



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

*“Selección y caracterización de clonas que expresan epítomos relevantes de  
Anaplasma marginale a partir de una biblioteca de despliegue en bacteriófagos  
filamentosos”*

### TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA  
Mariana Ruiz Hernández

Tutor: Dr. Rogelio A. Alonso Morales  
Comité tutorial: Dr. Sergio D. Rodríguez Camarillo  
Dr. Julio V. Figueroa Millán

JULIO

2008



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.

## RESUMEN:

La anaplasmosis bovina es una enfermedad hemolítica del ganado transmitida por artrópodos y causada por la rickettsia *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*). Por muchos años en México ha sido una enfermedad que produce pérdidas millonarias al país (OIE 1990) y dicho problema se ve acentuado por la ausencia de vacunas comerciales. El objetivo de esta investigación fué generar recursos biológicos útiles en la producción de una vacuna. Se utilizó una biblioteca de expresión de despliegue en la superficie de bacteriófagos filamentosos construida mediante la clonación de fragmentos de DNA de 700-1000 pb obtenidos por digestión parcial del DNA genómico de *A. marginale* con las enzimas *Rsal*, *AluI* y *HaeIII*, insertados en el sitio *EcoRV* del fagémido 3.2.

La biblioteca primaria se amplificó en la bacteria *XL1-BLUE MRF'* obteniendo un título de  $2.03 \times 10^5$  ufc. Esta biblioteca se movilizó a partículas infecciosas mediante la superinfección con el bacteriófago ayudador M13K07 el título de células infectadas fue de  $5.5 \times 10^9$  ufp. Además, se determinó el título de fagémidos recombinantes:  $2.4 \times 10^9$  ufc con 91.07% de clonas recombinantes para el fagémido 3.2, determinadas mediante PCR con iniciadores específicos para el vector. Una vez que se obtuvieron los títulos de la biblioteca de expresión y se caracterizaron los sueros y anticuerpos IgG2 mediante ensayos de ELISA con el antígeno purificado a partir de eritrocitos infectados de animales experimentales, se procedió al tamizado de las clonas recombinantes con las inmunoglobulinas tipo 2 para la obtención de una biblioteca enriquecida con clonas reconocidas por las IgG2. Finalmente y posterior a la amplificación, purificación y obtención del título de la biblioteca de expresión enriquecida, se procedió a la secuenciación de los insertos contenidos en dichos bacteriófagos recombinantes mediante la reacción de secuenciación utilizando el iniciador F' del bacteriófago M13 y con las condiciones sugeridas por el fabricante del kit de secuenciación Big Dye v.3. Dichas secuencias fueron comparadas en cuanto al tamaño del inserto, a que parte del genoma de la rickettsia corresponde, y para qué proteína codifica obteniendo seis grupos de clonas expresando fragmentos de proteínas reconocidas por las IgG2. Estas proteínas se caracterizan por pertenecer a un grupo en el cual se encargan de las funciones básicas para la sobrevivencia de los organismos, que no han sido caracterizadas como inmunógenos. Así que éstas pueden ser utilizadas en ensayos de caracterización inmunológica *in vivo* para probar su importancia en la participación en métodos de diagnóstico y/o para fines vacunales.

# ÍNDICE

	página
1 Introducción	6
2 Marco teórico	7
2.1 Anaplasmosis bovina	7
2.1.1 Definición de la enfermedad	7
2.1.2 Taxonomía	8
2.1.2.1 Clasificación y relaciones filogenéticas	8
2.1.2.2 Genoma de <i>Anaplasma marginale</i> y los genes de las proteínas de superficie	9
2.1.2.3 Regulación genética de las familias multigénicas de <i>Anaplasma marginale</i>	11
2.1.3 Patogénesis de la enfermedad	11
2.1.3.1 Proteínas asociadas al apéndice	15
2.1.3.2 Infección persistente del ganado	16
2.1.4 Antígenos de importancia inmunológica	17
2.1.4.1 Proteína Principal de Superficie 1 (MSP1)	18
2.1.4.2 Proteína Principal de Superficie 2 (MSP2)	18
2.1.4.3 Proteína Principal de Superficie 3 (MSP3)	20
2.1.4.4 Proteína Principal de Superficie 4 (MSP4)	20
2.1.4.5 Proteína Principal de Superficie 5 (MSP5)	22
2.1.5 Impacto económico de la Anaplasmosis bovina	22
2.1.6 Medidas de control contra la Anaplasmosis bovina	23
2.2 Desplegamiento en bacteriófago	24
2.2.1 Biología del fago filamentosos	25
2.2.1.1 Estructura de la partícula fágica	25
2.2.1.2 Infección	28
2.2.1.3 Replicación	29
2.2.1.4 Genes y expresión genética	30
2.2.1.5 Fisiología del ensamblaje del bacteriófago	31
2.2.1.6 Mecanismos de ensamblaje del bacteriófago	32
2.2.2 Proteínas de superficie utilizadas para el despliegamiento en bacteriófago	33
2.2.2.1 Proteína VIII	33
2.2.2.2 Proteína III	34
2.2.3 Tipos de sistemas de despliegamiento en bacteriófago	34

2.2.4 Aplicaciones del desplegamiento en bacteriófago	36
2.2.4.1 Desplegamiento en bacteriófago de proteínas y enzimas	36
2.2.4.2 Desplegamiento en bacteriófago de anticuerpos	37
2.2.4.3 Desplegamiento en bacteriófago de péptidos	38
2.2.5 Tamizado de la biblioteca en bacteriófago filamentoso	39
3 Hipótesis	42
4 Objetivo General	42
5 Objetivos particulares	42
6 Metodología	43
7 Resultados	53
8 Discusión de resultados	67
9 Conclusión	70
10 Anexos	71
11 Bibliografía	77

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura	página
1 Eritrocitos infectados con <i>Anaplasma marginale</i>	8
2 Mapa genético de <i>Anaplasma marginale</i>	10
3 Gráfica de infección de <i>Anaplasma marginale</i>	12
4 Representación esquemática del ciclo de desarrollo de <i>Anaplasma marginale</i> en ganado y garrapatas	14
5 Micografías electrónicas de los estadios de desarrollo de <i>Anaplasma marginale</i> dentro de las colonias en las células de garrapata	15
6 Desarrollo de la rickettsemia por <i>Anaplasma marginale</i> durante la infección aguda y persistente	16
7 Ciclo de vida del bacteriófago filamentoso	25
8 Genes y productos genéticos del bacteriófago filamentoso	26
9 Estructura del dominio de la proteína III y sus puntos de fusión para el desplegamiento	28
10 Infección de <i>Escherichia coli</i> por M13	29
11 Ciclo de vida de M13	30
12 Tres tipos de desplegamiento en bacteriófago	36
13 Método de tamizado para la selección de péptidos que se unen a anticuerpos específicos	41

## 1. INTRODUCCIÓN:

La anaplasmosis bovina es una enfermedad hemolítica causada por la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale* cuyos signos incluyen anemia progresiva, ictericia, fiebre, aborto y muerte entre otros. En México la ganadería reporta grandes pérdidas económicas por esta enfermedad; sin mencionar el obstáculo que representa en los programas de mejoramiento genético: “Ganado Mejor” (Rodríguez y col., 1999). Además, dicho problema se agrava por la ausencia de vacunas comerciales.

Actualmente las medidas que se aplican en programas de control de la enfermedad en zonas enzoóticas incluyen: control de poblaciones de vectores, preinmunización de animales susceptibles con sangre de animales portadores y el uso de antibióticos para prevenir o tratar la enfermedad, pero el riesgo que se corre es considerable y no existe una garantía de que los animales estarán protegidos.

Recientemente se ha evaluado la inmunización con proteínas purificadas de la membrana externa de *Anaplasma marginale* en un desafío homólogo, cuyos resultados revelan que de los animales inmunizados, algunos fueron protegidos completamente ante la confronta con el inmunógeno y esos animales desarrollaron bajos títulos de IgG1, altos títulos de IgG2 y alta producción de INF- $\gamma$  mientras que los protegidos parcialmente desarrollaron cantidades menores de IgG2 e INF- $\gamma$ . Esto sugiere que una gran respuesta de las células Th1 cooperadora (CD4+) caracterizada por la producción de INF- $\gamma$  en asociación con la producción del isotipo del anticuerpo opsonizante IgG2 lo cual se ha demostrado que es importante para la protección inmunitaria (Barigye y col. 2004).

La construcción de una biblioteca de expresión; la cuál nos permite determinar la expresión de ciertos epítopes antigénicos de alguna proteína de interés y a su vez caracterizarlos para determinar su participación dentro de la protección contra la anaplasmosis mediante el contacto con anticuerpos específicos del tipo IgG2, ha sido el punto de partida para el análisis de las secuencias obtenidas por un tamizado (biopanning) que finalmente será útil para la tipificación de las mismas para una posterior utilización en el campo de la vacunación.

El objetivo de éste trabajo fue generar recursos biológicos para la obtención de genes y antígenos relevantes de este microorganismo.

## 2. MARCO TEÓRICO

El control de las enfermedades de los animales y la promoción y protección de su salud son componentes esenciales de cualquier programa eficaz de mejora y producción animal. A pesar de los notables adelantos técnicos para el diagnóstico, la prevención y el control de enfermedades animales, la situación generalmente mala de la sanidad animal en los países en desarrollo causa pérdidas económicas sustanciales y sigue siendo un obstáculo importante para el incremento de la productividad ganadera.

En los países en desarrollo los servicios zoonosarios fueron establecidos con el objetivo primordial de controlar las principales enfermedades contagiosas e infecciosas, como la fiebre aftosa, la peste bovina, la pleuroneumonía contagiosa, o enfermedades parasitarias como la tripanosomiasis o las enfermedades transmitidas por garrapatas. Esta fue obviamente la prioridad, puesto que el control de las enfermedades es un requisito previo para el éxito de cualquier programa de desarrollo ganadero.

### 2.1 Anaplasmosis bovina.

#### 2.1.1 Definición de la enfermedad

La anaplasmosis es una enfermedad transmitida por garrapatas o moscas mordedoras causada por la rickettsia *Anaplasma marginale*, la cual es endémica en áreas tropicales y subtropicales del mundo. Esta enfermedad causa una pérdida económica tanto en ganado de ordeña como en ganado de carne en industrias a todo lo ancho del mundo (Kocan y col., 2003), y es caracterizada por fiebre, anemia, debilidad generalizada, mucosas pálidas, pérdida de peso (Ajayi y col., 1978), abortos, decremento en la producción de leche, y una alta mortalidad durante la fase aguda de infección (Palmer y col., 1986). La enfermedad clínica es más notable en ganado, pero otros rumiantes incluyendo el búfalo, bison, antílopes Africanos, y el venado pueden infectarse persistentemente con *A. marginale* (Kuttler, K. L. 1984). Theiler fue el primero en describir la infección de *A. marginale* en eritrocitos de ganado Africano como “puntos marginales” (Theiler, A. 1910). Un reporte similar fue publicado en Estados Unidos por Salmón y Smith en 1896, el cual describía la presencia un patógeno parecido a un punto en preparaciones sanguíneas de ganado como “un cuerpo redondo muy diminuto que se tiñe de azul para poder ser visto. El cuerpo como regla se encuentra situado en el extremo del corpúsculo” (Salmon y col., 1896).

Theiler subsecuentemente describió algunas subespecies de *A. marginale*, *A. centrale*, los cuales parecían ser menos patogénicas y para los cuales las inclusiones de *Anaplasma* se encontraban más a menudo en el centro de los eritrocitos en lugar de una localización marginal (Theiler, A. 1911).

Los eritrocitos son el único sitio conocido de infección de *A. marginale* en ganado (Fig 1A). Dentro de estas células las inclusiones unidas a la membrana (también llamados cuerpos iniciales) contienen de cuatro a ocho rickettsias (Fig. 1B), y el 70% o más de los eritrocitos pueden llegar a infectarse durante una infección aguda (Richey, 1981).

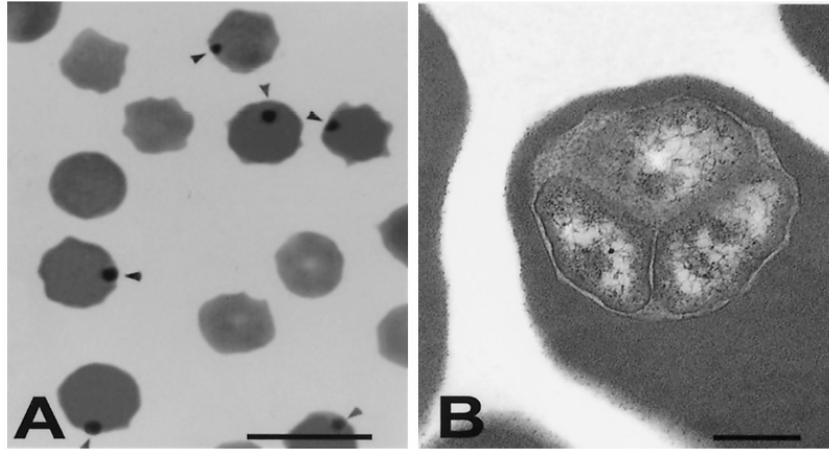


Figura 1. Eritrocitos infectados con *A. marginale*. (A) Cuerpos de inclusión (cabezas de flecha) se encuentran localizadas en la periferia del eritrocito en un frotis de sangre teñida. (B) Micrografía electrónica de un cuerpo de inclusión de *A. marginale* que contiene tres organismos. Barra 10  $\mu\text{m}$  (A) y 0.5  $\mu\text{m}$  (B). (Tomado de Kocan, y col., 2003)

## 2.1.2 Taxonomía

### 2.1.2.1 Clasificación y relaciones filogenéticas

Los organismos en el orden *Rickettsiales* fueron recientemente reclasificados basándose en sus características biológicas y análisis genéticos de los genes del RNAr 16S, *groESL*, y los genes de las proteínas de superficie (Dumler, y col., 2001). Este análisis filogenético propone la formación de cuatro géneros distintos dentro de la familia *Anaplasmataceae*: 1) *Anaplasma*, con 96.1% de similitud mínima; 2) *Ehrlichia*, con una similitud del 97.7%; 3) *Wolbachia*, con una similitud del 95.6%; y 4) *Neorickettsia*, con una similitud del 94.9% (Dumler, y col., 2001). Los organismos clasificados dentro de la familia *Rickettsiaceae* son bacterias intracelulares obligadas que crecen libremente dentro del citoplasma de células eucarióticas. Mientras los organismos que pertenecen a la familia *Anaplasmataceae* también son organismos intracelulares obligados, y se encuentran exclusivamente dentro de vacuolas unidas a la membrana en el citoplasma de la célula hospedera. Además, la mayoría de los organismos de la familia *Anaplasmataceae* se multiplican tanto en vertebrados como en invertebrados (principalmente garrapatas y tremátodos).

El género *Anaplasma* incluye tres especies que infectan los rumiantes: *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*. La anaplasmosis bovina es causada principalmente por *A. marginale*. Mientras que *A. centrale* es menos patógena para el ganado y ha sido utilizada como vacuna viva en Israel, Australia, África, y Sur América, la infección con este organismo puede, ocasionalmente, causar una enfermedad clínica. *A. ovis* es un patógeno de las ovejas y no presenta una infección persistente en ganado.

El género *Anaplasma* también incluye *A. phagocytophilum* (agente de la ehrlichiosis granulocítica humana), *A. bovis*, y *A. platys*.

### 2.1.2.2 Genoma de *A. marginale* y los genes de las proteínas de superficie

El pequeño genoma de *A. marginale* es circular, su tamaño estimado es de 1.2 a 1.6 Mb (Alleman, y col.; 1993). Las investigaciones realizadas durante los últimos 20 años se han enfocado a la identificación de las proteínas principales de superficie (MSPs). Se han encontrado

seis MSPs, MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5, identificadas a partir de organismos de eritrocitos infectados, y la información acerca de la secuencia de sus genes, proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales mono-específicos, variabilidad entre cepas, y vacunas ya se encuentra disponible. MSP1a, MSP4, y MSP5 se encuentran codificadas por genes únicos, mientras que MSP1b, MSP2 y MSP3 por familias multigénicas.

MSP1a y MSP1b forman el complejo MSP1. La subunidad a varía en su peso molecular entre aislados geográficos debido a los diferentes números de repeticiones en tándem de entre 28-29 aminoácidos localizados en la porción del amino terminal de la proteína (de la Fuente; y col.; 2001 y 2002). Debido a la variación de la porción repetida del gen MSP1a, éste ha sido utilizado como marcador genético para la identificación de diferentes aislados geográficos (Barbet; y col.; 1999). El gen, *msp1a*, que codifica para MSP1a se encuentra altamente conservado durante la multiplicación de la rickettsia en el ganado y en las garrapatas. Se demostró un epítipo sensible a la neutralización que pertenece a las repeticiones en tándem de MSP1a (Palmer, y col.; 1987) y además se encontró que se encuentra altamente conservada entre diferentes aislados (de la Fuente; y col.; 2001 y 2002). MSP1a ha demostrado ser una adhesina tanto para los eritrocitos bovinos como para las células de garrapata de cultivo utilizando *Escherichia coli* recombinante que expresa MSP1a en una microtitulación por hemoaglutinación (de la Fuente, y col.; 2001 y 2003). Se encontró que la porción de MSP1a con las repeticiones en tándem es necesaria y suficiente para efectuar la adhesión a los eritrocitos de bovino y a las células de garrapata (de la Fuente, y col.; 2003). Se ha demostrado que MSP1a se encuentra involucrada en la infección y transmisión de *A. marginale* por garrapatas *Dermacentor* y que contribuye a la inmunidad de contra la enfermedad en el ganado. MSP1b, codificado por al menos dos genes, *msp1β1* y *msp1β2*, entre los aislados geográficos se ha comprobado que es polimórfico (Barbet, y col., 1987; Camacho, y col., 2000). Aunque MSP1b se encuentra codificada por una familia multigénica, únicamente se observan pequeñas variaciones en la secuencia de MSP1b<sub>1</sub> y MSP1b<sub>2</sub> durante el ciclo de vida de la rickettsia tanto en el ganado como en la garrapata (Bradway, y col.; 2001). Dicha proteína, la cual forma un complejo con MSP1a, es una adhesina para los eritrocitos de bovino. Sin embargo, se demostró que MSP1b es también una adhesina pero únicamente para los eritrocitos bovinos; aunque no se probó que lo sea también para las células de garrapata (de la Fuente, y col., 2001).

MSP2 y MSP3 se encuentran codificados por dos familias multigénicas muy grandes y polimórficas (Palmer, y col., 1986). La secuencia de MSP2 y su composición antigénica varían durante el ciclo de rickettsemia en el ganado y en garrapatas persistentemente infectadas (de la Fuente, y col., 2001). MSP2 se encuentra codificado en un locus policistrónico. El gen *msp2* dentro del sitio de expresión es polimórfico. *msp2* codifica para un gran número de variantes de secuencias de aminoácidos tanto en los eritrocitos de bovino como en las glándulas salivares de la garrapata (Meeus, y col., 2001). MSP3 también varía en sus propiedades antigénicas y su estructura entre aislados geográficos. MSP2 y MSP3 se encuentran relacionados en la inducción de la respuesta inmunológica bovina protectora contra *A. marginale* (Barbet, y col., 2000; Brayton, y col., 2001).

MSP4 y MSP5 se encuentran codificadas por genes de una sola copia. Aunque MSP4 se encuentra altamente conservado, no hay información disponible acerca de su función (Oberle, y col., 1993). MSP5 también se encuentra altamente conservada y se ha probado su efectividad como antígeno de diagnóstico y es ampliamente utilizada en ELISA competitivo (Torioni de Echaide, y col., 1998). La función de MSP5 también es desconocida. Se han identificado los genes asociados al operón de *msp2* OpAG1, OpAG2 y OpAG3 en *A. marginale* y pudieran codificar para proteínas de su superficie (Lohr, y col., 2002).

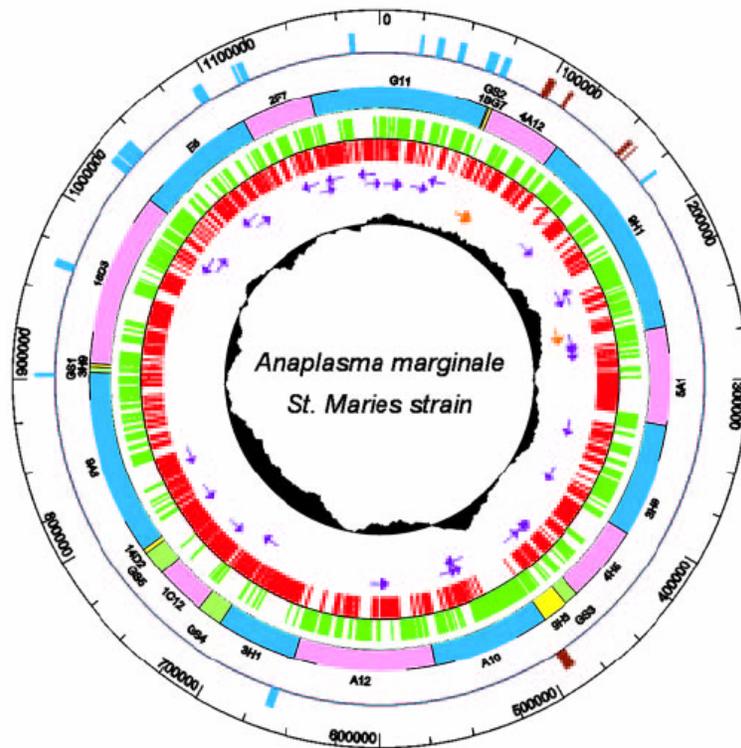


Figura 2: Mapa genético de *A. marginale*. El círculo interior representa la proporción de GC (G-C/G+C). El segundo y tercer círculo muestran la posición y la orientación de los genes RNAr (flechas naranjas) y RNAt (flechas moradas). El cuarto y quinto círculo muestran las posiciones de las secuencias codificantes predichas en su orientación hacia adelante (rojo) y de reversa (verde). El sexto círculo muestra la posición de los BACs (Bacterial Artificial Chromosome) (BACs completos en azul y rosa; parciales en amarillo) y en verde fragmentos de PCR que han sido secuenciados. El séptimo círculo muestra las posiciones de las superfamilias genéticas *msp1* (azul) y *msp2* (café). (Tomado de Brayton y col., 2005)

### 2.1.2.3 Regulación genética de las familias multigénicas de *A. marginale*

Al menos dos copias transcripcionalmente activas de *msp1β* han sido identificadas en el genoma de *A. marginale*. Sin embargo, aunque se han observado pequeñas variaciones en las secuencias de MSP1b<sub>1</sub> y MSP1b<sub>2</sub>, la recombinación no parece ser un mecanismo importante en la regulación de *msp1b* y la expresión de diferentes loci parece jugar el rol más importante (Bowie, y col., 2002). Se estima que el gen *msp2* tiene 10 o más copias en el genoma de *A. marginale*. Sin embargo, todas menos una de las copias de *msp2* son pseudogenes, y el operón que contiene el gen *msp2* expresado es de copia única (Bowie, y col., 2002). Los transcritos de *msp2* son policistrónicos y se encuentran unidos al marco de lectura abierto (Barbet, y col., 2000). Los pseudogenes en el gen *msp2* generan secuencias hipervariables y nuevas variantes antigénicas durante la multiplicación de la bacteria (Brayton, y col., 2002). Cassettes parciales de pseudogenes también se encuentran presentes en la familia del gen *msp3*, y a menudo los pseudogenes de las dos familias aparecen juntos (Brayton, y col., 2001; Munderloh, y col., 1994). Existe una gran cantidad de evidencia de que en las especies microbianas patógenas, hay una pérdida de la función genética durante la adaptación al hospedero. Los pseudogenes *msp2* y *msp3* pueden ser remanentes de genes funcionales a partir de patógenos adaptados a su hospedero en el proceso de disminución del contenido de su genoma para obtener un uso más eficiente de la información genética: proceso de evolución convergente reductivo causado por una

vida intracelular prolongada. Las dos familias genéticas tienen la misma secuencia en 5', lo que sugiere que pueden estar utilizando mecanismos similares para regular la combinación en el sitio de expresión; dicha especificidad se encuentra garantizada por su respectivo sitio recombinatorio 3' en la región codificante de cada gen. El control coordinado de la recombinación de estos genes contribuye a la evasión del sistema inmunológico del hospedero en respuesta al patógeno. La variación debe darse espontáneamente y frecuentemente existe selección de variantes que escapan al sistema inmunológico (Brayton, y col., 2002). La disminución o cambio en el genoma y la variación de la expresión genética ya ha sido reportado para otros patógenos.

### 2.1.3 Patogenia de la enfermedad

El periodo de incubación de la infección varía con el número de organismos en la dosis infectiva y dura entre 7 y 60 días, con un promedio de 28 días. Después de que la infección es detectada, el número de eritrocitos parasitados se incrementa geométricamente. Los eritrocitos infectados son fagocitados subsecuentemente por las células reticuloendoteliales del bovino, resultado en el desarrollo de una anemia ligera a severa e ictericia sin hemoglobinemia y hemoglobinuria. Los síntomas clínicos pueden incluir fiebre, pérdida de peso, aborto, letargia, ictericia, y a menudo la muerte en animales mayores a 2 años. El ganado puede sobrevivir a una infección aguda desarrollando una infección persistente caracterizada por un ciclo de rickettsemia bajo (French, 1999) (Figura 3).

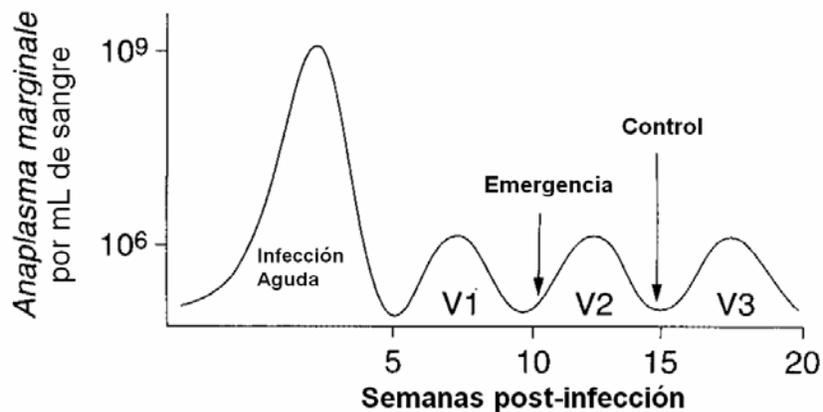


Figura 3. Gráfica de infección con *Anaplasma marginale*. Los niveles más altos de *Anaplasma marginale* durante la rickettsemia aguda ( $>10^9$   $\text{ml}^{-1}$ ) se pueden observar después del desarrollo de una respuesta inmunológica primaria, pero la emergencia de variantes antigénicas resulta en una infección persistente. La persistencia es caracterizada por ciclos rickettsémicos secuenciales, que ocurren en intervalos de aproximadamente 5 semanas, durante el cual nuevas variantes de MSP2 se replican hasta un pico  $>10^6$   $\text{mL}^{-1}$  y posteriormente son controlados por una respuesta inmunológica específica para dicha variante. Las variantes surgen en tres ciclos rickettsémicos secuenciales los cuales son designados y se muestran como V1, V2, y V3. (Tomado de French y col., 1999)

El ganado persistentemente infectado o “portador” adquiere una inmunidad para toda su vida y además son resistentes a una enfermedad clínica cuando se desafían. Sin embargo, el ganado infectado persistentemente sirve como reservorio para *A. marginale* debido a que provee una fuente de sangre para infectar tanto por transmisión mecánica como biológica. El ganado *Bos taurus* (i.e., Holstein, Brown Swiss, o Hereford) son mayormente susceptibles a desarrollar una anaplasmosis aguda que el ganado Zebu o Creole (Aguirre, 1988). Las crías son menos susceptibles a una infección con *A. marginale* y, cuando estas se infectan, son menos susceptibles a la enfermedad clínica. Este fenómeno no está comprendido completamente, pero la remoción del bazo convierte a las crías totalmente susceptibles a la infección, y la anaplasmosis en ganado joven esplenectomizado a menudo es más severo que el se observa en ganado viejo.

Sin embargo, una vez que las crías se infectan, desarrollan infecciones persistentes y una inmunidad de por vida a la anaplasmosis.

La transmisión de *A. marginale* puede efectuarse tanto mecánicamente por moscas mordedoras o por fomites sanguíneos contaminados y biológicamente por garrapatas (Dikmans, 1950). La transmisión mecánica frecuentemente ocurre vía fomites sanguíneos contaminados, incluyendo agujas, sierras para descorne, pinzas para la nariz, instrumentos para tatuar, mecanismos para etiquetar, e instrumentos para castración. El mecanismo de transmisión por artrópodos ha sido reportado para dípteros chupadoras de sangre o para mosquitos del género *Tabanus*, y *Stomoxys*. Esa forma de transmisión mecánica se encuentra considerada como la principal ruta de diseminación de *A. marginale* en áreas de Centro y Sur de América y África en donde los vectores (garrapatas) no se encuentran presentes y en donde *Boophilus microplus*, la garrapata de ganado de las zonas tropicales, parece no ser el vector biológico de *A. marginale* (Figueroa, 1998).

Además de la transmisión mecánica y biológica, *A. marginale* puede transmitirse de madre a cría transplacentariamente durante la gestación (Zaugg, 1985).

La transmisión biológica de *A. marginale* es llevada a cabo por garrapatas y aproximadamente 20 especies de garrapatas han sido incriminadas como vectores alrededor del mundo. La transmisión puede ocurrir de estadio a estadio (transestadio) o dentro de un mismo estadio (intraestadio), mientras que la transmisión transovarica de una generación de garrapatas a la siguiente parece no ocurrir (Stitch, y col., 1989). La transmisión interestadio de *A. marginale* ha sido demostrada por las garrapatas hospederas *Boophilus annulatus* en México. La transmisión intraestadial de *A. marginale* es efectuada por las garrapatas del género masculino. Estudios recientes han demostrado que los machos *Dermacentor* pueden jugar un rol muy importante en la transmisión de *A. marginale* debido a que son infectadas persistentemente con *A. marginale* y pueden transmitirla repetidamente cuando la transfieren entre el ganado (Kocan, y col., 1992). La transmisión de *A. marginale* por las garrapatas macho puede ser un mecanismo importante en la transmisión de *A. marginale* por garrapatas, incluyendo *Boophilus spp* y *D. albipictus*. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la alimentación simultánea de la garrapata adulta no parece influenciar la dinámica de transmisión de *A. marginale*. El ciclo de desarrollo de *A. marginale* en garrapatas es complejo y coordinado con el ciclo de alimentación de las garrapatas (Kocan, y col., 1992) (Figura 4).

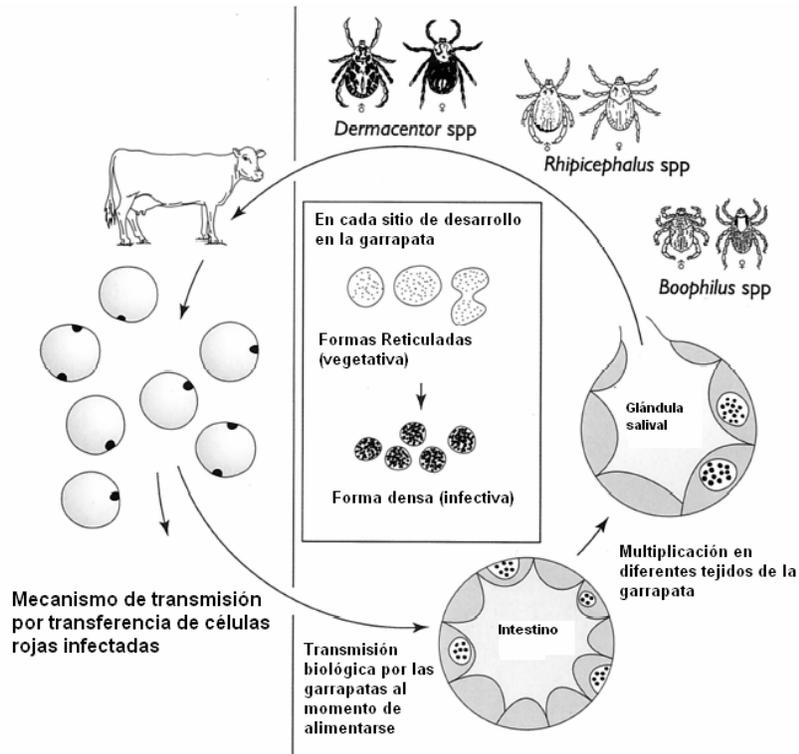


Figura 4. Representación esquemática del ciclo de desarrollo de *A. marginale* en ganado y en garrapatas. Los eritrocitos infectados son ingeridos por las garrapatas. El primer sitio de infección de *A. marginale* en las garrapatas son las células de la boca. Cuando las garrapatas se alimentan una segunda vez, diferentes tipos de tejidos de la garrapata se infectan, incluyendo las glándulas salivales, de donde la rickettsia es transmitida de vuelta al ganado. Se encuentran en células de garrapatas infectadas: en forma reticulada y densa. Las formas reticuladas parecen aparecer primero y representan el estado vegetativo, en el cual se divide por fisión binaria. De la forma reticulada cambia a la forma densa, la cual es la forma infectiva y puede sobrevivir extracelularmente (Palmer y col., 1999).

Los eritrocitos infectados que son introducidos cuando la garrapata se alimenta proveen una fuente de infección para las células del intestino. Posterior al desarrollo de *A. marginale* en las células intestinales, muchos otros tejidos de la garrapata se infectan, incluyendo las glándulas salivares, de donde las rickettsias son transmitidas hacia los vertebrados durante la alimentación.

En cada sitio de infección en garrapatas *A. marginale* se desarrolla dentro de vacuolas unidas a membranas o colonias. La primera forma de *A. marginale* observado en la colonia es la forma reticulada (vegetativa), la cual se divide por fisión binaria (Figura 5A), formando grandes colonias que pueden contener cientos de organismos.

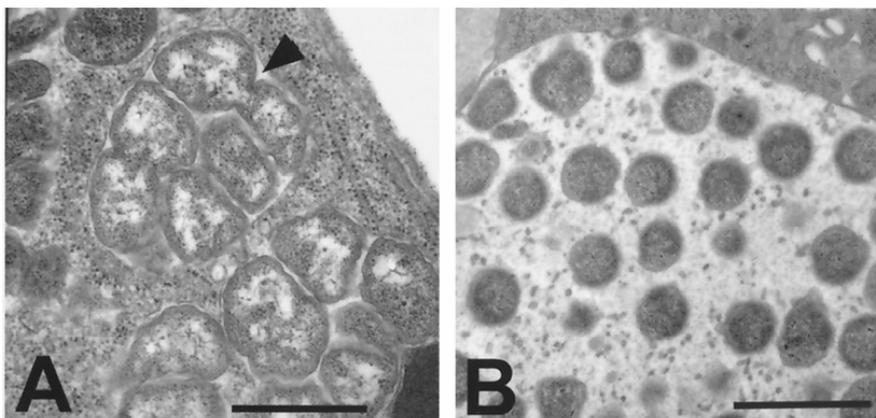


Figura 5. Micrografías electrónicas de los estadios de desarrollo de *A. marginale* dentro de las colonias en las células de la garrapata. (A) Formas reticuladas dentro de una colonia, dividiéndose por fisión binaria (cabeza de flecha). (B) Formas densas dentro de una colonia en una célula de garrapata infectada. Barras: 1  $\mu\text{m}$ . (Tomado de Kocan y col., 2003)

La forma reticulada entonces cambia a la forma densa (Figura 5B), la cual es la forma infectiva y ésta puede sobrevivir fuera de la célula hospedera. El ganado llega a infectarse con *A. marginale* cuando las formas densas se transmiten durante la alimentación de la garrapata vía las glándulas salivares.

### 2.1.3.1 Proteína asociada al apéndice

La movilidad es muy importante en la invasión y replicación de los patógenos bacterianos intracelulares. *Anaplasma marginale* a diferencia de muchos patógenos bacterianos, parasita eritrocitos maduros. Dentro del eritrocito, *A. marginale* se replica en una vacuola parasitófora formada de la invaginación de la membrana eritrocítica. Durante la replicación dentro de esta vacuola, una estructura descrita inicialmente como “cola” y posteriormente descrita como un apéndice de inclusión se identifica en la cara citoplasmática del eritrocito de la membrana de la vacuola. Varios estudios han indicado que los apéndices de inclusión contienen un componente derivado del parásito. Se ha demostrado recientemente que este apéndice de inclusión también contiene filamentos de actina del hospedero (F-actina). Entonces, a diferencia del patrón clásico en el cual la actina se ensambla en la superficie bacteriana, el apéndice asociado a *A. marginale* es ensamblado en la superficie externa de la vacuola. Cualquier proteína codificada por el parásito asociada con el apéndice de inclusión deberá ser secretada a lo largo de la membrana bacteriana y la que rodea a la vacuola parasitófora. La falta de bacterias homólogas a *A. marginale* bien caracterizadas que desarrollen colas de actina durante la infección intracelular es consistente con las observaciones estructurales en las cuales la organización de los filamentos de actina en eritrocitos infectados con *A. marginale* difiere de otros organismos como *L. monocytogenes*. También es importante destacar que no hay evidencia de la presencia de una proteína originadora de la nucleación para la polimerización de actina. El entendimiento de cómo *A. marginale* ensambla los apéndices de actina y como la proteína asociada al apéndice puede influenciar el ciclo de invasión, replicación, y egreso de la célula hospedera puede proveer nuevas ideas de las interacciones patógeno-eritrocito (Stich y col., 2004).

### 2.1.3.2 Ganado persistentemente infectado

La recuperación de una infección aguda con organismos del orden de los *Rickettsiales* con frecuencia resulta en una infección persistente del hospedero (Goff y col. 1988). El ganado que sobrevive a una infección aguda desarrolla un estado de portador crónico que no puede ser detectado microscópicamente (Richey, 1981). El ganado portador, aunque se encuentra protegido contra una enfermedad clínica, mantiene la infección a niveles muy bajos de *A. marginale* y sirven como reservorios para la transmisión por artrópodos a ganado susceptible.

Kieser y colaboradores demostraron que los niveles de rickettsemia varían marcadamente en animales infectados persistentemente en animales analizados bimestralmente (de  $<10^3$  a  $>10^5$  eritrocitos infectados por mL). Dicha variación puede reflejar la multiplicación cíclica de *A. marginale*, evento consistente con la aparición de variantes antigénicas que no han sido previamente reconocidas por el sistema inmunitario del hospedero. Para determinar si la rickettsemia cíclica ocurre en el hospedero infectado persistentemente y para comparar el ciclo durante una infección aguda, utilizaron hibridación de ácidos nucleicos para cuantificar el desarrollo de la rickettsemia durante la infección aguda y persistente.

Los resultados obtenidos de ensayos elaborados por Kieser y colaboradores indican que la infección aguda con *A. marginale* presenta un incremento constante en la rickettsemia seguido por un decremento.

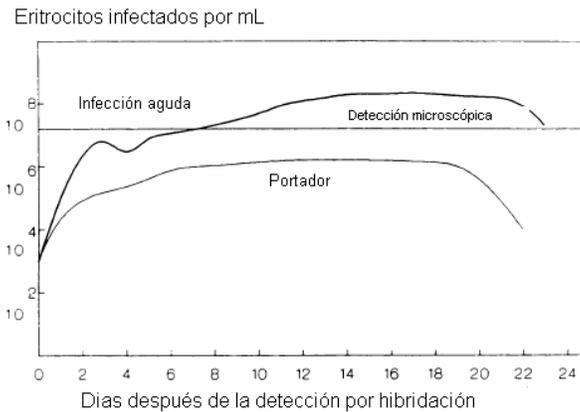


Figura 6: Desarrollo de la rickettsemia por *A. marginale* durante la infección aguda (infección aguda) y persistente (portador). Los niveles bajos de eritrocitos infectados con *A. marginale* fueron detectados utilizando hibridación con una sonda de RNA específica de 2.0 kilobases. La rickettsemia fue cuantificada por comparación de señales de hibridación por autoradiografía utilizando eritrocitos infectados en cantidades conocidas. Los niveles de rickettsemia de menos de  $5 \times 10^7$  eritrocitos infectados por mL fueron cuantificados utilizando microscopía. (Kieser y col. 1990).

Los niveles de rickettsemia del ganado con infección aguda presentan un pico de rickettsemia de más de  $10^8$  eritrocitos infectados por mililitro desarrollados de 14 a 18 días postdetección (Figura 6). Durante el ciclo normal de infección los niveles de rickettsemia se encontraron siempre por debajo de los límites inferiores de confiabilidad por examen citológico de sangre por microscopía.

El aumento y disminución de la rickettsemia durante la infección persistente es similar a aquella presentada durante la infección aguda. Esta similitud temporal entre las infecciones aguda y persistente sugiere que el mismo mecanismo del hospedero, una respuesta inmunológica primaria, puede controlar ambos ciclos de rickettsemia. La explicación a los hallazgos mencionados anteriormente se encuentra en que las diferentes variantes de *A. marginale* son expuestas en su superficie durante el parasitismo intracelular lo que permite un nuevo ciclo de invasión y multiplicación. Este mecanismo puede ser el responsable de la persistencia de un parásito intraeritrocítico obligado expuesto a la respuesta inmunológica competente. Una explicación alternativa para esta situación es que una respuesta inmunológica débil permite que una variante antigénica surja de nuevo. Sin embargo, el mantenimiento de altos títulos de anticuerpos, respuesta de linfocitos-T, y resistencia a desafíos homólogos en ganado persistentemente infectado indica que no existe una respuesta inmunológica débil (Eckblad y col., 1983). Además, se espera el desarrollo de una respuesta inmunológica anamnesica para controlar la rickettsemia en un periodo mucho más corto que el observado.

En contraste con otras infecciones por rickettsias, en la anaplasmosis, las variantes antigénicas presentan una tasa de variación alta, lo cual es necesario para la persistencia en el hospedero (McGuire y col., 1984). La habilidad de *A. marginale* para generar rápidamente variantes puede proveer un sistema modelo para el entendimiento de la variación antigénica y su rol en las infecciones persistentes por rickettsias.

#### 2.1.4 Antígenos de importancia inmunológica

Se han identificado proteínas en la superficie de *A. marginale* a partir de la cepa Florida por neutralización con anticuerpos policlonales (Palmer y col. 1984) las cuales fueron designadas

como Proteínas Principales de Superficie (MSPs); éstas son: MSP1 (31 kDa), MSP2 (36 kDa), MSP3 (86 kDa), y MSP4 (31 kDa) (Marilda y col. 1994).

Estas proteínas presentan un polimorfismo variable entre distintos aislamientos de *A. marginale*. Se encuentran en una estrecha relación intermolecular en la superficie de membrana de los cuerpos iniciales (Vidotto y col., 1994) y además pueden contener estructuras helicoidales con segmentos transmembrana, dominios para la constitución de complejos multiméricos y regiones que funcionan como secuencia señal (Barbet y Allred, 1991; Tebele y McGuire, 1991; Palmer y McElwain, 1995; Alleman y Barbet, 1996). La inmunización del ganado con membranas de *A. marginale* que contienen las proteínas de superficie induce inmunidad protectora contra la enfermedad clínica (Tebele y McGuire, 1991).

#### 2.1.4.1 Proteína Principal de la Superficie 1 (MSP1)

La proteína MSP1 fue originalmente descrita como AmF105 (Palmer y McGuire, 1984) y está compuesta por dos subunidades MSP1a y MSP1b, unidas por enlace disulfuro. MSP1 contiene un epítipo reconocible por anticuerpos monoclonales que neutralizan *A. marginale* in vitro. Este epítipo se encuentra localizado en un péptido de repeticiones en tándem de 20 a 29 aminoácidos (Allred y col., 1990). Los cuerpos iniciales purificados hemaglutinan eritrocitos de bovino y pueden ser inhibidos por anticuerpos contra MSP1a o MSP1b. Se ha demostrado que el complejo y las dos subunidades separadas, median la adherencia a los eritrocitos bovinos (McGuire y col., 1984), esto sugiere que MSP1a y MSP1b funcionan como adhesinas y se podrían requerir para la invasión de los eritrocitos, ya que anticuerpos específicos para MSP1 bloquean la unión de *A. marginale* a éstos. MSP1a es una adhesina para los eritrocitos de bovino y para las células de garrapata; mientras que MSP1b únicamente actúa en los eritrocitos (de la Fuente y col., 2001). Además, estos anticuerpos opsonizan los organismos vivos para la fagocitosis de los macrófagos (Cantor y col., 1993). Por otra parte la inmunización del ganado bovino con la proteína MSP1 nativa confiere un 100 % de protección contra la rickettsemia aguda y la enfermedad (Palmer y col., 1986; Palmer y col., 1989). La inmunización del ganado bovino con la proteína MSP1 nativa purificada confiere protección contra la rickettsemia aguda. Sin embargo, a diferencia de estos resultados, cuando se utiliza la proteína nativa, la inmunización con las proteínas recombinantes MSP1a, MSP1b o la combinación de ambas, no induce protección significativa (Palmer y McElwain, 1995). La MSP1b recombinante utilizada en los ensayos fallidos de inmunización se derivó de una copia del gen, el único miembro de la familia secuenciado hasta este momento (Barbet y Allred, 1991). Actualmente se sabe que existe coexpresión de al menos dos copias diferentes del gen, en la fase aguda de la anaplasmosis y la expresión de proteínas MSP1b con epitopes B variables (Camacho y col., 2000).

#### 2.1.4.2 Proteína Principal de la Superficie 2 (MSP2)

La proteína MSP2 está presente en la membrana como un tetrámero adyacente a las proteínas MSP1, MSP3 y MSP4. Sus subunidades están unidas mediante puentes disulfuro, y es relativamente inmunodominante (Palmer y col., 1988; Palmer y McElwain, 1995). Esta proteína es altamente polimórfica, con presencia de epitopes conservados, aunque presenta epitopes B diferentes, en las regiones polimórficas. Se ha demostrado la expresión de diferentes variantes antigénicas de esta proteína, durante la rickettsemia aguda (Eid y col., 1996). Las variantes que se presentan en cada ciclo de rickettsemia son reconocidas por el sistema inmunológico en ese momento, y el ciclo termina concomitantemente con una respuesta por anticuerpos específica para cada una de ellas. French y colaboradores (1999) demostraron que para MSP2 existen cuatro variantes verdaderamente antigénicas: V1, V4, V5 y V6; las cuales seguramente se encuentran

asociadas con la producción de anticuerpos contra MSP2. El mecanismo propuesto para la protección se basa en la producción de células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  para la activación coordinada de células B para la secreción de anticuerpos IgG2 opsonizantes y la activación de macrófagos por opsonización. La inducción de la respuesta de IgG2 posterior a una presentación de las variantes V5 y V6 indica que este tipo de activación mediada por IFN- $\gamma$  también ocurre en respuesta a las variantes MSP2 en una infección persistente. Aunque se ha demostrado la presencia de células T de memoria CD4<sup>+</sup> específicas contra MSP2, se desconoce cuantas otras células T específicas para otras variantes se producen. La conservación de la estructura genómica para la generación de variantes de MSP2 y de epítopes CD4<sup>+</sup> en *A. marginale* y *A. centrale* indica que estas dos especies presentan un repertorio similar de epítopes MSP2 al sistema inmune y esto puede ser responsable de la eficacia de protección contra *A. marginale* cuando se prueban vacunas de *A. centrale* (Brayton y col., 2002; Shkap y col., 2002).

El entendimiento actual de la mecánica de la inmunidad contra *A. marginale* se ha producido dados los experimentos con vacunas, de los cuales se pudo identificar a la proteína MSP2 como un inmunógeno inductor de protección (Palmer y col., 1988), y a partir de estudios de inmunidad por infección experimental. Después de la recuperación de la infección aguda, durante los cuales los niveles de rickettsemia exceden los 10<sup>9</sup> organismos por mL, el ganado permanece infectado persistentemente pero son inmunes a los altos niveles de rickettsemia y a la enfermedad en el caso de que sean desafiadas subsecuentemente ya sea homóloga o heterológamente. Las infecciones persistentes son asintomáticas y se caracterizan por ondas cíclicas de rickettsemia, en las cuales se refleja la emergencia y replicación de *A. marginale* expresando una variante antigénica de MSP2 (French y col., 1998). El análisis de las variantes de MSP2 ha revelado regiones amino y carboxi terminales altamente conservadas con un tercio de la parte central hipervariable. Esta región central representa el dominio de superficie primario y codifica para los epítopes de las células B inmunodominantes pero hipervariables (Eid y col., 1996). En contraste, las regiones conservadas flanqueantes son ricas en epítopes para células T e induce una fuerte respuesta del tipo CD4<sup>+</sup> contra MSP2 a pesar de la variación en el dominio central de la superficie. Se ha postulado que esta respuesta anamnesica por las células T provee una ayuda rápida para la respuesta primaria por las células B contra los epítopes hipervariables de la superficie y en el control de las variantes emergentes previas al pico de rickettsemia considerado para la enfermedad clínica. El papel de los epítopes conservados de las células T se encuentra avalado por la generación rápida de anticuerpos IgG2 específicos para cada variante después de su emergencia y por el control de la rickettsemia durante la infección persistente a un nivel de 100 o 1,000 veces por debajo del nivel establecido para la enfermedad clínica.

Este sitio hipervariable y multigénico provee la capacidad genética de la variación, y se ha demostrado (French y col., 1999) que los transcritos que codifican para una sola proteína MSP2 polimórfica son expresados en ciclos de rickettsemia secuencialmente (French y col., 1998). Sin embargo, unos cuantos tipos de variantes son recurrentes en picos subsecuentes; ya sea debido a que esta variante ha evadido la respuesta inmunológica existente o porque su emergencia no se encuentra relacionada con una presión inmunológica. Los tipos de variantes recurrentes siempre se han acompañado de la emergencia de variantes nuevas. La expresión de tipos recurrentes junto con variantes nuevas puede contribuir a la formación de nuevos epítopes que no han sido reconocidos previamente por el sistema inmunológico. Debido a que MSP2 dimeriza en la superficie de *A. marginale*, la expresión simultánea de variantes en un solo organismo puede resultar en la formación de epítopes conformacionalmente únicos. Si unos pocos organismos expresan una combinación de variantes de MSP2 única les será posible escapar al ataque inmunológico, luego habrá una nueva población de *A. marginale* en el pico subsecuente de rickettsemia expresando una combinación de un tipo recurrente y de una variante nueva generada. Otra posibilidad es que otras regiones hipervariables encontradas en la región 59 o 39 en la parte central y polimórfica resulten en la expresión de variantes que son idénticas. Los

anticuerpos específicos para cierta variante de MSP2 deben estar ausentes cuando la variante emerge por primera vez pero deben ser detectables cuando el ciclo de rickettsiemia termina.

#### 2.1.4.3 Proteína Principal de la Superficie 3 (MSP3)

La MSP3 está codificada por una familia multigénica, es también inmunodominante durante las infecciones natural y experimental. Se puede encontrar además en *A. centrale* y *A. ovis* (Palmer y McElwain, 1995). Es estructural y antigénicamente diferente entre cepas de *A. marginale*, presenta polimorfismo de talla entre aislamientos geográficamente diferentes (Alleman y Barbet, 1996) y es expresada por un simple "locus", en el cual la variación de los genes *mSP3* expresados es generada por recombinación utilizando pseudogenes (Meeus y col., 2003).

Muestra una identidad de 55% con los aminoácidos del amino terminal de MSP2. Además, se ha demostrado que existen epítopes conservados entre MSP2 y MSP3 mediante el reconocimiento *in vitro* de células monoclonales CD4<sup>+</sup>; concluyendo que existen muchos antígenos con epítopes cruzados y que algunos de éstos todavía no se han caracterizado (Brown y col., 1998). Los experimentos de vacunación con MSP3 muestran una protección parcial y han mostrado que la proteína es capaz de inducir la producción de cantidades grandes de anticuerpos (Palmer y McElwain, 1995). McGuire y colaboradores (1991) analizaron MSP3 por ensayos de inmunoprecipitación y demostraron que ésta es adecuada para el desarrollo de una prueba de diagnóstico para la anaplasmosis mediante la producción de un péptido sintético basado en la secuencia de MSP3; el cual, debe ser probado más ampliamente.

#### 2.1.4.4 Proteína Principal de la Superficie 4 (MSP4)

La proteína MSP4, es altamente conservada entre los distintos aislamientos de *A. centrale* y *A. marginale*. Esta proteína contiene bloques de aminoácidos relacionados con la proteína MSP2 (Alleman y Barbet, 1996). Sus epítopes conservados son de gran importancia tanto para el diagnóstico como para el desarrollo de una vacuna (Tebele y col., 1991; Oberle y col., 1993). Se ha comprobado que funciona como adhesina al igual que la MSP2 y las subunidades del complejo MSP1 y que tanto la nativa como la recombinante protegen a animales inmunizados en retos con cepas homólogas (McGarey y col., 1994). Trabajos recientes en inmunización de ganado con membranas de *A. marginale* han demostrado una protección del ganado utilizando las fracciones externas e internas de los cuerpos iniciales contra un desafío (Tebele y col., 1991). Interesantemente, la única proteína que aparentemente se encuentra conservada en estas fracciones es aproximadamente del mismo tamaño que MSP4. Esta proteína, si se encuentra en ambas fracciones puede ser la base de la inmunidad protectora.

La proteína MSP4 no ha sido ampliamente investigada como candidata para una vacuna. La detección del gene *mSP4* en bibliotecas genómicas de *A. marginale* por hibridación estándar y otros procedimientos de monitoreo habían sido totalmente infructuosas; hasta que Oberle y colaboradores en 1993 originaron un método de secuenciación genético que no necesita de una clonación molecular previa utilizando únicamente la secuencia de la proteína en su extremo Amino y la PCR. Una de las características más importantes descubiertas a partir de dicho estudio es que ésta es una proteína conservada no solamente a nivel molecular sino también genético. Los ciclos de parasitemia en infecciones crónicas sugieren que la variación antigénica también ocurre entre aislados (Kieser y col., 1990). MSP4 a diferencia de otras proteínas se encuentra codificada por un solo gen, restringiendo su potencial de recombinación. Aunque el mecanismo exacto de la variación antigénica se desconoce por completo, los antígenos que participan en funciones críticas para la supervivencia del parásito difícilmente varían bajo una presión inmunológica. Una proteína conservada como esta, en caso de que fuere protectora, parece ser la base ideal para una vacuna contra la anaplasmosis bovina. El reconocimiento de MSP4 por el suero de ganado inmunizado con proteínas de membrana externa establece la localización de esta proteína y sugiere que

puede tener una participación en la inducción de la inmunidad en estos animales. Sin embargo, la falta de reactividad con el suero de animales inmunizados con proteínas de la membrana interna sugiere que la proteína de la membrana interna de 31 kDa puede no ser MSP4.

El suero de ganado que ha sido infectado con *A. marginale* exhibe títulos variables de MSP4. Este suero no reconoce consistentemente la proteína recombinante o silvestre de MSP4 ni por ELISA ni por Western blot. Consecuentemente, el antígeno silvestre de MSP4 puede no estar siendo reconocido o débilmente reconocido inmunogénicamente y puede no ser útil como una herramienta de diagnóstico. Un alto título de anticuerpos en una respuesta inmunitaria no necesariamente correlaciona con una capacidad protectora. La generación de una respuesta por anticuerpos contra una proteína conservada como MSP4 puede proveer una protección contra aislados heterólogos de *A. marginale*. Hay cierta evidencia que sugiere que MSP4 se encuentra en la superficie de los cuerpos iniciales de acuerdo a ensayos con marcaje con lactoperoxidasa y por reconocimiento por suero de ganado inmunizado únicamente con membranas externas de cuerpos iniciales.

#### 2.1.4.5 Proteína Principal de la Superficie 5 (MSP5)

Otra de las proteínas, con una talla conservada entre todos los aislamientos y presente en todas las especies conocidas de *Anaplasma spp.*, es la MSP5. Es de poca complejidad estructural y muy importante en el ciclo de vida celular, aunque se desconoce exactamente su función. Se encuentra formando un dímero en la membrana, cuyas subunidades se unen por puentes de disulfuro. La proteína nativa y la recombinante muestran un epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal AnaF16C1 (Visser y col., 1992), presente en los estadios del parásito en la garrapata y en la forma intraeritrocítica, utilizándose en ensayos de ELISA competitivo, para la identificación de los animales infectados persistentemente (Knowles y col., 1996). Este epítipo induce altos títulos de anticuerpos en todas las especies infectadas, incluyendo bovinos, chivos y carneros (Visser y col., 1992; Ndung'u y col., 1995; Knowles y col., 1996; Munodzana y col., 1998; Torioni y col., 1998). La conservación del tamaño molecular de MSP5 entre cepas, tiene un contraste marcado con el polimorfismo observado para otras MSPs de *A. marginale*, principalmente MSP1a (Allred y col., 1990) y MSP2 (Oberle y col., 1988). Kano y col., (2002), realizaron la caracterización antigénica de aislados de *A. marginale* de diferentes regiones geográficas de Brasil y en todos los aislados estudiados estuvo presente la proteína MSP5, lo que coincidió con estudios previos realizados que demostraban la conservación de esta proteína en aislamientos de América, África e Israel (Visser y col., 1992; Knowles y col., 1996; Vidotto y col., 1998).

Oliveira y col., (2003), sugieren que esta proteína puede ser utilizada como antígeno para el diagnóstico serológico debido a la conservación de los epítopos para las células B entre diferentes aislamientos estudiados, corroborando la hipótesis de que este polipéptido tiene una función fundamental en el ciclo biológico del hemoparásito, estando presente durante las fases aguda y crónica de la infección bovina (Knowles y col., 1996).

La estructura de MSP5 se puede presentar como un monómero unido intramolecularmente por enlaces disulfuro o como un dímero; ambos en la presentes en la membrana de la rickettsia.

#### 2.1.5 Impacto económico de la Anaplasmosis bovina.

La anaplasmosis bovina causa una pérdida económica importante en la mayoría de los países, principalmente debido a la alta morbilidad y mortalidad en hatos de ganado susceptible. Las pérdidas debidas a la anaplasmosis son medidas a través de varios parámetros: pérdida baja de peso, reducción en la producción de leche, abortos, el costo del tratamiento de la

anaplasmosis, y mortalidad. Sin embargo, algunos estudios controlados han sido llevados a cabo para determinar las pérdidas anuales exactas causadas por la anaplasmosis por cada país, debido a que las pérdidas generales han sido reportadas como altas, tremendas y enormes. Sin embargo, las pérdidas anuales actuales en ganado de carne en Latino América se han calculado en aproximadamente \$800 millones, correspondiendo para México según reportes de la OIE (2004) a 250 focos de infección y 777 casos reportados; las estrategias de control para dichos casos se resume en: rastreo, vigilancia epidemiológica, control de vectores, cuarentena fronteriza y restricción de desplazamientos en el interior del país. Sin embargo, el mayor impacto económico ocasionado por la anaplasmosis a la producción de ganado en los trópicos es en los programas de mejoramiento genético públicos o privados como el Programa de “Mejoramiento Genético” y el de “Ganado Mejor” propuestos e impulsados por la SAGARPA.

#### 2.1.6 Medidas de control contra la Anaplasmosis bovina.

Las medidas de control de la anaplasmosis no han cambiado mucho en los últimos 60 años. Varían dependiendo de la locación geográfica e incluyen control de artrópodos mediante la aplicación de acaricidas, por administración de antibióticos, y por vacunación. El control de los artrópodos no es práctico en diferentes áreas y puede únicamente prevenir parcialmente en contra de la transmisión de *A. marginale*, lo cual puede ocurrir tanto mecánica como biológicamente. La quimioterapia, probablemente utilizada más a menudo para la prevención de la anaplasmosis en Estados Unidos más que en otras áreas de mundo, es cara y a menudo no aplicable a cierto ganado, y la utilización de antibióticos intensivamente trae el riesgo de una selección de cepas resistentes. La vacunación ha sido una forma económica y efectiva de control de la anaplasmosis bovina a nivel mundial.

Las vacunas para el control de la anaplasmosis pueden dividirse en dos: vacunas vivas y muertas. Ambos tipos de vacunas se basan en el uso de *A. marginale* de eritrocitos bovinos y producen una inmunidad protectora que reduce o previene una enfermedad clínica, pero estas vacunas no previenen que el ganado se infecte persistentemente con *A. marginale*. La protección contra la enfermedad clínica por organismos muertos o atenuados es posible, pero la variación de la efectividad para proveer una inmunidad cruzada protectora contra aislados heterólogos limita la utilidad de estas vacunas. Las infecciones persistentes en el ganado contribuyen a una diseminación de *A. marginale* debido a que este ganado sirve como reservorio de la infección para una transmisión mecánica o una fuente de infección por garrapatas. Los animales que se recuperan de una infección con *A. marginale* se encuentran protegidos contra el desafío homólogo pero no necesariamente contra el heterólogo; la incapacidad de las vacunas actuales de proteger contra desafíos heterólogos, resulta en una enfermedad clínica severa (Kuttler y col., 1993).

Investigaciones previas han demostrado que la inmunización de ganado con extractos de las membranas interna o externa de los cuerpos iniciales de *A. marginale* pueden producir inmunidad protectora. Estas fracciones membranales difieren en su morfología, en su composición peptídica, y en sus especificaciones antigénicas con respecto a la producción de anticuerpos de acuerdo a la fracción inoculada. Estos datos establecen la existencia de una correlación entre los títulos de los anticuerpos de las fracciones de las membranas externas y la inmunidad protectora (Tebele y col., 1991). La membrana externa de *Anaplasma marginale* se encuentra compuesta por MSP's unidas covalente y no covalentemente en complejos multiméricos; consecuentemente, la inducción de la efectividad de los anticuerpos contra los epítopes de estas proteínas puede requerir el mantenimiento de las estructuras secundarias hasta cuaternarias de las proteínas MSP's (Vidotto y col., 1994).

A pesar de las severas pérdidas económicas debido a la anaplasmosis bovina, las estrategias de vacunación y diagnóstico actuales son inadecuadas. Los obstáculos incluyen las dificultades del diagnóstico de animales infectados persistentemente y la variabilidad antigénica

entre los aislados de *A. marginale*. Las investigaciones llevadas a cabo en las últimas décadas han contribuido enormemente a nuestro conocimiento de la composición antigénica de *A. marginale* y el rol de las MSP's en el desarrollo de la inmunidad protectora a la infección. Sin embargo, al día de hoy, no se han desarrollado muchas vacunas que utilicen tecnologías moleculares.

Una estrategia importante para el desarrollo de una vacuna efectiva es la identificación de epítopes protectivos expuestos en la superficie. La conservación genética y antigénica de las proteínas protectoras puede ser de importancia crítica para una profilaxis efectiva, debido que los aislados de *A. marginale* varían ampliamente en su estructura proteica, antigenicidad, morfología y virulencia.

## 2.2 Despliegamiento en Bacteriófago (Phage display)

Desde su primera descripción el despliegamiento de péptidos y proteínas en el fago filamentoso se define como una técnica de selección *in Vitro* que hace posible que polipéptidos con propiedades especiales sean extraídos a partir de una gran colección de variantes. Un gen de interés es fusionado a uno que codifica para una proteína de la superficie del fago, lo cual resulta en partículas fágicas que despliegan la proteína codificada y su gen, proveyendo un enlace directo entre el fenotipo y el genotipo. Esto permite que las bibliotecas de fagos sean sujetas a un paso de selección (por ejemplo: cromatografía de afinidad o biotamizado [biopanning]), y las clonas recuperadas pueden ser identificadas por secuencia o amplificadas para rondas posteriores de selección. Desde su descripción inicial en la investigación del Dr. Smith (1985); el despliegamiento en fago ha llegado a establecerse como un método poderoso para la identificación de polipéptidos con propiedades innovadoras.

Los fagos filamentosos son ideales en diferentes formas para su uso como vehículos de clonación y principalmente para el despliegamiento. Su genoma es pequeño y tolera inserciones en regiones esenciales; la construcción de bibliotecas y su clonación se facilitan por la habilidad de aislar tanto ADN de hebra sencilla como doble (ADNs y ADNhd), y por la disponibilidad de vectores sencillos basados en plásmidos; las proteínas de la superficie pueden ser modificadas con la retención de la infectividad; el bacteriófago puede acumularse en altos títulos debido a que su producción no mata a la célula; y las partículas fágicas son estables a un amplio rango de condiciones de selección potenciales.

### 2.2.1 Biología del fago filamentoso

Los fagos filamentosos constituyen una gran familia de virus bacterianos que infectan varios tipos de bacterias gram negativas. La característica que los define es un genoma de hebra sencilla, circular encapsulado en una estructura larga parecida a un tubo flexible compuesta de miles de copias de una proteína de superficie principal, con unas proteínas poco menores en las puntas. El genoma es pequeño – una docena de genes empacados muy juntos y una región intergénica (RI) que contiene secuencias necesarias para la replicación del ADN y su encapsidación. A diferencia de la mayoría de los virus bacterianos, los fagos filamentosos son producidos y secretados a partir de bacterias infectadas sin matar a la célula por lisis (Figura 7).

La mayoría de la información acerca de los bacteriófagos filamentosos deriva de aquellos que infectan a *E. coli* como *M13*.

#### 2.2.1.1 Estructura de la partícula fágica

Los fagos filamentosos tienen un diámetro de aproximadamente 6.5 nm y un largo determinado por el tamaño de su genoma. La clonación del ADN en regiones no esenciales del genoma puede crear un fago más grande, aunque entre más largos sean, son más susceptibles a romperse.

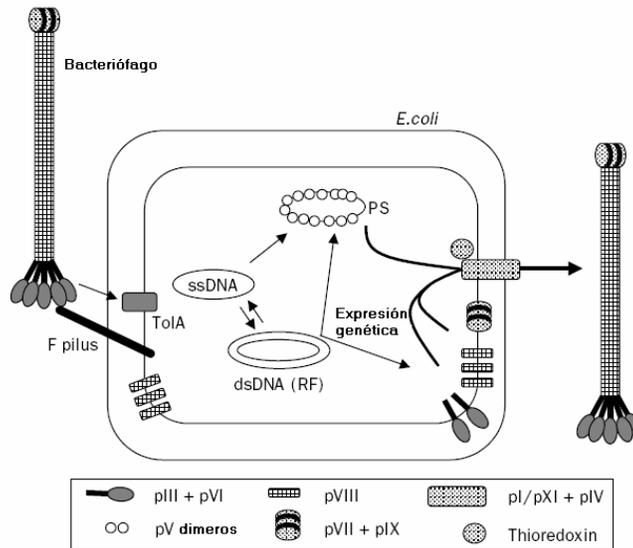


Figura 7: Ciclo de vida el bacteriófago filamentosos M13. La unión secuencial de la proteína pIII a la punta del F-pilus y posteriormente al complejo de la proteína Tol resulta en la despolimerización de las proteínas de la superficie fágica, su deposición en la membrana citoplasmática (donde se haya disponibles para su reutilización), y la entrada del ADN de hebra sencilla el citoplasma. El ADN es convertido por las enzimas del hospedero en la Forma Replicativa (FR) de doble hebra, el molde para la expresión genética del fago. La progenie de ADN de hebra sencilla, cubierta por dímeros de pV, son los precursores de los viriones. Un complejo multimérico que se encuentra en ambas membranas – compuesto por pI, pXI, pIV, y la proteína citoplasmática del hospedero tioredoxina – media la conversión del complejo pV-ADNs a viriones y también la secreción de los viriones de la célula. Este proceso involucra la remoción de los dímeros de pV y su reemplazo por las cinco proteínas de superficie que residen en la membrana citoplasmática. (Tomado de Russel y col., 2003).

Las partículas fágicas se encuentran compuestas por cinco proteínas de superficie (Figura 8). El tubo hueco que rodea el ADN de hebra sencilla se encuentra compuesto por miles de copias de la proteína principal de la superficie de 50 residuos, la proteína pVIII, orientada a 20° del eje de la partícula y sobrepuestos como escamas para formar una hélice dextrógira. El filamento se mantiene unido por interacciones entre las secciones medias hidrofóbicas de las subunidades adyacentes. Exceptuando por los residuos N-terminales expuestos en la superficie, la proteína pVIII forma una sola y continua  $\alpha$ -hélice. Los cuatro residuos cargados positivamente cercanos al carbono terminal de pVIII se encuentran en la superficie interna del tubo e interactúan con los fosfatos del ADN viral de hebra sencilla.

Los extremos de la partícula pueden distinguirse en micrografías electrónicas. En el extremo romo contiene varias copias (3-5) de las proteínas pVII y pIX, dos de las proteínas traducidas ribosomalmente más pequeñas conocidas (33 y 32 residuos respectivamente). Sin embargo, la evidencia inmunológica indica que al menos una de las pIX se encuentra expuesta y las regiones variables de los anticuerpos han sido desplegadas exitosamente en el amino terminal de la proteína pVII y pIX. El ensamblaje del fago empieza en los extremos de pVII- pIX, y en la ausencia de cualquiera de estas proteínas, no se forma ninguna partícula.

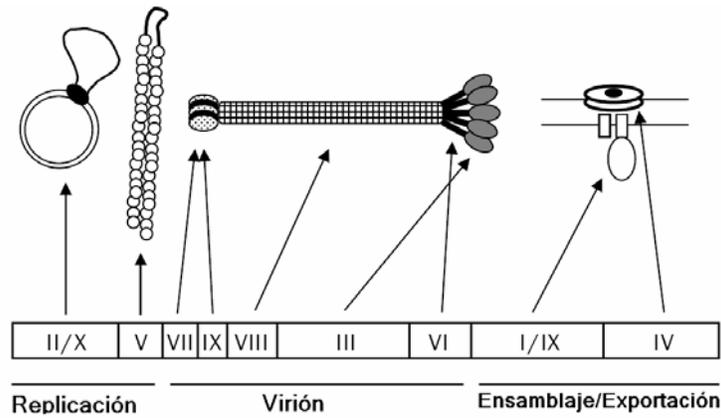


Figura 8: Genes y productos genéticos del bacteriófago filamentoso M13. El gene II codifica para pIII, la cual se une en la parte intergénica del ADN de doble hebra y hace una unión con la hebra positiva, iniciando la replicación por medio de las proteínas del hospedero. La proteína pX se requiere posteriormente durante la infección para la modulación de la cantidad de ADN de hebra sencilla que se va acumulando. El gene V codifica para la proteína que se une al ADN de hebra sencilla. Los genes VII y IX codifican para dos proteínas pequeñas localizadas en las puntas del virus; la cual es la primera en emerger de la célula durante el ensamblaje. El gene VIII codifica para la proteína principal de superficie, y los genes III y VI para las proteínas localizadas el final del virion y que se encargan de la mediación de la terminación del ensamblaje, liberación del virión y de la infección. el gene I codifica para dos proteínas citoplasmáticas membranales, pI y la pXI; el gene IV codifica para una proteína que funciona como un canal multimérico membranal exterior a través del cual el fago sale de la bacteria. Nótese que el genoma es de hecho circular, pero en este diagrama se muestra lineal únicamente con fines de claridad. (Tomado de Russel y *col.*, 2003).

El extremo puntiagudo contiene aproximadamente cinco copias de la proteína pIII y de la pVI, ambas de las cuales son necesarias para que el bacteriófago se desprenda de la membrana celular; la proteína pVI es degradada en células que carecen de la proteína pIII, lo que sugiere que estas proteínas se incorporan a la membrana celular antes de su incorporación a las partículas fágicas. Pueden ser aisladas a partir de los fagos en forma de complejos. La disposición de la proteína pVI en la partícula todavía es desconocida, pero la pVI con fusiones en el carbono terminal pueden ser incorporadas al fago, lo que sugiere que esta porción de la proteína pVI de 112 residuos puede encontrarse expuesta.

Se conoce más a cerca de la proteína de 406 residuos pIII, la proteína más comúnmente utilizada para el desplegamiento (Figura 9). Su dominio N terminal, el cual es necesario para la infectividad del fago, se encuentra expuesto en la superficie y forma pequeños pomos que a menudo pueden verse que sobresalen del extremo puntiagudo de la partícula en micrografías electrónicas. Se han definido tres dominos de la proteína pIII, dos en el N-terminal (N1 y N2) los cuales se cree que interactúan intramolecularmente en base a un análisis cristalográfico. Los tres dominos se encuentran separados por dos conectores presumiblemente flexibles que se encuentran caracterizados por repeticiones de secuencias ricas en glicina. Los 132 residuos finales, incluyendo el dominio del C-terminal son necesarios y suficientes para que la pIII sea incorporada en la partícula fágica y para mediar la terminación del ensamblaje y liberación del fago de la célula; este dominio probablemente se encuentra enterrado en la partícula.

El genoma de hebra sencilla del fago se encuentra orientado de cierta manera dentro de la partícula fágica. Su orientación viene determinada por la señal de empacamiento (SE), localizado en la región intergénica no codificante del genoma. La señal de empacamiento, es una horquilla imperfecta pero extremadamente estable, se encuentra posicionada al final de las proteínas pVIII y pIX de la partícula y es necesaria y suficiente para llevar a cabo una encapsidación circular del ADN de hebra sencilla en las partículas fágicas. Algunas substituciones de aminoácidos en las

proteínas pVIII, pIX y pI permiten que hebras de cadena sencilla que carecen de una señal de empaquetamiento sean encapsadas; no se conoce si el ADN se orienta al azar en dichas partículas o si alguna pequeña región duplex sirve como una señal secundaria.

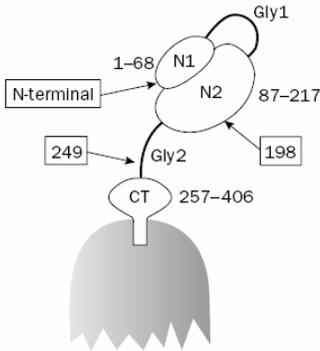


Figura 9. Estructura del dominio de la proteína pIII y sus puntos de fusión para el desplegamiento. Se muestran tres dominios para pIII: de N a C-terminal, los dominios N1, N2 y C-terminal se encuentran separados por regiones ricas en glicina. El carbono terminal se encuentra enterrado en la partícula fágica y se requiere para el ensamblaje del virión. Las tres posiciones en las cuales se realizan más comúnmente el desplegamiento se encuentran indicadas en un rectángulo; los números refieren la cantidad de residuos en la secuencia de la proteína madura. Nótese que la fusión en la posición 198 deja un residuo de cisteína impar en el dominio N2, lo que puede interferir con el desplegamiento. (Tomado de Russel *v col.*, 2003)

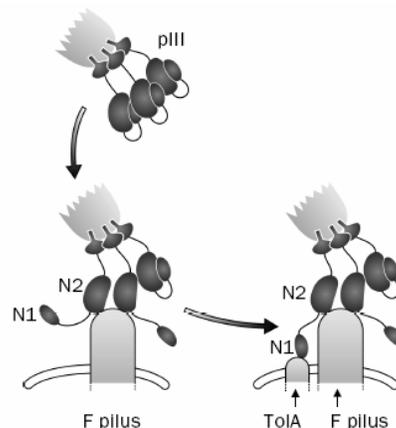
### 2.2.1.2 Infección

Todos los fagos filamentosos que han sido caracterizados utilizan el pili, los cuales son apéndices celulares superficiales, como receptores. Hay muchos tipos diferentes de pili. El fago de *E. coli* utiliza un pili de auto-transmisión que media la transferencia del plásmido que los codifica a la bacteria receptora.

La infección normalmente inicia cuando el dominio N2 de la proteína pIII se une a la punta del pilus. Como debiera esperarse debido a la baja abundancia del F pili (solo unos cuantos por célula) y el tamaño pequeño del blanco que presentan sus extremos, el rango y eficiencia de la infección de un cultivo bacteriano es mejorado utilizando una gran cantidad de fagos por cada célula y una alta densidad celular (Figura 10). Sin embargo, si la densidad alta se alcanza por células creciendo que han dejado atrás la fase Log, la expresión del pilus decrece y por lo tanto la infectividad se ve comprometida.

El pili generalmente se ensambla y desensambla continuamente, esto, posiblemente estimulado por la unión de los fagos, atrae a los fagos más cerca de la superficie celular. Después de que el pilus se une a N2, el dominio N1 se libera de su interacción normal con N2, lo cual lo hace disponible para que se una a la proteína TolA del hospedero, la cual se extiende a lo largo del periplasma de la membrana citoplasmática. La forma como el fago penetra la membrana exterior y la capa de peptidoglicanos todavía es desconocida. Para la infección del fago se requieren tres proteínas Tol (Q, R y A), todas proteínas membranales citoplasmáticas integrales, las cuales son absolutamente requeridas para la infección del fago. Estas median la despolimerización de las proteínas de la superficie del fago en la membrana citoplasmática y la traslocación del ADN viral de hebra sencilla en el citoplasma bacteriano, aunque los detalles moleculares de cómo esto se lleva a cabo todavía no se han determinado.

Figura 10: Infección de *E. coli* por M13. La infección se inicia con la interacción del dominio N2 de pIII con el F pilus. Esta interacción libera el dominio N1 de su interacción intramolecular con N2, lo que permite que se una a un dominio discreto (D3) de la proteína bacteriana TolA. Los pasos subsiguientes todavía no se encuentran caracterizados. (Tomado de Russel y col., 2003).



### 2.2.1.3 Replicación

Desde la entrada del ADN de hebra sencilla del fago (la hebra +, que tiene la misma polaridad que el RNAm), las RNA y ADN polimerasas y topoisomerasas del hospedero lo convierten a doble hebra, una molécula superenrollada llamada Forma Replicativa (FR). La FR sirve como molde para la expresión genética del fago, y esta expresión – en particular, la síntesis de pII, una enzima cortadora en sitios específicos – es necesaria para la replicación posterior. A través de un mecanismo de rodamiento circular, pII une la hebra + de la FR en un sitio específico en la región intergénica no codificante del genoma del fago, y el extremo 3' de la unión es elongado por la ADN polimerasa III del hospedero utilizando la hebra – como molde. La hebra + original es desplazada por la helicasa conforme la hebra + nueva es sintetizada, y cuando una ronda de replicación se completa, la hebra + desplazada se recirculariza por la actividad de la pII y de nuevo se convierte en la FR. La síntesis de la hebra – requiere un iniciador de RNA. El iniciador es generado por la RNA polimerasa, la cual inicia la síntesis en un sitio inusual en la región intergénica de la hebra + consistente de dos horquillas adyacentes que incluyen un promotor de -35 y -10 motivos separados por una región de hebra sencilla.

Durante las fases tempranas de la infección, cuando la concentración de la pV es baja, las hebras recién sintetizadas son convertidas inmediatamente a su FR, y tanto las FR como las proteínas del fago se incrementan exponencialmente. Conforme su concentración se incrementa, la pV se une cooperativamente a nuevas hebras +, previniendo el acceso a la polimerasa y bloqueando su conversión a la forma replicativa. La pX reiniciadora, la cual es idéntica a 111 residuos del C-terminal de pII, se requiere para una acumulación estable de las hebras sencillas en esta etapa, pero el mecanismo mediante el cual esto actúa permanece desconocido. pV es dimérica, con la superficie de interacción de las subunidades opuesta a la superficie de unión a ADN.

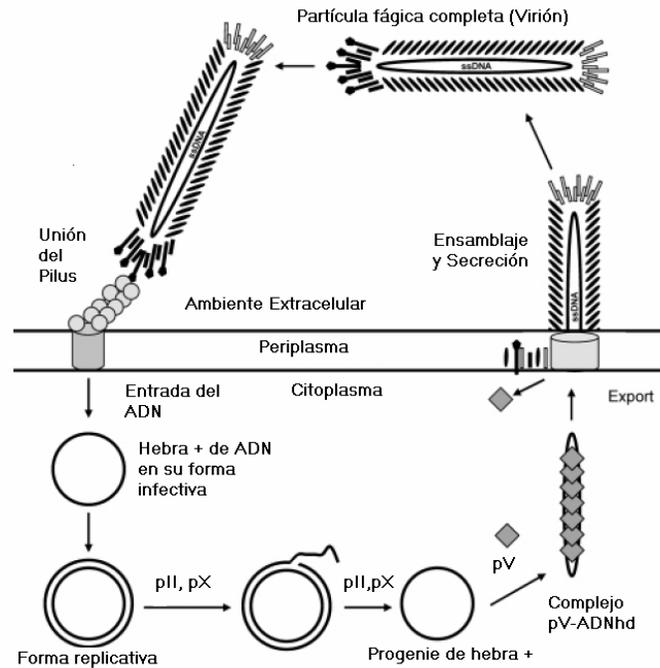


Figura 11. Ciclo de vida de M13. Las partículas fágicas se unen a *E. coli* por su pilus, el cual se encuentra codificado en genes que se llevan en el factor- F. Después de la unión con el fago, el pilus se retrae, atrayendo a la partícula a la superficie celular. Entonces, el dominio N-terminal (N1) de pIII interactúa con la proteína unida a la membrana TolA. La hebra sencilla de ADN de la partícula fágica (hebra +) se introduce a la bacteria a través de un proceso que todavía no se comprende totalmente, y es entonces cuando es convertida a ADN de doble hebra (forma replicativa) por las proteínas de *E. coli*. Las proteínas pII y pX, se encuentran envueltas en el proceso de amplificación del genoma viral, el cual termina con la producción de varias copias de hebra doble de ADN del fago. Dichas hebras son protegidas con la pV. Luego el complejo interactúa con la maquinaria exportadora, la cual simultáneamente ensambla y secreta la partícula viral utilizando una serie de proteínas de superficie del fago que han sido previamente insertadas en la membrana externa. Finalmente, la partícula viral es liberada de la célula, sin matarla, y la pV es reciclada. (Tomado de Kehoe y col., 2005)

Entonces desde la unión, el arreglo de los dímeros en posición opuesta colapsa la hebra circular sencilla en una estructura parecida a una vara en la cual ésta se enreda. El ADN se encuentra orientado en un complejo, con la horquilla de la secuencia de empacamiento saliendo por un extremo, presumiblemente debido a que pV une ADN de doble hebra débilmente. El complejo pV/ADN de hebra sencilla es el sustrato para el ensamblaje del fago.

#### 2.2.1.4 Genes y expresión genética

El genoma del fago contiene aproximadamente 6400 nucleótidos contenidos en nueve genes empacados estrechamente, y una región no codificante (la región intergénica) la cual contiene los orígenes de replicación para la síntesis de las hebras + y - además de la señal de empacamiento. Dos de los genes de los fagos (I y II) tienen sitios de iniciación de la traducción internos de los cuales se producen proteínas reiniciadoras (cuya secuencia es idéntica al tercio del carboxilo terminal de la proteína completa). En cada caso, tanto la proteína reiniciadora y la completa son necesarias para la producción exitosa del fago. De las 11 proteínas codificadas por el fago, tres se requieren para regenerar el ADN de hebra sencilla (pII, pX y pV), tres se requieren para el ensamblaje del fago (pI, pXI y pIV), y cinco son componentes de la partícula fágica (pIII, pVI, pVIII y pIX).

Todas las proteínas fágicas son sintetizadas simultáneamente, aunque hay diversos mecanismos para asegurar que cada una de ellas se produzca a una tasa adecuada. Existen diferencias en los promotores y en la fuerza del sitio de unión al ribosoma o su accesibilidad. Una débil señal de terminación dependiente de rho en el inicio del gene I limita su transcripción, y el largo número de codones no utilizados reduce la tasa de traducción. Por otro lado, los transcritos sobrepuestos que provienen de múltiples promotores (hay solo dos terminadores) y múltiples eventos de procesamiento de RNA incrementan la abundancia de los RNAs de los genes que se encuentran cerca de los terminadores.

Esto se traduce en altos niveles de pV y pVIII, las proteínas que se requieren en mayores cantidades.

En etapas posteriores de la infección, la cantidad de las proteínas del fago y la síntesis del ADN disminuyen. Esto ocurre cuando la concentración de pV secuestra las hebras + y previene su conversión a la forma replicativa, el molde para la expresión genética. Además, un exceso de pV hace que se una a una estructura tetraplex de los RNA mensajeros del gene II y el X, reprimiendo su traducción, y la reducción de los niveles de pII nos lleva a un nivel bajo de la síntesis de la hebra +. A estos bajos niveles de síntesis, se mantiene un nivel constante de la producción de productos del fago mediante la secreción de la progenie y por el crecimiento y división continua de las células infectadas, y la producción del fago se mantiene en un rango constante.

#### 2.2.1.5 Fisiología del ensamblaje del Bacteriófago

Una característica principal del ensamblaje del fago filamentoso es que es un proceso de secreción. El ensamblaje ocurre cuando la membrana citoplasmática, y los fagos de recién producción son secretados de las células mientras son ensamblados. Todas las ocho proteínas codificadas por el fago que participan en el ensamblaje son proteínas integrales de membrana. Esto incluye tres proteínas no víricas – pI y pXI en la membrana citoplasmática y pIV en la membrana externa – y las cinco proteínas de la superficie viral, las cuales residen en la membrana citoplasmática previa a su incorporación en el fago. Dos de ellas son sintetizadas (pIII y pVIII) como precursores y, después de la liberación de la secuencia señal, emigran hacia la membrana con su Carbono-terminal en el citoplasma. La orientación de las otras proteínas de superficie no se conoce todavía con certeza. pVI es particularmente hidrofóbica (75% de sus residuos son hidrofóbicos) y pueden atravesar la membrana más de una vez.

La primera progenie de los fagos aparece en el sobrenadante del cultivo aproximadamente 10 minutos después de la infección (a 37°C). La cantidad de estos fagos se incrementa exponencialmente por aproximadamente 40 minutos, después la tasa de crecimiento permanece lineal. Se producen aproximadamente 1000 fagos por célula en la primera hora. Bajo condiciones óptimas las células infectadas pueden continuar creciendo y dividiéndose – y producir más fagos – indefinidamente. La infección persistente es posible debido a las cinco proteínas de la cápside y a las hebras virales sencillas son removidas de la célula (por ensamblaje y secreción) a una tasa conmesurada con su síntesis, y la acumulación de las proteínas no secretadas se previene por el loop regulatorio de pV/pII y por su dilución mediante el crecimiento y división continuos. El crecimiento continuo de las células productoras de fagos a un rango considerablemente menor que las bacterias que no se encuentran infectadas, se refleja directamente en la turbidez de las placas del bacteriófago. Cuando las placas se observan más claras que turbias, las células infectadas han muerto. Esto ocurre cuando hay un desbalance entre los componentes sintetizados y el ensamblaje de los fagos.

#### 2.2.1.6 Mecanismos de ensamblaje del bacteriófago

El ensamblaje del fago puede dividirse en cinco etapas: preiniciación, iniciación, elongación preterminación y terminación. La preiniciación se define como la formación de un sitio de ensamblaje, dicha región se hace visible mediante microscopía electrónica justo en la región en donde la membrana citoplasmática y la exterior se encuentran más cercanas. Los sitios de ensamblaje se encuentran compuestos por tres proteínas morfogenéticas, pI, pXI y pIV, las cuales interactúan via dominios periplásmicos (N-terminal para pIV y C-terminal para pI y presumiblemente pXI); dichos sitios se forman independientemente de cualquier otra proteína fágica. El sitio de ensamblaje es un largo canal que atraviesa ambas membranas bacterianas. El dominio citoplasmático N-terminal de pI contiene un motivo de unión nucleotídica conservada; debido a que este motivo es esencial para el ensamblaje del fago, y que este requiere la hidrólisis de ATP, pI probablemente es una ATPasa.

La iniciación toma lugar únicamente en el sitio de ensamblaje, las dos proteínas menores de superficie (pVIII y pIX) se encuentran localizadas al inicio de la punta de la partícula así como también el ADN de hebra sencilla. Los análisis genéticos sugieren que pVIII y pIX (en la membrana) interactúan con la señal de empacamiento, y que ésta se asocia con el dominio citoplasmático de pI. La tioredoxina del hospedero, proteína citoplasmática conocida como potente agente reductor de disulfuros proteicos, también interactúa con pI. Aunque el ensamblaje del fago no utiliza esta actividad redox, la tioredoxina parece ser parte del complejo de iniciación, y puede contribuir a la fase de elongación.

La elongación envuelve el reemplazamiento sucesivo de los dímeros de pV que cubren el ADN viral por pVIII insertadas en la membrana y la translocación del ADN a través de la membrana. El proceso continua hasta que el final del ADN viral ha sido cubierto por pVIII. Si la pIII o la pVI se encuentran ausentes, la partícula fágica extracelular permanece unida o atada a la membrana citoplasmática en donde permanece para finalizar su elongación cuando otro complejo pV-DNA de hebra sencilla accesa a el sitio de ensamblaje; finalmente, los fagos filamentosos que permanecen unidos de más de 10 veces la unidad de longitud se van acumulando. Inclusive en infecciones normales cuando pIII y pVI se encuentran presentes, aproximadamente el 5% de la progenie de las partículas fágicas son el doble de largo. Dichas rondas secundarias de elongación no requieren reiniciación (Russer y *col.*, 1989).

La preterminación es la incorporación del complejo pIII-pIV embebido en la membrana al extremo terminal de la partícula fágica naciente. Un fragmento que contiene solo 83 residuos del carbono terminal de pIII son suficientes para finalizar este paso, pero no estimula la liberación del fago de la célula. La terminación o liberación del fago, requiere un segmento de 93 residuos del C-terminal de pIII, ha sido postulado que consiste en un cambio conformacional en el complejo pIII-pVI, lo cual libera el complejo (y el fago) de la membrana citoplasmática (Rakonjac y *col.*, 1999). Inclusive una porción mayor de pIII (132 residuos) se requiere para la formación de partículas víricas estables.

### 2.2.2 Proteínas de superficie utilizadas para el desplegamiento en bacteriófago

Las cinco proteínas de la cápside ha sido utilizadas para el desplegamiento de proteínas o péptidos. Algunos autores han reportado la fusión de fragmentos de anticuerpos al amino terminal de las proteínas pVII y pIX, lo cual constituye el inicio del final de la punta del virión (Gao y *col.*, 1999). La proteína pIV, que interactúa con pIII al final de la punta del virión, también ha sido utilizada para desplegar polipéptidos a través de una fusión en el C-terminal. Este tipo de unión es particularmente deseable para el desplegamiento de polipéptidos codificados por fragmentos de ADNc, dado que la inclusión del codón de terminación al final del ADNc no impedirá el desplegamiento. Por lo anterior, pVI ha probado ser altamente efectiva para la expresión de clonas basandose en interacciones proteína-proteína. Sin embargo, por mucho las proteínas más comúnmente utilizadas para el desplegamiento son pVIII y pIII.

### 2.2.2.1 Proteína pIII

La pIII, presente en cinco copias al final del virión, es la proteína principalmente utilizada para el desplegamiento de proteínas de fusión debido a su tolerancia de inserciones de gran tamaño, su compatibilidad con el desplegamiento monovalente, y la gran disponibilidad de vectores adecuados. Aunque la pIII es más tolerante que la pVIII a inserciones substanciales, la infectividad del fago resultante puede reducirse, algunas veces dramáticamente. Así como con la pVIII, esto puede evitarse utilizando fagémidos preconstruidos, lo que resulta en la producción de viriones híbridos cuya producción resulta en altos títulos de pIII del tipo silvestre. Dado que la infectividad de dichos viriones no recae en la proteína pIII de fusión, estas proteínas pueden producirse como pIIIs truncadas diseñadas con la estructura proteica deseada. Este diseño puede conferir un desplegamiento altamente eficiente, reduciendo o eliminando la proteólisis de la proteína de fusión, así como la reducción del tamaño del fagémido. La desventaja potencial incluye la posibilidad de un impedimento estérico de la proteína desplegada.

### 2.2.2.2 Proteína pVIII

La pVIII, es una proteína principal de superficie, y se encuentra presente en miles de copias en las partículas fágicas. Las secuencias para el desplegamiento normalmente son insertadas en el extremo N-terminal, entre la secuencia señal y el inicio de la secuencia codificadora de la proteína madura. Sin embargo, solo unas cortas secuencias de polipéptidos (6-8 residuos) pueden ser desplegados en cada copia de pVIII en un virión – tamaños mayores pueden impedir el empacamiento de las partículas, probablemente debido a las restricciones de tamaño que impiden el paso a través del canal por el cual el fago pasa durante la extrusión. El desplegamiento de polipéptidos más grandes en pVIII requiere de la expresión de la proteína de fusión de un vector fagémido, produciendo viriones híbridos producidos principalmente los del tipo silvestre pVIII.

Una estrategia innovadora es la utilización de la ingeniería para modificar las proteínas para su aplicación en una serie de aplicaciones mas grande: las pVIII que han sido modificadas permiten el desplegamiento de polipéptidos más grandes y en número de copias mayor (Sidhu y *col.*, 2000), o para el desplegamiento de proteínas fusionadas en el C-terminal de la proteína (Weiss y *col.*, 2000).

### 2.2.3 Tipos de sistemas de Desplegamiento en bacteriófago

Los sistemas mágicos están contruidos de tal forma que cada copia de los polipéptidos fusionados es desplegada con una copia de la proteína nativa. Entonces, si una biblioteca de péptidos es desplegada en pVIII en un sistema fágico, cada virión tiene un péptido desplegado por cada copia de pVIII – algunos tienen hasta 2700 copias por virión. Esta característica se logra fusionando la biblioteca de ADN con la única copia de pVIII en el genoma del fago. Las bibliotecas peptídicas pueden desplegarse en pVIII utilizando un sistema fágico, pero el tamaño del peptido es limitado, y el efecto de avidéz a menudo resulta en la baja discriminación entre uniones de alta y baja afinidad. De hecho, este sistema es ideal para la identificación de moléculas de baja afinidad para blancos difíciles. Muchas bibliotecas peptídicas han sido clonadas en el genoma del fago de tal manera que son desplegadas en el extremo amino de pIII. Esto modifica cada copia de pIII del virión, pero con solo cinco copias el efecto de avidéz se disminuye en gran cantidad. Sin embargo, pIII también se encuentra limitada con respecto a lo que puede aceptar. Alteraciones significativas en cada pIII en el virión, como la fusión de una proteína heteróloga, puede evitar el ensamblaje del virión o bloquear la infectividad. Inclusive si los cambios son solo un impedimento menor para el ensamblaje del fago, la presión selectiva incrementará el número de fagos revertentes en la biblioteca.

Un fagémido es un plásmido que lleva un marcador de resistencia a antibiótico, orígenes de replicación bacterianos y fágicos, el gene del fago en el cual la biblioteca se va a desplegar, y la señal de empacamiento del fago. La biblioteca es clonada en el fagémido de tal forma que será expresada como proteína de fusión a la proteína del fago. El ADN del fago se utiliza para transformar bacterias y pueden ser amplificadas y seleccionadas de la misma manera que cualquier otro plásmido. La producción y mantenimiento de la biblioteca en la bacteria, la cual replica su ADN mucho más precisamente que el bacteriófago, es una forma en la cual la diversidad de las bibliotecas se mantiene.

Para desplegar péptidos o proteínas utilizando un fagémido, las bacterias que llevan el ADN del fagémido son infectadas con el fago ayudador para producir partículas víricas para su uso en selección. Desde la infección de las bacterias que contienen el fagémido, el genoma del fago ayudador inicia la síntesis de las proteínas del tipo silvestre del fago. Dado que el fagémido lleva un promotor del fago contra corriente (3' a 5') de la secuencia que codifica la proteína de fusión, la síntesis de la proteína de fusión también es iniciada, y ésta es adicionada a una serie de variantes para las proteínas fágicas. Cuando el ensamblaje del fago inicia, los viriones serán ensamblados preferencialmente utilizando el fagémido, dado que difiere del fago ayudador en que este tiene una señal de empacamiento totalmente funcional. Pequeñas cantidades de la proteína de fusión serán utilizadas para la serie de variantes celulares para el ensamblaje del fago, y las partículas secretadas desplegarán una secuencia foránea en la proteína de superficie y llevarán el fagémido que codifica para dicha secuencia.

Otros tipos de fago ayudador se han diseñado para bloquear el crecimiento de fagos que carezcan de proteína de fusión. A pesar de los mejores procedimientos experimentales, el resultado de cada selección contendrá un pequeño número de fago ayudador que no reconoce un blanco específico. En selecciones con pocos blancos a reconocer o altamente específicos que impidan el crecimiento del fago, es posible el fago ayudador pueda excluir a los blancos reales durante la amplificación. Este resultado puede prevenirse si todos los fagos que carecen de proteínas de fusión son incapaces de amplificarse por sí solos. En un ensayo, los dominios N1 y N2 de pIII fueron eliminados del genoma del fago ayudador, dejando un dominio C-terminal, el cual todavía puede ser expresado y ser incorporado en la partícula viral. Este fago ayudador es propagado via electroporación de su genoma en una sepa bacteriana expresando pIII a partir de un plásmido; cuando la selección se lleva a cabo utilizando dicho fago ayudador, los únicos viriones que pueden propagarse por sí mismos son aquellos que llevan la proteína de fusión. Alternativamente, se puede incluir un sitio de proteólisis y la selección se lleva a cabo con un tratamiento con tripsina.

Los sistemas híbridos involucran al fago ayudador pero también permiten el ensamblaje de las partículas fágicas utilizando proteínas nativas más una proteína de fusión. Por ejemplo, una segunda copia del gen de pVIII puede localizarse en el genoma del fago bajo el control de un promotor *tac* con un sitio múltiple de clonación. Entonces, el ADN heterólogo adicionado al extremo 5' de la segunda copia del gen aparecerá en el producto de la proteína recombinante como una fusión de Amino terminal, lo cual puede resultar en una proteína de fusión de superficie que es ensamblada en viriones al mismo tiempo con la proteína pVIII nativa. Aunque este sistema es aplicable a las proteínas de superficie de M13, como lo es pIII, es más común utilizarse con pVIII.

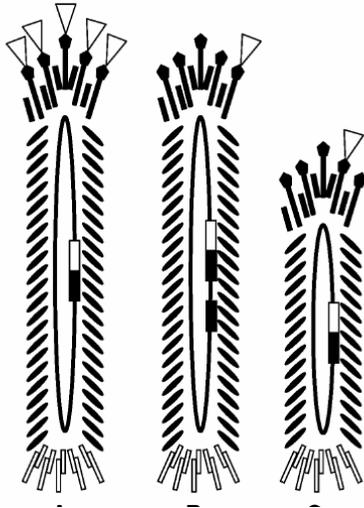


Figura 12: Los tres tipos de despliegamiento en fago. (A) Sistemas fágicos. El genoma del fago contiene solo una copia de pIII (en negro), y la secuencia desplegada (blanco) es fusionada a una copia. Consecuentemente, cada pIII despliega la misma proteína de fusión (triángulo), (B) Sistemas híbridos. El genoma del fago contiene dos copias de pIII, una con una copia de la fusión y otra sin la fusión. Los promotores para estos dos genes son generalmente diseñados de tal forma que el tipo silvestre de pIII es expresada a niveles más altos en la célula. Entonces el tipo silvestre más común aparece con más frecuencia en el virión. (C) Sistemas con fagémido. En lugar del genoma del fago, el virión contiene un fagémido, el cual generalmente es más pequeño. La infección con el fago ayudador hace que la expresión de las proteínas del fago, y del fagémido exprese la biblioteca fusionada a pIII. (Tomado de Kehoe y col., 2005).

## 2.2.4 Aplicaciones del despliegamiento en bacteriófago

Existe un enorme número de problemas biológicos que pueden ser resueltos utilizando el

despliegamiento en fago para aislar moléculas afines a partir de una gran biblioteca. Esto incluye la definición de epitopes y mimotopos reconocidos por diferentes anticuerpos, la identificación de péptidos que se mimetizan dependiendo de la conformación del sitio de unión o de varios receptores, el aislamiento de péptidos que se unen y se introducen a tipos celulares específicos, identificación de una fuente de moléculas unidoras de proteínas, obtención de péptidos que pueden ser utilizados como inmunógenos y agentes terapéuticos y la identificación de anticuerpos que reconocen antígenos específicos. El enorme número de aplicaciones para el despliegamiento en fago puede resumirse en tres temas generales que se agrupan de acuerdo a la naturaleza de la molécula a ser desplegada: 1) proteínas y fragmentos de proteínas, 2) fragmentos de anticuerpos y 3) péptidos producidos al azar.

### 2.2.4.1 Despliegamiento de proteínas y enzimas

Los fagos son capaces de expresar un amplio rango de proteínas exógenas como fusiones con gpIII o con gpVIII. En muchos casos, proteínas o dominios proteicos completos pueden ser desplegados con un plegamiento adecuado. De hecho hay una gran serie de ejemplos de proteínas desplegadas que retienen su función en la superficie del fago. Entonces el fago representa una forma de trabajo adecuada para la identificación de sustratos enzimáticos o para investigar las interacciones ligando-receptor. El despliegamiento en fago también ha probado ser útil en los esfuerzos por identificar o construir enzimas nuevas que catalizan reacciones definidas. Un adelanto tecnológico ha utilizado modificaciones al despliegamiento en fago tradicional para seleccionar actividades enzimáticas definidas a partir de una gran biblioteca de proteínas desplegadas como fusiones con gpIII. Para identificar aquella que presente la actividad adecuada, los autores encontraron un método para anclar el producto de la reacción catalizada por la enzima a la partícula fágica. Debido a que esta partícula contiene la información genética de la molécula deseada, y puede ser aislada y propagada *in Vitro* (Demartis, S. y col., 1999). Dichas estrategias ingeniosas pueden ayudar a expandir una gran variedad de actividades proteicas que pueden ser auxiliadas por el despliegamiento en bacteriófago. El despliegamiento en fago ha sido utilizado extensivamente para estudiar las interacciones proteína-ADN o para la identificación de proteínas que reconocen sitios específicos en el ADN con alta afinidad.

El despliegamiento en bacteriófago ahora se utiliza ampliamente en el estudio de las interacciones entre proteínas, particularmente en los esfuerzos por explorar las funciones

relacionadas con la estructura y las interrelaciones de proteínas multifuncionales. En algunos casos se han utilizado las proteínas como plataforma para el desplegamiento de péptidos al azar en la superficie del fago. Estos péptidos producidos al azar en regiones expuestas en la superficie de la proteína y usualmente tienden a funcionar de una forma similar que el receptor proteico. Finalmente, esta tecnología nos permite aislar moléculas con propiedades moleculares específicas a partir de bibliotecas complejas conteniendo millones de variantes. Las diferentes clases de proteínas funcionales que pueden expresarse en el bacteriófago aún se están ampliando.

#### 2.2.4.2 Desplegamiento en bacteriófago de anticuerpos

Los fragmentos de anticuerpos han sido desplegados en la superficie del fago en un formato monovalente como los fragmentos Fab o fragmentos variables de cadena sencilla (Single-Chain Variable Fragments, *scFv*). Los fragmentos Fab incluyen la región variable y la primera región constante de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo en donde *scFv* solo consiste en los dominios variables de la cadena pesada y ligera conectadas por un péptido unidor. El desplegamiento de los fragmentos de anticuerpo ha facilitado el aislamiento de anticuerpos con especificaciones de unión raras o con bajas constantes de disociación ( $< 10$  nM). Por esta técnica, los fragmentos Fab que han sido aislados son bastantes y de una variedad de moléculas grande, como la neurotoxina del botulismo (Emmanuel, P., y *col.* 1996), antígenos de la malaria (Fu, Y., y *col.* 1997), protein cinasas (Kosako, H., y *col.*, 1996) e inclusive proteínas de la superficie celular de mamíferos (POUM, M., y *col.*, 1999).

Se ha sugerido que el desplegamiento de anticuerpos en bacteriófago y la producción de anticuerpos recombinantes en bacterias puede llevarnos a superar muchas limitaciones de la tecnología del hibridoma proveyendo más control sobre el proceso de selección de anticuerpos en terminos de afinidad y especificidad, permitiendo la producción de anticuerpos monoclonales de alta afinidad. Varios reportes han elucidado algunas de las ventajas de la tecnología del desplegamiento en fago a diferencia de la tecnología del hibridoma tradicional en términos de rapidez, simplicidad y la diversidad de anticuerpos identificados (Andersen, P., y *col.*, 1996; Clarkson, T., y *col.*, 1991). Las afinidades de los anticuerpos aislados a partir de las bibliotecas en bacteriófago dependen de la extensión de la fuente del anticuerpo, el tamaño de la biblioteca y la estrategia de tamizado utilizada para aislar las clonas deseadas a partir de la biblioteca. Las grandes bibliotecas de *scFv* ( $> 10^9$  clonas individuales) a partir de donadores que nunca han sido inmunizados pueden producir *scFv* con afinidades subnanomolares (Vaughan, T., y *col.*, 1996).

Las bibliotecas de anticuerpos usualmente son de ADN proveniente de tres fuentes diferentes: 1) hibridomas que expresan una especificidad deseada; 2) células de sangre periférica de animales inmunizados con un antígeno contra el cual el anticuerpo deseado es afín; y 3) donadores no inmunizados. En la última categoría, los anticuerpos usualmente son de una menor afinidad debido a que no han sufrido una mutación somática, lo cual es un paso importante del proceso de maduración de la afinidad que, *in vivo*, produce anticuerpos de alta afinidad. Sin embargo, hay reportes que han descrito el aislamiento de fragmentos *scFv* con afinidades subnanomolares a partir de bibliotecas construidas a partir de donadores no inmunizados (Vaughan, T., y *col.*, 1996). Una ventaja del desplegamiento sobre la tecnología del hibridoma es la habilidad de seleccionar anticuerpos de alta afinidad y específicos contra antígenos que tienen una inmunogenicidad baja. Generalmente se cree que con múltiples rondas de tamizado y reamplificación hay una selección de clonas que se unen con alta afinidad, sin embargo, a menudo este no es el caso debido a problemas asociados con el enriquecimiento por anticuerpos específicos con alta afinidad.

El desplegamiento también ha proveído un nuevo acercamiento al diseño de vacunas y a la búsqueda de anticuerpos con potencial terapéutico. Además ha sido aplicado en el estudio de interacciones antígeno- anticuerpo.

Los anticuerpos contra carbohidratos juegan un rol importante en la respuesta inmunológica contra varios patógenos aunque, estos anticuerpos tienden a ser de baja afinidad y se conoce relativamente poco de ellos en cuanto a sus interacciones. El desplegamiento en bacteriófago ha sido utilizado para aislar fragmentos Fab de baja afinidad que unen carbohidratos de importancia médica. Ha facilitado el aislamiento de fragmentos de anticuerpos recombinantes por marcaje intracelular de terapéuticos.

Puede ser utilizado para la obtención de información estructural de antígenos en casos donde la cristalografía de rayos X y la resonancia espectroscópica magnética nuclear son difíciles de emplear.

Finalmente, puede permitir la producción de fragmentos de anticuerpos solubles en *E. coli* con potencial para ser aplicados en diagnóstico y terapia. Sin embargo, estos avances en la producción de anticuerpos se han limitado debido a las dificultades de producir y purificar las cantidades de anticuerpos que pueden ser obtenidos actualmente por la tecnología de hibridoma.

#### 2.2.4.3 Desplegamiento en bacteriófago de péptidos

Aunque muchas bibliotecas de fragmentos de anticuerpos han sido dirigidas hacia moléculas unidoras con las especificaciones deseadas, las bibliotecas de péptidos no han sido sesgadas comparativamente. Generalmente, los oligonucleótidos al azar son construidos de tal manera que contengan codones para todos los aminoácidos, y minimizando el número de codones de paro. Estos oligonucleótidos son clonados en genes que codifican para las proteínas de superficie, lo que resulta en el desplegamiento en bacteriófago de péptidos al azar en su superficie. Las bibliotecas de péptidos al azar han sido construidas con un largo de inserto que va de 6 a 43 residuos con una variedad de inhibidores inducidos por cisteína. Dichas bibliotecas sirven para incrementar la diversidad de estructuras moleculares que están disponibles para la selección por afinidad. Los péptidos que interactúan con un rango de moléculas, como anticuerpos monoclonales y policlonales y otras proteínas unidoras, pueden ser seleccionadas sin tener un conocimiento previo de su estructura o sitios de interacción de la molécula diana. Entonces, el desplegamiento de bibliotecas peptídicas puede jugar un rol potencialmente importante en elucidar los mecanismos que involucra la patogénesis de la enfermedad así como el diseño de vacunas y su desarrollo. Las interacciones que involucran carbohidratos y ácidos nucleicos también son dignas de estudiarse utilizando la tecnología del desplegamiento de péptidos. La habilidad de seleccionar los péptidos con las propiedades deseadas depende del tamaño y diversidad de la biblioteca y la estrategia utilizada en la selección.

Las bibliotecas de péptidos al azar han sido utilizadas en una gran cantidad de aplicaciones además del mapeo de epítopes y la identificación de mimótopos. Los ciclos de señalización intracelular han sido estudiados identificando péptidos que se unen a receptores que participan en la transducción de la señal. Los péptidos pequeños que poseen actividades que son comparables con los agonistas auténticos y antagonistas han sido aislados a partir de bibliotecas de péptidos al azar. Estas bibliotecas también han sido utilizadas para identificar ligandos de péptidos y substratos de proteínas y enzimas así como para seleccionar péptidos que se unen y entran a una variedad de tipos celulares diferentes.

#### 2.2.5 Tamizado de la biblioteca en bacteriófago filamentoso.

El tamizado o Biopanning es el proceso mediante el cual los bacteriófagos que expresan las especificaciones deseadas y ciertas características de unión son escogidos a partir de una biblioteca de desplegamiento en bacteriófago a partir de una serie de biomoléculas. Este proceso usualmente involucra una reducción regresiva en la diversidad de la biblioteca mediante diversas rondas de selección. El éxito del proceso de selección puede depender no solamente en el tipo de biblioteca que se utilizó sino también en el proceso utilizado para llevar a cabo la

búsqueda. El proceso de tamizado generalmente involucra la inmovilización de una molécula blanco a una superficie sólida, exponiéndolo directamente con la biblioteca en bacteriófago y eluyendo los fagos que se unieron. Los fagos eluidos usualmente se amplifican infectando *E. coli* y son tamizados de nuevo utilizando la molécula inmovilizada, para permitir un enriquecimiento posterior de aquellos fagos que se unen específicamente. Sin embargo hay, algunas variaciones que han sido empleadas para llevarse a cabo y que han resultado en éxito. La matriz en la cual la molécula diana es inmovilizada puede ser placas de ELISA, inmunotubos, y camas cubiertas de poliestireno. La molécula diana puede unirse directamente a la matriz o puede unirse indirectamente a través de un unidor ("linker").

En algunos casos no es necesario inmovilizar la molécula diana. En el método de Fagos Infeccivos Selectivos (SIP; Selective Infective Phages) se toma ventaja de la estructura modular de gpIII. En este método, la molécula diana es expresada como proteína de fusión con los dos dominios N-terminal de gpIII. La biblioteca es expresada en el dominio C-terminal de gpIII unida a la partícula fágica, la cual en la ausencia de los dominios N-terminales no es infectiva. Cuando una partícula se une a la molécula blanco, la infectividad de la partícula fágica es reestablecida permitiendo la amplificación del fago con la especificidad deseada (Spada, y col., 1997).

La diversidad de la biblioteca utilizada, la astringencia del procedimiento de tamizado y los métodos utilizados para eluir el fago unido son factores que afectan el resultado del tamizado. Las condiciones utilizadas para la amplificación de los fagos eluidos también afectarán el resultado del procedimiento. Los fagos eluidos infectan *E. coli* que poseen el F-pili, y cada fago infectará únicamente una célula. Entonces las células crecerán en medio líquido o sólido. La amplificación en un medio sólido involucra el plaqueo de las células infectadas en cajas con agar y su recuperación de dicho medio a líquido. El cultivo de células infectadas en medio líquido no es una labor muy ardua, sin embargo inicialmente se pensaba que el cultivo líquido promovía una selección que favorecía a aquellas clonas que tenían una ventaja de crecimiento. Esto se creía hasta que se encontraron niveles similares de competición entre las clonas cultivadas en medio sólido y por lo tanto no existe una ventaja significativa en la amplificación en cultivo líquido.

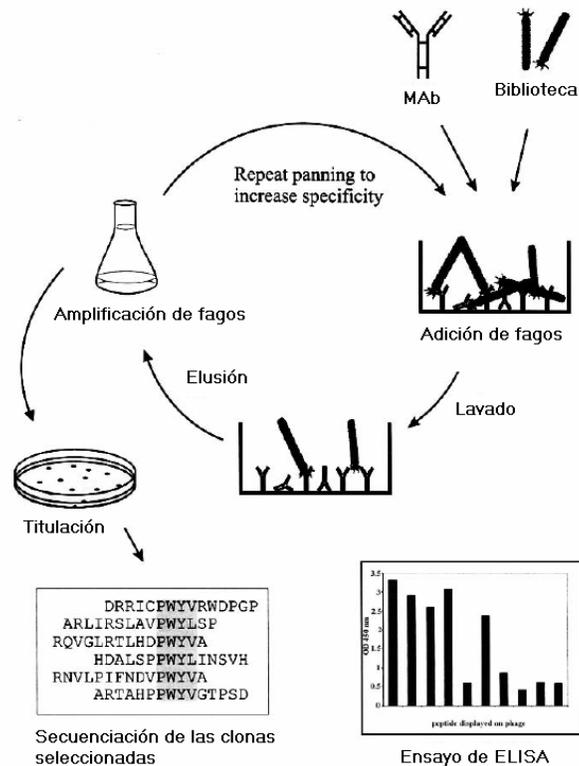


Figura 13. Método de tamizado para la selección de péptidos que se unen a anticuerpos específicos. Los anticuerpos son inmovilizados en placas para microtitulación y se ponen en contacto con la biblioteca a tamizar. Los bacteriófagos que no se unen a los anticuerpos son lavados y los que se unen son eluidos y amplificados en medio de cultivo líquido. Los fagos seleccionados se someten a otros ciclos hasta completar varias rondas. Finalmente se identifican aquellas secuencias que son comunes y se determina su reactividad por ensayos inmunológicos como ELISA. (Tomado de Spada, y *col.*, 1997)

### 3. HIPÓTESIS

La selección y la caracterización de clonas individuales a partir de una biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* construida en el bacteriófago filamentoso que expresan epítomos relevantes, proveerá de información genética útil para la futura producción de vacunas y métodos de diagnóstico necesarios para la industria ganadera.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Seleccionar y caracterizar clonas que expresen epítomos de *Anaplasma marginale* a partir de una biblioteca de expresión de despliegue en bacteriófagos filamentosos.

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 5.1 Expandir y caracterizar una biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* en el fagémido pHage 3.2.
- 5.2 Obtener y caracterizar los antígenos de *Anaplasma marginale*.
- 5.3 Obtener de la concentración de los antisueros provenientes de bovinos inmunizados experimentalmente con *Anaplasma marginale*, su peso molecular por Electroforesis en gel de Agarosa y su afinidad a los antígenos de *Anaplasma marginale* por ensayo de ELISA.
- 5.4 Tamizado de la biblioteca de expresión con antisueros específicos.
- 5.5 Obtener a partir de las clonas seleccionadas, el grado de afinidad con respecto a los anticuerpos IgG2 específicos para *Anaplasma marginale* por ensayo de ELISA además de la secuencia de la proteína acoplada y su respectiva correspondencia con el gen que la codifica.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Caracterización de la biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* en forma de ADN.

La biblioteca utilizada en esta investigación es una biblioteca de expresión de despliegue en la superficie de bacteriófagos filamentosos producida mediante la clonación de fragmentos genómicos de 700-1,000 pb obtenidos por digestión parcial con las enzimas *RsaI*, *AluI*, y *HaeIII* en el sitio EcoRV del fagémido 3.2; trabajo llevado a cabo por la M en C. Verónica Ocampo Espinoza para la obtención del grado con la tesis "Construcción de bibliotecas genómica y de expresión genética para la identificación de antígenos de *Anaplasma marginale*." (Julio, 2004)

La caracterización de la biblioteca se llevó a cabo inicialmente por la cuantificación del material genético mediante fluorimetría utilizando una solución amortiguadora para fluorimetría de rango bajo de ADN (10 a 500 ng/ $\mu$ L) y un estándar de ADN ( $\lambda$  DNA/*HindIII*) con una concentración de 100 ng/ $\mu$ L. Posteriormente se separó por electroforesis en un gel de Agarosa al 1% cargando 5.0  $\mu$ L de la biblioteca equivalentes a 315 ng de ADN. Para el corrimiento del gel se utilizó solución Amortiguadora TAE 1X y una corriente constante de 72 volts por 1 hora.

### 6.2 Obtención de bacteriófagos recombinantes. Construcción de la biblioteca primaria.

Para obtener la biblioteca primaria se transformaron por choque térmico células XL1-BLUE MRF' (Stratagene) con 50 ng de DNA de la biblioteca y se agregó 1ml de medio 2xYT (Tryptona 16 g, extracto de levadura 10 g, NaCl 5 g, pH 7 / 1 litro) conteniendo glucosa al 2%, pasada la incubación de 1 hora a 37°C con agitación a 250 rpm; se tomaron 10 $\mu$ l de células transformadas para la determinación del número de clonas transformantes (número de colonias resistentes a ampicilina recuperadas después de la transformación). El título de la transformación es determinado por la siguiente fórmula:

$$\# \text{ clonas transformantes} = \# \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución (0)} \times 100$$

El resto de las células (990  $\mu$ L) se dejaron crecer por 6 horas adicionales con 100 $\mu$ g/mL de ampicilina para permitir el crecimiento de los fagémidos recombinantes.

### 6.3 Rescate de los fagos recombinantes. Superinfección con el bacteriófago ayudador M13K07.

Para rescatar los fagos recombinantes, se agregaron a 500  $\mu$ L de los 990  $\mu$ L de la biblioteca, 9.4 mL de medio 2xYT conteniendo glucosa y ampicilina y 100  $\mu$ L del fago ayudador M13K07 (New England Biolabs) con un título de  $1 \times 10^{11}$  ufp continuando con el crecimiento durante 2 horas adicionales. Se realizó una centrifugación a 2,000 x g/10' descartando el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 10 mL de 2xYT con ampicilina y kanamicina (100  $\mu$ g/mL) incubando de 12-20 horas a 37°C con agitación a 300 rpm. Finalmente los fagos recombinantes se recuperaron por centrifugación a 10,000 x g/20' descartando la pastilla y fueron almacenados a 4°C para su posterior titulación. Esta biblioteca se tituló mediante la infección de células XL1-BLUE MRF' (Stratagene) en fase de crecimiento logarítmico, haciendo diluciones seriadas desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-9}$  en medio 2XYT; 100 $\mu$ L de las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  se mezclaron por separado con 100 $\mu$ L de cada una de las células correspondientes incubando durante 30' a temperatura ambiente. Finalmente fueron esparcidas en placas de 2XYT ampicilina e incubadas toda la noche a 37°C para su crecimiento. El título de células infectadas se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de colonias/mL} = \frac{\text{\# colonias en la placa} \times \text{factor de dilución}}{0.5 \times 0.1 \text{ mL}}$$

**El título de células infectadas (ufc/mL) = título de la biblioteca (ufp/mL)**

#### 6.4 Determinación de clonas positivas presentes en la biblioteca de expresión.

Para corroborar el porcentaje de clonas que incorporaron insertos de 700-1000 pb de ADN de *Anaplasma marginale* en la biblioteca de expresión de la rickettsia en el pHage 3.2, se realizó el ensayo de PCR con iniciadores específicos para el vector que alinean en los extremos del sitio de clonación, para con ello observar la amplificación de un fragmento de 370 pb correspondiente a los vectores pHage 3.2 que no incorporaron inserto alguno, o fragmentos de entre 1070-1370 pb para aquellos que incorporaron los insertos.

Los iniciadores de PCR utilizados fueron los siguientes:

PHage 3.2 F: **5´ CAG CTA TGA CCA TGA TTA CG 3´**  
PHage 3.2 R: **5´ CCT CAT AGT TAG CGT AAC GA 3´**

Para la reacción de amplificación se emplearon las colonias recuperadas de la infección de células XL1-BLUE MRF'(Stratagene). De las colonias obtenidas se recolectaron con una punta de pipeta 40 colonias, se suspendieron en 10 µL de agua y fueron desnaturalizadas a 95°C/10'. De esas clonas desnaturalizadas sólo 5 µL se agregaron con el buffer de reacción de PCR. Posterior al ensayo de PCR se separó por electroforesis una muestra (10 µL) en geles de agarosa al 1% de cada una de las reacciones para determinar el porcentaje de clonas positivas con base en el tamaño de los fragmentos amplificados y al número de clonas negativas (las que amplificaron sólo el fragmento correspondiente al vector sin insertos). Con lo anterior se pudo determinar el porcentaje de clonas que presentan insertos correspondientes a los fragmentos de 700-1000 pb de DNA de *A. marginale*, haciendo un estimado del tamaño de la biblioteca.

#### 6.5 Preparación de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale* a partir de glóbulos rojos infectados.

La extracción y purificación de cuerpos iniciales de *A. marginale* de la cepa MEX-17 (Unidad de Anaplasmosis, CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP) se realizó mediante la técnica descrita por Palmer y McGuire en 1984 y modificada por Barigye, 2004, como sigue: 35 mL de glóbulos rojos infectados (g.r.i.) que contenían el equivalente a  $2.16 \times 10^{11}$  g.r.i. y 94 % de parasitemia, fueron descongelados en forma rápida en baño maría a 37°C. Inicialmente se centrifugaron a 1000 x g para eliminar los glóbulos blancos y sus núcleos y se lavaron cuatro veces resuspendiendo en 40 mL de solución salina de Puck 1x (KCl 0.40 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15 g, NaCl 8.0 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O 0.29 g por Litro, pH 7.2) adicionada con gentamicina (5µg/mL), centrifugando a 10,000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 10 mL de la misma solución de lavado y se sometió a ruptura por ondas de ultrasonido con un Sonic Dismembrator (Fisher®) por 5' a 50% de potencia con una micropunta de 3mm de diámetro con intervalos de descanso de 30 segundos por cada minuto. Los cuerpos iniciales se lavaron con solución salina de Puck 1x centrifugando 15' a 10,000 x g y resuspendiendo en un volumen final de 5 mL. Para eliminar los restos de la membrana de los eritrocitos, los cuerpos iniciales fueron purificados haciéndolos pasar por un gradiente de sacarosa (de 10 a 50% de Sacarosa) mediante centrifugación en una centrífuga de ángulo fijo a 7,000 x g/ 25'. Los cuerpos iniciales fueron recuperados resuspendiéndolos en 1 mL de solución salina de Puck 1x. Finalmente, se procedió a la caracterización de los cuerpos iniciales mediante cuantificación de la cantidad de proteína por el ensayo de Bradford (BioRad) utilizando como estándar una solución de BSA 100 µg/mL y por electroforesis en gel de Acrilamida

al 12% en condiciones reductoras llevando a cabo la separación a 50 volts por 2 horas. El gel fue teñido con Azul de Coomasie.

#### 6.6 Evaluación del antígeno de *Anaplasma marginale* por ensayo de ELISA.

La evaluación del antígeno purificado de la rickettsia fue llevado a cabo sensibilizando una placa de 96 pozos planos (Nunc-Immuno Plates) con concentraciones del antígeno a evaluar entre 0.003 y 0.2  $\mu\text{g}$  de proteína por pozo en solución amortiguadora de carbonatos 1x; incubando toda la noche a 4°C. Después del lavado de la placa con SSAF-T se adicionaron los sueros Positivo y Negativo a una concentración constante de 5  $\mu\text{g}$  de proteína total por pozo, la incubación se llevó a cabo a una temperatura de 37°C y por un tiempo de 1 hora. El anticuerpo anti-IgG bovino conjugado con fosfatasa alcalina (ImmunoJackson Research) fue adicionado a una dilución 1:25,000 e incubado por 1 hora a 37°C. El sustrato p-NPP (ImmunoJackson Research) fue adicionado en una concentración de 0.075% en solución Amortiguadora Tris 20 mM agregando 100  $\mu\text{L}$  por pozo y cuando la reacción colorida se llevó a cabo se leyó la placa en un espectrofotómetro a 405 nm (Beckman Coulter Spectrofotómetro DTX 880 Multimode Detector).

#### 6.7 Evaluación de los anticuerpos de sueros de animales por ensayo de ELISA.

El ensayo de ELISA fue llevado a cabo sensibilizando una placa estándar de 96 pozos planos (Nunc-Immuno Plates) con 0.1  $\mu\text{g}$  de proteína del antígeno de *Anaplasma marginale* (cuerpos iniciales) por pozo en solución amortiguadora de carbonatos 1x; la placa se incubó toda la noche a 4°C y al día siguiente se lavó 3 veces con Solución salina amortiguadora de fosfatos con Tween 0.1% (SSAF-T) adicionando 200  $\mu\text{L}$  para cada lavado. Posteriormente se adicionaron los sueros problema en concentraciones desde 0.1 a 5.0  $\mu\text{g}$  de proteína por pozo y se dejó incubar la placa a 37°C por 1 hora. Después del lavado de la placa con SSAF-T se adicionó el anticuerpo anti-IgG bovino conjugado con fosfatasa alcalina (ImmunoJackson Research) en una dilución de 1:25,000, agregando 200  $\mu\text{L}$  por pozo e incubando 1 hora a 37°C. La placa finalmente fue revelada con el sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP ImmunoJackson Research) en una concentración de 0.075%, y fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm (Beckman Coulter Spectrofotómetro DTX 880 Multimode Detector).

#### 6.8 Purificación de anticuerpos IgG2 a partir de sueros de animales infectados experimentalmente con *Anaplasma marginale* por cromatografía de intercambio iónico.

Inicialmente el suero proveniente de animales infectados experimentalmente fue dializado con 1 litro de la solución amortiguadora de equilibrio 1X (Solución amortiguadora de Tris HCl 0.1 M pH 8.6) a una temperatura de 4°C llevándose a cabo dicho proceso durante toda la noche. La purificación se llevó a cabo utilizando una columna de DEAE/Sephadex de 30 mL y el cromatógrafo BioRad®. La corrida se llevó a cabo inicialmente lavando la columna con 50 mL solución amortiguadora de equilibrio. La muestra ya dializada fue colocada en la columna adicionando un volumen de 4 mL. Una vez que la muestra pasa por la columna ésta fue lavada con la misma solución de equilibrio siendo necesario lavar con 50 mL de la solución amortiguadora hasta que en el cromatograma no detectase ninguna señal; hay que recalcar que esta fracción es la que debe de conservarse ya que es en esta en donde se encuentran las IgG2. Finalmente la solución utilizada para eluir los anticuerpos IgG retenidos fue Glicina-HCl 0.1 M pH 3.0. La fracción no unida se concentró con columnas Centricón (Millipore) de 50 kDa centrifugando a 4,000 rpm por 15' haciendo lavados con Tris-HCl 0.1M pH 7.0. Para confirmar la presencia de inmunoglobulina, una cantidad de la muestra se somete a electroforesis en gel de Acrilamida-bis al 10% las muestras fueron separadas mediante electroforesis en gel en condiciones reductoras por 1 hora a 150 volts para visualizar las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos IgG.

## 6.9 Verificación de la pureza de los anticuerpos IgG2 purificados por ensayo de ELISA.

Para conocer el nivel de pureza de los anticuerpos IgG2 purificados se llevó a cabo un ensayo de ELISA sensibilizando la placa de 96 pozos con los anticuerpos purificados y los estándares de IgG1 e IgG2 (ImmunoJackson Research); la cual se llevó a cabo por toda la noche a 4°C. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- IgG1 e IgG2 bovino (ImmunoJackson Research) en una dilución 1:1000 dejando llevarse a cabo la reacción por 1 hora a 37°C, el conjugado utilizado para la reacción fue anti-IgG conejo acoplado a fosfatasa alcalina (ImmunoJackson Research) en una dilución de 1: 1000. Para revelar el resultado se utilizó el sustrato p-NPP (ImmunoJackson Research) en una concentración de 40 mg/mL en solución amortiguadora Tris 20 mM. La placa fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm (Beckman Coulter Spectrofotometer DTX 880 Multimode Detector).

## 6.10 Titulación de la actividad de los anticuerpos IgG2 purificados por ensayo de ELISA.

La determinación de la actividad de los anticuerpos IgG2 purificados fue determinada mediante un ensayo de ELISA utilizando el antígeno de *Anaplasma marginale* purificado en una concentración constante de 0.1 µg de proteína por cada pozo para la sensibilización de la placa de 96 pozos. Ésta se llevó a cabo a 4°C por toda la noche. La reacción antígeno-anticuerpo fue realizada colocando diferentes concentraciones de IgG2 que fueron desde 0.2 hasta 1.5 µg de proteína por pozo; ésta fue llevada a cabo a una temperatura de 37°C por 1 hora. El anticuerpo anti-IgG bovino conjugado con fosfatasa alcalina (ImmunoJackson Research) se adicionó en una dilución de 1:15,000 y se incubó por 1 hora a 37°C. El revelado tuvo lugar mediante la adición del sustrato p-NPP (ImmunoJackson Research) en una concentración de 0.075%; la placa se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm (Beckman Coulter Spectrofotometer DTX 880 Multimode Detector).

## 6.11 Selección de anticuerpos IgG2 específicos para el antígeno de *Anaplasma marginale* por cromatografía de afinidad.

Para la obtención de anticuerpos altamente específicos para los antígenos de *Anaplasma marginale* se utilizó una matriz de Sefarosa activada con NHS (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow<sup>®</sup> de Amersham Biosciences) empacando la columna de 1 mL con 250 µL de NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow<sup>®</sup> (GE Healthcare Bio-Sciences) y se dejó 2 horas a 4°C para que la matriz se compactara. Se lavó la columna con 2.5 mL (diez volúmenes de columna) de la solución acidificadora 1M HCl a 4°C; adicionando poco a poco para que pase lentamente hasta completar el volumen. El eluido se descarta. Se prepara la solución de acoplamiento centrifugando 750 µL del antígeno de *Anaplasma marginale* a 8,000 rpm a 4°C y el botón se resuspende en 125 µL de la solución amortiguadora de acoplamiento 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>; 0.5 M NaCl; pH 8.3 (NaHCO<sub>3</sub>: 0.21g : 0.2 M:10 mL; NaCl: 0.29 g:0.5 M:10 mL) a 4°C (5-10 mg/mL del antígeno en solución amortiguadora de acoplamiento; el volumen óptimo es un volumen de columna). Se adicionó la solución de acoplamiento (ya con el antígeno) a la columna sellando la parte inferior de la misma y dejando que el acoplamiento se lleve a cabo toda la noche a 4°C.

Una vez que se ha acoplado el antígeno se lavó la columna para eluir aquello que no se pegó; inicialmente se lavando con 1 mL (un volumen de columna) de la solución amortiguadora de bloqueo (0.1 M Tris-HCl: pH 8.5 (0.16 g:0.1 M:10 mL); permitiendo que pase lentamente manteniendo una temperatura de 4°C; después, se hace pasar 1 mL (un volumen de columna) de la solución de lavado (0.1 M CH<sub>3</sub>COONa-3H<sub>2</sub>O; 0.5 M NaCl; pH 4.0 (CH<sub>3</sub>COONa-3H<sub>2</sub>O: 0.14 g:0.1

M:10 mL; NaCl: 0.29 g:0.5 M:10 mL). Se repiten los lavados tanto con la solución de bloqueo como con la de lavado 4 veces más con el mismo volumen.

Para evitar que cualquier grupo del medio que no fue unido al antígeno interfiera en la purificación éste debe ser bloqueado adicionando 500 µL de la solución amortiguadora de bloqueo y manteniendo la matriz a 4°C por al menos 4 horas. Después se lava la columna con 4 mL (cuatro volúmenes de columna) de la solución amortiguadora de equilibrio haciendo que pase lentamente.

La purificación de los anticuerpos IgG2 específicos se lleva a cabo equilibrando la columna con el volumen correspondiente, se adicionan 0.5 mL los anticuerpos IgG2 que han de ser purificados cuidando de no atrapar burbujas. Se deja incubar la columna con los anticuerpos por al menos 2 horas a 4°C. Se lavan los anticuerpos que no se pegaron al antígeno con aproximadamente 7 mL (siete volúmenes de columna) de solución amortiguadora de equilibrio; recolectando las fracciones de 300 µL en tubos limpios y determinando cantidad de proteína por el método de Bradford (75 µL de PBS, 20 µL del Reactivo de Bradford (BioRad) sin diluir y 5 µL de muestra/pozo; agitar y leer a 595 nm) hasta que la absorbancia sea la misma que el blanco. La elusión de los anticuerpos se da mediante la solución amortiguadora de elusión (0.1 M Glicina-HCl; pH 2.7), haciéndola pasar a través de la columna y hasta completar aproximadamente 10 mL (diez volúmenes de columna) de solución amortiguadora de elusión recolectando fracciones de 300 µL y determinando la cantidad de proteína por el método de Bradford (como en el paso anterior) hasta que la absorbancia sea la misma que el blanco. Para neutralizar el pH de la solución amortiguadora de elusión se adicionan 60 µL de la solución amortiguadora neutralizante.

Finalmente se concentran las fracciones en las cuales se encuentran los anticuerpos eluidos (de acuerdo al ensayo de Bradford) con columnas de 30 kDa (Centricón 30) centrifugando 1 mL a 4,000 rpm por 5 minutos. Se lavan 2 veces los anticuerpos con 2 mL de la solución amortiguadora de equilibrio centrifugando a 4,000 rpm por 10 minutos o hasta obtener el volumen deseado. Se visualizan los anticuerpos corriéndolos en un gel de Acrilamida-bis acrilamida al 10 % en condiciones reductoras y finalmente los anticuerpos que no se ocupen se almacenan 4°C hasta su utilización.

#### 6.12 Caracterización de los anticuerpos seleccionados con el antígeno de *Anaplasma marginale* por ensayo de ELISA.

La determinación de la actividad de los anticuerpos IgG2 purificados fue determinada mediante un ensayo de ELISA utilizando el antígeno de *Anaplasma marginale* purificado en una concentración constante de 0.1µg de proteína por cada pozo para la sensibilización de la placa de 96 pozos. Ésta se llevó a cabo a 4°C por toda la noche. La reacción antígeno-anticuerpo fue realizada colocando diferentes concentraciones de IgG2 que fueron desde 0.2 hasta 1.5 µg de proteína por pozo; ésta fue llevada a cabo a una temperatura de 37°C por 1 hora. El anticuerpo anti-IgG bovino conjugado con fosfatasa alcalina (ImmunoJackson Research) se adicionó en una dilución de 1:15,000 y se incubó por 1 hora a 37°C. El revelado tuvo lugar mediante la adición del sustrato p-NPP (ImmunoJackson Research) en una concentración de 0.075%; la placa se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm (Beckman Coulter Spectrofotómetro DTX 880 Multimode Detector).

#### 6.13 Caracterización de los anticuerpos que reconocen al antígeno de *Anaplasma marginale* por ensayo de Western Blot.

Para una identificación más precisa de la afinidad de los anticuerpos seleccionados para con el antígeno de *A. marginale* se lleva a cabo un ensayo que consiste en la separación de las proteínas que conforman el antígeno de la rickettsia por su peso molecular mediante la

electroforesis en gel de acrilamida-bis-acrilamida; una vez que han sido separadas son transferidas por una corriente electroforética a una membrana, la cual, es revelada poniéndola en contacto con los anticuerpos a los cuales son afines al antígeno. La anterior se llevó a cabo utilizando un gel de acrilamida-bis-acrilamida al 12% en su gel inferior y al 4% en su gel superior en condiciones reductoras y separando el 150  $\mu$ L antígeno con una corriente eléctrica de 100 volts por 2 horas. La transferencia de las proteínas se llevó a cabo utilizando una membrana de PVDF (BioRad®) activada con Metanol absoluto por 2 minutos a 4°C y equilibrada con la solución amortiguadora de transferencia a 4°C por 15 minutos. La corriente eléctrica utilizada fue de 100 volts por 30 minutos utilizando el sistema semiseco de BioRad®. La membrana con las proteínas transferidas fue bloqueada con la solución amortiguadora de bloqueo (SSAF-T con 5% leche descremada) por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante a 200 rpm. La membrana es lavada por 3 veces utilizando 10 mL de la solución salina amortiguadora de lavado (SSAF-T). Para llevar a cabo la reacción Antígeno-Anticuerpo se utiliza una dilución 1 a 10 de:

- a) Suero Positivo
- b) Suero Negativo
- c) IgG2 específicas para el antígeno

Utilizando 2 mL de cada dilución e incubando toda la noche a 4°C con agitación constante a 200 rpm. Una vez que se ha lavado la membrana 3 veces con 2 mL de SSAF-T se procede a adicionar el conjugado anti-IgG bovino/fosfatasa alcalina (ImmunoJackson Research) en una concentración de 1:1000 adicionando 1 mL a cada tira, incubando 2 horas a temperatura ambiente y con agitación constante a 50 rpm. Finalmente para revelar se adicionó el substrato pre-preparado BCIP/NBT (BD Biosciences) por 10 minutos en obscuridad. Para detener la reacción se lava con suficiente agua. Secar a temperatura ambiente.

#### 6.14 Tamizado de la biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* con los anticuerpos IgG2 específicos.

Para llevar a cabo el tamizado de la biblioteca de expresión fueron sensibilizados 3 pozos por duplicado con las siguientes concentraciones de IgG2 purificadas:

- ✚ Primer ciclo: 1  $\mu$ g de proteína por pozo
- ✚ Segundo ciclo: 0.75  $\mu$ g de proteína por pozo
- ✚ Tercer ciclo: 0.5  $\mu$ g de proteína por pozo

Las condiciones de sensibilización de los pozos fueron: 4°C toda la noche.

Para el primer ciclo, se tamizaron  $1.0 \times 10^{10}$  ufc provenientes de la biblioteca de expresión dejando llevarse a cabo la selección de las clonas por 1 hora a 37°C. La eliminación de aquellas clonas que no fueron unidas se llevó a cabo mediante 8 lavados con 200  $\mu$ L cada uno con SSAF-T. Las clonas seleccionadas fueron recuperadas mediante la infección de 100  $\mu$ L de células XL1-BLUE MRF' (Stratagene) en la fase de crecimiento logarítmico durante 30 minutos a 37°C. Una vez que las bacterias fueron infectadas, fueron amplificadas creciendo las bacterias XL1-BLUE MRF' (Stratagene) infectadas en 2 mL de medio 2XYT/Glucosa 1 hora a 37°C. Posteriormente se llevó a cabo la superinfección con el fago ayudador M13K07 en una concentración de  $5 \times 10^9$  ufp en 1 mL del medio de cultivo adicionado con ampicilina en una concentración de 100  $\mu$ g/mL durante 1 hora a 37°C. El cultivo fue transferido a un tubo de centrifuga y se centrifugó a  $2,000 \times g/10'$  a 4°C. Se removió y eliminó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendió en 10 mL del medio 2XYT/amp/kan y fue incubado 37°C toda la noche con agitación a 250 rpm. Al siguiente día se centrifugó el cultivo a  $10,000 \times g/20'$  a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y recentrifugado a  $10,000 \times g/10'$ . Posteriormente la biblioteca enriquecida con los fagos fue purificada adicionando 10 mL de una solución amortiguadora de bloqueo (BSA 1%/SSAF-T) e incubando a 4°C por mínimo 10 minutos. Para precipitar el fago se agregaron 4 mL de PEG al

20% y se incubó la mezcla a 4°C por al menos 1 hora. Finalmente se centrifugó a 10,000 Xg/20' a 4°C, se descargó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de PBS. Se lleva a cabo la titulación de la biblioteca enriquecida y purificada mediante la infección de 100 µL células XL1-BLUE MRF' (Stratagene) en su fase de crecimiento logarítmico y creciéndolas en placas con medio sólido de LB adicionado con ampicilina 100 µg/mL.

Para el segundo ciclo se tamizaron  $1.4 \times 10^8$  ufc provenientes de la biblioteca enriquecida y purificada por el primer ciclo de tamizado y en el tercer ciclo se tamizaron  $1.1 \times 10^8$  ufc provenientes de la biblioteca enriquecida y purificada por el segundo ciclo de tamizado. Se llevó a cabo la titulación de la biblioteca enriquecida por los tres ciclos consecutivos del tamizado infectando 100 µL de células XL1-BLUE MRF' (Stratagene) en fase de crecimiento logarítmico con diluciones consecutivas entre  $1 \times 10^{-2}$  hasta  $1 \times 10^{-9}$  y espatulando las bacterias infectadas en medio de cultivo LB/ampicilina, se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Una vez que han crecido las colonias fueron contadas y fue calculado el título de la biblioteca con la misma fórmula especificada en el punto número 3.

#### 6.15 Selección de clonas individuales provenientes del ciclo 3 del tamizado de la biblioteca de expresión.

Las clonas individuales fueron seleccionadas a partir de las cajas utilizadas para la titulación de la biblioteca enriquecida y purificada por los tres ciclos del tamizado, utilizando puntas de micropipeta hasta completar 30 colonias. Las colonias fueron resuspendidas en 400 µL de medio 2XYT/ampicilina/glucosa y dejadas crecer toda la noche a 37°C con agitación constante a 250 rpm. Éstos medios con los fagos se consideran los "Stocks" de las clonas individuales en XL1-BLUE MRF'(Stratagene). De los "Stocks" de las clonas individuales se tomaron 50 µL los cuales fueron sometidos a superinfección con  $5 \times 10^8$  ufp del fago ayudador M13K07 en medio de cultivo 2XYT/ampicilina/glucosa incubando 2 horas a 37°C con agitación a 250 rpm. Las superinfecciones fueron centrifugadas a 14,000 rpm/5'; eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 400 µL de medio 2XYT/ampicilina/kanamicina, éstos cultivos fueron incubados toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm. A continuación fueron purificados los fagos de las clonas individuales por precipitación con PEG 20 adicionando inicialmente 300 µL de la solución amortiguadora de bloqueo (BSA 1%/SSAF-T) e incubando a 4°C/10'. Para la precipitación fueron adicionados 120 µL de PEG 20 y la mezcla fue incubada por al menos 2 horas a 4°C. Los fagos fueron recuperados mediante centrifugación a 10,000 x g/20' a 4°C, el sobrenadante fue eliminado y los fagos fueron resuspendidos en 100 µL de SSAF. Una vez que los fagos individuales estuvieron listos fueron titulados en placas de LB/ampicilina mediante la infección de células XL1-BLUE MRF' (Stratagene) en fase de crecimiento logarítmico.

#### 6.16 Caracterización de las clonas individuales por ensayo de ELISA.

El ensayo de ELISA fue llevado a cabo sensibilizando los pozos de la placa de 96 pozos (NuncImmuno plates) con 5 µg de proteína de las IgG2 seleccionadas con el antígeno dejando incubarse durante toda la noche a 4°C. Los fagos fueron adicionados a la placa sensibilizada adicionando:  $1 \times 10^4$  ufc de las clonas que tienen un título igual o menor a  $1 \times 10^6$  ufc,  $1 \times 10^6$  ufc de aquellas cuyo título es igual o menor a  $1 \times 10^8$  ó  $1 \times 10^8$  ufc por cada pozo y por duplicado únicamente de aquellas que tienen un título igual o menor a  $1 \times 10^{10}$ ; la incubación fue a temperatura ambiente por 2 horas. En seguida de lavar aquellos fagos que no fueron unidos por los anticuerpos se adicionó el anticuerpo anti-M13 pIII acoplado a peroxidasa (ImmunoJackson Research) en una dilución 1:5000 incubando por 1 hora a 37°C. El substrato utilizado para la reacción fue ABTS en una concentración de 40 mg/ 100 mL. Para la lectura de la placa se utilizó un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.

#### 6.17 Caracterización de las clonas individuales seleccionadas por secuenciación.

La información genética de los bacteriófagos recombinantes seleccionados con los anticuerpos IgG2 purificados por afinidad con el antígeno de *A. marginale* fue obtenida por secuenciación lisando células infectadas con los fagos sometiéndolas a una temperatura de 95°C/10'. Para la reacción de secuenciación se utilizó el iniciador F' de M13. Una vez obtenido suficiente material genético para la reacción de secuenciación (>200 ng) se utilizó el kit de secuenciación Big Dye v.3. La información obtenida fue analizada en el programa de computadora Chromas Pro.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización de la biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* en forma de ADN.

La cantidad de ADN de la biblioteca de expresión determinada por fluorometría es de 63 ng de ADN por cada  $\mu\text{L}$  de la biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* teniendo en total de 126  $\mu\text{g}$  en los 2 mL de la biblioteca.

La integridad del material genético fue verificada por la electroforesis (Figura 14), el cual nos muestra para la biblioteca de *Anaplasma marginale* un par de bandas definidas: una que se encuentra alrededor de 6,000 y 7,000 pb y la otra de menos de 3,600 pb; además de estas podemos observar bandas dispersas lo cual se traduce en material genético degradado. Es importante señalar que lo anterior no tiene un impacto negativo para los efectos de este estudio, debido a que la gran mayoría del material genético se encuentra en óptimas condiciones de trabajo así que la biblioteca en forma de ADN se encuentra con una calidad “aceptable” para la transformación de las células.



Figura 14. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de la biblioteca en forma de ADN de *Anaplasma marginale* (Biblioteca) 1.- Marcador de Peso Molecular; 2.- Biblioteca.

### 7.2 Obtención de bacteriófagos recombinantes. Construcción de la biblioteca primaria.

De la transformación de células competentes XL1-BLUE MRF' con 50 ng de ADN de la biblioteca en construida en el vector pHage 3.2 se obtuvo un total de  $2.03 \times 10^5$  ufc, lo anterior puede considerarse como que la transformación fue eficiente. Dicha cantidad de ufc corresponde a  $4.6 \times 10^6$  ufc por  $\mu\text{g}$  de ADN. Para amplificar la biblioteca ya en el bacteriófago filamentoso las células transformadas se superinfectaron con el fago ayudador M13K07, el cual es el encargado de la producción de bacteriófagos filamentosos que contengan el vector pHage 3.2. debido a que es éste fago ayudador el que posee la información necesaria para el ensamblaje de los bacteriófagos y su liberación de la célula hospedera.

### 7.3 Rescate de los bacteriófagos recombinantes. Superinfección con el bacteriófago ayudador M13K07.

Posterior a la transformación de las células competentes se procede a la superinfección para llevar a cabo la liberación de los bacteriófagos recombinantes utilizando  $1.0 \times 10^{11}$  ufp del

bacteriófago ayudador M13K07 para obtener un volumen de 10 mL de una biblioteca en forma de bacteriófagos recombinantes.

Para conocer la cantidad de bacteriófagos que han incorporado el vector se procede a infectar células XL1-BLUE MRF' en su fase de crecimiento logarítmico y haciéndolas crecer en un medio con Ampicilina ya que únicamente aquellas bacterias que hayan sido infectadas con el bacteriófago filamentoso recombinante podrán crecer en un medio que ha sido ya que sólo estas poseerán el gene de resistencia a ampicilina contenido en el vector. El título de la biblioteca en forma de bacteriófagos recombinantes alcanzó un título de  $4.94 \times 10^{10}$  ufc/mL, produciendo un volumen de biblioteca de 10 mL.

#### 7.4 Determinación de clonas positivas presentes en la biblioteca de expresión.

Con el propósito de determinar el porcentaje de clonas en la biblioteca que incorporaron insertos entre 700 y 1,000 pb de ADN de la biblioteca de *A. marginale*, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando iniciadores (primers) específicos para el vector, estos iniciadores se unen a secuencias que se encuentran en las regiones flanqueantes del sitio múltiple de clonación en el fagémido. De las colonias recuperadas de medio adicionado con ampicilina provenientes de la infección de células XL1BLUE MRF' con 50 ng de DNA de la biblioteca, se tomaron 50 clonas de la biblioteca y se sometieron a la reacción de PCR.

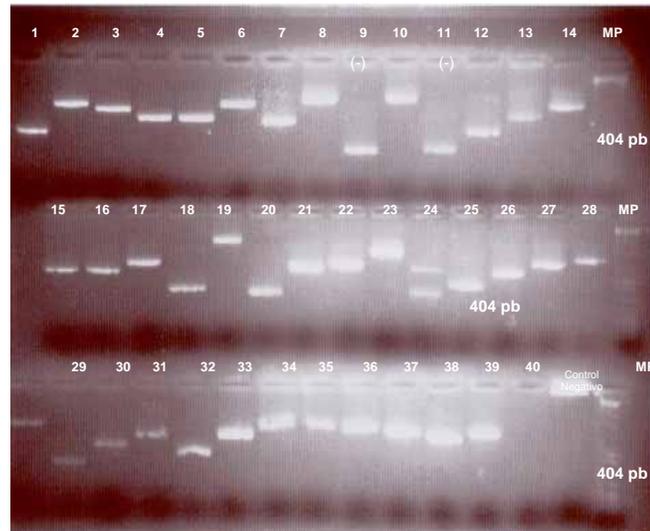


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de PCR de las clonas recombinantes, revelado con bromuro de Etidio. Las clonas no recombinantes amplifican un segmento de 370 pares de bases; señaladas con un signo negativo.

Del gel de agarosa de los productos de PCR se pueden observar bandas de diferentes pesos moleculares; de las cuales aquellas con un peso molecular mayor de 1,094 y hasta 1,394 pb corresponden a clonas consideradas como positivas; es decir, que incorporaron el inserto y aquellas con un peso molecular de 394 pb; que corresponde al tamaño del vector sin inserto, son consideradas clonas negativas. Tomando los parámetros explicados anteriormente se obtuvo un porcentaje de clonas postivas o que incorporaron el inserto de: 91.07%

#### 7.5 Preparación de cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale* a partir de glóbulos rojos infectados.

El antígeno de *A. marginale* fue purificado por la metodología antes descrita, una vez que los cuerpos iniciales fueron obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de acrilamida al 10% en condiciones reductoras (Figura 16).

El perfil de bandas que presenta el antígeno de *A. marginale* con respecto a los reportados anteriormente se corresponde completamente. Es importante destacar que algunas haciendo una comparación con el patrón de bandeado de los glóbulos rojos sanos podemos inferir que nuestros cuerpos iniciales se encuentran libres de estos residuos. Además del antígeno podemos decir que las proteínas provenientes de los cuerpos iniciales no se encuentran degradadas dado que las bandas se encuentran bien definidas y de acuerdo a los pesos moleculares antes reportados.

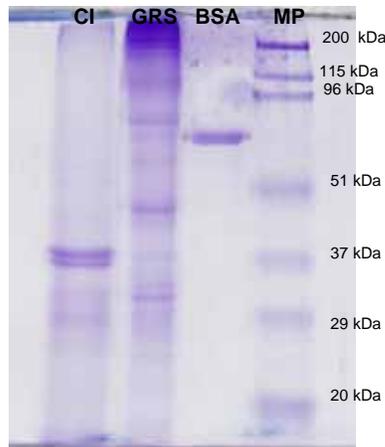


Figura 16. Electroforesis en gel de Acrilamida al 10% de los cuerpos iniciales de *Anaplasma marginale*. CI: cuerpos iniciales, GRS: glóbulos rojos sanos de bovino, BSA, Albúmina Sérica Bovina; MP: marcador de peso molecular.

## 7.6 Evaluación del antígeno de *Anaplasma marginale* por ensayo de ELISA.

Para evaluar la reactividad del antígeno frente a los anticuerpos en suero de bovinos infectados experimentalmente con *A. marginale* se llevó a cabo un ensayo de ELISA utilizando diferentes cantidades de los cuerpos iniciales (Figura 17). Una vez que el antígeno estaba en un soporte inmóvil se adicionaron los Sueros positivos y negativos los cuáles contienen los anticuerpos; de esta forma podemos conocer la afinidad de éstas inmunoglobulinas por el antígeno purificado.

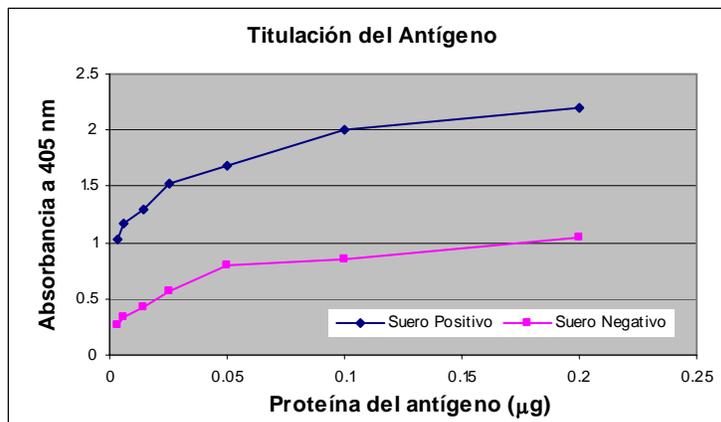


Figura 17. Resultados del ensayo de ELISA de la evaluación del Antígeno de *Anaplasma marginale* con el suero de bovinos infectados (Suero Positivo y Negativo) experimentalmente variando la concentración de proteína del antígeno desde 0.02 µg hasta 0.2 µg.

En la gráfica se muestra como a medida que la cantidad del antígeno total de *Anaplasma marginale* aumenta en cada pozo, hay un aumento en la absorbancia lo cual se traduce como una elevación en la cantidad de anticuerpos afines al antígeno. Es importante señalar que a diferencia de la afinidad mostrada entre el Suero Positivo y el antígeno de *A. marginale* la afinidad del Suero Negativo por el antígeno presenta valores muy por debajo de ellos. Las diferencias entre los valores de absorbancia son demuestran la presencia en el Suero Positivo de anticuerpos que reconocen específicamente a los antígenos de la rickettsia; lo cual, es lo requerido dado que para este estudio se necesitan anticuerpos que identifiquen a los antígenos de *A. marginale* entre otras proteínas. La cantidad óptima para llevar a cabo ensayos de ELISA para caracterización de sueros es de 5  $\mu\text{g}$  de proteína total de cuerpos iniciales purificados por pozo de ensayo.

### 7.7 Evaluación de los anticuerpos presentes en los sueros de animales por ensayo de ELISA.

La afinidad de los anticuerpos presentes en los sueros de animales infectados y no infectados con *A. marginale* por sus antígenos fue determinada por el ensayo de ELISA (Figura 18). La placa fue sensibilizada con una cantidad constante del antígeno de 5  $\mu\text{g}$  de proteína total por pozo y en contraparte fueron utilizadas diferentes cantidades de proteína sérica de los sueros tanto positivo como del negativo.

En el gráfico se observa claramente la afinidad de los anticuerpos presentes en el Suero positivo con respecto al antígeno de *Anaplasma marginale* y hay un aumento gradual de la Absorbancia conforme la cantidad de proteína sérica total va aumentando. En contraparte se encuentran los datos obtenidos por la utilización del Suero Negativo; cuyos valores de absorbancia traducidos como afinidad se encuentran seguramente justificados por uniones del tipo inespecíficas, dichas uniones se deben a que en los sueros se encuentran una colección de inmunoglobulinas capaces de reconocer una amplia gama de antígenos por uniones inespecíficas. Es importante tipificar los sueros a utilizar debido a que debemos garantizar que los anticuerpos presentes en el suero identifican particularmente al antígeno de *Anaplasma marginale* ya que son estas inmunoglobulinas las que se utilizan como proteína tamizadora de la biblioteca de expresión.

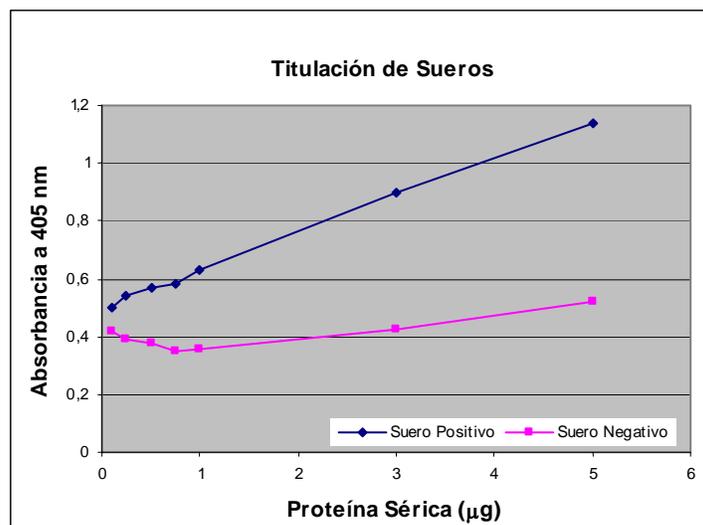


Figura 18. Resultados del ensayo de ELISA de la evaluación de sueros positivos y negativos de bovinos infectados experimentalmente con *Anaplasma marginale*.

## 7.8 Purificación de anticuerpos IgG2 a partir de sueros de animales infectados experimentalmente con *Anaplasma marginale* por cromatografía de intercambio iónico.

Para obtener las IgG2 necesarias para llevar a cabo el tamizaje de la biblioteca de desplegamiento en bacteriófago de *A. marginale* se llevó a cabo purificándolas por cromatografía por intercambio iónico (Figura 19), utilizando una matriz de DEAE/Sephadex. En esta parte es importante recalcar que la matriz utilizada está diseñada para unir las IgG1 además de otras proteínas, así que la fracción de nuestro interés (aquella que contiene IgG2) es aquella que no es afín a la matriz; por lo tanto, ésta será la primera fracción en salir de la columna durante la cromatografía. En el cromatograma en el eje x se muestra el tiempo y en el eje y la absorbancia. El primer pico corresponde como se mencionó anteriormente a las IgG2; es decir la fracción que no se pegó a la matriz de la columna y el segundo pico corresponde a la fracción IgG1 y otras proteínas.

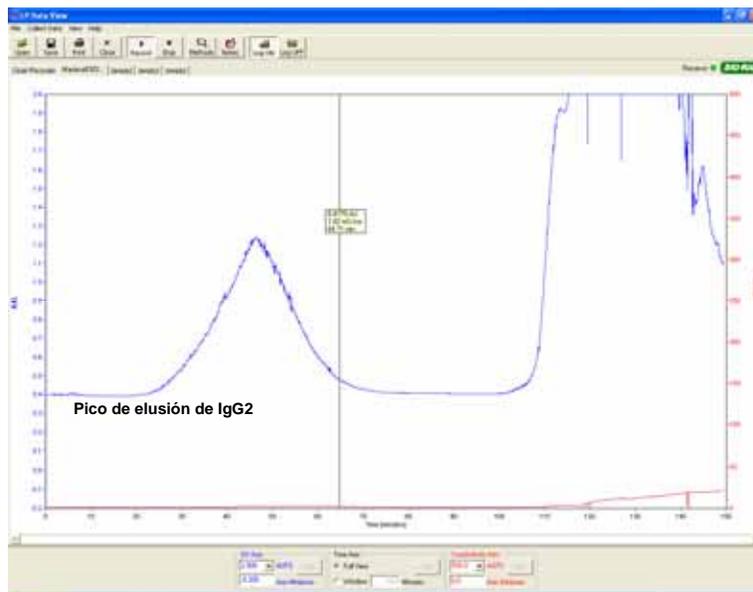
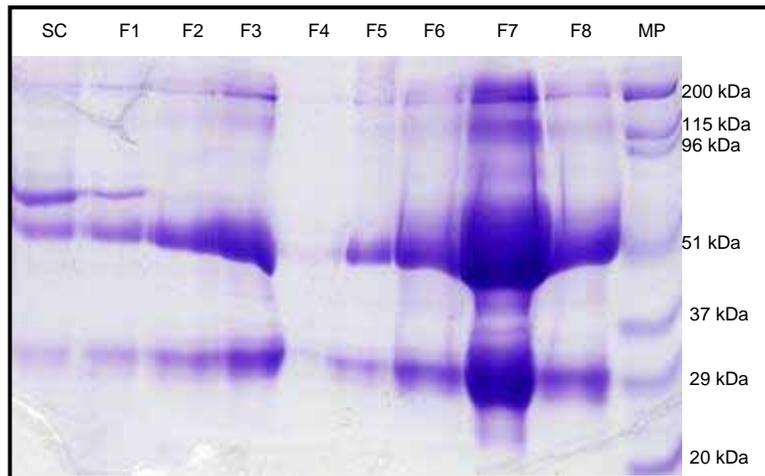


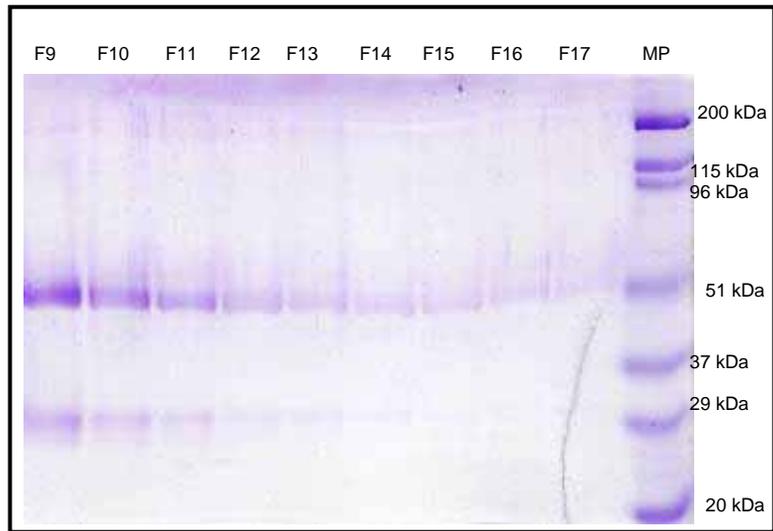
Figura 19. Cromatograma de la purificación de anticuerpos IgG2 por cromatografía de intercambio iónico.- La línea azul representa las Unidades de Absorbancia (UA) y la línea roja la conductividad; en el eje X se observa el Tiempo en minutos. En la gráfica se especifica en cual de los dos picos salen las IgG2.

En el gel 1 y 2 (Figura 20 a y B) se muestra el resultado de la electroforesis en gel de Acrilamida-bis acrilamida de cada una de las fracciones recuperadas en el primer pico de la purificación y en cada una de ellas éstas se muestra el patrón de bandas característico para los anticuerpos en condiciones reductoras en el cual se muestra una banda cuyo peso molecular corresponde a las cadenas pesadas y tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y una segunda banda que corresponde a las cadenas ligeras y que tiene un peso molecular de 25 kDa. Las bandas adicionales a las arriba mencionadas corresponden a proteínas como por ejemplo BSA; y que no tienen una influencia en la afinidad por el antígeno de *A. marginale*.

Figura 20 A y B



20 A: Gel 1.- Electroforesis en gel de Acrilamida al 10% de las diferentes fracciones de IgG2 purificadas a partir de suero de bovinos infectados experimentalmente. SC: suero completo; F1a F8; Fracciones. MP: marcador de peso molecular.



20 B: Gel 2.- Electroforesis en gel de Acrilamida al 10% de las diferentes fracciones de IgG2 purificada a partir de suero de bovinos infectados experimentalmente. F9 a F17; Fracciones. MP: marcador de peso molecular.

### 7.9 Verificación de la pureza de lo anticuerpos IgG2 purificados por ensayo de ELISA.

Para corroborar que las IgG's purificadas por intercambio iónico corresponden al subtipo 2 se llevó a cabo un ensayo de ELISA (Tabla 1) utilizando anticuerpos monoclonales específicos contra los subtipos de IgG's:  $\alpha$ IgG1 e  $\alpha$ IgG2.

Tabla 1.

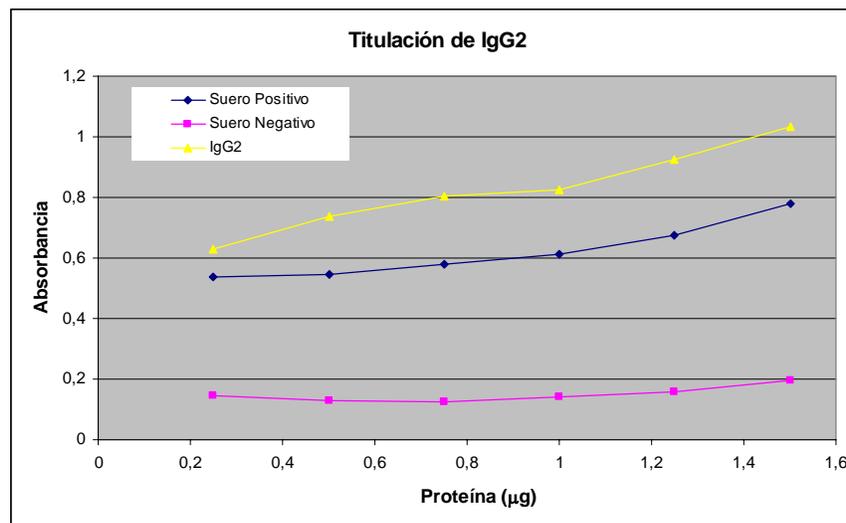
	Blanco	Control IgG1	Control IgG2	Muestra 1	Muestra 2	
	1	2	3	4	5	Anticuerpo monoclonal
A	0.726	2.171	0.439	0.582	0.562	IgG1
B	0.567	2.183	0.365	0.327	0.481	IgG1

C	0.576	2.253	0.346	0.366	0.473	IgG1
D	0.522	2.144	0.370	0.355	0.587	IgG1
E	0.493	0.430	3.303	3.285	3.315	IgG2
F	0.505	0.348	3.282	3.258	3.299	IgG2
G	0.415	0.423	3.315	3.247	3.323	IgG2
H	0.611	0.764	3.241	3.268	3.283	IgG2
				Confirmativa de IgG2	Confirmativa de IgG2	

En la tabla 1 se muestran los valores de Absorbancia que reflejan que la purificación de los anticuerpos del subtipo IgG2 fue satisfactoria tanto en la Muestra 1 como en la Muestra 2 lo cual puede verse reflejado en los valores de Absorbancia en los pozos en los cuales el anticuerpo monoclonal dirigido contra la IgG2 es similar con respecto a los controles para IgG2.

#### 7.10 Titulación de la reactividad de los anticuerpos IgG2 purificados por ensayo de ELISA.

Para determinar si existe afinidad entre el antígeno de *Anaplasma marginale* y los anticuerpos IgG2 purificados se llevó a cabo un ensayo de ELISA. En la Figura 21 se muestra la curva de titulación de las IgG2 purificadas comparada con las curvas de titulación de los sueros ya caracterizados, la afinidad que existe entre las inmunoglobulinas purificadas por el antígeno de *A. marginale* es evidente dado que muestra un valor muy por arriba de los valores obtenidos para con el suero positivo y con el negativo, ambos previamente ensayados. Dicho reconocimiento encuentra su fundamento en el hecho de que la cantidad de proteínas depositadas en cada pozo en el caso de las IgG2 fueron producidas como respuesta a la presencia de la rickettsia en el individuo experimental y por lo tanto el reconocimiento o afinidad se encuentra aumentado, a diferencia de que la cantidad de proteína de los sueros incluye todos los tipos y subtipos de inmunoglobulinas y además todas las proteínas propias de la sangre, dejando así una cantidad de moléculas afines a los antígenos muy reducida.



#### 7.11 Selección de anticuerpos IgG2 específicos para el antígeno de *Anaplasma marginale* por cromatografía de afinidad.

Para obtener únicamente aquellos anticuerpos que reconozcan específicamente al antígeno de *Anaplasma marginale* las IgG2 purificadas anteriormente se hacen pasar a través de una columna a la cual se encuentra acoplado el antígeno; seleccionando únicamente aquellas anticuerpos afines a los antígenos de la rickettsia (Figura 22).

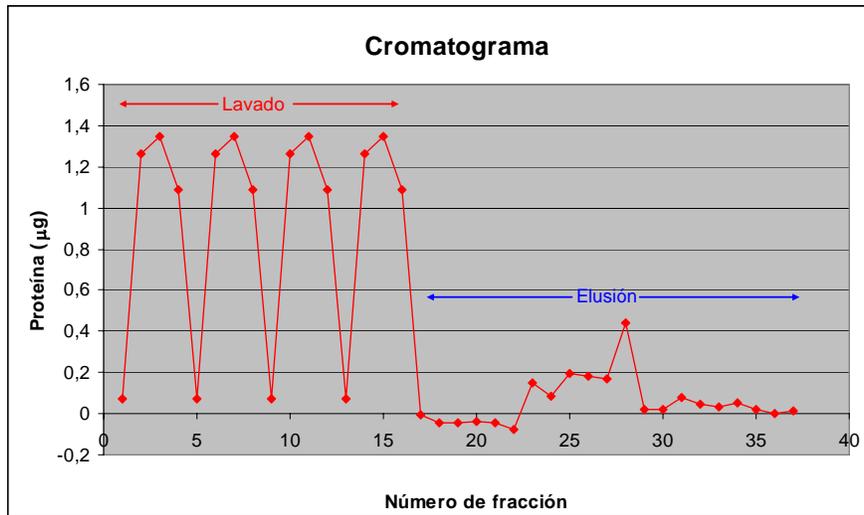
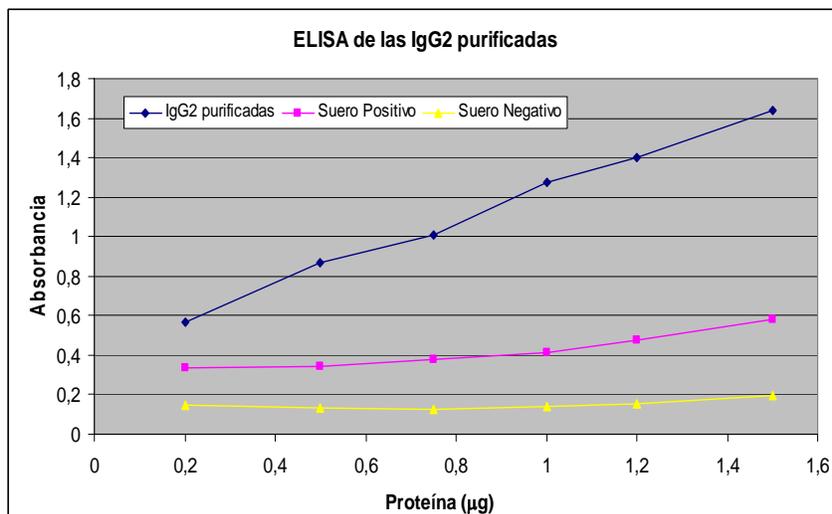


Figura 22. Cromatograma de la purificación de anticuerpos IgG2 específicos para *Anaplasma marginale*. La primera fase representa el lavado de la columna de aquellos anticuerpos que no se unieron (lavado); la segunda es en la cual aquellos anticuerpos afines al antígeno se despegan de la columna (elusión).

Rendimiento de la columna: **0.7%** (Valor calculado tomando en cuenta la cantidad de proteína que entra a la columna y la cantidad de esta misma proteína que se retiene en la misma).

### 7.12 Caracterización de los anticuerpos seleccionados con el antígeno de *Anaplasma marginale* por ensayo de ELISA.

Para llevar a cabo la caracterización de dichos anticuerpos, se llevaron a cabo ensayos de ELISA. En la figura 23 se muestra la diferencia entre la afinidad de los anticuerpos altamente específicos para el antígeno de la rickettsia con respecto a aquella afinidad del suero positivo.



### 7.13 Caracterización de los anticuerpos que reconocen a *Anaplasma marginale* por Western Blot.

Otra forma de evaluar los anticuerpos es mediante la inmovilización del antígeno en un soporte (membrana) previa separación de cada una de sus proteínas de acuerdo a su peso molecular (SDS-PAGE). Una vez que se han transferido las proteínas separadas a la membrana, ésta se ponen en contacto con los anticuerpos primarios; aquellos que queremos evaluar, después se adiciona el conjugado como anticuerpo secundario y finalmente se revela agregando el sustrato correspondiente (Figura 24).

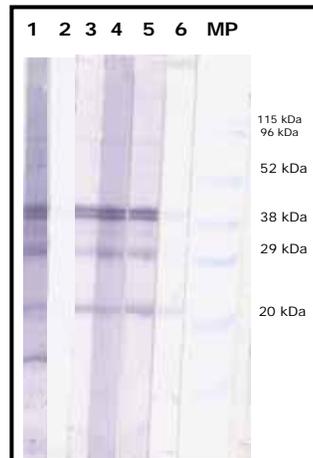


Figura 24. Western Blot del antígeno de *Anaplasma marginale* con diferentes anticuerpos: 1) Suero Positivo, 2) Suero Negativo, 3) IgG's totales purificadas por cromatografía de afinidad con el Äktaprime, 4) IgG2, 5) IgG2 purificadas por intercambio iónico, 6) IgG1 y MP) marcador de peso molecular.

De acuerdo a los resultados de ensayo se observan bandas más definidas y de un color más intenso en aquellas membranas sensibilizadas con el antígeno que fueron puestos en contacto con los anticuerpos IgG2 purificados por intercambio iónico, lo que se traducen como una mayor unión por afinidad específica entre las moléculas del antígeno y las inmunoglobulinas presentes en el purificado. Aunque al analizar los resultados no se encuentre una diferencia avasalladora entre las intensidades de las bandas tal como en los ensayos de ELISA ésto puede ser explicado ya que la diferencia de concentraciones entre las IgG2 purificadas por intercambio iónico y aquellas de otras fuentes es muy grande.

Es importante señalar que las bandas que se reconocen en cada uno de los ensayos corresponden a los pesos moleculares de las diferentes proteínas de superficie (MSP1 a 5)

### 7.14 Tamizado de la biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* con los anticuerpos IgG2 específicos para el antígeno.

A partir de la biblioteca de despliegue en bacteriófago se llevaron a cabo 3 ciclos consecutivos de selección empleando anticuerpos IgG2 altamente específicos para el antígeno de *A. marginale*. En la tabla 2 se muestra el tamaño de la biblioteca enriquecida y purificada por cada uno de los ciclos del tamizaje.

Tabla 2.

Ciclo	Tamaño de la biblioteca enriquecida y purificada
1	1.26X10 <sup>10</sup> ufc/mL
2	5X10 <sup>9</sup> ufc/mL
3	7.16X10 <sup>7</sup> ufc/mL

7.15 Selección de clonas individuales provenientes del tercer ciclo del tamizado de la biblioteca de expresión.

Las clonas seleccionadas son resultado del tamizado de la biblioteca de expresión por tres ciclos consecutivos utilizando como proteína seleccionadora anticuerpos IgG2 específicas para el antígeno de *Anaplasma marginale*.

En la tabla 3 se muestra los títulos de las 17 clonas que fueron seleccionadas para secuenciación.

Tabla 3.

Número de clona	Título
1	1.6 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
2	1.6 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
3	1.3 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
4	1.4 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
5	8.3 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
6	1.4 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
7	1.06 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
8	1.75 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
9	1.4 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
10	6.1 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
11	1.08 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
12	2.02 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
13	1.46 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
14	1.16 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
15	1.3 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
16	1.46 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL
17	1.2 X 10 <sup>10</sup> ufc/mL

7.16 Caracterización por ensayo de ELISA de las clonas individuales seleccionadas.

Para determinar el reconocimiento de los sueros por estas clonas seleccionadas se llevó a cabo un ensayo de ELISA (Figura 25).

Ensayo de ELISA de las clonas individuales seleccionadas por tres ciclos de tamizado de la biblioteca de expresión utilizando IgG2 específicas para el antígeno de *A. marginale* y revelado con anti-pVIII.

En el gráfico se evidencia que cada una de las clonas reconocidas por los anticuerpos específicos para *A. marginale* tiene diferente grado de reconocimiento o afinidad. Esto podría interpretarse como que cada una de las clonas seleccionadas posee características de reactividad o inmunogenicidad a diferentes niveles. Los valores de Absorbancia de las IgG2 altamente específicas no muestra una gran diferencia con los valores mostrados por el suero Positivo; lo cual podría interpretarse como que hay una afinidad por el antígeno de la misma magnitud.

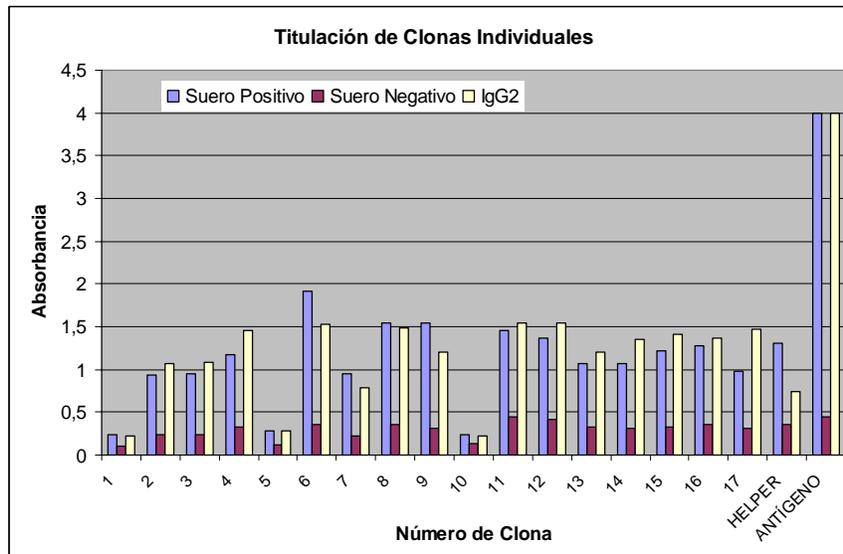


Figura 25. ELISA de las clonas individuales seleccionadas por el tamizado de la biblioteca. En la gráfica se muestra la afinidad de las clonas por las IgG2 purificadas. Como control negativo se encuentra el fago Ayudador y como control positivo el antígeno de *Anaplasma marginale*.

### 7.17 Secuenciación de las clonas obtenidas después de tres ciclos consecutivos de tamizado con los anticuerpos purificados.

Tabla 4.

OD ELISA IgG2	Clona	Tamaño del Inserto	Número de bases secuenciadas	Región del genoma de <i>A. marginale</i>	Identidad		GAPS (%)	Identidad del segmento clonado
					%	(N/N)		
0,228	1	2,300	810	683,123-683,788	91	613/669	1	Cadena N de la <a href="#">1-desoxi-D-xylulose 5-fosfato reductoisomerasa NADH deshidrogenasa</a>
1,065	2	1,900	978 <sup>a</sup>	756,188-756,620	99	429/435	0.45	Proteína hipotética
1,078	3	2,400	750 <sup>a</sup>	1'099,669-1'100,000	100	332/332	0	Proteína hipotética
1,449	4	2,300	758 <sup>a</sup>	683,083- 683,731	99	644/649	1	Cadena N de la <a href="#">1-desoxi-D-xylulosa 5-fosfato reductoisomerasa NADH deshidrogenasa</a>
0,275	5	2,300	825 <sup>a</sup>	638,057-638,782	95	694/727	5	<a href="#">foliopoliglutamato sintetasa porfobilinogeno deaminasa</a>
1,527	6	2,200	794 <sup>a</sup>	1'099,669-1'100,000	99	330/332	0.6	Proteína hipotética
0,788	7	2,200	712 <sup>a</sup>	756,188-756,617	94	410/434	1	Proteína hipotética
1,487	8	1,800	946 <sup>a</sup>	638,050-638,782	97	718/734	0.3	<a href="#">foliopoliglutamato sintetasa porfobilinogeno deaminasa</a>
1,203	9	2,200	1,176 <sup>a</sup>	1'132,232-1'132,403	100	172/172	0	Subunidad $\gamma$ de la <a href="#">DNA polimerasa III</a>
0,221	10	1,800	552 <sup>a</sup>	1'132,232-1'132,403	100	172/172	0	Subunidad $\gamma$ de la <a href="#">DNA polimerasa III</a>
1,544	11	2,000	834 <sup>a</sup>	1'099,669-1'100,000	99	331/332	0.3	Proteína hipotética
1,543	12	2,200	1,162 <sup>a</sup>	1'099,669-1'100,000	100	332/332	0	Proteína hipotética
1,207	13	1,850	514 <sup>a</sup>	756,272-756,617	91	321/349	2	Proteína hipotética
1,354	14	1,850	795 <sup>a</sup>	1'099,669-	100	332/332	0	Proteína hipotética

				1'100,000				
1,514	15	1,900	539	1'090,004- 1'090,350	92	327/354	3	OMP 8
				1'088,763- 1'088.837	100	75/75	0	OMP7
1,363	16	2,000	1,171 <sup>a</sup>	683	99	705/707	0	Cadena N de la <a href="#">1-desoxi-D-reductoisomerasa NADH deshidrogenasa</a>
1,469	17	2,200	916 <sup>a</sup>	1'132,232-	100	172/172	0	Subunidad <a href="#">polimerasa III</a>

<sup>a</sup> Parte de esta secuencia pertenece a la proteína pIII del Bacteriófago M13.

	Cadena N de la <a href="#">1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa NADH deshidrogenasa</a>
	<a href="#">Folypoliglutamato sintetasa forfobinogeno deaminasa</a>
	Subunidad $\gamma$ de la <a href="#">DNA polimerasa III</a>
	Proteína hipotética en la región 756,188 a 756,620
	Proteína hipotética en la región 1'099,669 a 1'100,000
	Genes de las proteínas de la Membrana Externa 7 y 8

Para obtener información sobre los epítopes relevantes en cuanto a la generación de una protección por el sistema inmunológico se extrajo el material genético de las clonas seleccionadas por los anticuerpos IgG's totales e IgG2 específicas para el antígeno, purificados a partir de suero de animales infectados; se secuenció la información genética y se cotejó con el banco de genes para obtener la identidad de ésta.

Secuenciación de las clonas individuales seleccionadas por tres ciclos de tamizado de la biblioteca de expresión utilizando IgG2 específicas para el antígeno de *Anaplasma marginale*.

En la tabla de resultados de la secuenciación de las clonas se muestran además de las regiones a las cuales corresponden los insertos, algunas características importantes que pudieran influir en la densidad optica mostrada en los ensayos de ELISA como es el tamaño del inserto. Algunas regiones se repiten inclusive en más de una ocasión y se encuentran marcados con el mismo color. Dado que aquellas clonas que corresponden a una misma región de acuerdo a la secuenciación se demuestra lo contrario ya que si el tamaño del inserto es diferente por lo tanto es evidente que corresponden a diferentes clonas. Lo anterior, es muy importante ya que esto se interpreta como que esta proteína codificada en dicha región está siendo seleccionada en más de una vez por los anticuerpos específicos de *A. marginale*.

## 8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La expansión y caracterización de la biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* se llevó a cabo exitosamente, obteniendo un título final de  $4.94 \times 10^{10}$  ufc/mL de la Biblioteca secundaria, con un porcentaje de clonas que incorporaron el inserto de 92% lo cual se traduce en un número considerable de variantes que incluyen diferentes regiones del genoma de *Anaplasma marginale*, diferentes combinaciones genéticas resultado de la recombinación de los pseudogenes, diferentes porciones de genes y por lo tanto diferentes partes de proteínas tanto solas como combinadas, para ser identificadas por aquellos anticuerpos que reconocen específicamente a la rickettsia.

El tamizado de la biblioteca de expresión de la rickettsia se llevó a cabo bajo condiciones que ayudaran a la optimización del proceso, las cuales incluyeron: la utilización de una pequeña cantidad de proteína tamizadora (IgG2 específica para *A. marginale*) con la finalidad de aumentar el grado de afinidad de las uniones entre las clonas seleccionadas y los anticuerpos, un aumento de la astringencia de los lavados entra cada ciclo de tamizado o selección con el fin de eliminar aquellas uniones de tipo inespecífico como las que pueden llegar a darse únicamente por uniones débiles entre las moléculas y que no tienen su naturaleza en un reconocimiento molecular pleno, sometimiento a varios ciclos de selección consecutivos de las clonas seleccionadas en los cuales se va disminuyendo la cantidad de la proteína tamizadora para un aumento en la competencia y la utilización de anticuerpos IgG2 altamente específicos para el reconocimiento de los antígenos de *A. marginale* provenientes de sueros de animales infectados experimentalmente con los cuerpos iniciales de la *A. marginale* para garantizar que éstas IgG2 altamente específicas seleccionen clonas que son verdaderamente afines.

A partir de la biblioteca de expresión enriquecida y purificada por tres ciclos de tamizado con IgG2 específicas para los antígenos de *A. marginale* con un título de  $7.16 \times 10^7$  ufc/mL se seleccionaron 30 clonas que expresan epítomos reconocidos por las inmunoglobulinas, a partir de esta colección y por ensayo de ELISA se escogieron aquellas clonas que presentaban mayor afinidad tanto para el suero Positivo como para las mismas IgG2 utilizadas para llevar a cabo el tamizado; lo anterior con el fin de secuenciar únicamente aquellas clonas que se comprobó que son altamente afines a los anticuerpos, obteniendo de esta forma la información necesaria para llevar a cabo la relación entre genotipo y fenotipo.

La información genética obtenida a partir de la secuenciación de las clonas seleccionadas por ensayo de ELISA nos muestra regiones que normalmente se encuentran altamente conservadas en los organismos, ya que éstas codifican para proteínas que poseen funciones básicas como lo es la duplicación del material genético y que a diferencia de lo que se esperaba, no fueron seleccionados aquellos genes que codifican para las proteínas de superficie; las cuales se caracterizan por ser inmunogénicas como ya se ha demostrado en diferentes ensayos. Lo anterior puede deber su explicación a dos cuestiones principalmente: la disponibilidad de las proteínas de superficie en condiciones normales dado el ciclo de vida del parásito, el cual se encuentra caracterizado por la migración de una célula hemática a otra para llevar a cabo la infección y es en este transcurso cuando las proteínas que se encuentran más susceptibles a ser atacadas por el sistema inmunológico del hospedero son las que se encuentran en la membrana celular externa y por otro lado a la cantidad de las diferentes variantes, de las diferentes combinaciones, que hacen que la competencia que se da entre los diferentes fenotipos expresados, por las inmunoglobulinas altamente específicas para el antígeno sea más dura lo que a su vez se traduce en un aumento en la especificidad de la afinidad entre las moléculas.

La disponibilidad de las proteínas encontradas en la superficie hace que éstas en condiciones normales o experimentales se encuentren mucho más accesibles que aquellas que permanecen en condiciones normales dentro del organismo del patógeno, dándoles una ventaja

ante las otras proteínas en cuanto al reconocimiento inmunológico se refiere así como al evolutivo; aunque, esto no necesariamente se traduce como que estas proteínas internas no puedan iniciar una respuesta inmunológica por sí mismas eso quedaría en duda; sino que cabría la posibilidad de que estas proteínas se encuentran alejadas del sistema inmunológico del hospedero para no causar una respuesta inmunológica agresiva del hospedero contra el parásito.

Es muy importante señalar que hay regiones genéticas que fueron seleccionadas más de una vez como la comprendida entre 1,099,669 a 1'100,000 que pertenece a una Proteína Hipotética y que se repite 5 veces entre la colección de 17 clonas; es decir, que dicha región está siendo seleccionada en más de una vez y con diferentes tamaños de inserto lo cuál nos hace darnos cuenta que pertenecen a clonas diferentes. En resumen, estas clonas son seleccionadas en más de una ocasión debido a su afinidad con los anticuerpos utilizados para el tamizado y no a uniones inespecíficas.

Otro aspecto importante a ser considerado y que puede ser muy relevante en cuanto al entendimiento de los resultados obtenidos en este estudio son las hipótesis encaminadas a justificar la respuesta inmunológica basándose en la premisa de que ésta puede deberse no únicamente a una proteína en particular sino más bien a una serie de combinaciones de diferentes proteínas que activan la respuesta inmunológica (Noh S. M. y col. 2008). Estas hipótesis se encuentran basadas en resultados de diferentes ensayos en los cuales se han utilizado proteínas monoclonales de las proteínas de superficie que han sido utilizadas para inmunizar individuos sin obtener una respuesta inmunológica protectora y por lo tanto no satisfactoria.

Si bien, habría que probar primero que los fagos filamentosos que despliegan las proteínas de *A. marginale* descritas son efectivamente reconocidas por anticuerpos presentes en el suero de animales infectados mediante Western blots; o que anticuerpos preparados contra éstas proteínas de fusión reconocen de forma auténtica el componente antigénico en un extracto de eritrocitos infectados. Y finalmente estas clonas podrá ser probada su efectividad como inmunógenos o como elementos para el diagnóstico de la Anaplasmosis bovina en ensayos de desafío con animales *in vivo*.

A la fecha, no se ha identificado una proteína de superficie de *Anaplasma marginale* capaz de inducir inmunidad por sí sola, mientras que las proteínas de superficie como un complejo se sabe que producen una disminución en el nivel rickettsemia. Esta diferencia entre la eficacia de los inmunógenos complejos contra las proteínas por si solas reflejan la necesidad de un diversidad de epitopos mayor para utilización como blancos para los anticuerpos o, en una alternativa, pueden llegar a reflejar la importancia del reconocimiento cruzado inducido por proteínas que pertenecen a complejos asociados a la membrana.

En general, la tecnología de desplegamiento en bacteriófago es una herramienta de la biología molecular que se encuentra encaminada precisamente al descubrimiento de nuevas moléculas con potencial inmunogénico y que se encarga de discriminar de una gran variedad de combinaciones aquellas que pudieran utilizarse en otros campos de aplicación como diagnóstico y vacunas.

La anaplasmosis bovina es una enfermedad que ha tenido mucho impacto en los parámetros productivos por mucho tiempo y la producción de nuevos recursos genéticos para su adelanto e innovación como los expuestos en este trabajo podrán ser el punto de partida a nuevas tecnologías y adelantos médicos.



## 9 CONCLUSIONES

Se caracterizó la biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* construida en el vector pHage 3.2 con un título de  $4.94 \times 10^{10}$  ufc/mL, la cuál fue tamizada con anticuerpos IgG2; purificados a partir de suero de animales infectados experimentalmente por cromatografía de intercambio iónico y de afinidad, específicos para el antígeno de *A. marginale* para la obtención de una biblioteca enriquecida y purificada por tres ciclos consecutivos de tamizado con un título de  $7.16 \times 10^7$  ufc/mL.

A partir de esta selección de clonas se caracterizaron por ensayos inmunológicos y de secuenciación a 17 clonas que expresan epitopos relevantes de *A. marginale* las cuales se caracterizan por pertenecer a regiones que codifican para proteínas con funciones básicas para la sobrevivencia de los organismos, que no han sido caracterizadas como inmunógenos. Así que éstas pueden ser utilizadas en ensayos de caracterización inmunológica *in vivo* para probar su importancia en la participación en métodos de diagnóstico y/o para fines vacunales.

Tal como se ha demostrado ampliamente, las bibliotecas en bacteriófago son una gran fuente para estudios de diversidad genotípica y fenotípica. El valor de la unión del genotipo y del fenotipo se encuentra libre de duda. En las últimas dos décadas se ha observado un increíble crecimiento del uso del desplegamiento en bacteriófago, y además se han desarrollado un gran número de tecnologías acopladas a él, que se incrementarán conforme se hagan nuevos descubrimientos científicos, no únicamente en Medicina Veterinaria sino también en otras áreas como biomédica, agricultura, química e inclusive electrónica.

La mayoría de las tecnologías han presentado limitaciones y dificultades, y el desplegamiento en bacteriófago no es la excepción, pero no cabe la menor duda de que el desplegamiento en bacteriófago es una tecnología extremadamente útil, y que ha hecho una enorme contribución a la ciencia y que lo continuará haciendo por largo tiempo. Conforme avanza la ciencia para resolver nuevos problemas científicos, la utilidad de los sistemas de desplegamiento será limitada únicamente por nuestra imaginación.

## 10. ANEXOS

### I. Secuencia clona 1

CAGAAGTCCACACACCCATGCGTGTTCCACGATTGCCGCGGAATAACCGTAGTCTGGTCTGCTGTTTCTGTGACA  
TGC GGAAAAAGGCCAAGAGATCTTGAGATGAAAACTGTGATCTTGTTAAGGAGAATGGCCACAACCTTCAAAGTCA  
TCATGATTGTCGCGCATAATCTGAACTGCTTTCTACCCTGTGCACCAAGTGAACCAAATACAGAACTCTCTTCC  
GACCCATATGAAGCACTCAACCGTTGACCTAAGTGCACCTCCAAAAACCCACTTTATGCTCTGGAACAAGGTGT  
CAAATACTGGGCCAAAAACAAGGCAATGACGCTCAACAACATACAAAAACGGCAATAACGGTCAGGCCAAGT  
GGTGC GAAAGCGCTGGATGCCCATCACCCATTACCAGTTGATCAAAGTACACCACCCTAGCGATACGAAAAAGA  
AAAAGAATGGCTTAATCTTGACTGTTACACAAGCAAACGTACGGGAAAGAAAAGGAGGTTGGGATGTCTGACATC  
TCGATACTTTGAGAAAAAGTATTTGGGCCAACATCCCACAACTGCGGAAACCCGGCAGCTGAAACCATATAAAC  
GACCAACGCGAAAAACAACAATGGGCTACTTCGGTGCATACCCGCAAGGCTTGCTAATTCAAACCCTTCATCATCC  
TACCTGAGGAGTACCGAAAAATCCACGCAATTATCACCCAACCTCATCAACACGTAAGTAAAGATGGCATAAGAAA  
ACGTGCCATGCAAGACAACCACCGACAGTCCCTACCCGATATCACACTCTGGATCCTAAAAAG

### II. Secuencia clona 2

AAGGTCAGAGACATTCGCTGCGTGTTCCCGAAGTTGCCGCGGAAAATTCGTAGTCTGGTCTTGCTGTTTCTGTGA  
CTATGCCGGCCAGCCGGCCGTCGACGATCCGCAAATCCAGAGATGACGTAATCATGCGCGGGTTACCAAACCGG  
TGCCTAGTTTATTTGCCACGAGACACAGTCATTTAGCTGAGTGC GGTGTTATGTACACCCCCAAAAAGCCCCGGCA  
AAGAGGGATTCTCGCCCCGCCCTTGCCTTAGAGCTGGCTAACGCTCGGCACCTCCTCGTGCTTGCAGGCAACA  
ACCAGTCACTCCTACACCGTTGAGCGCTGCTGATGAAGTACCGTTTTATAGTGAATATTGAAGCAATGTTTCTTCA  
ACGGTCACACCGAACTCCTTCACGAGCTCTTCTAGAGTTTGCATCTCTACGAATTCGCCATAACGTCCAGAGCAG  
CTTGAGCTTCGGTCTCAGCATCGATGGCAGAAGTTTTTGGTTTACTGACAAGTAGCAACCTTACCAGGAATAGCC  
GCAGCCATGGATCAGATCTGGGCCCGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGAACGGTACCGCATAGGAGC  
TCGCTGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAA  
ACTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTACTGAGGGTGGCG  
CTCAGTGTACGGTACATGGGTTCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCG  
GTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTAATAACCCCTCCTGAGTACGGTGTACACCTATTCCGGGCTAT  
ACTTATATCAACCCTCTCAACGGCACTTATCCC GCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCCTCCCTT  
GAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTACTGTTTTCAGAAATATAGGTTCCAAGATAGGCAGGGGGCATTAGACTGTT  
TATACCGGCACTGTTTACTCAGGGCACCTGACCCCGCTCTAAACCTTACTTACCGAGCTAACACTTCTGTGAAT  
CAATCAAGCGCCAGTGTAAAGACCGCCCTAGACTTGGAAACGTGCTCAAGTAATGACTGAGGCGAGAGAT

### III. Secuencia clona 3

AGACGTCTCGTACACGAGCTGCGTGTTTCGAAATTCGAGGAAAATTCGTAGTCTGGTCTTCTGTTTCTGTGACT  
ATCGGGCCAGCCGGCCGTCGACGATCCAAGCCTGTGAATAACGGGTGCGAGTGTGTGAAATATCGTAATATTAG  
GATAGCTCTTGCTTTTCTTTATCCTGATCGTCGCAGCATAGCGCACCGAACGCGCTACACTGTACACAGCTCATGT  
AAGTATCTGGATACGGGTCGTTACGGAGCTGGACAGAAACAGACTCTGCTGTACCTGTGGGTA CTCACTTAACA  
GGACCAAGCCGTCACATGCGCGCATGCCGGGTTTTTCAATCTCGTGACCCCAAAAGACACAGACCCTGCATACG  
TATACTACATATTGCATACTAACACTAGTAATAATCACGTCATTTTCCAACCATCGGATCAAATCTGGGCCCGAACA  
GAACTGATCTCTGAAGAATACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCGTGAAACTGTTAAAAAATGTGTAGCAAAA  
CCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCT  
GTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGAAATTTGACTGGT GACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCCCTATTGG  
GCTTGAATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTTTGAGGGTGTGCGTTCTGAGG

### IV. Secuencia clona 4

GAGAAGTCTTGAACACGTTAAGTATGTA CTGAGCATTACAGGAAAAAATTATCATAGGCTGTTCCCTTCTGTTGC  
GGTACTATGCGGCCAGCCGGCCGTCGACGATCTTGCGATGCCAGTAACTGTGCATCTTGCTTAGCAACTAGGG  
CCACAACCTTCAAAGTCA TCAGGATTGTGCGCAAAAATCTGAACTGCTTTCTGCCCTATGCACCCAGTGAACCAA  
TACAGAACTCTCTTCCGACCCATATGAAGCACTCAACCGTTGACCTAAGTGCACCCTCCAAAAACCCACACCAG  
GCCCTGGAACAGGATATCAAATACTGGGCCAAAAACAAGGCAATGACGCTCAACAACATACAAAAACGGCAAT  
AACGGTCAGGCCAAGTGGTGC GGAAGCGCTGGATGCCAGCACCCATTGCCGGTTGATCAAAGTACACCACC  
TAGCGATACGAAAAACAGTAAAGCATGGCACAATCCCGACTGCCACACAAGCAGAACGTACGGGAAAGCCACGA  
CCGTTGGGATGTCTGACATCACGATAGATTTGAGAAAAAGTATTTGGGCCAACATCCCAAAAACGGCGGAAACC  
CGGCAGCTGAAACCATAGAGACGACCAACGCGAAAGCCACAAATGGGCTACTTCGGTGCATACCAGCAAGGCTT

GCTAATTCAAACCCTTCATCATCGTACCTGAGGAGTACGGAAAAATCCACGCATTTATCACCCAACCTCGTCAACA  
CATAGT

#### V. Secuencia clona 5

AGAGTTCTGGATACGAGCTACGTGTTCCGAAATCCGCGGAAGGACCGTAGGATGGTCTGCTGTTTCGGTGACAT  
GCGGCCAGCCGGCCGTGACGATCTGCACCTTTCTTCTGATCGATGAGGTGCCGATTTTTGCTCCGGCGGGTA  
AGGAGTTTAGGCTTTTGTACTTTACAGATATAAAAACGTCCATGGGAGATCTTCTTTTGTAGTACGCACGGCATGTCT  
AAGTTTTCGGAATAAAAGCCCCGGAACATCCTTGGCCGAGTGTACGGCAATGTCTATCTTATTGGCCAACAGGGCC  
TCTTCTATCTCTTTGATGAACAGGCCCTTGGCGCAATGTCACACAGTGGCCTGTCAACCTTTACATCCCCAGACG  
TTTTTATCTTGATAACATCCACGCGGACTTCAGGAAAGTGGGCTGCAATTGCGGCTTTGACCTCCTCCGCTTGGAT  
GAGTGCCAGCGTCTTCTCTTGTTCGCAGTCTGACCACAGGAGCATAACATACACCCTCACAAAGAGGACGGAAG  
TACTCATCGAGACCCAGAGTTAGCATATATTTGCCAGTTACTCCACATGGCGTCAAACATGAATCGCAGTGATGGT  
AGACAACCTTGCCTTGGCCGATAACTCTCCATCCAGCCATGATAAAAATTGGGATATCAGCATAACAACGCTCTCT  
TTGAGCAAGTACCTGCTAGGAATAGGGACCCGCACACCAAATTTGTGGGCTCTGGGCCAGACTCCCAATGATA  
AAAATTTACTGATAGAAAATGAATATCACTTTCTGCTGAGGAGGGAATGCCAAGCTCTGCGGCGTCT

#### VI. Secuencia clona 6

AAGAATACTTAGATACGCGCTACGTGTTTCACGAATCCGAGGAAAATTATCATTGTTTGTCTTCTGTTTCGGTGA  
CTATGCGGCCCATCCGGCCGTGACAATCCAAGCCTGTGAATAACGGGTGCGAGTGTGTGAAATATCGTAATATT  
AGGATAGCTCTTGCTTTTCTTATCCTGATCGTGCAGCATAGCGCACCGAACGCGCTACACTGTACACAGCTCAT  
GTAAGTATCTGGATACGGGTCGTTACGAGCTGGACAGAAACAGACTCTGCTGTACCTGTGGTACTCACTTAA  
CAGGACAAAGCCGTACATGCGCGCATGCCGGGTTTTTCAATCTCGTGACCCCAAAAGACACAGACCCTGCATA  
CGTATACTACATATTGCATACTAACACTAGTAACAATCACGTCATTTTCCAACCATCGGATCAAATCTGGGCCGAA  
CAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGACCGGTACCGCATAGGAGCTCGCTGAAACTGTAAAAAGGAAGGTAGG  
AAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAAATCGTTACGCTAACTATGAGG  
GCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGAAGTTTGTACTGGTGACAAAACCTCAGTGTTACGGTACATGGGTTCTAT  
TGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGATTCTGAGGGTG  
GCGGTAATAACCTCCTGAGAACAATGATACACCTA

#### VII. Secuencia clona 7

AGAGAATCACGGACACGAGAATGTGTTCCACGAGTGCCGAGGAAAATTCATAGTATGGTCTGCTGTTTCGGTGA  
CATGCGGCCCATCCGGCCGTGAAATCCCCAAATCCAGAGATGACGTAATCATCCGCGGGTTACCAAACCGGTGC  
CTAGTTTATTTGCCACGAGACACAGTCATTTAGCTGAGTGCGGTGATAAGTACGCCCCAAAAAGCCCCGGCAA  
GAGGGATTCTCGCCCCGCCCTTGCCTTAAAGCTGGCTAACGCTCGGCACCTCCTCGTGCTTGCATGTAACAACC  
AGTCACTCCTACACCGTTGAGCGCTGCTGATGAAGTACCGTTTTATAGTGAATATTGAAGCAATGTTTCTTCAACG  
GTCACACCGAACTCCTTACGAGCTCTTCTAGAGTTTGCATCTCTACGAATTCGCCCATAACGTCCAGAGCAGCTT  
GGGCTTCGGTCTAAGCATCGTTGGCAGAAGTTTTGGTTTACTGACAAGTAGCAACAAAAAAGAAAAATAGCCGC  
AGCCATGGATCAAATTTGGGCCGAAACAGAACTGATCACTGAAGAAAACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCA  
CTGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAAAAAAAACCCATACAGAAAATTAATTAATACTAAAATCTGGAAAATGACAAAACCTT  
AAATCGAAACACTAACTATGAGGGCTG

#### VIII. Secuencia clona 8

AAAAGTCTTGCACACCCTATGCGTGTACCGAAGTTGTGCGCGGAAAATTTTCGTAGTCTGGTCTTGCTGTTTCGGTG  
ACTATGCGGCCAGCCGGCCGTGACGATCTGCACCTTTCTTCTGATCGATGAGGTGCCGATTTTTGCTCCGGCG  
GGTAAGGAGTTTAGGCTTTTGTACTTTACAGATATAAAAACGTCCATGGGAGATCTTCTTTTGTAGTACGCACGGCA  
TGTCTAAGTTTTCGGAATAAAAGCCCCGGAACATCCTTGGCCGAGTGTACGGCAATGTCTATCTTATTGGCCAACAG  
GGCCTCTTCTATCTCTTTGATGAACAGGCCCTTGGCGCAATGTCACACAGTGGCCTGTCAACCTTTACATCCCCA  
GACGTTTTTATCTTGATAACATCCACGCGGACTTCAGGAAAGTGGGCTGCAATTGCGGCTTTGACCTCCTCCGCTT  
GTATTAGTGCCAGCGTCTTCTCTTGTTCAGCCTGACCACAGGAGCATAACATACACCCTCACCCTACAACG  
GAAGTACTCATCGAGACCCAGAGTTAGCATATATTTGCCAGTTACTCCACATGGCGTCAAACATGAATCGCAGTGA  
TGGTAGACAACCTTGCCTTACCCGATAACTCTTCCATCCAGCCATGATAAAATTTGTGATATCAGCATAACAACGCT  
CTCTTTGAGCAAGTACCTGCTAGGAATAGTGACCCGCACACCAAATTTGTGGGCTCTGGGCCAGAATCCCAAT  
GCTAAGAATTTTCTGATAGAAGACTGTATGTCACCTTCTGCTGAGGAGGGAATGCCAAGCTCTGCAGCGTCTGCG  
GCGAGATCAGATCTGGGCCGAAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGAACGGGTACCGCATAGGAGCTCGC  
TGAAACTGTTGAAAAGTTGTTTAGAAAACCCCATACAG

### IX. Secuencia clona 9

GAAAGCGAACACACGCGCTGTGTGTTCCGAACATGTCCCAGGAAAATTATCATAGTCTGGTCCTTGTTGTTTCTG  
GTTACTATGCGGCCAGCCGGCCGTGACGATCCTGTACTTAAGCGCTAAATTCACGGCTACACTCGGAACAACA  
GTGGGAAGCGCAACCCAGAAAGACGACGCTACGGCTGCTTTATTTCTAACCTGACCGACTTCACGCGCAATCTGC  
TCGCACCGCCCTGAAAATCCTATCACAGTTACAAAAAACTCAACTGGGTTTTTTCGGATCAGATCTGGGCCCGAA  
CAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCGCTGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAA  
AACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGG  
CTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCTATT  
GGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGT  
GCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTTA  
TCCGCTGTACTGAGCAAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGTAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCATGT  
TTCAGAATAATAGTTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTTATACGGGCACGTGTTACTCAAGGCACCTGACCC  
CGTAAAACCTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAGCCATGTATGACGTTTACTGGAAACGGTAAATTCAA  
GACTGCGTTTTCCATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTCGTTTGTGAAATATCAGGGCCAATTCGTCTGACCTGC  
CCTCACCTCCTGTCAATGGATGGCGGCGGCTCTGGGTGTGGTTCTGTGTGGCAGCTCTGAAGGGGGTGGACTC  
TGAAGGGTGGCGGGTCTGAGGTGGCGGCTCGAAGGAAGGTCGGGTCACGGCGGCTGGCCTCTGGTCCGGAGG  
AATATTATGATATATAACAAACGAAGGCACATACTCCACCTCATC

### X. Secuencia clona 10

GAAAACCAAGTACATTTGCTGGTGTTCGAAATTCGAGGAAAATTTTATAGTATGGTCTGCTGTTTCGGTGACTAT  
GCGGCACAGCCGGCCGTAGACGATCCTGTACTTAAGCGCTAAATTCACGGCTACACTCGGAACAACAGTGGGAA  
GCGCAACCCAGAAAGACGACGCTACGGCTGCTTTATTTCTAACCTGACCGACTTCACGCGCAATCTGCTCGCACC  
GCCCTGAAAATCCTATCACAGTTACAAAAAACTCAACTGGGTTTTTTCGGATCAGATCTGGGCCCGAACAGAAAC  
TGATCTCTGAAGAAGACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCGCTGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAACCCCA  
TACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTGG  
GGGAATGCTACAGGCGTTGTATTTTGCAGTCTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGATACCAAGTGGACTT  
GCTATCCCTGAAAATGAGGGTGA

### XI. Secuencia clona 11

AAACCCACATAGTACACTCGCTGAGTGTTCACCACCTTCCCGGATAAATTATCATTGTATGTTCTTCTGTTTCGG  
TACTATGCGGCCAGCCGGCCGTGACGATCCAAGCCTGTGAATAACGGGTGCGAGCGTGTGAAATATCGTAAT  
ATTAGGATAGCTCTTGCTTTTTCTTTATCCTGATCGTCGCAGCATAGCGCACCGAACGCGCTACACTGTACACAGCT  
CATGTAAGTATCTGGATACGGGTCGTTACGGAGCTGGACAGAAACAGACTCTGCTGTACCTGTGGGTACTCACT  
TAACAGGACCAAGCCGTACATGCGCGCATGCCGGTTTTTTCAATCTCGTGACCCCAAAGACACAGACCCTGC  
ATACGTATACTACATATTGCATACTAACACTAGTAATAATCACGTCATTTTCCAACCATCGGATCAAATCTGGGCC  
GAACAGAACTGATCTCTGAAGAATACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCGCTGAAACTGTTGAAAGTAGGTTA  
GCAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATGA  
GGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCC  
TATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAAGGTGGCGTTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGACG  
GTGACGGAACCTAAACCTCCTGAATAAAGTGATACACATATTCCGCGCTATACTTCTATCAACCCTCACGACGGCAC  
TA

### XII. Secuencia clona 12

AGAAGGCTTAGCGACACGAGAATATGTTCTGACCATTTACCGGAAAAAATTATTATTGTCAATTCCTTTATGTGTT  
GGTACTATGCGGCCAGCCGGCCGTGACGATCCAAGCCTGTGAATAACGGGTGCGAGTGTGTGAAATATCGT  
AATATTAGGATAGCTCTTGCTTTTTCTTTATCCTGATCGTCGCAGCATAGCGCACCGAACGCGCTACACTGTACACA  
GCTCATGTAAGTATCTGGATACGGGTCGTTACGGAGCTGGACAGAAACAGACTCTGCTGTACCTGTGGGTACTC  
ACTTAACAGGACCAAGCCGTACATGCGCGCATGCCGGTTTTTTCAATCTCGTGACCCCAAAGACACAGACCC  
TGCATACGTATACTACATATTGCATACTAACACTAGTAATAATCACGTCATTTTCCAACCATCGGATCAGATCTGGG  
CCCGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCGCTGAAACTGTTGAAAGTTGT  
TTAGCAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTA  
TGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGT  
TCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTG  
AGGGTGGCGGTAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGTTATACTTATATCAACCCTCTCGACGG

CACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCACCCCTCTTAATAC  
TTTCTGTTTCAGAAATAATAGGTTCCGAATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCAC  
TGAACCCCGTTAAAACCTTATTACCATAACACTTTCCTTGTATCATCACAAGTCACGGTATGACGCTTACGGGAAACG  
TTAAATATAGAGAATGGCGCTTTCCCTTTCCCTGGCTTAAATGAAGGAATCCCATTTGCTTGGGAAAATATTCAAGG  
GCCACATATCGTTGCTGTACCCG

### XIII. Secuencia clona 13

AAGAGTTAAGAACACGAGATACGTGTTTCACGAATGCCGAGGAAAAATCGTAGTATGGTCTAGCTGTTTCTGTGAC  
ACAAAAACGCCAAAAAAATCCCAAATCCAAGATGACAATCATGCGGAGTTAGAAATCGGTGCCTATTTTATTGTC  
CACGAGACACAGTCATTTAGCTGAGTGCTGTATTTATACACCCCAAAAAGCCCCGGCAAAAAGGGATTCTCGCC  
CCGCCCTTGCCTTAGAGCTGGCTAACGCTCGGCACCTCCTCGTGCTTGGCTCCTAATAACCAGTCACTCCTACAC  
CGTTGAGCGCTGCTGATGAATTACCGTTTTATAGTGAAATATTGAAGCAATGTTTCTTCAACGGTCAACCCGAACTC  
CTTACGAGCTCTTCTAGAGTTTGCATCTCTACAAATTCACCCATAACCACCAGAGCAGCTGGGGGTAGAGACACA  
GCTTTTTTTGCCCCCCCCCCCTTGGACTGACAAATACAAAAAAGGAGGCC

### XIV. Secuencia clona 14

TAGAAACGCCCGTACACGCGCTGTGTGTTCCAGAAGTTTTACGGGAAAAATTATTATTGTCTGTTCTTTTTGTTTT  
GGTACTATGCGGCCAGCCGGCCGTCGACGATCCAAGCCTGTGAATAACGGGTGCGAGTGTGTGAAATATCGT  
AATATTAGGATAGCTCTTGGCTTTTTCTTATCCTGATCGTCGCAGCATAGCGCACCGAACGCGCTACACTGTACACA  
GCTCATGTAAGTATCTGGATACGGGTCGTTACGGAGCTGGACAGAAACAGACTCTGCTGTACCTGTGGGTA  
ACTTAACAGGACCAAGCCGTCACATGCGCGCATGCCGGGTTTTTTCAATCTCGTGACCCCAAAAGACACAGACCC  
TGCATACGTATACTACATATTGCATACTAACACTAGTAATAATCACGTCATTTTCCAACCATCGGATCAGATCTGGG  
CCCGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCGTGAACTGTTGAAAGTTGT  
TTAGCAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTATAGATCGTTACGCTAACTA  
TGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAACTCAGTGTTACGGTACATGGGT  
TCCTATTGGGCTTGTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTG  
AGGGTGGCGGTACTAACCTCCTGAGTACGGTGATACACC

### XV. Secuencia clona 15

CGATACGCATCACTTCGTGTGTTGACGAGTGCGGAGGAAAGTCGTAGTCTGGTCTAGCTGTTACTGATGACAGAA  
AAAACCCCATGTAGAGAGACCCAATAGATAAGTGCTTGAGACCCCTCTCTATAGAGAGCCCTCTAGAGGAGAGGA  
TATGAGTGCAGAGATGTCAGCGACTGCGCTGACTTCTTACATGTCGAGTAGAGGAGGGTCATGTCATAGCAATTG  
GCTGTGAAGTGCAATTCTTGTCTACTTGACAATGCAAAAACAAAACAATTTCTCTCCCCAGCTAAGAGAGGGCAT  
TGCAATATGCTGACTAATAATATACAGCATAACAACAGATGAATA

### XVI. Secuencia clona 16

AACTTCGCGACTCGCTGTGTGCACCGACCATGTGACGGAAAAATTATCATAGTCTGGTCTTCTGTTTCGGTTAC  
TATGCGGCCAGCCGGCCGTCGACGATCTTGGGATGCCAGTAAGTGTGCATCTTGGCTTAGCAACTAGGGCCACAA  
CTTCAAAGTCATCAGGATTGTGCGCAAAAATCTGAACTGCTTTCTGCCCTATGCACCCAGTCGAACCAAATACAGA  
AACTCTTTCCGACCCATATGAAGCACTCAACCGTTGACCTAAGTGCACCCTCCAAAAACCCACACCAGGCCCT  
GGAACAGGATATCAAAATACTGGGCCAAAAACAAGGCAATGACGCTCAACAACATACAAAACAACGGCAATAACGG  
TCAGGCCCAAGTGGTGCAGGAGCGCTGGATGCCAGCACCCATTGCCGGTTGATCAAAGTACACCACCCTAGCG  
ATACGAAAACAGTAAAAGCATGGCACAATCCCGACTGCACACACAAGCAGAACGTACGGGAAAGCCACGACCGTT  
GGGATGTCTGACATCACGATAGATTTGAGAAAAAAGTATTTGGGCCAACATCCAAAAACGGCGGAAACCCGGCA  
GCTGAAACCATAGAGACGACCAACGCGAAAGCCACAAATGGGCTACTTCCGGTGCATACCAGCAAGGCTTGTCTAAT  
TCAAACCTTCATCATCGTACCTGAGGAGTACGGAAAAATCCACGCATTTATCACCCAACTCGTCAACACGTAGT  
GGAAGATGGCATAACGAAGACGTGCCGTGCAAGACAACCACCGGCAGTACGTACCCGAGATCAGATCTGGGCCCG  
AACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCGCTGAAACTGTTGAAAGTTGTTAGC  
AAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTATAGATCGTTACGCTAACTATGAGG  
GCTGTCTGTGGAATGCTAACAGGCGTTTGTAGTTTGTACTGGTGGACGAAACTTCAGTGTTACCGGTTACATGGGA  
TTCTTATTGGGGCTTGCCTATCCCTGAAAATGGAGGGGGTGGGTGGACTCTGAAGGGGTGGGGTTTTCTGAGGT  
ATGCGGTTCTTGAAGAGGTGGCAGGGTACTTAAACACTTCA

## XVII. Secuencia clona 17

CGGAATCTCCTACACGCGCTGCCTGTTCCCGAAGTTTCCCCTGAAAAATTATTATTGGCAGTTCCTTTAGGTGCTG  
GTTACTATGCGGCCAGCCGGCCGTTCGACGATCCTGTACTTAAGCGCTAAATTCACGGCTACACTCGGAACAACA  
GTGGGAAGCGCAACCCAGAAAGACGACGCTACGGCTGCTTTATTTCTAACCTGACCGACTTCACGCGCAATCTGC  
TCGCACCGCCCTGAAAATCCTATCACAGTTCACAAAAAACTCAACTGGGTTTTTGC GGATCAGATCTGGGCCCGAA  
CAGAAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGAACGGTACCGCATAGGAGCTCGCTGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAA  
AACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGG  
CTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGGTTCTATT  
GGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTG  
GCGGTAATAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCGGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTTA  
TCCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCATGT  
TTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTTATACGGGCACTGTTACTCAGGGCACTGACC  
CCGTAAAACCTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGA  
GACTGCGC

## 11 BIBLIOGRAFIA

- ADDA C.; Tilley L.; Anders R.; Foley M; Infect. Immun.1999;67:4679-4688.
- ALLEMAN A. R. y Barbet, A. F. "Evaluation of Anaplasma marginale major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen". J. Clin. Microbiol. 1996;34: 270- 276.
- ALLEMAN A. R., S. M. Kamper, N. Viseshakul, and A. F. Barbet. "Analysis of the Anaplasma marginale genome by pulsed-field electrophoresis." J. Gen. Microbiol. 1993;139:2439-2444.
- ANDERSEN, P., Stryhn, A. Hansen, B. Fugger, L., Engberg, J., Buus, S.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996;93:1820-1824.
- BARBET, A. F. y Allred D. R. "The *msp1β* multigene family of Anaplasma marginale nucleotide sequence analysis of an expressed copy". Infect. Immun. 1991; 59: 971-976.
- BARBET A. F., A. Lundgren, Jooyoung Yi, F. R. Rurangirwa, y G. H. Palmer. "Antigenic variation of Anaplasma marginale by expression of MSP2 mosaics." Infect. Immun. 2000; 68:6133-6138.
- BARBET A. F., G. H. Palmer, P. J. Myler, y T. C. McGuire. "Characterization of an immunoprotective protein complex of Anaplasma marginale by cloning and expression of the gene coding for polypeptide AM 105L." Infect. Immun.1987; 55:2428-2435.
- BARBET A. F., R. Blentlinger, Jooyoung Yi, A. M. Lundgren, E. F. Blouin, y K. M. Kocan "Comparison of surface proteins of Anaplasma marginale grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle." Infect. Immun. 1999; 67:102-107.
- BARIGYE Robert, García-Ortiz M.A., Rojas Ramirez E. E., Rodríguez Camarillo S.D. "Identificación de antígenos IgG2 específicos en tres cepas mexicanas de Anaplasma marginale". Téc Pecú Mex 2004; 42(1):219-236.
- BOWIE M. V., J. de la Fuente, K. M. Kocan, E. F. Blouin, y A. F. Barbet. "Conservation of major surface protein 1 genes of Anaplasma marginale during cyclic transmission between ticks and cattle." Gene 2002; 282:95-102.
- BRADWAY D. S., S. Torioni de Eschaide, D. P. Knowles, S. G. Hennager, y T. F. McElwain. "Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with Anaplasma marginale." J. Vet. Diagn. Investig. 2001; 13:79-81.
- BRAYTON K. A., D. P. Knowles, T. C. McGuire, y G. H. Palmer. "Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001;98:4130-4135.
- BRAYTON K. A., G. H. Palmer, A. Lundgren, J. Yi, and A. F. Barbet. "Antigenic variation of Anaplasma marginale msp2 occurs by combinatorial gene conversion." Mol. Microbiol. 2002; 43:1151-1159.
- BRAYTON K. A., Kappmeyer L. S., Herdon D. H., Dark M. J., Tibals D. L., Palmer G. H., McGuire T. C., Knowles D. P. "Complete genome sequencing of Anaplasma marginale reveals that the surface is skewed to two superfamilies of the membrane proteins" PNA's 2005:102:3:844-849.
- BROWN W. C.; Shkap V.; Zhu D.; McGuire T. C.; Tuo W.; McElwain T. F.; Palmer G. H. "CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with Anaplasma marginale outer membranes and protected against homologous challenge". Infect. Immun. 1998. 66:5406-5413.
- CAMACHO M.; Muñoz, M. L.; Suarez, C. E.; McGuire, T. C.; Brown, W. C. y Palmer, G. H. "Expression of polymorphic *msp1β* genes during acute Anaplasma marginale rickettsemia". Infect. Immun. 2000; 68: 1946-1952.
- CAMACHO Minerva, Muñoz, M.L., Suarez C.E., McGuire T.C., Brown W. C., PALMER G.H. "Expression of Polymorphic *msp1b* Genes during Acute Anaplasma marginale Rickettsemia". Infection and immunity, Abril. 2000, p. 1946-1952.
- CAMACHO Nuez M.; Muñoz M. L.; Suárez C. E.; McGuire T. C., Brown W. C.; Palmer G. H.; "Expression of polymorphic *msp1α* genes during acute Anaplasma marginale rickettsemia". Infect. Immun. 2000; 68:1946-1952.
- CANTOR G.H.; Pontzer, C. H. y Palmer, G.H. "Opsonization of A. marginale mediated by bovine antibody against surface protein MSP-1". Vet. Immunol. Immunopathol". 1993;37: 343- 350.
- CLARKSON, T., Hoogenboom, H., Griffiths, A., Winter, G.; Nature 1991:352:624-628.
- DE LA FUENTE J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin E. F., and K. M. Kocan. "Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia Anaplasma marginale to host cells." Vet. Microbiol. 2003; 91:265-283.
- DE LA FUENTE J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin, and K. M. Kocan. "Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of the ehrlichial pathogen Anaplasma marginale." Int. J. Parasitol. 2001; 31:1705-1714.
- DE LA FUENTE J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin, y K. M. Kocan. "Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen Anaplasma marginale to bovine erythrocytes and tick cells." Int. J. Parasitol. 2001; 31:145-153.
- DE LA FUENTE J., R. A. Van Den Bussche, J. C. Garcia-Garcia, S. D. Rodriguez, M. A. Garcia, A. A. Guglielmo, A. J. Mangold, L. M. Friche Passos, M. F. Barbosa Ribeiro, E. F. Blouin, and K. M. Kocan. "Phylogeography of New World isolates of Anaplasma marginale (Rickettsiaceae: Anaplasmataceae) based on major surface protein sequences." Vet. Microbiol. 2002; 88:275-285.
- DE LA FUENTE J., R. A. Van Den Bussche, y M. Kocan. "Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of Anaplasma marginale (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). Vet. Parasitol." 2001; 97:65-76.
- DE LA FUENTE J., y K. M. Kocan. "Expression of Anaplasma marginale major surface protein 2 variants in persistently infected ticks." Infect. Immun. 2001; 69:5151-5156.
- DEMARTIS, S., Huber, A., Viti, F., Lozzi, L., Giovannoni, L., Neri, P., Winter, G., Neri, D.; "A strategy for the isolation of catalytic activities from repertoires of enzymes displayed on phage". J. Mol. Biol. 1999:286:617-633.
- DIKMANS G. "The transmission of anaplasmosis". Am. J. Vet. Res. 1950;11:5-16.
- DUMLER J. S., A. F. Barbet, C. P. J. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Rurangirwa. "Reorganization of the 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. 2001;51:2145–2165.

- ECKBLAD W. P., Y R. A. Magonigle. "Acquired cellular responsiveness in cattle cleared of Anaplasma marginale 28 months earlier". Vet. Immunol. Immunopathol. 1983;4:659-663.
- EID G., D. M. French, A. M. Lundgren, A. F. Barbet, T. F. McElwain, and G. H. Palmer. "Expression of major surface protein 2 antigenic variants during acute Anaplasma marginale rickettsemia". Infect. Immun. 1996;64:836–841.
- FAO "Resistencia a los antiparasitarios. "Estado actual con énfasis en America Latina". Estudio FAO Producción y Sanidad Animal, 2003.
- FIGUEROA J. V.; Álvares J. A.; Ramos J. A.; Rojas E. E.; Santiago C.; Mosqueda J. J.; Vega C. A.; Buening G. M.; "Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases". Ann. N. Y. Acad. Sci. 1998. 849:1–10.
- FRENCH D. M., T. F. McElwain, T. C. McGuire, and G. H. Palmer. "Expression of Anaplasma marginale major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia". Infect. Immun. 1998;66:1200–1207.
- FRENCH D. M., W. C. Brown, and G. H. Palmer. "Emergence of Anaplasma marginale antigenic variants during persistent rickettsemia". Infect. Immun. 1999;67:5834–5840.
- FU, Y., Shearing, L., Haynes, S., Crewther, P., Tilley, L., Anders, R., Foley, M.; J. Biol. Chem. 1997;272:25678-25684.
- GOFF W., A. Barbet, D. Stiller, G. Palmer, D. Knowles, K. Kocan, J. Gorham, and T. McGuire. "Detection of Anaplasma marginale infected tick vectors using a cloned DNA probe". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988;85:919-923.
- HOLLINGER, P y Riechmann, L; Structure;1997:5:265
- KEHOE J. W.; Kay B. K.; "Filamentous phage display in the new millennium". Chem. Rev.; 2005; 105:4056-4072.
- KOCAN K. M.; De la Fuente J.; Guglielmo A. A.; Meléndez R. D.; "Antigens and alternatives for control of Anaplasma marginale infection in cattle". Clin. Microbiol. Reviews. 2003;16:4:698-712.
- KOCAN K. M.; Stiller D.; Goff W. L.; Claypool P. L.; Edwards W.; S. A. Ewing; McGuire C.; Hair J. A.; Barron S. J.; "Development of Anaplasma marginale in male Dermacentor andersoni transferred from infected to susceptible cattle. Am. J. Vet. Res. 1992. 53:499–507.
- KOSAKO, H., Akamatsu, Y., Tsurushita, N., Lee, K.-K., Gotoh, Y., Nishida, E.; Biochem. 1996;35: 13212-13221.
- KUTTLER K. L., y L. D. Winward. "Serologic comparison of 4 Anaplasma isolates as measured by the complement fixation test". Vet. Microbiol. 1984. 9:181-186.
- KUTTLER K. L., y R. A. Todorovic. "Techniques of preimmunization for the control of anaplasmosis". Proceedings of the 6th National Anaplasmosis Conference. Heritage Press, Stillwater, Okla. 1973. p. 106-112.
- KUTTLER K. L.; Zaugg J. L.; Johnson L. W. "Serologic and clinical responses of premunized vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different Anaplasma marginale isolates." Am. J. Vet. Res. 1984; 45:2223-2226.
- LOHR C. V., K. A. Brayton, V. Shkap, T. Molda, A. F. Barbet, W. C. Brown, G. H. Palmer. "Expression of Anaplasma marginale major surface protein 2 operon-associated proteins during mammalian and arthropod infection." Infect. Immun. 2002; 70:6005–6012.
- MARILDA C. Vidrotto, Travis C. McGuire, Terry F. McElwain, Guy H. Palmer y Donald P. Knowles, Jr. "Intramolecular Relationships of Major Surface Proteins of Anaplasma marginale" Infection and Immunity. 1994; 62:7:2940-2946.
- MCGAREY D. J.; Barbet, A. F.; Palmer, G. H.; McGuire, T. C. y Allred, D. R. "Putative adhesins of Anaplasma marginale: major surface polipeptides (MSP) 1a and 1b". Infect. Immun. 1994;62: 4594-4601.
- MCGUIRE T. C., G. H. Palmer, W. L. Goff, M. I. Johnson, Y W. C. Davis. "Common and isolate-restricted antigens of Anaplasma marginale detected with monoclonal antibodies". Infect. Immun. 1984;45:697-700.
- MEEUS P. F. M., y A. F. Barbet. "Ingenious gene generation." Trends Microbiol. 2001; 9:353–355.
- MEEUS P. F.; Brayton, K. A.; Palmer, G. H. y Barbet, A. F. "Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of Anaplasma marginale". Mol. Microbiol. 2003;47: 633-643.
- MUNDERLOH U. G., Y. L. M. Wang, C. Chen, y T. J. Kurti. "Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick Ixodes scapularis." J. Parasitol. 1994; 80:533–543.
- NDUNGÚ L.W.; Aguirre, C.; Rurangirwa, R. R.; McElwain, T. F.; McGuire, T. C.; Knowles, D. P. y Palmer, G. H. "Detection of Anaplasma ovis infection in goats using the MSP5 competitive inhibition Enzyme-linked". J. Clin. Microbiol. 1995;33:675-679.
- NOH Susan M., Brayton K. A., Brown W. C., Norimine J., Munske G. R., Davitt C. M., Palmer G. H "Composition of the surface proteome of Anaplasma marginale and its role in 1 protective immunity induced by outer membrane immunization", Infection and Immunity; 2008 doi:10.1128/IAI. 00008-08 Marzo.
- OBERLE M.S., Palmer H.G., Barbet F.A., "Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of Anaplasma marginale", Infection and Immunity. 1993, 61:12:5245-5251.
- OBERLE S. M., y A. F. Barbet. "Derivation of the complete msp4 gene sequence of Anaplasma marginale without cloning." Gene 1993; 136:291–294.
- PALMER G. H. y McElwain, T. F. "Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis". Vet. Parasit. 1995;57: 233-253.
- PALMER G. H. y McGuire, T. C. "Immune serum against Anaplasma marginale initial bodies neutralizes infectivity for cattle". Infect. Immun. 1984;13: 1010-1015.
- PALMER G. H., A. F. Barbet, K. L. Kuttler, y T. C. McGuire. "Detection of an Anaplasma marginale common surface protein present in all stages of infection." J. Clin. Microbiol. 1986; 23:1078–1083.
- PALMER G. H., and T. C. McGuire. "Immune serum against Anaplasma marginale initial bodies neutralizes infectivity for cattle". J. Immunol. 1984. 133:1010-1015.
- PALMER G. H., S. D. Waghela, A. F. Barbet, W. C. Davis, and T. C. McGuire. "Characterization of a neutralization-sensitive epitope on the Am 105 surface protein of Anaplasma marginale." Int. J. Parasitol. 1987; 17:1279–1285.

- PALMER G. H., S. M. Oberle, A. F. Barbet, W. C. Davis, W. L. Goff, and T. C. McGuire. "Immunization with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge". *Infect. Immun.* 1988;56:1526–1531.
- PALMER G. H., S. M. Oberle, A. F. Barbet, y T. C. McGuire. "Immunization of cattle with a 36-kilodalton surface protein induces protection against homologous and heterologous *Anaplasma marginale* challenge". *Infect. Immun.* 1988;56:1526-1531.
- PALMER G. H.; Barbet, A. F.; Cantor, G. H. y McGuire, T. C. "Immunization of cattle with the MSP1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate". *Infect. Immun.* 1989;59: 3340-3342.
- PALMER G. H.; Barbet, A. F.; Kuttler, K.L. y McGuire, T.C. "Detection of *Anaplasma marginale* common surface proteins in all stages of infection". *J. Clin. Microbiol.* 1986;23: 1078-1083.
- PALMER G. H.; Rurangirwa F. R.; Kocan K. M.; Brown W. C.; "Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*". *Parasitol. Today* 1999;15:253–300.
- POUL, M.-A., Marks, J. D.; *J. Mol. Biol.* 1999;288:203-211.
- RICHEY E. J. Bovine anaplasmosis, In R. J. Howard (ed.). "Current veterinary therapy: food animal practice". The W. B. Saunders Co., Philadelphia. 1981. p. 767-772.
- RUSSEL M.; Lowman H. B.; Clackson T.; *Introduction to phage biology and phage display.* 2003.
- RUSSEL M.; Whirlow H.; Sun T.P.; Webster R.E.; *J. Bacteriol.* 1998;170:5312.
- SANGSTER, N.C.; Gill, J. "Pharmacology of anthelmintic resistance." *Parasitology Today.* 1999;15: 141-146.
- SALMON D.E., Smith T., "Infectious diseases of cattle: southern cattle fever (Texas fever)" Special report on diseases of cattle feeding. USDA Bureau of Animal Industry. Government Printing Office, Washington p. 428-438.
- SCHILLHORN van Veen, T.W. "Sense or nonsense? Traditional methods of animal parasitic disease control". *Veterinary Parasitology* 1997; 71: 177-194
- SCOTT T. K., Inge S. E., y Guy H. P., "Cyclic Rickettsemia during Persistent *Anaplasma marginale* Infection of Cattle". *Infection and Immunity.* 1990;Apr; pp. 1117-1119.
- SHKAP V.; Pipano, E.; McGuire, T. C. y Palmer, G. H. "Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* y *Anaplasma marginale*". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002;29: 31-40.
- SMITH G.P., *Science*, 1985;228;1315
- SPADA, S., Krebber, C., Pluckthun, A.
- STICH R. W., Olah G. A., Brayton K. A., Brown W. C., Fechheimer M., Green-Church K., Jittapalapong S., Kocan K. M., McGuire T. C., Rurangirwa F. R., Palmer G. H., "Identification of a novel *Anaplasma marginale* appendage-associated protein that localizes with actin filaments during intraerythrocytic infection". *Infection and Immunity*, 2004;72:12:7257-7264.
- TEBELE N., T. C. McGuire, y G. H. Palmer. "Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes". *Infect. Immun.*1991.59:3199-3204.
- THEILER A. "*Anaplasma marginale*. The marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease". Report of the government veterinary bacteriologist. 1908-1909.
- THEILER A. "Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by males of *Dermacentor andersoni* Stiles fed on an Idaho field-infected, chronic carrier cow". *Am. J. Vet. Res.* 47:2269-2271.
- THEILER, A; "Further investigations into anaplasmosis of South African cattle". 1<sup>st</sup> Report of the Director of Veterinary Research, Department of Agriculture of the Union of South Africa. 1911.
- TORIONI DE ESCHAIDE, S., D. P. Knowles, T. C. McGuire, G. H. Palmer, C. E. Suarez, y T. F. McElwain. "Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-lined immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5." *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:777–782.
- VAUGHAN, T., Williams, A., Pritchard, K., Osbourn, J., Pope, A., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R., Wilton, J., Johnson, K.; *Nat. Biotechnol.* 1996;14:309-314.
- VIAL, H.J.; Traore, M.; Failamb ; Ridley R.G. "Renewed strategies for drug development against parasitic diseases". *Parasitology Today* 1999; 15: 393-394.
- VIDOTTO M. C., McGuire T. C., Mc-Elwain T. F., Palmer G. H., y Knowles D. P., *Infect. Immun.* 62:2940–2946
- VIDOTTO, M.; McGuire, T.C.; McElwain, T. F.; Palmer, G. H. y Knowles D. P. "Intermolecular relationships of major surface proteins of *A. marginale*". *Infect. Immun.* 1994;62: 2940-2946.
- VISSER, E. S.; McGuire, . C.; Palmer, G. H.; Davis, W. C.; Shkap, V.; Pipano, E. y Knowles, D. P. JR. "The *Anaplasma marginale* msp5 genes encoded 19 kDa protein conserved in all recognized *Anaplasma* species". *Infect. Immun.* 1992;60: 5139-5144.
- WALSH G., Headon D. R. *Protein Biotechnology.* 1995; pp. 1, 13-15.
- ZAUGG J. L.; "Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation". *Am. J. Vet. Res.* 1985. 46:570–572.