoyo en el laboratorio, su compañía en los momentos buenos y otros no tan buenos y su amor permitieron terminar con este ciclo.

Y por último a la mirada interrogativa, aquella sonrisa y a las carcajadas de Damián. ☺

## Índice general.

Contenido.	Pag.
<b>I INTRODUCCIÓN.</b> .....	1
<b>II REVISIÓN DE LA LITERATURA.</b> .....	3
2.1. Características de la Familia <i>Anaplasmataceae</i> .....	3
2.2. Taxonomía de <i>Anaplasma marginale</i> .....	4
2.3. Epidemiología.....	5
2.4. Transmisión.....	5
2-5. Respuesta inmune .....	6
2.6. Vacunación.....	6
2.7. Proteínas descritas en <i>Anaplasma marginale</i> .....	7
2.8. Caracterización de proteínas por geles de doble dimensión	9
2.9. Justificación.....	11
2.10. Objetivos .....	11
<b>III METODOLOGÍA.</b> .....	12
3.1. Purificación de cuerpos iniciales de <i>Anaplasma marginale</i> ....	12
3.1.1 Extracción de cuerpos iniciales de <i>Anaplasma marginale</i> .12	
3.1.2. Gradiente de Percoll. ....	13
3.1.3. Gradiente de sacarosa.....	13
3.1.4. Mini ensayo de Cuantificación de proteína por el Método de Bradford.. ....	13
3.2. Identificación de proteínas de <i>Anaplasma marginale</i> .....	14
3.2.1. Electroforesis. ....	14
3.2.2. Extracción de proteínas hidrofóbicas. ....	15
3.2.3. Tinción de Coomassie.....	15
3.2.4. Tinción Coloidal de Coomassie.....	16
3.2.5. Electrotransferencia. ....	16
3.3. Purificación de IgG2. ....	17
3.3.1. Purificación de IgG2 por intercambio iónico.....	17
3.3.2. Técnica de ELISA .....	17
3.3.3. Inmunoelectrotransferencia con IgG2 purificada.....	18

<b>IV RESULTADOS..</b> .....	19
4.1. Purificación de cuerpos iniciales de <i>Anaplasma marginale</i> ...	19
4.1.1. Gradiente de Percoll y de Sacarosa.....	19
4.1.2. Frotis de CI por los gradientes de Percoll y Sacarosa. ..	19
4.2. Identificación de proteínas de <i>Anaplasma marginale</i> . .....	19
4.2.1. Electroforesis. ....	19
4.3. Purificación de IgG2 .....	20
4.3.1. Purificación de IgG2 por intercambio iónico.....	20
4.3.2. Electroforesis de IgG2 .....	20
4.3.3. Técnica de ELISA. ....	20
4.4. Geles en doble dimensión e inmunoelectrotransferencia.....	20
4.4.1. Inmunoelectrotransferencia.....	20
4.4.2. Inmunoelectrotransferencia con IgG2 purificada.....	21
4.4.3. Electroforesis en doble dimensión de 10X7. ....	21
4.4.4. Inmunoelectrotransferencia en doble dimensión 10X7	21
4.4.5. Electroforesis en doble dimensión 14X12. ....	22
4.4.6. Inmunoelectrotransferencia en doble dimensión 14X12.	22
<b>V DISCUSIÓN.</b> .....	23
<b>VI REFERENCIA.</b> .....	27
<b>VII ANEXOS.</b> .....	31

## Lista de figuras.

Figura 1. Gradiente de Percoll y Gradiente de Sacarosa.

Figura 2. Frotis de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale* a partir de un gradiente de Percoll y de un gradiente de Sacarosa.

Figura 3. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida al 12.5% de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale*.

Figura 4. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida al 12.5% mostrando la IgG2 purificada.

Figura 5. Inmunoelectrotransferencia de Cuerpos Iniciales de *Anaplasma marginale*.

Figura 6. Inmunoelectrotransferencia de CI de *Anaplasma marginale*.

Figura 7. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en 2 dimensiones de Proteínas de *Anaplasma marginale* teñido con Coomassie.

Figura 8. Inmunoelectrotransferencia en 2-D pH 3-10 de proteínas precipitadas de CI de *Anaplasma marginale*, revelando con IgG2 purificada.

Figura 9. Gel de doble dimensión de proteínas precipitadas de CI de *Anaplasma marginale* de 14X12cm.

Figura 10. Inmunoelectrotransferencia en doble dimensión de proteína precipitada de *A. marginale* contra IgG2 previamente purificada.

Grafica 1. Purificación de IgG2 a partir de suero de bovino por Cromatografía de intercambio iónico.

Tabla 1. Valores de títulos de la fase retenida e IgG2 purificada a partir de un suero hiperinmune contra *Anaplasma marginale*.

## Resumen

La anaplasmosis es causada por *Anaplasma marginale*, especie del género *Anaplasma* (Rickettsiales: Anaplasmataceae).. La garrapata es su vector biológico de *A. marginale* pero el patógeno después es transmitido mecánicamente a ganado susceptible por moscas contaminadas en sus bocas por sangre contaminada o por fomites. Este organismo es intracelular obligado. Tanto ganado y garrapatas se encuentran infectados de manera persistente con *A. marginale* y funcionan como reservorio de la infección. La enfermedad clínica se observa por disminución de peso, aborto y muerte. Estudios con bovinos apoyan la inducción de respuesta inmune tipo Th1 CD4, proliferación de linfocitos T, interferon gamma ( $IFN\gamma$ ) y anticuerpos del tipo inmunoglobulina G2 (IgG2) que actúan directamente sobre la superficie del patógeno. En este trabajo se identifican proteínas a partir de cuerpos iniciales en electroforesis 2-D e inmunoelectrotransferencia. En electroforesis 2-D se observan 42 proteínas y en inmunoelectrotransferencia 32 proteínas reconocidas por IgG2.

## **Abstract.**

Bovine anaplasmosis is caused by *Anaplasma marginale*, the type species of the genus *Anaplasma* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). Ticks are biological vectors of *A. marginale* but the pathogen is often transmitted mechanically to susceptible cattle by blood-contaminated mouthparts of biting flies or fomites. These obligate intracellular organisms. Clinical disease weight loss, abortion, and death can occur Both cattle and ticks become persistently infected with *A. marginale* and thus serve as reservoirs of infection. Studies with both bovine support the induction of a type 1 immune response leading to antigen-specific CD4, T-lymphocyte proliferation, gamma interferon (IFN $\gamma$ ) production, and immunoglobulin G2 (IgG2) antibody directed against the pathogen surface as being necessary for protection. In this work is show proteins to from of initial body, in 2D electrophoresis and immunoblotting. In electrophoresis are 42 and immunoblotting 32 proteins identified wiht IgG2.

## I- INTRODUCCIÓN.

La anaplasmosis bovina es una enfermedad que se caracteriza por ser infecciosa no contagiosa, su agente causal es la rickettsia *Anaplasma marginale* (Am). Esta enfermedad es de mucha importancia en la ganadería debido a las pérdidas económicas en zonas subtropicales y tropicales, principalmente por la disminución en la producción de leche y muerte de los bovinos. Su transmisión biológica es a través de algunas garrapatas y su transmisión mecánica se basa por la utilización de utensilios contaminados y se asume que también por moscas hematófagas.

*Anaplasma marginale* fue reportada en 1910 por Theiler, quien identificó a la rickettsia dentro de los eritrocitos y en 1911 la diferenció de *Anaplasma centrale*, estando *marginale* en el margen y *centrale* en el centro, como su propio nombre nos lo indica.

Entre los signos de esta enfermedad se presenta anemia, pérdida de peso, disminución en la producción de leche, ictericia, fiebre, aborto y la muerte en animales no tratados (Kuttler et al., 1984). Los animales que se logran recuperar de la enfermedad aguda fungen como reservorios del agente, el que circula en la sangre en mínimas cantidades y que nos detectables por microscopio en frotis, lo cual ocasiona que animales susceptibles puedan infectarse en un futuro. (Dickmans, 1950; Ewing 1981.)

Para el control de la anaplasmosis se ha propuesto la vacunación, sin embargo aún no existe una vacuna eficaz que mitigue los signos de esta enfermedad. Una alternativa es usar una vacuna teniendo como base proteínas de membrana pero hasta el momento se tiene solamente el estudio de solo 5 proteínas del complejo principal de superficie, conocidas como las MSP's por sus siglas en ingles "Major Surface Proteins" pero aún quedan muchas proteínas por identificarse. Entre las proteínas que se conocen tenemos la MSP1a y MSP1b, ambas conforman una proteína que esta implicada en la adhesión ya que MSP1a se adhiere hacia la membrana de eritrocitos de bovino, como en células del intestino de garrapata y MSP1b solo hacia la membrana de eritrocito bovino. MSP2 y MSP3, se encuentran en gran abundancia y pertenecen a familias multigénicas, ambas le dan variabilidad antigénica al recombinarse entre ellas. MSP4 y MSP5, se utilizan para fines

filogenético y/o diagnóstico. Aunque se tienen más proteínas identificadas, no se conocen mucho de ellas, por ejemplo en nuestro laboratorio se han identificado 6 proteínas y se tiene como objetivo su estudio y su futura aplicación como posibles candidatas a formar parte de una vacuna.

## II REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1. Características de la Familia Anaplasmataceae.

Bacteria Gram-negativa, a menudo pleomórfica cocoide a elipsoidal que reside dentro de vacuolas citoplásmicas, solo y más a menudo en inclusiones compactas (morulas) presente en células hematopoyéticas maduras e inmaduras, particularmente células mieloides, neutrófilos y eritrocitos, en sangre periférica o en tejido, usualmente órganos fagocítico mononuclear (bazo, hígado, médula ósea) de huéspedes mamíferos. Por ultraestructura, se observan dos formas morfológicas, incluyendo células reticulares largas y formas pequeñas con protoplasma condensado llamado corazón denso (Popov 1998). Su vector son garrapatas. Las bacterias no son motiles. No se cultivan en medio libre o embrión de pollo. Algunas especies son cultivadas en neutrófilos, en línea de células mielomonocítica, promielocítica, eritrocitos y células de garrapata. Las diferentes especies de Anaplasma son agentes etiológicos de enfermedades en perros y otros caninos, humanos y rumiantes como bovino, cabra, oveja y llama. Patógeno variable o de infecciones no patógenas en algunos rumiantes como bovino, cabra, oveja y ciervos, caballos y roedores. En lo que respecta al contenido ADN, se tiene estimado que de G + C varia entre 30 y 56 % aproximadamente (Dumler et al., 2001).

## 2.2. Taxonomía de *Anaplasma marginale*.

Reino	Bacteria
Dominio	Bacteria
Phylum (división)	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rickettsiales
Familia	Anaplasmataceae
Genero	<i>Anaplasma</i>
Especie	<i>marginale</i>

(Bergey's 2004).

*Anaplasma marginale* es una rickettsia intracelular obligada que infecta a eritrocitos de bovinos causando la enfermedad conocida como Anaplasmosis bovina que se caracteriza por ser una infección no contagiosa, principalmente de animales susceptibles. Entre los signos de esta enfermedad se caracteriza por anemia progresiva, ictericia, abortos en animales gestantes y muerte, puede presentarse de forma crónica en ausencia de signos clínicos típicos. La enfermedad es más severa en animales mayores de 2 años ya que en los jóvenes se ha encontrado que son más resistentes (Jones et al., 1968).

*Anaplasma marginale* fue reportada en 1910 por Theiler, indicando que el organismo carece de citoplasma y se localiza en la periferia del eritrocito. *Anaplasma marginale* es de tamaño pequeño, esférica, con medidas de 0.2 a 1µm de diámetro (Hugh-Jones y col., 1988) y casi siempre se encuentra dentro de un cuerpo de inclusión que consta aproximadamente de 8 cuerpos iniciales (Theiler 1910). El genoma de *A. marginale* es de 1, 197,687pb, con un contenido de G+C del 49%.

### **2.3. Epidemiología.**

La anaplasmosis en bovinos es común en Sudáfrica, Australia, Rusia, Centroamérica, Sudamérica y Estados Unidos. Su propagación está determinada por la presencia de artrópodos vectores y la incidencia de la enfermedad se debe particularmente a la introducción de animales susceptibles y la expansión del vector.

La tasa de morbilidad es habitualmente alta en los brotes, pero la mortalidad depende de la susceptibilidad y puede ser del 50 % o más en bovinos recién llegados a los focos de infección.

Los animales jóvenes son relativamente resistentes a la enfermedad, son susceptibles a la infección y se mantienen permanentemente infectados, pero inmunes. Se ha hipotetizado que esta resistencia se debe a la inmunización pasiva por el calostro de la madre al becerro. Este se llega a infectar entre las 4-24 semanas, pero los cambios clínicos y patológicos son leves y breves. Los animales en un ambiente infectado que se hacen seronegativos por cualquier motivo, son totalmente susceptibles a la infección. (Rodríguez et al., 2004).

### **2.4. Transmisión.**

La fuente de infección de *Anaplasma marginale* es siempre la sangre de un animal infectado. El cual puede ser un portador por muchos años o de por vida, pudiendo o no ser detectado la rickettsia en frotis.

La transmisión biológica de *Anaplasma marginale* está dada por especies de garrapatas del género *Boophilus*, *Rhipicephalus*, *Ixodes* y *Dermacentor*. (Sieber 1990; Ristic 1968; Yeruham y Braverman 1981; Zaugg et al., 1986). Aunque en México el principal transmisor es la garrapata *Boophilus microplus* por ser endémica de zonas tropicales y subtropicales (Trappaga et al., 1988).

En la transmisión mecánica se encuentran varios factores, uno de ellos es la participación de moscas hematofagas de establos, tábanos y mosquitos, (Ristic, 1968). Otro de los factores es la utilización de instrumentos contaminados en cirugía, agujas, aretador, entre otros, a esto también se le conoce como transmisión iatrogénica (Dickmans, 1950).

## 2-5. Respuesta inmune

La respuesta humoral hacia *Anaplasma marginale* esta dada por la producción de anticuerpos fijadores del complemento, aglutinantes, precipitantes y opsonizantes, estos aumentando la destrucción del agente causal por parte de los macrófagos.

La respuesta celular del huésped hacia *A. marginale* es través de la producción de IFN- $\gamma$  y este participa en la activación de macrófagos aumentando la capacidad fagocítica y la actividad de células B, originando células plasmáticas que liberan IgG2, la respuesta esta dada por Th1 CD4 simultáneamente a la liberación de IgG2.

## 2.6. Vacunación.

La vacuna contra *A. marginale* utilizando como antígeno *A. centrale* no se ha utilizado en México debido que esta especie no es nativa de nuestro país y el utilizarla podría ocasionar una respuesta desfavorable al ser una cepa exótica.

Otra de las vacunas probadas es con una cepa atenuada con rayos gamma, la cual se inocularon en 2 venados para minimizar su virulencia. El resultado en algunos animales fue positivos, pero en otros fue desde cuadros agudos hasta la muerte, ya que estos resultados depende de la susceptibilidad del huésped, lo que hace que la vacuna sea un control no confiable y por lo cual su uso de discontinuó (Henry et al., 1983). Otro de los ensayos se llevo a cabo en 3 animales, uno de ellos con una cepa virulenta viva, el segundo con una cepa atenuada y el último con una cepa inactivada con un adyuvante oleoso (vacuna Anaplaz<sup>®</sup> Forte Dodge Laboratories, Forte Dodge IA) , los animales con la cepa virulenta y la atenuada mostraron una respuesta asociada a la protección *in vivo*, aunque la cepa inactivada mostró menos descenso en el número de glóbulos rojos (Carson et al., 1977) el único inconveniente de esta vacuna es que provenía de glóbulos rojos y provocaba isoeritrolisis neonatal (Dennis et al., 1970). También hay más reportes de la utilización de vacunas inactivadas, una de ellas es inactivada con saponina Quil-A<sup>®</sup> (Montenegro-James et al., 1991) a una concentración de 1.5mg/ml. Hart y col., en 1991 también probaron la inactivación de *A.m.* en el cual los cuerpos iniciales (CI) fueron purificados a través de un gradiente de densidad con Renografin al 40% e inactivados con glutaraldehído a una concentración 1:100 a 37°C durante 72 hrs, el cual se

ocupo a una concentración de 10-20µg/ml en adyuvante de saponina Quil-A® a una concentración final de 3mg/ml. También el equipo de Rodríguez en el 2000 utilizó una vacuna inactivada utilizando como adyuvante con STDMC (RIBI). Estos últimos 3 trabajos los resultados que muestran son positivos ya que al desafiar con cepas homologas y heterólogas se observo protección en la mayoría de los animales probados.

La vacunación que se lleva a cabo con cepas inactivadas da resultados bastantes positivos, aunque a la vez parciales ya que no se puede extrapolar hacia otros países debido a la variabilidad antigénica con la que cuenta Am, por lo mismo se ha inclinado el estudio de Am hacia encontrar un antígeno que sea eficaz con una protección del 100% en todos los animales. Hasta el día de hoy se tienen 6 proteínas descritas las cuales son MSP1, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5 y Ana 29.

## **2.7. Proteínas descritas en *Anaplasma marginale*.**

**MSP1.** Es una proteína de membrana que esta compuesta por un heterodímero unido de manera no covalente. Ambas proteínas tienen un peso molecular similar que va de 100kDa a 105kDa. Estas proteínas fueron clonadas y expresadas en *E. coli* y se obtuvieron dos genes *msp1a* y *msp1b*, que expresan a su homóloga en proteína (Barbet et al., 1987). Al mismo tiempo se demuestra que MSP1a está codificada por un solo gen *msp1a* y MSP1b es expresada por dos genes *msp1β1* y *msp1β2* (Barbet et al., 1987; Viseshakul et al., 2000; Camacho-Nuez et al., 2000; Bowie et al., 2002). Además MSP1a cuenta con una región variable formada por repeticiones en tándem compuestas por 28 a 29 aminoácidos (Palmer et al., 1987; 1989; Allred et al., 1990; de la Fuente et al., 2001a; 2003a) lo que hace que difiera en su peso molecular en distintas cepas. El gen se conserva y es utilizado como un marcador filogenético. Se ha determinado que estas proteínas fungen como adhesinas, MSP1a hacia la membrana de eritrocitos de bovino, como en células del intestino de garrapata, su dominio de adhesión esta situado en la región extracelular N-terminal que contiene los residuos repetidos (de la Fuente et al., 2003b) y MSP1b solo hacia la membrana de eritrocito bovino (de la Fuente et al. 2001). Esta proteína también se encuentra en las especies *A. centrale*, *A. ovis* y *A. phagocytophilum* (Lew et al., 2002)

**MSP2.** MSP2 es una proteína inmunoprotectora, que se encuentra en la superficie, esta proteína cuenta con un peso molecular de 36 kDa y es codificada por una familia multigénica (*mSP2*) en especies de *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*, ya que en *A. phagocytophylum* es codificada por un solo gen. El hecho de ser expresada por una familia multigénica, le da la característica a la proteína de ser muy variable, todas dentro de un mismo rango de peso molecular, estas variaciones son principalmente en la región variable hidrofóbica (French et al., 1998, Eid et al., 1996). Estas variaciones se deben a que los genes se recombinan entre si, incluso ha mostrado que cuenta con pseudogenes que también participan en la recombinación génica, generando proteínas más complejas, lo que le permite al microorganismo evadir la respuesta inmune, contribuyendo a la persistencia de la infección en el huésped (French et al., 1998; 1999).

**MSP3.** Es una proteína con un peso molecular de 86 kDa, inmunodominante y al igual que MSP2 es codificada por una familia multigénica que le permite evadir la respuesta inmune del huésped; además los genes de *mSP3* se recombinan con los genes de *mSP2* generando proteínas más complejas.

**MSP4.** Cuenta con un peso aproximado de 31kDa, esta proteína es expresada por el gen único conservado *mSP4*. El hecho de ser un gen conservado limita a la proteína a ser igual conservada, a inducir una respuesta mínima o casi nula, por esta razón se utiliza para fines filogenéticos.

**MSP5.** Esta es de las últimas proteínas que se han descrito, tiene un peso molecular de 19kDa y es muy conservada. Se le encuentra en especies de *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, y *A. phagocytophylum* (Visser et al., 1992; Molad et al., 2004). Se le ha ocupado principalmente en ensayos de diagnósticos en la prueba de ELISA, aunque no es recomendable en lugares donde se tengan más de una especie de *Anaplasma* ya que no se puede diferenciar entre las cepas o especies.

Existen otras proteínas además de las MSP's antes descritas. En Australia llevaron a cabo un estudio en el cual identificaron a 5 proteínas más,

nombrándolas como Ana17, Ana29, Ana32, Ana37 y Ana4, estas proteínas se observan en geles de doble dimensión en el rango de pH de 7.7-9.6. De este grupo aislaron a la Ana 29 la cual provenía de un extracto con un pH 7.83-8.10, misma que a la inoculación en bovinos se observó que inducía una respuesta inmune con la producción de anticuerpos que protegieron a los animales en un desafío. ( Riding et al., 2003).

Entre los demás antígenos identificados, se encuentran los de Barigye et al., (2004), el cual reporta como Am28, Am33, Am37, Am50, Am52, Am56, y Am170, los cuales fueron identificados por Wester blot contra IgG2.

El interés en la caracterización de proteínas de *Anaplasma marginale* ha aumentado, tanto así que López 2005 publicó un trabajo identificando a 75 proteínas, de las cuales 24 están secuenciadas y se encuentran en el GenBank o genoma de *Anaplasma marginale*.

## **2.8. Caracterización de proteínas por geles de doble dimensión.**

El análisis del genoma de microorganismo se esta llevando a cabo a través de procedimientos moleculares, en los casos en los cuales no se tiene la información de los genes que codifican las proteínas que generan una respuesta inmune, se emplea entonces la Proteómica la cual ocupa como técnicas la Cromatografía y la Electroforesis, la cual comprende desde la identificación de la muestra en geles de una sola dimensión, en doble dimensión y sus respectivos Wester blot para identificación de las proteínas que son reconocidos por anticuerpos específicos. Entre las técnicas de electroforesis que se utilizan para la purificación de proteínas se tienen electroforesis de flujo continuo y electroelución, ambas técnicas son de gran utilidad, pero el rendimiento es bajo y se corre el riesgo de la degradación de la proteína. Ambas técnicas han pasado a un segundo plano ya que la separación de proteínas por punto isoeléctrico es bastante fiable y se puede proceder para la secuenciación de aminoácidos y obtener su respectiva secuencia de ADN. Para la secuenciación de aminoácidos se utilizan un equipo MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry) la cual genera péptidos cortos para cada proteína y luego se realiza una búsqueda en la base de datos con un software específico, el cual luego nos devuelve un resultado, con varios posibles candidatos a ser la proteína en cuestión y

sí del microorganismo problema se tiene secuenciado todo su genoma facilita su identificación y la secuenciación del ADN, en los casos que la proteína no coincida con lo que esta en la base de datos se procede a una LC-ESI-MS (Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry), Cromatografía de Líquidos acoplada a la Espectrometría de Masas con Ionización por Electrospray, la cual también genera péptidos, esta técnica es más efectiva pero es más tardada y costosa y la cantidad de muestra es mayor, ya que para MALDI-TOF solo es necesario que la proteína se vea en un gel de 2-D teñida con azul de Coomassie.

En este trabajo se tiene como objetivo la purificación de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale* cepa Mex-17

## **Justificación**

La anaplasmosis bovina es una enfermedad importante en regiones tropicales y subtropicales de México, su agente causal es la rickettsia *Anaplasma marginale* y entre los signos de esta enfermedad se encuentra fiebre, ictericia, disminución en la producción de leche, aborto y muerte. Por lo cual su importancia se debe a las pérdidas en el área pecuaria a diferentes niveles, desde el impedimento de la importación de ganado genéticamente superior al nativo de regiones tropicales, pérdidas económicas por elevados costos de tratamiento, baja producción de carne y leche y por muerte de la unidad productiva.

En la actualidad no existe una vacuna eficaz contra la anaplasmosis bovina, lo que hace necesario la identificación de nuevos antígenos que se puedan utilizar para el diagnóstico o que puedan ser incluidas en una vacuna recombinante.

De las proteínas de *Anaplasma marginale* conocidas como MSP's y Ana29 se han realizado ensayos en los cuales han identificado más proteínas, lo que nos indica que debemos identificar proteínas con una cepa mexicana de alta virulencia.

### **Objetivo general**

Identificar proteínas de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale* cepa Mex-17.

### **Objetivos específicos**

- 1.- Purificar cuerpos iniciales (CI) de *Anaplasma marginale* cepa Mex-17.
- 2.- Optimizar la purificación de CI de *A. marginale* a través de gradiente.
- 3.- Identificar proteínas de CI de *A. marginale* cepa Mex-17 a través de procedimientos electroforéticos.
- 4.- Purificar IgG2 a partir de suero de bovino contra CI de *A. marginale* cepa Mex-17.
- 5.- Identificar proteínas de CI de *A. marginale* cepa Mex-17 reconocidas por IgG2 de bovino.

### III METODOLOGÍA

#### 3.1. Purificación de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale*.

##### 3.1.1. Extracción de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale*.

Para la obtención de los Cuerpos Iniciales (CI) de *Anaplasma marginale*, se descongeló sangre infectada a 40°C en baño maría, una vez descongelada, se mezclaron 3 volúmenes de Solución Salina de Puck pH 7.4 [con Gentamicina 50µg/mL e inhibidor de proteasas Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF)] por uno de sangre infectada y se centrifugó a 403xg durante 15 minutos en una centrifuga Jouan BR4í, pasado este tiempo se recolecta el sobrenadante y el sedimento se desecha (ya que en el quedan los residuos de células nucleadas), el sobrenadante ahora se centrifugó a 15000xg por el lapso de 30 minutos en una centrifuga Jouan KR22í, una vez terminado este tiempo el sobrenadante se desecha y se comienzan a lavar ahora los eritrocitos infectados que quedaron en el pellet en solución salina de Puck y se centrifugaron a 15000xg durante 30 minutos, se desechó el sobrenadante y se mezclaron 2 volúmenes de solución de Puck por 1 de estroma, esta mezcla se sonicó en un disruptor de células (Fisher sonic Dis-membrator Modelo 300) a 50W de potencia ultrasónica en 3 periodos de 2 minutos con 1 minuto de descanso entre cada periodo, teniendo siempre la muestra en un baño de hielo. El sonicado se centrifugó a 15000xg por 15 min en sol. salina de Puck, con el afán de eliminar en un primer paso parte de las membranas de eritrocitos en el sobrenadante y el sedimento se homogeniza aproximadamente en 2 volúmenes de la misma sol. de Puck, por otro lado se preparó un gradiente de Percoll (3.1.2) y de densidad continuo con Sacarosa (3.1.3), en los cuales se colectaron la banda donde quedan los CI (32 %) y estos son lavados en sol. salina de Puck a 15000xg / 15 min por 2 ocasiones, siempre desechando el sobrenadante, por último los CI son almacenados en volúmenes de 200µL a -70°C.

### **3.1.2. Gradiente de Percoll.**

Se mezcló una parte de NaCl 1.5M con 9 partes de Percoll. Del estroma sonificado se toman 7 volúmenes y se mezclan con 3 partes de la solución de NaCl 1.5M/Percoll y es centrifugada a 23000xg durante 30min a 4°C. Una vez diferenciados los CI de las membranas, se colectan con una pipeta Pasteur y son lavados con sol. de Puck a 10000xg durante 15min a 4°C. (McCorkle-Shirley et al., 1985).

### **3.1.3. Gradiente de sacarosa.**

Se prepara una dilución de Sacarosa al 40% en NaCl 0.15M. Con la ayuda de tubos comunicantes (formador de gradiente), se prepara el gradiente. En el tubo que comunica hacia la salida, se coloca la sacarosa al 60% y en el otro tubo se coloca NaCl al 0.15M. El tubo comunicante se coloca sobre una parrilla de agitación, en ambos tubos se colocan magnetos para agitación, se coloca la manguera de los tubos comunicantes sobre un tubo de centrifuga y se abre rápidamente el pase de los tubos comunicantes para que se forme el gradiente. Para que haya una separación adecuada de los cuerpos iniciales, dentro del gradiente, la muestra, debe ser pequeña (1-2ml) sobre el gradiente de Sacarosa, y se centrifugó a 7000xg durante 30min.

En caso de no contar con el tubo comunicante se puede realizar con una micropipeta de 1000microlitros y cuidadosamente ir depositando la solución.

Una vez que se diferencian los CI de las membranas, se toman los CI y son lavados con sol. de Puck a 15000xg durante 15min a 4°C.

### **3.1.4. Mini ensayo de Cuantificación de proteína por el Método de Bradford.**

Se utilizó Albúmina Sérica Bovina para realizar una curva de calibración estándar en concentraciones de 1-10µg/mL en agua destilada para 200µL por duplicado, se le adicionó 40µL de reactivo de Bradford y c.b.p. 200µL de agua destilada en cada caso.

Las muestras problemas se mezclaron por separado en una proporción de 1:8 en NaOH 0.1N en un volumen de 400µL, las cuales se colocaron en un baño maría hirviente durante 5 min, después fueron centrifugadas en una micro centrifuga a 10000 rpm durante 5 min, se tomaron volúmenes del sobrenadante de 1.25µL, 2.5µL y 5µL, todas por duplicado, también se les adicionó 40µL de reactivo de Bradford y c.b.p. 200µL de agua destilada, el estándar y las muestras, son leídas al mismo tiempo en un Microplate reader Model 680 BIO-RAD a una longitud de onda de 595nm. Los datos de densidad óptica de la curva estándar son cuantificados por una regresión lineal y las muestras problemas son interpoladas en la regresión lineal.

### **3.2. Identificación de proteínas de *Anaplasma marginale*.**

#### **3.2.1. Electroforesis.**

Se realizaron geles de poliacrilamida - SDS al 12.5% de monómero en el gel de separación y de 4% en el gel de preseparación según el método descrito por Laemli (1970). Tomando en cuenta la concentración de proteína que se obtiene por el método de Bradford, los cuerpos iniciales son preparados en buffer de muestra (Tris-HCl 0.0625M pH 6.8, SDS 2%, Glicerina 10%, β-mercaptoetanol 5% y Azul de bromofenol 0.002%), se colocaron en baño de agua en ebullición durante 5min y fueron centrifugadas a 10,000 rpm/5min. De este sobrenadante se tomó el volumen equivalente a 10µg y es colocado en cada carril del gel de poliacrilamida que previamente se sumergió en amortiguador de corrimiento (Tris 0.025M, Glicina 0.192M y SDS 0.1%) y es corrido para mini geles a 120V durante 1:30 hrs. y en geles de 12 X 16 a 250V /5 hrs. con un sistema de enfriamiento. Después de este tiempo algunos geles se utilizaron para transferir las proteínas a una membrana o utilizados para la Tinción de Coomassie (Azul de Coomassie 0.1%, metanol 20%, ácido acético 10%) durante 15 min a 56°C y después fueron desteñidos en una solución con metanol 20%, ácido acético 15% realizándole los cambios necesarios hasta verse las bandas, una vez que la bandas de proteínas se revelan, el gel fue colocado en una solución con Metanol 10% para distintos fines.

### **3.2.2. Extracción de proteínas hidrofóbicas.**

Para la identificación de proteínas hidrofóbicas se llevó a cabo una extracción con un detergente suave o menos agresivo que no le confiere carga a las proteínas y no las desnaturaliza. Se utilizó el detergente Tritón X-114 en solución Tris 10mM pH 7.4, EDTA 1mM y PMSF 1mM, adicionándole aproximadamente 1mg de proteína por mililitro de esta mezcla a una concentración final de Tritón X-114 de 3%. Se dejó incubar toda la noche a 4°C con agitación suave y constante, al día siguiente se centrifugó a 16000xg/30min a 4°C, después se separo el sobrenadante y fue incubado en baño de agua a 37°C/5min, posteriormente se centrifugó a 1200 rpm/15min a temperatura ambiente (T.A). en una centrifuga Jouan BR4í, de este centrifugado se observaron dos fases, la fase detergente se observó en la parte inferior del tubo y la fase acuosa en la superior, la fase detergente fue lavada por 2 ocasiones en Tris 10mM pH 7.4, EDTA 1mM y PMSF 1mM y centrifugada en las mismas condiciones, separando las fases acuosa y detergente, a estas fases se les adicionaron 3 volúmenes de acetona fría y se dejaron a -20°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó el precipitado a 16000xg/30min a 4°C y se le dio un lavado con acetona, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones eliminando siempre el sobrenadante. El sedimento se disolvió en el amortiguador de carga para los geles de isoeléctroenfoco.

### **3.2.3. Tinción de Coomassie.**

Para la identificación de las proteínas en los geles de poliacrilamida es necesario teñirlos en Coomassie, el cual se prepara disolviendo 0.1% de Azul de Coomassie Brillante R-250, 7.5% ácido acético y 50% metanol en agua destilada y se deja tiñendo el gel por 4 horas o toda la noche.

#### **3.2.4. Tinción Coloidal de Coomassie.**

Para los geles que se ocuparon para la secuenciación de proteínas se colorean en tinción coloidal de Coomassie, el cual se disuelve 1g de Azul de Coomassie Brillante G-250 en 20 ml de agua destilada, en otro vaso de precipitado se disuelve 16ml de ácido orto fosfórico en 768 ml de agua destilada, una vez disuelto este, se le adiciona 80g de sulfato de amonio, ya que se haya disuelto el sulfato de amonio se le adiciona 16ml de la solución de Azul de Coomassie Brillante G-250. Una vez realizada esta mezcla se almacena sin necesidad de ser filtrada y hasta su uso se le adiciona 200ml de metanol. Esta solución final es con la que se tiñe el gel por 6h o toda la noche y se destiñe con agua grado Milli Q.

#### **3.2.5. Electrotransferencia.**

La electrotransferencia se realizó a partir de un gel de poliacrilamida en el cual las proteínas de *A. marginale* fueron separadas por electroforesis. La electrotransferencia se realizó de 2 maneras; una sumergida y la otra en un sistema semi seco. En la sumergida el gel es equilibrado en amortiguador de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.192M y metanol 20%) durante 20 min a T.A., por otro lado se recorto del tamaño del gel una membrana de PVDF Immobilon P7 (Millipore) de 0.45 $\mu$ m y fue sumergida en metanol absoluto durante 10 min, pasado este tiempo la membrana fue colocada en amortiguador de transferencia por 10 min. Una vez que la membrana y el gel fueron equilibrados se preparó el sándwich cubriendo ambos extremos con papel Watman No.3 dentro del mismo y fue sumergido en la cámara con el amortiguador de transferencia y se corrió a 200mA / 2hr y 1 hr a 300mA. En el sistema semi-seco se utilizó el equipo Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer cell (BioRad), en el cual el gel fue equilibrado en amortiguador de transferencia (Tris 0.048M, glicina 0.039M, SDS 10% y metanol 20%) durante 30 min y la membrana 20 min, se prepara el sándwich y los mini geles se transfirieron a 25V/30min y los geles de 12 X 16cm 25V/1hr.

### **3.3. Purificación de IgG2.**

#### **3.3.1. Purificación de IgG2 por intercambio iónico.**

La purificación de IgG2 se realizó de acuerdo a la publicación por Bastida-Corcuera y col., 1999

La IgG2 específica para *A. marginale* se obtuvo a partir de sangre periférica, de un bovino hiperinmune. El suero obtenido por centrifugación fue dializado de acuerdo a lo publicado por Bastida-Corcuera et al., 1999 en amortiguador de Tris 0.1M pH 8.6 con por lo menos 3 cambios con el mismo amortiguador.

El suero dializado fue pasado por una columna de resina de intercambio iónico DEAE Sephacel® en etanol al 20% en una columna de 30cm de Amershan, la cual es equilibrada en amortiguador de Tris 0.1M pH 8.6. El paso de las proteínas (IgG2) se registró en el Cromatógrafo de BioLogic LP Bio-Rad, monitoreando con el programa LP Data View v1.03.Ink Una vez colectadas las fracciones con Tris pH 8.6, se procedió a concentrar y monitorear por SDS-PAGE.

#### **3.3.2. Técnica de ELISA**

La pureza de las inmunoglobulinas purificadas fue verificada por ensayos de ELISA, usando como estándar IgG1 e IgG2 comercial (Jackson Laboratories) en la cual se fijaron placas de 96 pozos con Cl. conteniendo cada pozo 5µl de inmunoglobulina el cual se preparó previamente disolviéndolo en volúmenes iguales de SDS al 0.1% dejándolo incubar 30 min. a T.A. Luego se mezcló esta solución 1:200 en amortiguador de carbonatos 30mM pH 9.6 y se deposito 200µL por pozo de esta solución y se dejaron las placas a 4°C toda la noche. Al otro día las placas son lavadas por 3 ocasiones con Solución Salina Amortiguadora de Fosfato pH 7.2 / Tween 20 0.05% (SSAF/Tween20) a T.A. una vez terminados los lavados la placa fue bloqueada depositando en cada pozo 200µl de leche descremada en polvo ("Svelty", Nestle) al 5% en SSAF/Tween20 dejándola incubar a 37°C/1hr, al terminar este periodo de incubación la placa se vuelve a lavar de la misma manera que se describió anteriormente. Después de los lavados se incubó por duplicado la placa con el anticuerpo purificado o sueros problemas diluidos 1:1000, 1:500, 1:200, en SSAF/Tween20, a 37°C/1hr, pasado este tiempo se le vuelven a dar los 3 lavados y la placa posteriormente fue incubada con la IgG de conejo anti-ratón

unido a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:1000 en SSAF/Tween20 durante 1 hr. Al finalizar este tiempo la placa fue lavada de la misma manera pero ahora por 2 ocasiones y el tercer lavado fue dado con Sol. Tris 100mM pH 9.5 por 5 minutos también, y al finalizar se incubo por último la placa depositando 200µl por pozo con el sustrato p-nitrofenilfosfato al 0.075% en Sol. Tris 100mM pH 9.5 a 37°C/30 min. y al finalizar este tiempo la placa es leída a 405nm en el Microplate reader Model 680 BIO-RAD.

### **3.3.3. Inmunolectrotransferencia con IgG2 purificada.**

La membrana que resulta en la electrotransferencia, fue incubada en solución de albúmina sérica bovina (ASB) al 10% en Solución Salina Amortiguadora de Fosfato pH 7.2 / Tween 20 0.05% (SSAF/Tween20) toda la noche a 4°C. Al siguiente día la membrana fue lavada por 3 ocasiones con SSAF/Tween20 a T.A. durante 5 minutos en cada lavado, después la membrana se incubó con el suero que se deseó probar (IgG2 purificada) a diluciones de 1:500, 1:250, 1:100 en SSAF/Tween20 durante 2 hrs, al terminar este tiempo la membrana se volvió a lavar 3 veces como se describió antes, inmediatamente después la membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal IgG2 de ratón anti-bovino a una dilución de 1:1000 en SSAF/Tween20 durante 1 hr. Al pasar este tiempo se volvieron a repetir los lavados, a la membrana se le dio una última incubación con el conjugado IgG de conejo anti-ratón unido a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:1000 en SSAF/Tween20 durante 1 hr, se volvió a repetir el paso de los lavados y por último se le aplicó sobre la membrana el sustrato premezclado de NBT/BCIP (fosfato de azul nitrotetrazoleo-5-bromuro-4-cloruro-3-indolil) de Sigma Cat. B6404 en agitación lenta hasta que se revelaran las proteínas, la reacción fue detenida con etanol al 70%, y se les adicionó abundante agua para eliminar algún exceso, finalmente las membranas se dejan secar las membranas en la oscuridad.

## **IV RESULTADOS.**

### **4.1. Purificación de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale*.**

#### **4.1.1. Gradiente de Percoll y de Sacarosa.**

En la obtención de cuerpos iniciales de *A. marginale* a partir de eritrocitos infectados se utilizaron gradientes de Percoll y de Sacarosa, en los cuales se pueden observar en la Fig.1 ambos tipos de gradientes, las líneas que corresponden a membranas de eritrocitos y de los cuerpos iniciales

Los mayoría de los CI purificados por gradiente de Percoll quedan en un botón de Percoll que se forma al lavar las bacterias.

La utilización de gradientes de sacarosa para la purificación de los CI se utilizó en la mayor parte del ensayo, debido a que la sacarosa se elimina con los lavados que se le dan a CI.

#### **4.1.2. Frotis de CI por los gradientes de Percoll y Sacarosa.**

Una vez lavados los CI que se purificaron por los gradientes de Percoll y de Sacarosa, se realizaron frotis con la tinción de Giemsa los cuales se observaron con el objetivo de inmersión 1000X. Los CI se observan como puntos de color morado (Fig.2). En ambos procedimientos no se detectan membranas de eritrocitos de bovino.

### **4.2. Identificación de proteínas de *Anaplasma marginale*.**

#### **4.2.1. Electroforesis.**

A los CI purificados se les determino la concentración de proteína por la técnica de Bradford y se monitorearon en geles de poliacrilamida al 12.5%. en condiciones reductoras por la adición de  $\beta$ -mercapoetanol en el amortiguador de muestra. En la Fig.3 se observan las proteínas que se encuentran en los cuerpos iniciales separados por peso molecular.

### **4.3. Purificación de IgG2.**

#### **4.3.1. Purificación de IgG2 por intercambio iónico.**

La purificación de IgG2 a partir de suero hiperinmune se llevó a cabo a través de una columna de intercambio iónico en un Cromatógrafo de BioLogic LP Bio-

Rad, monitoreada con el programa LP Data View v1.03.Ink hasta que se observó que se comenzaba a formar una curva y se colectó la muestra en un colector Modelo 2128 de Bio Rad. El primer pico corresponde a IgG2, el segundo pico (fase retenida) esta relacionado a todas las Ig's y demás proteínas que se encuentran en el suero (Grafica 1).

#### **4.3.2. Electroforesis de IgG2.**

Una vez purificada la IgG2 se le determinó la concentración de proteína y se realizó un gel de electroforesis al 12.5% con el afán de monitorear la IgG2. La utilización  $\beta$ -mercapoetanol en el amortiguador de muestras facilita la separación de las cadenas ligera y pesada (Fig.4).

#### **4.3.3. Técnica de ELISA.**

La técnica de ELISA nos revela la dilución en la que se debe utilizar la IgG2 purificada tanto para ensayos en ELISA que Otra de las metodologías que se siguió, fue la titulación de la IgG2 que se purificó por columna de intercambio iónico, con el interés de conocer la mayor dilución que se podía utilizar el anticuerpo y que nos diera un resultado positivo. En la tabla 1 se muestra las lecturas a 405nm (Lector de placa Modelo 680 Bio-Rad). Esta tabla nos indica que la mayor dilución para la IgG2 purificada es a 1:500 y que la contaminación por IgG1 es casi nula.

### **4.4. Geles en doble dimensión e inmunoelectrotransferencia**

#### **4.4.1. Inmunoelectrotransferencia.**

A los CI purificados se les realizó una inmunoelectrotransferencia revelando con IgG's. En la siguiente figura se muestra en el carril 1: marcador de peso molecular Bio-Rad; carril 2: Eritrocitos de bovinos no infectados; Carril 3-6: CI de *Anaplasma marginale*. En esta figura se puede observar que el carril donde se colocó eritrocitos de bovinos no infectados (carril 2) no hay respuesta con el suero, lo que nos indica que el suero responde exclusivamente hacia proteínas de *A. marginale* (Fig.5).

#### **4.4.2. Inmunoelectrotransferencia con IgG2 purificada.**

Se realizó una inmunoelectrotransferencia, en el cual tenemos en la membrana proteínas de CI las cuales se revelaron a diferentes diluciones con la IgG's, IgG2 e IgG1(Fig.6). En el carril 2, utilizando el suero completo y revelando con IgG totales se observan todas aquellas proteínas que son reconocidas por los anticuerpos. Para el carril 3, 4, se utilizo el suero completo a 1:500, 1:200 y se revelo con IgG. Al igual en los carriles 5 y 6 se utilizo las mismas diluciones de suero completo y revelando con IgG1. La mejor dilución para IgG2 purificada fue 1:200 (carril 7). En el carril 9 se puede observar reacción positiva utilizando como anticuerpo primario la IgG2 purificada 1:200 y revelando con IgG1. Los carriles 9 y 10 indican la presencia de IgG2 y de IgG1.

#### **4.4.3. Electroforesis en doble dimensión de 10X7.**

Para la identificación y la secuenciación de la Am28 se realizaron geles de doble dimensión, en la Fig.7 se muestra un mini gel pH 3-10, las proteínas provienen de una previa extracción con detergente (Tritón X-114) y precipitación con 3 volúmenes de acetona. Este gel nos indica que las proteínas de *A. marginale* se sitúan en la parte central de este rango de pH y podemos observar que existen proteínas con el mismo peso molecular y con punto isoeléctrico cercanos.

#### **4.4.4. Inmunoelectrotransferencia en doble dimensión 10X7.**

De los geles en doble dimensión también se realizaron inmunoelectrotransferencia, con el afán de observar si nuestras proteínas también revelaban utilizando IgG2 1:500 como anticuerpo primario y revelando con el monoclonal del mismo (Fig.8), encontrando que existen más proteínas que no se ven en la tinción con Coomassie, y otras que desaparecen en esta técnica.

#### **4.4.5. Electroforesis en doble dimensión 14X12.**

De igual manera como en los geles anteriores se realizaron geles en 2D ahora con un pH 4-7, para observar con mejor detalle las proteínas de *A. marginale* (Fig.9). En este gel se observan aproximadamente 42 proteínas con distintos puntos isoeléctricos, desde 4.6 a 6.5.

#### **4.4.6. Inmunoelectrotransfrecia en doble dimensión 14X12.**

Ahora mostramos una inmunoelectrotransferencia de un gel en 2D de 14X12cm, pH 4-7 en el cual tenemos en la membrana proteínas precipitadas de CI de *Anaplasma marginale* revelando con IgG2 purificada a una dilución de 1:500; observando 32 proteínas con puntos isoelectricos de 4.5 a 6.6.

## V. DISCUSIÓN.

Para la identificación de proteínas de *A. marginale*, como la Am28 se inició el ensayo con la obtención de CI de *A. marginale* libres de membranas de eritrocitos de bovinos; primero se llevó a cabo la sonicación de los glóbulos rojos infectados y posteriormente fueron separados por un gradiente de Sacarosa y no por un gradiente de Percoll como anteriormente se había llevado a cabo por Barigye 2004., debido a que la obtención de los CI era mermada por el Percoll, ya que en los lavados posteriores que se le dan a los CI para eliminar el Percoll, al ser centrifugados quedaba los CI en el botón de Percoll y era imposible su disolución y en este paso perdíamos muestra. Se propuso utilizar un gradiente de Sacarosa, la cual es más fácil de eliminar a través de simples lavados y la concentración de proteína era más satisfactoria, otro de los beneficios de utilizar Sacarosa se debe a su costo bajo. Para hacerlo más sencillo podemos decir: de 100ml de eritrocitos infectados se obtienen 3ml de CI con una concentración de proteína de 3.5mg/ml con Percoll y con Sacarosa 8mg/ml de proteína. Lo que nos indica que los gradientes de Sacarosa facilitan y permiten conservar una mayor cantidad de proteína. Ambos métodos fueron monitoreados a través de geles de Poli(acrilamida) en el cual ambos geles no muestran ninguna diferencia en las bandas.

Una vez tenido el antígeno de *A. marginale* fue necesaria la purificación de IgG2 a partir de suero de un animal previamente inmunizado con CI de Méx-17 para identificar las proteínas que pueden ser capaces de inducir una respuesta inmune, esta purificación se llevo a cabo a través de una columna de intercambio iónico y después concentrada a través de filtros, se le determinó su concentración de proteína y se tituló en la técnica de ELISA para posteriormente utilizarla en las inmunoelctrotransferencias a una dilución 1:500, este ensayo también nos permite observar que la purificación de IgG2 por columna de intercambio iónico no es absoluta, ya que también existe contaminación de IgG1, como se observa en la figura 9; carril9, aquí lo que nos permite destacar es la utilización de un anticuerpo monoclonal como segundo anticuerpo antes de utilizar el conjugado, permitiéndonos exclusivamente ver anticuerpo IgG2 unido al antígeno y de igual forma IgG1 al antígeno.

Para la caracterización de proteínas de *A. marginale* se propuso obtenerlas a través de geles de doble dimensión y ser secuenciada por MALDITOF.

Como se comentó anteriormente, en los geles de doble dimensión nos muestran una gran variedad de proteínas de pesos moleculares y puntos isoeléctricos. En el área que corresponde aproximadamente para 28kDa se observan 3 proteínas del mismo peso molecular pero de distinto punto isoeléctrico, pI 4.8, 4.9 y 5.2 aproximadamente, al contrario que lo que reporto Barigye y col.,2004, en el cual solo observaba una proteína 28kDa, por ejemplo ya, en su tesis el observa en tinción en plata 12 proteínas y en inmunoelectrotransferencia solo 9, este resultado es distinto seguramente por el método que llevo a cabo, ya que el utilizó los CI tal cuales y en este trabajo las proteínas fueron extraídas con un detergente no iónico (Tritón X-114) además que el método que siguió para realizar los geles en dos dimensiones no es el mismo que se presenta en este trabajo. Para este trabajo se ocuparon tiras de isoelectroenfoque (Bio-Rad) y también lo realizamos con la técnica de O'Farrell, en ambas metodologías estamos observando más proteínas que las antes observadas, aunque las proteínas de nuestro interés se ven en muy poca abundancia, casi nula, mientras que otras proteínas se observan en grandes cantidades como por ejemplo la MSP2 que se puede observa que se encuentra en gran abundancia en la célula de la rickettsia. Mientras el resto de la proteína total se reparte en muchas y la concentración y la visualización en mínima. En geles 2D pH4-7 teñido en Coomassie se observan 42 proteínas, mientras que en la inmunoelectrotransferencia se observan 32, en el gel teñido en Coomassie vemos dos proteínas de 27kDa, (probablemente corresponden a la misma Am28), pero en la inmunoelectrotransferencia se observa una pequeña proteína a la izquierda, indicándonos que no es una Am28, sino Am28a, Am28b y Am28c. El hecho de ser estas proteínas de 27kDa tampoco nos pueden acercar al trabajo de Riding en el 2003 donde caracteriza a una proteína de 27 kDa que nombro como Ana 29, por el hecho de tener un peso molecular cercano a la Am28 que reporto Barigye, ya que la Ana 29 se encuentra en un rango de pH de 7.7-9.6 y las nuestras anda en pH 5 aprox. Aunque queda su comparación hasta tener las secuencias

Una de las recomendaciones, es continuar con la aplicación de los geles en 2D, para secuenciar todas las proteínas que se observan, mientras no se

tengan sus secuencias en ADN, tanto aquellas que se observan en Coomassie como las que se revelan al utilizar un anticuerpo, estas últimas son de mayor importancia ya que algunas de ellas podrían ser candidatas a incluirse en una vacuna en un futuro. El hecho de que la proteína se vea en un gel teñido en Coomassie no es ganancia para su secuenciación ya que en algunos casos se necesita más de un punto, así que sería vital implementar la Cromatografía de exclusión como técnica de fragmentación de proteínas por peso molecular o la utilización de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) y así tratar de concentrar la mayor cantidad de proteínas para ser utilizadas en geles de doble dimensión y de esta manera se estaría aumentando la posibilidad de observarla en mayor cantidad para su secuenciación.

## VI REFERENCIA.

**Adams JH, Smith RD, Kuhlenschmidt MS. 1986.** Identification of antigens of two isolates of *Anaplasma marginale*, using a western blot technique. *Am J Vet Res.* Mar;47(3):501-6.

ANAPLASMOSIS BOVINA. CENID-PAVET. INIFAP.

**Barbet A.F., Palmer, G.H., Myler, P.J., and McGuire, T.C. 1987.** Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for a polypeptide Am105L. *Infect. Immun.* 55:2428-2435.

**Barigye R., García Ortiz M. A., Rojas Ramírez E. E. y Rodríguez Camarillo S. D. 2004.** Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas Mexicanas *Anaplasma marginale*. *Téc Pecu Méx* 42(1):219-236.

**Barigye, Robert. 2003.** Caracterización de los antígenos de *A. marginale* responsables de la estimulación de linfocitos de tipo Th1, provenientes de animales vacunados y protegidos contra el desafío heterólogo. Universidad Nacional Autónoma de México, Doctorado. Julio pp 1 – 192

**Bastida-Corcueraa F.D. Nielsenb K.H., Corbeila L.B. 1999.** Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein A, protein G, and *Haemophilus somnus* IgBPs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 71 143-149.

**BERGEY`S MANUAL 2004.** TAXONOMIC OUTLINE OF THE PROKARYOTES. BERGEY`S MANUAL® OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, SECOD EDITION Release 5.0 May 2004 pp 34-40.

**Bordier C. 1981.** Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *The journal of biological chemistry.* Vol.256, No.4, pp. 1064-1607

**Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.

**Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH. 1998.** CD4(+) T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun.* Nov;66(11):5406-13.

- Carson CA, Sells DM, Ristic M. 1977.** Cell-mediated immunity related to challenge exposure of cattle inoculated with virulent and attenuated strains of *Anaplasma marginale*. *Am J Vet Res.* Aug;38(8):1167-72.
- Dennis, R.A., O'Hara, P.J., Young M.F., and Doris, K.D., 1970.** Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. *JAVMA.* 156:1861-1869.
- Dickmans, G., 1950.** The transmission of anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 11,5-16.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001.** Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* Nov;51(Pt 6):2145-65.
- Ewing, S.A., 1981.** Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Proc of the 7th National Anaplasmosis Conference, Mississippi State University, MS, USA, pp.395-423.
- Graham J. 2001.** Biological centrifugation. Bios
- Hair (ed.), 1986.** Morphology, physiology and behavioral ecology of ticks. Ellis Horwood Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Hart, L.T., Luther, D.G., and Todd, W.J. 1991.** *Anaplasma marginale* antigen, antigen compositions, vaccine and process for the production of said antigen, antigen compositions and vaccine. United States patent No. 4,956,278.
- Henry, T., Norman, B.B., Fly, D.E., Wichmann., R.A., and York, S.M., 1983.** Effects and use of modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183:66-69.
- Hugh-Jones, M.E., Busch, D., Raby, C., and Jones F., 1988.** Seroprevalence survey for *Anaplasma* card test reaction reactors in Louisiana, USA, cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 6: 143-153.
- Jones EW, Kliwer IO, Norman BB, Brock WE. 1968.** *Anaplasma marginale* infection in young and aged cattle. *Am. J. Vet. Res.* 29:535-544
- Kocan KM.** Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host, p. 472–505. *In* J. R. Sauer and J. A.

**Kuttler KL, Zaugg JL, Johnson LW. 1984.** Serologic and clinical responses of premunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *Am J Vet Res.* Nov;45(11):2223-6.

**Laemmli U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685

**Lopez J. E, Siems F., Palmer G. H. Brayton K. A., McGuire C. T., Norimine J., and Brown W. 2005.** Identification of Novel Antigenic Proteins in a Complex *Anaplasma marginale* Outer Membrane Immunogen by Mass Spectrometry and Genomic Mapping. *Infection and Immunity.* Vol. 73, No.12 pp 8109-8118.

**Manual BIOLOGIC LP CHROMATOGRAPHY SYSTEM** Cat # 731-8300, 731-8301 Bio-Rad.

**Manual FRACTION COLLECTOR MODEL 2128** Cat # 731-8123, 731-8124 Bio-Rad.

**Manual Mini Prep Cell** Cat # 170-2908 Bio-Rad.

**Manual Mini-PROTEAN® II 2-D Cell, Mini-PROTEAN II Tube Cell, and Mini-PROTEAN II Tube Module** Cat # 165-2960, 165-2961 and 165-2965 Bio-Rad.

**Manual ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit** Cat # 163-2130 Bio-Rad.

**Manual ReadyPREP™ 2-D Starter Kit** Cat # 163-2105 Bio-Rad.

**Manual ReadyPrep™ Sequential Extraction Kit** Cat # 163-2100 Bio-Rad.

**Manual ReadyStrip™ IPG STRIP** Cat # 163-2099 Bio-Rad.

**McCorkle-Shirley, SM, Hart, LT, Larson, AD, Todd, WJ, and Donovan, MS. 1985** High yield preparation of purified *Anaplasma marginale* from infected bovine red blood cells *Am J Vet Res* 46 (8)

**Montenegro S, James MA, Benitez MT, Leon E, Baek BK, Guillen AT. 1991.** Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as vaccine against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* 77: 93-101.

**Osorno BM, Ristic M. 1977.** Anaplasmosis bovina, con énfasis en control, diagnóstico, distribución de la enfermedad en México y uso de la vacuna atenuada de *A. marginale*. *Vet. Mex. UNAM* 8:85-89.

**Patarroyo JH, Henckel DJ, Prates AA, Mafra CL. 1994.** Antigenic profile of a pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin, using a western blot technique. *Vet Parasitol.* Mar;52(1-2):129-37.

**Percoll® Methodology and applications** Density Marker Beads for calibration of gradients of Percoll® Pharmacia, Sweden

- Potgieter, FT, Kocan KM, McNew RW, Ewing SA. 1983.** Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. Am. J. Vet. Res. 44:2256–2261.
- Rickwood D and Hames B. D. 1981.** Gel electrophoresis of proteins. IRL PRESS Washington
- Riding et al., 2003.** Identification of novel protective antigens from *Anaplasma marginale*. Vaccine 21 1874 -1883.
- Ristic, M. 1968.** Anaplasmosis. In: Blood diseases of man and animals. Vol 2, Weinmand., Ristic, M. (eds.) Academic press., Inc., New York, N.Y. pp. 474-537.
- Ristic M. 1980.** Anaplasmosis. In: Bovine Medicine and Surgery ed. by H.I. Amstutz, Am. Veterinary Publications, Inc. 2nd Ed. Vol. 1 Sta Barbara, Cal., pp 324-348.
- Ristic M. Kreier J P. 1984.** Anaplasma, In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. N.R. Kreig and J.B. Holt. (eds.) Vol. I Baltimore, William & Wilkins pp. 719-722
- Rodríguez Camarillo SD, García Ortiz MA, Cantó Alarcón GJ, Hernández Salgado G, Santos Cerda N, Aboytes Torres R. 1999.** Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. Tec. Pecu. Mex. 37:1-12.
- Rodríguez Camarillo SD, García Ortiz MA, Preciado de la Torre J.F. Rojas Ramírez E. E. 2004.** Folleto N.7. CONTROL Y TRATAMIENTO DE LA
- Sieber, H. 1910.** Uber. *Anaplasma marginale*. Ver. Tieaztl. Wschr. 50:993-998.
- Theiler, A., 1910.** The marginal points in blood of cattle suffering from specific diseases. Rep. Gov. Vet. Bact. Transv:7.
- Trápaga, B.J., Aguirre, E.J, Sobrino, A.L, 1988.** La Anaplasmosis y la babesiosis en Mexico. Informe al O.I.E. Dirección de Salud Animal SARH., México.

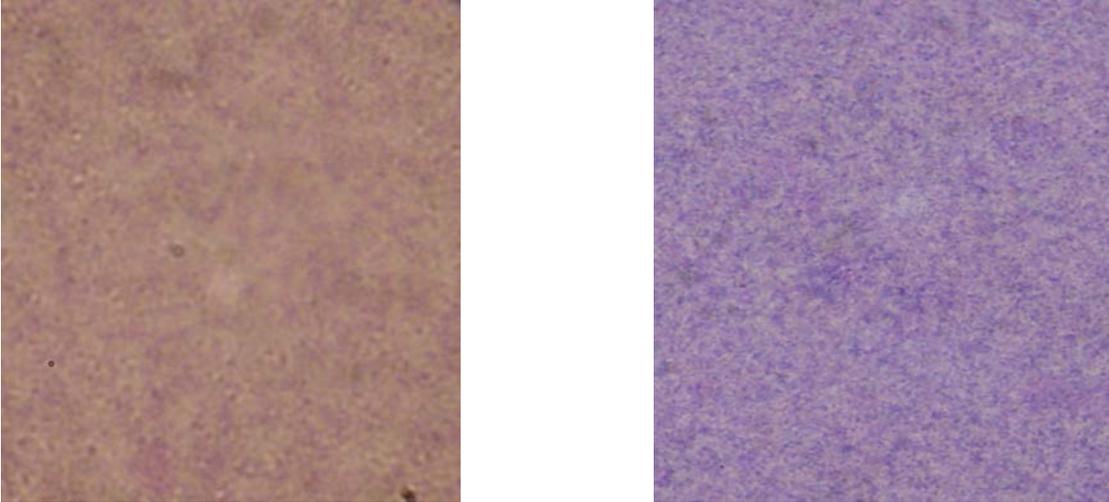
## VII. ANEXOS

Figura 1. Gradiente de Percoll y gradiente de Sacarosa.



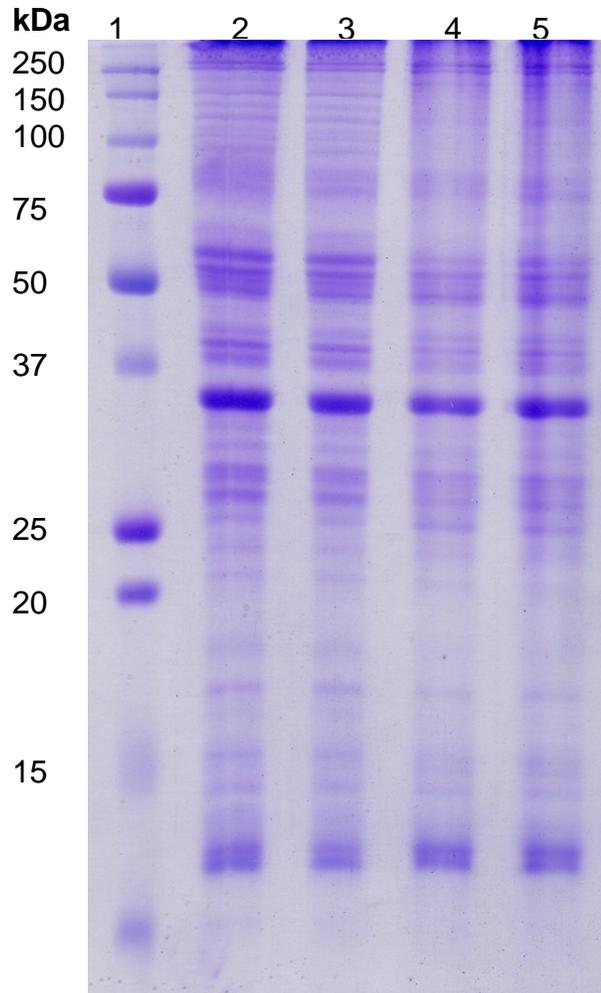
Para el gradiente de Percoll se observan dos líneas, el de arriba muestra el estroma de eritrocitos y la de abajo corresponde a cuerpos iniciales. Para el gradiente de Sacarosa, se ve que la segunda línea son los cuerpos iniciales, la línea de arriba son las membranas de eritrocitos y parte de hemoglobina que lleva la muestra, que no entran al gradiente.

Figura 2. Frotis de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale* a partir de un gradiente de Percoll y de un gradiente de Sacarosa.



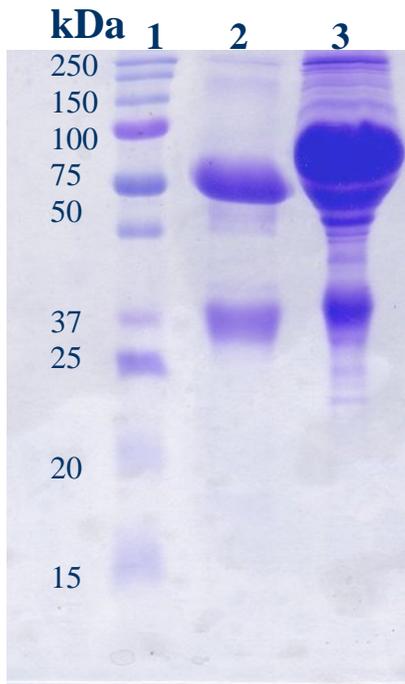
En ambos frotis se observan cuerpos iniciales, los cuales se ven como puntos de color morado con la tinción de Giemsa.

Figura 3. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida al 12.5% de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale*.



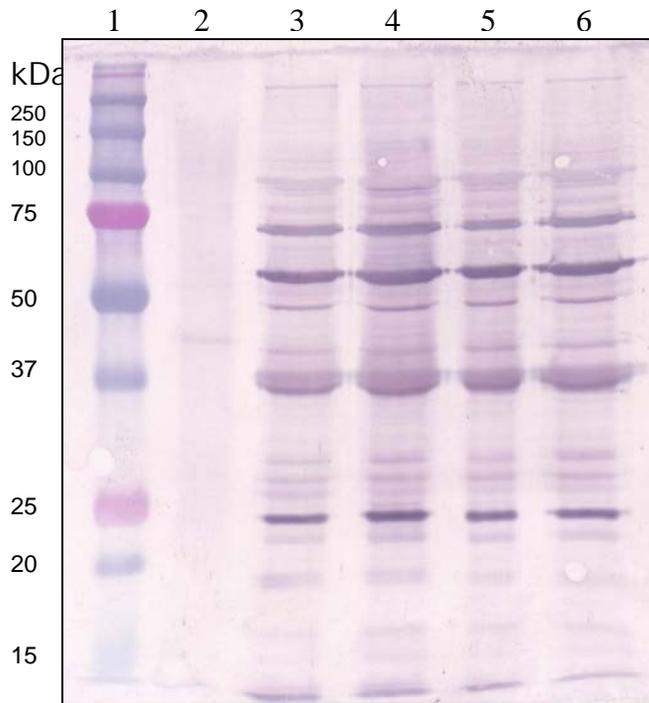
En el carril 1: marcador de peso molecular Bio-Rad. En los carriles 2-5 se colocaron 35 $\mu$ l muestra preparada en el buffer de SDS con  $\beta$ -mercaptoetanol, conteniendo 45 $\mu$ g de proteína

Figura 4. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida al 12.5% mostrando la IgG2 purificada.



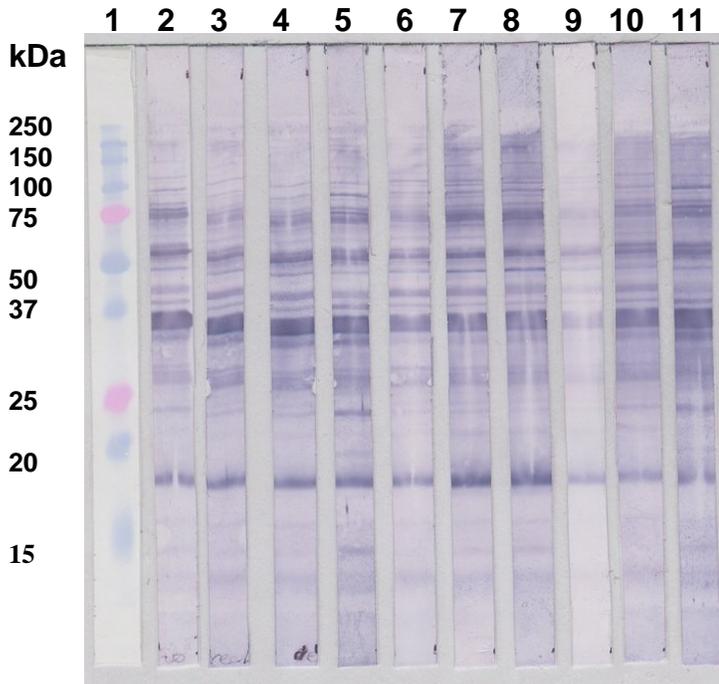
Gel de poliacrilamida al 12.5%. Las muestras fueron preparadas con amortiguador de SDS con  $\beta$ -mercaptoetanol, mostrando la fracción colectada que corresponde a IgG2. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: IgG2 colectada. Carril 3: Fase retenida en la matriz conteniendo demás proteínas que se encuentran en el suero.

Figura 5. Inmunoelectrotransferencia de Cuerpos Iniciales de *Anaplasma marginale*.



Carril 1: marcador de peso molecular Bio-Rad. Carril 2: eritrocitos de bovino no infectado. Carril 3-6: cuerpos iniciales. La membrana esta revelada con IgG's.

Figura 6. Inmunolectrotransferencia de CI de *Anaplasma marginale*.



Carril 1: Marcador de peso molecular Bio-Rad; Carril 2-11: proteínas de cuerpos iniciales reconocidas con distintas diluciones de sueros.

Carril 2: suero No.135 1:200 revelado con IgG's

Carril 3, 4: suero No.135 1:500, 1:250 revelado con IgG2.

Carril 5: suero No.135 1:250 revelado con gG1.

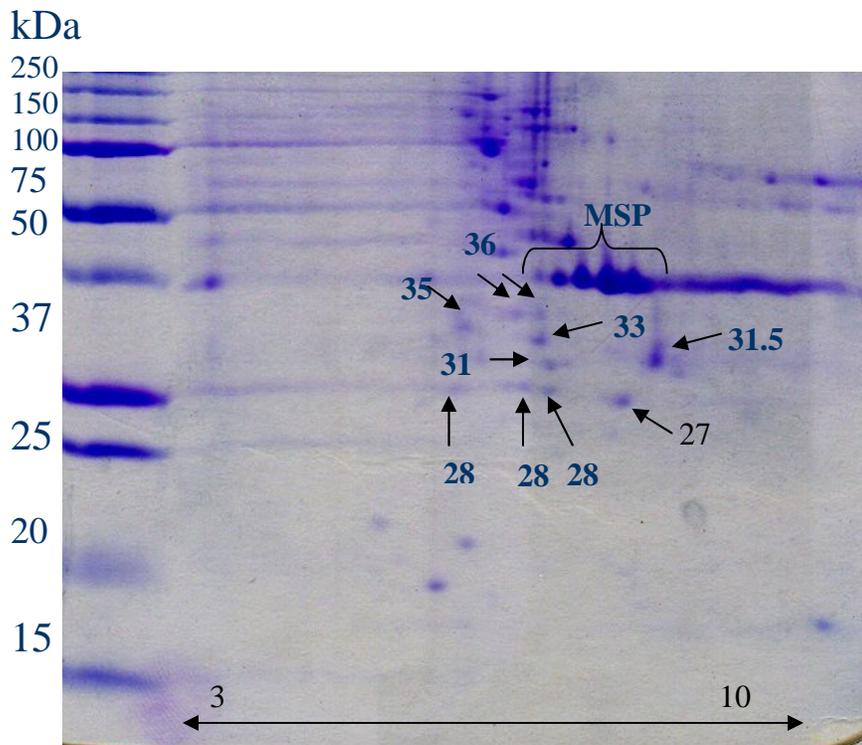
Carril 6, 7 y 8: IgG2 1:500, 1:200, 1:100 revelado con IgG2.

Carril 9: IgG2 1:200 revelado con IgG1.

Carril 10: fase retenida en la matriz 1:100 revelado con IgG2.

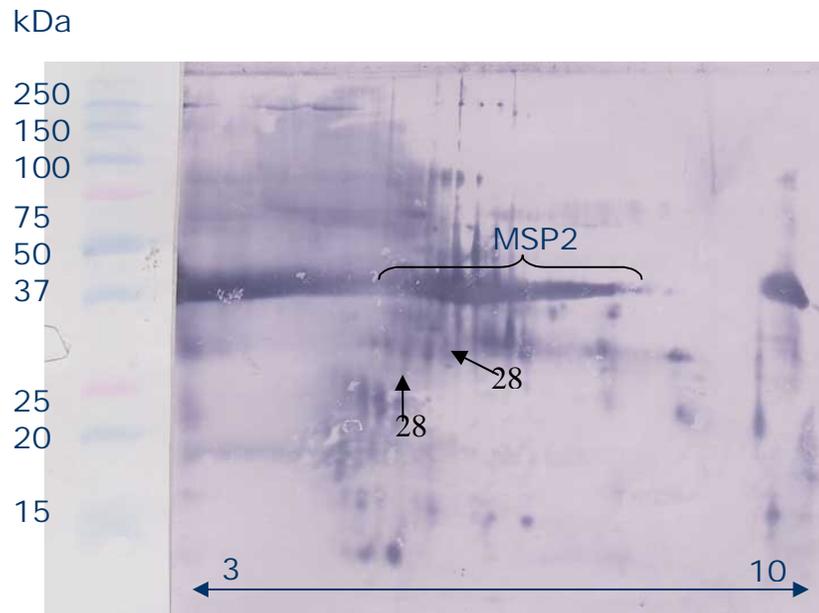
Carril 11: fase retenida en la matriz 1:100 revelado con IgG1.

Figura 7. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en 2 dimensiones de Proteínas de *Anaplasma marginale* teñido con Coomassie.



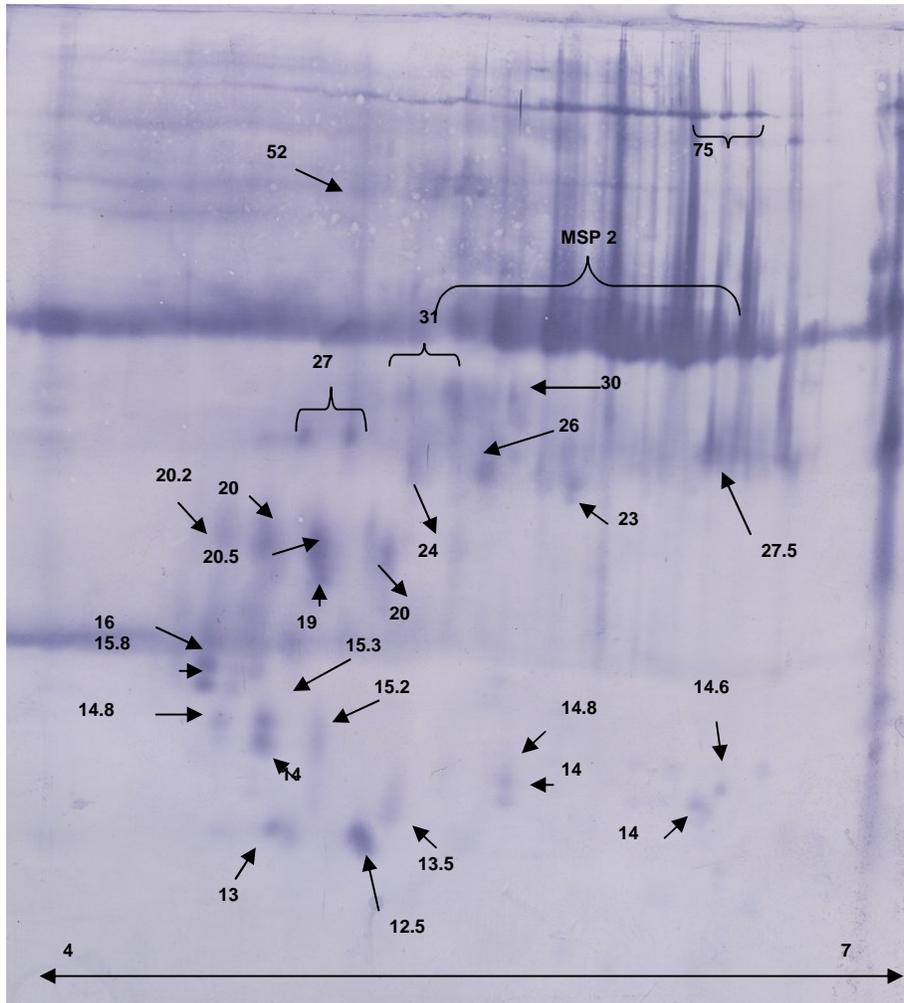
Las proteínas que se observan se pueden apreciar en el centro del rango de pH 3-10, incliándose ligeramente hacia el pH básico. En el gel se pueden ver más de 30 proteínas. Algunas proteínas no se pueden contar bien por su cercanía con otras.

Figura 8. Inmunoelectrotransferencia en 2-D pH 3-10 de proteínas precipitadas de CI de *Anaplasma marginale*, revelando con IgG2 purificada.



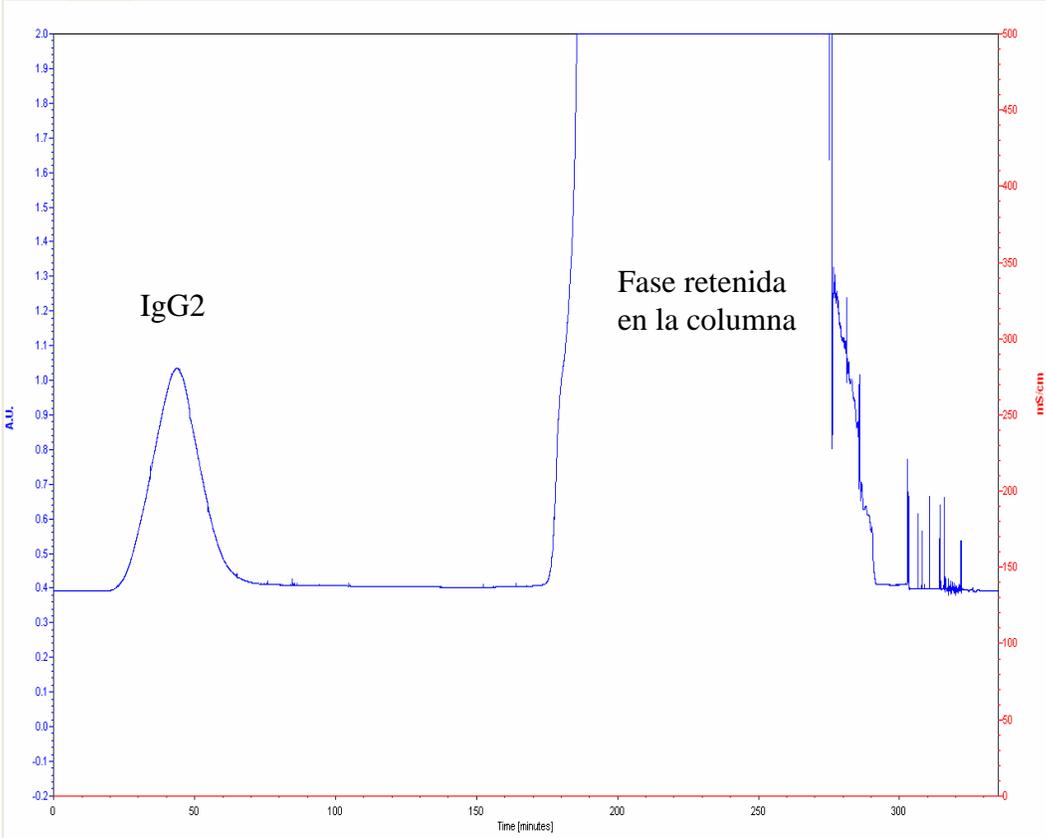
En la imagen se observan proteínas de *A. marginale* que son reconocidas por IgG2 purificada de suero de bovino. Se observan aproximadamente 25 proteínas.

Figura 10. Inmunoelectrotransferencia en doble dimensión de proteína precipitada de *A. marginale* contra IgG2 previamente purificada.



En la membrana se observan proteínas que son reconocidas por IgG2 de suero de bovino a una dilución 1:500.

Grafica 1. Purificación de IgG2 a partir de suero de bovino por Cromatografía de intercambio iónico.



El primer pico corresponde a la IgG2

IgG2

de bovino y el segundo pico son las proteínas que se retienen en la matriz de la columna.

Tabla 1. Valores de títulos de la fase retenida e IgG2 purificada a partir de un suero hiperinmune contra *Anaplasma marginale*.

		Blanco	0.021
		Positivo	1.670
		Negativo	0.183
		<b>Diluciones.</b>	<b>∝ IgG2</b>
			<b>∝ IgG1</b>
<b>FASE RETENIDA</b>		1:1000	0.369
		1:500	0.454
		1:200	0.544
		1:100	1:253
		1:20	1:259
		1:1000	0.39
<b>IgG2 PURIFICADA</b>		1:500	1:323
		1:200	1:283
		1:50	1:249
		1:20	0.34
		1:10	0.39
			0.33

La tabla muestra los datos de IgG2 purificada y de la fase retenida. En ambas los valores de 1 o más se toman como positivos. Las absorbancia se miden a 405nm.