



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA**  
**PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN *virB3* DE *Anaplasma marginale***  
**Y SU EVALUACIÓN COMO ANTÍGENO RECOMBINANTE**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**PALOMA RIVERA LARA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**SERGIO DARÍO RODRÍGUEZ CAMARILLO**

**(CENTRO DE INVESTIGACIÓN DISCIPLINARIA EN PARASITOLOGÍA**  
**VETERINARIA, INIFAP)**

**COMITÉ TUTOR:**

**ROGELIO A. ALONSO MORALES**

**(FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA)**

**GUILLERMINA AVILA RAMÍREZ**

**(FACULTAD DE MEDICINA)**

**MÉXICO, CD. MX. OCTUBRE 2016**



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.

## DEDICATORIAS

Quiero dedicarle este trabajo a mi esposo Josué, puesto que él más que nadie me ha apoyado en el transcurso de todo este recorrido. Mi Josito, créeme que sin ti este logro que hoy obtengo no hubiera sido posible. Me has acompañado y has estado siempre a mi lado, incluso en los momentos en los que sentía que ya no podía más. ¡TE AMO inmensamente, mi Amorito! Eres mi motivación para seguir adelante. Gracias por todo lo que has hecho por mí, por todas las aventuras que vivimos (especialmente durante los últimos 2 años), por todas las enseñanzas y por tu amor incondicional. Eres la luz de mi vida ♥.

## AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Anaplasmosis del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, financiado por **INIFAP, Proyecto SEP-CONACYT 168167.**

Quiero agradecer a mis tutores Dr. Rogelio A. Alonso Morales, Dra. Guillermina Avila Ramírez y especialmente a mi tutor principal Dr. Sergio D. Rodríguez Camarillo por los consejos, por las críticas constructivas y por todo el apoyo que me han brindado. Los considero, además de excelentes tutores, grandes personas a las que admiro mucho.

Agradezco también a mis padres, Inés y Eloy, porque siempre han estado conmigo, apoyando mis decisiones y ayudándome a escalar tan alto como he querido.

A mi amigo Sergio, porque ha sido mi maestro desde que llegué al laboratorio, porque aun estando lejos siempre ha estado apoyándome, ayudándome a resolver mis dudas y brindándome su amistad absoluta.

A mi amigo Julián, porque es una persona con gran capacidad analítica y por lo tanto, con quien más he razonado, compartido y discutido diferentes puntos de vista, pero sobre todo por la confianza que tiene en mí, además de todo lo que compartimos fuera de lo académico.

A mi amigo Saúl, por el apoyo mutuo con nuestros experimentos, por soportarme tanto, por compartir su comida conmigo, por las risas, travesuras, pláticas y demás cosas que compartimos juntos dentro y fuera del laboratorio.

## RESUMEN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad causada por la rickettsia gram negativa *Anaplasma marginale*, una bacteria intracelular obligada que infecta exclusivamente los eritrocitos maduros de los bovinos, generando diversos signos y síntomas e incluso, en casos severos, es capaz de provocar la muerte. Hasta el momento en México y en muchas partes del mundo no existen alternativas de vacunas comerciales para su control, por lo que el desarrollo de una vacuna es de gran importancia debido a que genera pérdidas considerables a nivel mundial. Por ello, una estrategia propuesta es el diseño de vacunas a partir de proteínas de superficie de *A. marginale* que sean inmunogénicas, que presenten baja o nula variabilidad y que además, se encuentren asociadas a funciones vitales o de virulencia de los patógenos. En este sentido, los componentes del sistema de secreción tipo IV (SST4) de *A. marginale* están siendo estudiados como blanco en el diseño de vacunas recombinantes. El SST4 está implicado en la virulencia de los patógenos y es capaz de transportar diversas macromoléculas, incluyendo DNA y proteínas. La proteína VirB3 forma parte de SST4, está asociada a la membrana bacteriana y, en algunas bacterias, participa en la estabilidad de dicho sistema. Por este motivo, el gen *virB3* de *A. marginale* se clonó y expresó como proteína recombinante en la cepa DE3 de *E. coli*. Con la finalidad de demostrar el grado de conservación, se obtuvo la secuencia del gen en seis diferentes aislados mexicanos. Así mismo, se evaluó la capacidad que tienen los anticuerpos de bovinos inmunizados con *A. marginale*, que presentaron protección post-inmunización, para reconocer la proteína recombinante. Los resultados obtenidos mostraron que el VirB3 es una proteína que no presenta variación alguna en sus secuencias, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, comparada con la cepa St. Maries. Además, se demostró que la proteína recombinante puede ser reconocida por inmunoglobulinas de tipo G, presentes en el suero de bovinos inmunizados, por lo que podría desencadenar un tipo de respuesta inmune que induzca protección sólida contra la enfermedad.

Palabras clave: *Anaplasma marginale*, Sistema de secreción tipo IV, proteínas recombinantes, VirB3.

## ABSTRACT

Bovine anaplasmosis is a disease caused by gram negative rickettsia *Anaplasma marginale*, an obligate intracellular bacterium that infects only mature erythrocytes of cattle, generating various signs and symptoms and even, in severe cases, can cause death. So far in Mexico and in many parts of the world there is no alternative of commercial vaccines to control, so the development of a vaccine becomes very important because it generates considerable losses worldwide. Therefore, a proposal strategy is to design vaccines based on surface proteins of *A. marginale* presenting low or no variability and also is associated with vital functions or virulence of pathogens. In this sense, the components of the type IV secretion system (SST4) of *A. marginale* are being studied as targets in the design of recombinant vaccines. The SST4 is involved in the virulence of pathogens and is capable of carrying various macromolecules, including DNA and proteins. The VirB3 protein is part of the SST4, is associated with the bacterial membrane and in some bacteria, involved in the stability of the system. Therefore, the *A. marginale virB3* gene was cloned and expressed as recombinant protein in *E. coli* DE3. In order to demonstrate the degree of conservation, the gene sequence was obtained to six different Mexican isolates. Also was evaluated the ability of the antibodies of immunized cattle with *A. marginale*, which in turn presented protection following immunization, to recognize the recombinant protein. The results showed that VirB3 is a protein that presents no variations in their sequences, both nucleotide and amino acid, compared with the strain St. Maries. Furthermore, it was shown that the recombinant protein can be recognized by immunoglobulins type G, present in the serum of immunized cattle, which could trigger a type of immune response that induces strong protection against the disease.

Keywords: *Anaplasma marginale*, Type IV Secretion System, recombinant proteins, VirB3.

## CONTENIDO

DEDICATORIAS .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Taxonomía.....	3
Transmisión.....	4
Ciclo de vida.....	5
Respuesta inmune.....	6
Control de la enfermedad.....	8
Vacunas contra la anaplasmosis.....	9
Sistemas de secreción.....	11
Sistema de secreción tipo IV.....	12
Proteína VirB3.....	15
JUSTIFICACIÓN .....	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
METODOLOGÍA .....	18
1. Análisis bioinformático.....	18
2. Organismos.....	19
3. Diseño de Iniciadores y condiciones de la amplificación del gen <i>virB3</i> .....	19
4. Extracción de DNA genómico y amplificación.....	19
5. Secuenciación de amplicones.....	20
5.1. Ligación y Transformación.....	20
5.2. Extracción de DNA plasmídico.....	21
6. Expresión de la Proteína.....	22
6.1. Ligación y transformación.....	22

6.2. Expresión de la proteína.....	23
7. Purificación de la proteína.....	24
8. Preparación del inóculo.....	25
9. Inoculación en conejos.....	25
10. Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE.....	26
11. Identificación de la proteína VirB3 mediante Western blot.....	26
12. Preparación de controles.....	27
12.1. Extracción de proteínas de membrana de eritrocitos.....	27
12.2. Extracción de cuerpos iniciales.....	28
12.3. Controles para la identificación de VirB3 recombinante.....	29
RESULTADOS.....	31
Análisis <i>in silico</i> .....	31
Análisis <i>in silico</i> de antigenicidad.....	35
Diseño de iniciadores.....	36
Extracción de DNA genómico.....	37
Análisis de secuencias.....	38
Ligación y transformación.....	39
Expresión de la proteína.....	40
Purificación de la proteína.....	43
Identificación de la proteína VirB3 mediante Western blot.....	43
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIÓN.....	56
REFERENCIAS.....	57



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>A. marginale</i> .....	3
Cuadro 2. Descripción de anticuerpos y antígenos utilizados para Western blot.....	26
Cuadro 3. Composición en aminoácidos de la proteína VirB3 de <i>A. marginale</i> .....	34
Cuadro 4. Características de la secuencia completa de VirB3 y del fragmento extracelular.....	34
Cuadro 5. Secuencias inmunogénicas encontradas con el programa ABCPred.....	36
Cuadro 6. Características de los iniciadores diseñados y sintetizados.....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vector biológico de transmisión de <i>A. marginale</i> .....	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>A. marginale</i> .....	6
Figura 3. Activación de la respuesta Inmune. ....	7
Figura 4. Sistema de secreción tipo IV de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	15
Figura 5. Determinación de hélices transmembranales con el programa TMHMM. ....	32
Figura 6. Predicción de hélices transmembranales con el programa Tmpred. ....	32
Figura 7. Predicción de índice de hidrofobicidad con el programa ProtScale.....	33
Figura 8. Péptido señal.....	35
Figura 9. Determinación del índice antigénico. ....	35
Figura 10. Regiones inmunogénicas analizadas con el programa BCEPred. ....	36
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del amplicón <i>virb3</i> a partir de DNA genómico de aislados mexicanos de <i>A. marginale</i> .....	37
Figura 12. Alineamiento de las secuencias consenso del gen <i>virB3</i> . ....	38
Figura 13. Alineamiento de las secuencias de cepas americanas.....	39
Figura 14. Alineamiento de las secuencias consenso obtenidas de DNA plasmídico. ....	40
Figura 15. Verificación de la inserción correcta del amplicón en el vector de expresión.....	40
Figura 16. Controles negativos.....	41
Figura 17. Expresión de la proteína VirB3 recombinante en células BL21-botón celular.....	42
Figura 18. Expresión de la proteína VirB3 en células BL21-Sobrenadante.....	42
Figura 19. Proteína purificada.....	43
Figura 20. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3, reconocida por un anticuerpo anti-histidinas.....	44
Figura 21. Identificación de la proteína recombinante VirB3 en comparación con sus controles negativos, mediante electroforesis SDS-PAGE. ....	45
Figura 22. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3 y sus controles negativos para la detección de anticuerpos presentes en suero del bovino 135 infectado con <i>A. marginale</i> . ....	46
Figura 23. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3 y sus controles negativos para la detección de anticuerpos presentes en suero del bovino 027 infectado con <i>A. marginale</i> . ....	46
Figura 24. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3 y sus controles negativos para la detección de anticuerpos presentes en suero del bovino 4338 infectado con <i>A. marginale</i> . ....	47

Figura 25. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3, reconocida por anticuerpos presentes en el suero del conejo 1. ....	48
Figura 26. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3, reconocida por anticuerpos presentes en el suero del conejo 2. ....	48
Figura 27. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3, reconocida por anticuerpos presentes en el suero del conejo 3. ....	49
Figura 28. Reconocimiento de la proteína nativa por anticuerpos de conejo mediante la técnica de inmunotransferencia. ....	49
Figura 29. Determinación de la presencia de IgG2 en contra de la proteína VirB3 nativa y rVirB3 mediante de la técnica de inmunotransferencia. ....	50

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la industria pecuaria tiene gran importancia debido a que da origen a una gran cantidad de subproductos de alto valor. El continente Americano ocupa el primer lugar en la producción de carne, contando con países con alta actividad ganadera donde la especie rumiante más importante es el bovino (FAO, 2009). En México, Veracruz es el principal Estado productor de ganado bovino con un volumen de producción de 258.6 mil toneladas, Jalisco es el segundo productor con 199.6 mil toneladas y Chiapas ocupa el tercer lugar, con una producción de 114.7 mil toneladas (SIAP, 2014).

La bacteria gram negativa *Anaplasma marginale* es la causante de una de las enfermedades con mayor impacto en la industria pecuaria, provocando grandes pérdidas económicas en las zonas donde es endémica. En Estados Unidos se reporta una mortalidad anual de entre 50,000 a 100,000 animales (Corona et al., 2004). Así mismo, en algunos estados de México se han realizado estudios que reportan hasta un 70% de ganado infectado, estimándose pérdidas anuales considerables que demuestran un rango muy grande de transmisión (Rodríguez et al., 2009).

*A. marginale* infecta exclusivamente los eritrocitos de los bovinos y se caracteriza por inducir anemia grave progresiva, fiebre, pérdida de peso, ictericia, disminución en la producción de leche, anemia hemolítica, hemoglobinuria debido a la lisis de células infectadas y muerte en los casos severos de animales no tratados (Munderloh et al., 2004).

El principal vector biológico de *A. marginale* en México son las garrapatas de los géneros *Dermacentor albictus* y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sin embargo, la transmisión también puede ocurrir de forma mecánica a través de insectos hematófagos como moscas de los géneros *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans* o, a través de fómites contaminados (Aubry y Paré, 2012).

El control efectivo de la anaplasmosis requiere tanto el control de la enfermedad en el hospedero como la reducción de la infección y transmisión del patógeno a través de las garrapatas (Rodríguez et al., 2003; Aubry y Paré, 2012).

Aun cuando se han desarrollado vacunas a partir de aislados atenuados de cepas de *A. marginale*, ya sea utilizando a la bacteria completa o algunas proteínas de superficie (Aubry y Geale, 2011), el éxito obtenido es limitado debido a la alta variabilidad de la bacteria (Ocampo-Espinoza *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2012). A pesar de los grandes avances sobre el conocimiento de la respuesta inmune y el análisis de proteínas de superficie de *A. marginale*, no existe todavía una vacuna que induzca una protección sólida y de larga duración a los animales susceptibles. Los inmunógenos disponibles actualmente son cepas atenuadas de *A. marginale* derivadas de sangre y por lo tanto son un riesgo potencial para transmitir otros patógenos presentes en la sangre (Rodríguez *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2016).

Una estrategia en el diseño de vacunas incluye el uso de proteínas asociadas a funciones vitales o de virulencia de los patógenos. En este sentido, los componentes del sistema de secreción tipo IV (SST4) de *A. marginale* están siendo estudiados como una alternativa en el diseño de vacunas recombinantes. Este sistema se encuentra conformado por productos del operón VirB (VirB1 - VirB11) y se le asocia a funciones de virulencia de los patógenos, ya que al menos en otros organismos es capaz de transportar diversas macromoléculas, incluyendo DNA (Shamaei-Tousi *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que VirB3, en *Brucella abortus*, es un componente importante para la virulencia de la bacteria (junto con otras proteínas del operón VirB) y que la supresión de la misma causa niveles reducidos en la expresión de VirB5, VirB8, VirB9, VirB10 y VirB11, lo que sugiere que VirB3 es necesaria para la estabilidad de otras proteínas en el SST4 (Den Hartigh *et al.*, 2008).

En este trabajo se pretende clonar el gen *virB3* e inducir la expresión de manera recombinante, para demostrar la capacidad de la proteína codificada de ser reconocida por anticuerpos de bovino inmunoprotegidos contra la anaplasmosis. Si la premisa de que es inmunogénica se cumple, sería una ventaja utilizarla como agente vacunal, ya que podría ser incluida en una vacuna multivalente contra la anaplasmosis.

## ANTECEDENTES

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, causada por una bacteria gram negativa, intracelular obligada de la familia *Anaplasmataceae*, ubicada en el orden de las *Rickettsiales*, llamada *Anaplasma marginale*. Esta bacteria, reside en los eritrocitos maduros de los bovinos adultos, ya sea en sangre periférica o en tejidos, así como en células endoteliales infectadas de manera *in vitro* (Dumler *et al.*, 2001; Palmer *et al.*, 2000).

La primera descripción de *A. marginale* como agente etiológico de una enfermedad específica y el nombre de la misma, fue designado por Arnold Theiler en Sudáfrica (1910), quien inicialmente denominó a la bacteria como puntos marginales y la diferenció de la babesiosis bovina. Sin embargo, la identificación de la anaplasmosis como una enfermedad de los bovinos ocurrió en 1893 por Smith y Kilborne quienes, al trabajar con babesiosis, descubrieron nuevas inclusiones en la periferia del citoplasma de los eritrocitos, pero los consideraron como formas de desarrollo de *Babesia bigemina* (Palmer, 2009).

### Taxonomía.

*A. marginale* se clasifica en el genogrupo II de las Ehrlichias, dentro del orden de los Rickettsiales, familia Anaplasmataceae (Dumler *et al.*, 2001) y género *Anaplasma* que a su vez, incluye a las especies *A. subespecie centrale*, *A. ovis* y *A. bovis* que, al igual que *A. marginale*, son bacterias intraeritrocíticas obligadas (Rymaszewska y Grenda, 2008).

**Cuadro 1. Taxonomía de *A. marginale*.**

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

Fuente: GOLD Genomes Online Databases, 2011.

## Transmisión.

La infección por *A. marginale* clínicamente es más notable en el ganado bovino, pero eso no excluye que otros rumiantes como el búfalo de agua, el bisón, el antílope africano y el venado, lleguen a ser infectados por la bacteria de manera persistente (Kocan *et al.*, 2003).

La presencia de la enfermedad ocurre mayormente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo Estados Unidos, América central, América del Sur, el Sur de Europa, África, Asia y Australia y su transmisión puede ser de tipo mecánica o biológica. En el caso de la transmisión biológica se incluyen, la transmisión transplacentaria vaca-becerro (Aubry y Geale 2011) y por medio de las garrapatas de los géneros *Dermacentor*, *Ixodes* y *Rhipicephalus spp.* (Scoles *et al.*, 2007). Los vectores biológicos más importantes en Estados Unidos, son las garrapatas ixódidas de los géneros *Dermacentor andersoni* y *Dermacentor variabilis*. El género más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo México, es *Rhipicephalus microplus* (Futse *et al.*, 2003), mostrada en la figura 1. Por otra parte, los vectores mecánicos también juegan un papel importante en la transmisión de *A. marginale*. Este tipo de transmisión se lleva a cabo mediante la picadura de insectos hematófagos de la familia *Tabanidae* y moscas hematófagas como *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans* (Scoles *et al.*, 2005). Los mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* también son considerados como transmisores mecánicos (Mazzola *et al.*, 1976).



**Figura 1. Vector biológico de transmisión de *A. marginale*.** A la izquierda se puede observar una garrapata hembra adulta y a la derecha una garrapata macho, ambas *Rhipicephalus microplus*.

El ganado infectado con *A. marginale* desarrolla una infección aguda que puede alcanzar picos de hasta  $10^9$  eritrocitos infectados por mililitro de sangre y es en esta fase en donde ocurre la enfermedad clínica, caracterizada por diferentes síntomas y signos clínicos (Aubry y Geale 2011). El ganado que sobrevive a la infección aguda, mantiene una infección persistente de por vida, en la cual el ganado queda inmune y se vuelve resistente a la aparición de signos clínicos y síntomas que aparecen ante un desafío. Los niveles de rickettsemia se mantienen muy bajos, entre  $10^{2.5}$  y  $10^6$  eritrocitos infectados por mililitro de sangre, no obstante, el ganado puede servir de reservorio del patógeno y transmitir la enfermedad a otros bovinos a través de los vectores (Scoles *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2012).

#### **Ciclo de vida.**

El ciclo de *A. marginale* (figura 2) inicia cuando las garrapatas toman la sangre del bovino infectado. Después de la ingestión, en el lumen del intestino medio de la garrapata, *A. marginale* invade y coloniza las células mediante un proceso que es llevado a cabo por receptores de superficie de la rickettsia (Brayton *et al.*, 2012). Tal es el caso de la proteína Msp1 $\alpha$ , que presenta un fragmento variable que se encuentra expuesto sobre la membrana de la rickettsia con propiedades de adhesina hacia células del intestino de las garrapatas de los géneros *Dermacentor variabilis* e *Ixodes scapularis*. Cabe mencionar que Msp1 $\alpha$ , en conjunto con otra proteína llamada Msp1 $\beta$  también son capaces de adherirse a un receptor aún no identificado en los eritrocitos del bovino, lo cual les permite llevar a cabo la colonización (de la Fuente *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2009).

Dentro de las células epiteliales del intestino medio de la garrapata, *A. marginale* se replica dentro de vacuolas intracelulares para formar colonias de hasta varios cientos de microorganismos, equivalentes a  $10^6$  organismos por intestino. Después de esta replicación inicial en el epitelio del intestino medio, la rickettsia entra en la hemolinfa y posteriormente invade las células epiteliales de la glándula salival (Brayton, 2012). Finalmente la rickettsia se transmite a través de las glándulas salivales de la garrapata durante la alimentación en la siguiente etapa después de la muda. Una vez que se encuentra en el hospedero mamífero, *A. marginale* infecta



eritrocitos y células endoteliales, dicha forma de infectar aún no se ha explicado (Rodríguez *et al.*, 2009).

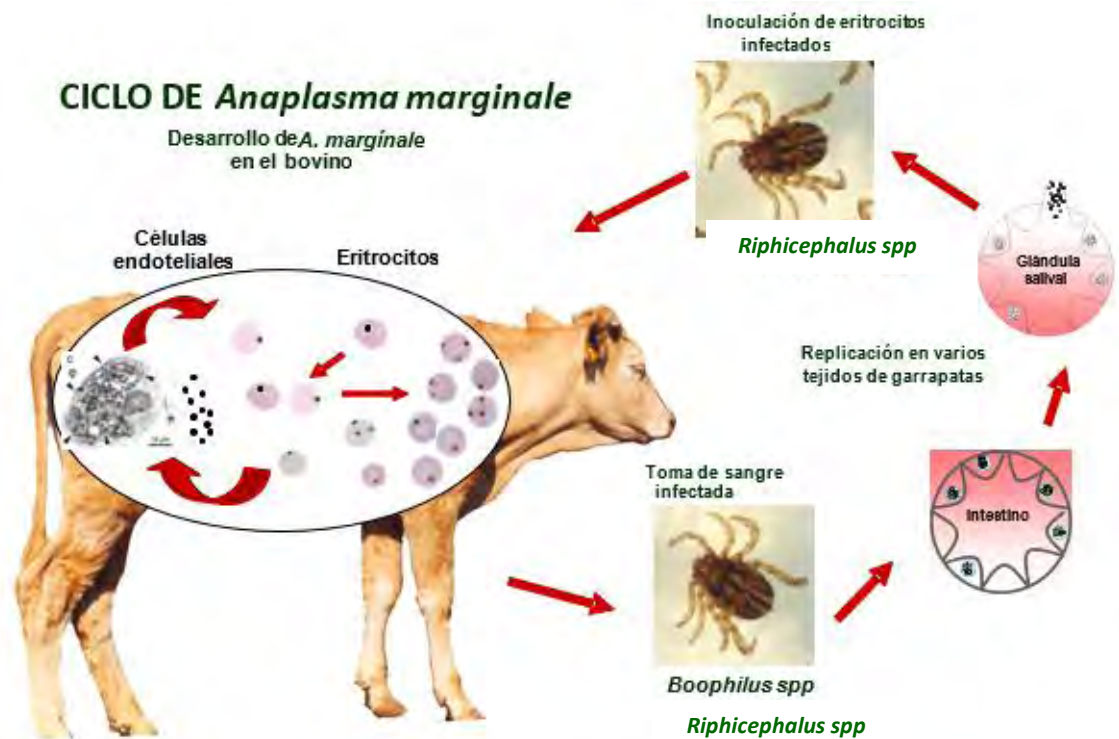


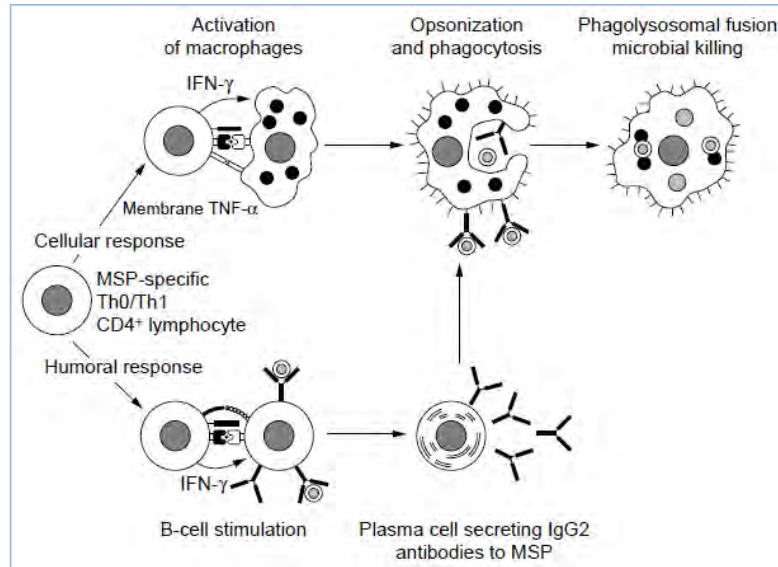
Figura 2. Ciclo de vida de *A. marginale*. Se incluye a la garrapata *Rhipicephalus spp* como transmisor biológico (Rodríguez *et al.*, 2009).

### Respuesta inmune.

*A. marginale* no se replica dentro de células que expresen moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), por lo tanto, se ha supuesto que la inmunidad protectora ante una infección por dicha bacteria requiere la activación tanto de la respuesta de células T CD4+ como de la producción de anticuerpos (Brown, 2012).

Tal como se muestra en la figura 3, el mecanismo de activación de la respuesta inmune correspondiente a la fase aguda de la infección, inicia mediante la activación de macrófagos y células dendríticas que reconocen y fagocitan a la bacteria, presentando péptidos antigénicos en el contexto del MHC clase II. Los péptidos presentados son reconocidos por linfocitos T CD4+ para posteriormente desencadenar una respuesta inmune de tipo celular, inducida por la secreción de interleucina 12 (IL-12) y la subsecuente producción de IFN- $\gamma$ , por lo que la respuesta humoral, después de

la diferenciación de las células B a células plasmáticas, induce la producción de isotipos de inmunoglobulina (Ig) G de alta afinidad como IgG1 e IgG2 (Brown, 2012).



**Figura 3. Activación de la respuesta Inmune.** Células T CD4+ específicas contra MSP's, secretando IFN-γ para la activación de macrófagos y cambio de isotipo de células B para la producción de IgG2 (Palmer *et al.*, 1999).

Según estudios realizados en animales protegidos contra la anaplasmosis, para desencadenar una respuesta inmune de tipo protectora, el bovino requiere la inducción de altos títulos de IgG2. Este proceso es inducido por IL-12 que activa a linfocitos T CD4+ productores de IFN-γ, interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) (Palmer *et al.*, 1999; Barigye *et al.*, 2004). Una vez que la IgG2 reconoce los péptidos antigénicos, aumenta la actividad fagocitaria de los macrófagos, mediando la opsonización y aumentando a su vez la producción de óxido nítrico secretado por los macrófagos activados, el cual favorece la muerte de *A. marginale* (Brown *et al.*, 1998).

Inicialmente, la respuesta por IgG2 se encuentra dirigida contra algunas de las proteínas de membrana externa (Msp's) y dentro de ellas, la Msp2 es la variante inmunodominante y con alta variabilidad antigénica (Palmer *et al.*, 1999). Esta proteína es codificada por una familia multigénica que consiste en un gen funcional y siete pseudogenes, los cuales codifican para una región hidrofílica e hipervariable en

la parte central. Los productos de estos pseudogenes son capaces de recombinarse entre sí para formar nuevas variantes (Rodríguez *et al.*, 2009).

Se cree que los anticuerpos presentes contra Msp2, juegan un papel muy importante en el control de la bacteremia, siendo capaces de neutralizar a la bacteria cuando se encuentra extracelularmente durante el proceso de invasión de un nuevo eritrocito y mediante la opsonización de la bacteria, para que sea fagocitada por los macrófagos (Palmer *et al.*, 1999). Sin embargo, esta proteína también podría estar funcionando como una cortina de humo hacia el sistema inmune, ya que cuando la enfermedad está por controlarse, se genera una nueva variante de MSP2 y por tanto, se genera una nueva respuesta inmune ante la nueva variante, por lo que dicha respuesta no es suficiente para eliminar la infección (Rodríguez *et al.*, 2009). Por otra parte, no se han detectado anticuerpos directos contra la superficie de los eritrocitos infectados, por lo tanto, la fagocitosis de estos eritrocitos debe ocurrir por otro mecanismo (Palmer, 1999).

#### **Control de la enfermedad.**

El control eficaz de la anaplasmosis requiere una disminución tanto de la infección en el mamífero hospedero como del vector, con el fin de reducir la infección del patógeno (de la Fuente *et al.*, 2006).

Los métodos disponibles en la actualidad, incluyen el uso de acaricidas para la eliminación del vector biológico, el tratamiento específico de los animales con antibióticos y el uso inmunógenos no comerciales. Estas técnicas de control sólo limitan las pérdidas provocadas por las garrapatas y las enfermedades que transmiten y no pueden considerarse del todo efectivas ya que, la selección de las garrapatas resistentes a acaricidas y la presencia de residuos en carne y leche limitan el uso de pesticidas y antibióticos. Por otro lado, el uso de antibióticos es eficaz sólo si se lleva a cabo correctamente, pero por un período de tiempo corto (Reinbold *et al.*, 2010).

La vacunación se ha propuesto como un método preventivo ante la anaplasmosis bovina (Rodríguez *et al.*, 2009) sin embargo, no existen vacunas comerciales eficaces a pesar de los intentos por procesos diferentes, tales como cepas atenuadas, eritrocitos infectados, antígenos purificados derivados de células de garrapata,

patógenos recombinantes y proteínas derivadas de la garrapata (de la Fuente *et al.*, 2006). Por ello, una nueva opción en el diseño de dichas vacunas incluye el uso de proteínas asociadas a funciones vitales o de virulencia de los patógenos (Shamaei *et al.*, 2004).

### **Vacunas contra la anaplasmosis.**

La anaplasmosis bovina causa daños que ameritan el estudio de alternativas para la prevención de la enfermedad. Las vacunas recombinantes basadas en proteínas asociadas a funciones vitales o de virulencia son una opción viable debido a que, en comparación con otros métodos utilizados en contra de la anaplasmosis, son más económicas y su uso podría prevenir las pérdidas en la producción o la muerte de los animales infectados. Además, las vacunas en general suelen ser de aplicación anual (Rodríguez *et al.*, 2009). Se han diseñado vacunas vivas, atenuadas y vacunas inactivadas para el control de la misma, sin embargo se ha tenido éxito limitado (Kocan *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2008).

En México y en muchos países se han utilizado diferentes alternativas. Éstas incluyen a las vacunas vivas, atenuadas por diferentes metodologías como la radiación, a partir de cepas de *A. marginale* (Simpson *et al.*, 1964; Kuttler, 1972) y aún, vacunas heterólogas hechas a partir de cepas de *A. centrale*, una especie menos virulenta que se utiliza para brindar protección cruzada contra cepas virulentas de *A. marginale*, con uso muy difundido en algunos países (Pipano, 1995; Dark *et al.*, 2011). Desafortunadamente, los tipos de vacunas descritos no han dado resultados que puedan ser aplicables a la inmunización rutinaria. Un ejemplo de esto fue un preparado de eritrocitos de bovino infectados con la rickettsia, que por contener una gran cantidad de eritrocitos del bovino, indujo la producción de anticuerpos contra los propios eritrocitos de algunos animales, lo que llegó a producir la lisis de los eritrocitos de becerros nacidos de madres vacunadas o choque anafiláctico en otros (Osorno *et al.*, 1975). Por otro lado la variabilidad antigénica que presenta *A. marginale* de regiones geográficas diferentes (Jiménez *et al.*, 2012), influye en el grado de protección obtenido (Ocampo-Espinoza *et al.*, 2006). En México durante la formación de un banco de cepas de la rickettsia, se caracterizó y se encontró una cepa que en

ausencia de procesos de modificación resultó ser de moderada a mínima virulencia (García-Ortiz *et al.*, 1998 y 2000). Esta cepa se ensayó en animales de varias edades, a diferentes dosis y contra desafíos con cepas heterólogas, siempre induciendo protección sólida cuando se usa en animales menores a los 9 meses de edad (Rodríguez *et al.*, 2008). Como todas las vacunas a partir de eritrocitos infectados, incluye el riesgo de transmitir otros patógenos en la sangre de los animales donde se prepara la vacuna.

En el caso de vacunas inactivadas contra la anaplasmosis, preparadas a base de bacterias parcialmente purificadas a partir de sangre infectada se han ensayado con grados variables de éxito (Corrier *et al.*, 1985). En México, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), inició investigaciones hacia el desarrollo de vacunas inactivadas que, después de muchos estudios, rindieron un inmunógeno inactivado libre de residuos de eritrocitos que no induce anticuerpos en contra de los mismos y sí induce una respuesta inmune sólida contra el desafío, siempre y cuando en el preparado se incluyan cepas del lugar donde se va a aplicar (Orozco-Vega *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2000; Suarez y Noh, 2011). Estas vacunas se distribuyen actualmente por el INIFAP y han resultado muy efectivas induciendo inmunidad sólida contra las cepas con las que se elabora, además, es de fácil manejo, ya que sólo tiene restricción en que el espectro de protección es limitado a las cepas con las que se elabora.

Por otro lado, aun cuando existen opciones no comerciales para la prevención de la anaplasmosis en México, estas tienen limitaciones ya que impiden un uso amplio en programas de vacunación debido precisamente a todas las restricciones mencionadas que presentan (Rodríguez *et al.*, 2000).

Actualmente, la vacunología reversa, basada en el estudio *in silico* de las secuencias publicadas para genomas completos de varios patógenos, incluyendo *A. marginale*, permite predecir las proteínas que pueden servir como candidatos a agentes vacunales. De esta forma se buscan genes de proteínas que sean inmunogénicas, ubicadas en la superficie externa de la membrana celular, que estén asociados a funciones vitales o de virulencia y que sean no variables entre muchos

aislados del patógeno en cuestión. Cabe mencionar, que para llevar a cabo los análisis *in silico* de este trabajo, se ha utilizado la cepa St. Maries de *A. marginale* considerada como cepa prototipo de alta transmisibilidad (Brayton, 2005).

Los sistemas de secreción están siendo estudiado como una alternativa en el diseño de vacunas recombinantes ya que se encuentran en las membranas y su función es el intercambio de moléculas que incluyen: DNA y proteínas entre organismos del mismo tipo o entre el patógeno y el hospedador (Lee y Schneewind, 2001).

### **Sistemas de secreción.**

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. En las últimas décadas los sistemas de secreción de bacterias han sido intensamente estudiados, principalmente de las bacterias gram negativas, dado que las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna, y la membrana externa que es una bicapa asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos (González y Dreyfus, 2003).

Las vías de secreción por las que las proteínas son translocadas en las bacterias gram negativas han sido clasificadas en siete grupos principales (I - VI y autotransportadores). Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan (Lee y Schneewind, 2001). Estos grupos se pueden aún subdividir en dos clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática: las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un

intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (González y Dreyfus, 2003).

#### **Sistema de secreción tipo IV.**

El sistema de secreción tipo IV (SST4) se encuentra en diversos grupos de microorganismos capaces de infectar a una gran variedad de animales y plantas. Es uno de los siete tipos de sistemas de secreción conocidos, de clase Sec-independiente, utilizados por las bacterias gram negativas en una variedad de procesos, que van desde la introducción de factores de virulencia en células eucariotas, hasta la transferencia de material genético por conjugación entre bacterias (Lockwood *et al.*, 2011; Chandran *et al.*, 2009).

De entre las funciones mencionadas, se considera que la principal función del SST4 es promover la plasticidad y diversidad del genoma, ya que juega un papel crucial en la transferencia de plásmidos que contienen genes de resistencia a antibióticos entre las bacterias patógenas (Chandran y Waksman, 2015).

La diferencia principal entre éste y otros sistemas de secreción es precisamente, que el SST4 se encuentra asociado con los componentes principales de la maquinaria de conjugación, lo que les permite, además de adquirir nuevos genes de resistencia a antibióticos, degradar moléculas orgánicas, producir toxinas, y otros rasgos de virulencia, ya que es capaz de transportar diversos sustratos macromoleculares incluyendo DNA y proteínas (Mossey *et al.*, 2010).

La secuenciación del genoma completo de *A. marginale* reveló la presencia de genes homólogos al SST4. En general, en diversos estudios de los genomas de las Rickettsias, se ha definido la presencia del SST4, caracterizado por la expansión de las familias de genes de *virB4* y *virB6* y por la ausencia de *virB5*. Se tiene la hipótesis de que el SST4 en *A. marginale* juega un papel muy importante en la invasión y patogénesis, debido a que se translocan proteínas efectoras a través de su membrana hacia el interior de las células blanco eucariotas. Sin embargo, las proteínas efectoras del SST4 no han sido identificadas todavía (Lockwood *et al.*, 2011).

Los sistemas de secreción tipo IV se dividen en tres grandes grupos de acuerdo a su función:

- Grupo I: se encuentran implicados dos procesos principales, la transferencia de DNA de una célula a otra en el proceso de conjugación y, la movilización en bloque de grandes regiones de genes de manera eficiente. De esta manera, puede transferir arsenales enteros de módulos funcionales, que promueven actividades de supervivencia e infección (Zechner *et al.*, 2012).
- Grupo II: se encarga de la transferencia de proteínas, ya que, algunas bacterias inyectan una o varias proteínas efectoras en las células huésped, que cumplen con múltiples funciones celulares para que el patógeno infeccioso se beneficie (Zechner *et al.*, 2012).
- Grupo III: se basa en el contacto independiente, es decir, en el intercambio de macromoléculas entre la célula y el medio externo (Zechner *et al.*, 2012).

Una segunda clasificación del SST4 está dada de acuerdo a las principales funciones biológicas que este presenta. En esta clasificación se incluyen:

- Maquinarias de conjugación: son las más comunes en el SST4 y son codificadas por plásmidos auto-transmisibles o transposones conjugativos, también llamados elementos conjugativos e integrativos. Los plásmidos auto-transmisibles también codifican para una maquinaria de procesamiento de sustrato, denominado relaxoma, el cual incluye una relaxasa (Chandran y Waksman, 2015), cabe aclarar que no se han encontrado plásmidos en *A. marginale*.
- Translocadores efectoras: los componentes de este grupo funcional son esenciales para la patogénesis de las bacterias y otros microorganismos. Estos componentes han sido caracterizados únicamente en bacterias Gram negativas y su función principal es el transporte de factores de virulencia, los cuales son liberados en el citosol de la célula hospedera (Chandran y Waksman, 2015).
- Sistemas de liberación/recepción de DNA: este sistema se encuentra adaptado a partir de la maquinaria de conjugación. Forma una clase funcional en la que los microorganismos captan moléculas de DNA desde el medio extracelular y así mismo, son capaces de liberar moléculas de DNA hacia el medio



extracelular. A diferencia de las maquinarias de conjugación, carecen del complejo relaxoma (Chandran y Waksman, 2015).

Debido a los traslapes funcionales que existen entre los diversos mecanismos de secreción tipo IV, resulta complicado clasificar estrictamente todos los SST4 conocidos en clases funcionales distintas. Por tal motivo, se sugiere una última clasificación que se describe a continuación:

- Sistema de Secreción tipo IVa (SST4a): este sistema se encuentra representado por *A. tumefaciens*. Es codificado por 12 genes que son elementos del operón VirB (*virB1-virB11*) y del operón D4 (*virD4*). Tiene además un complejo relaxosoma conservado, similar al encontrado en la mayoría de los SST4 de tipo conjugativo y se sabe que conforman un pilus que se encarga de establecer el contacto con la célula hospedera y de esta manera, llevar a cabo la secreción de sustrato (Chandran y Waksman, 2015).
- Sistema de Secreción tipo IVb (SST4b): este sistema está representado por *Legionella pneumophila* y es considerado importante para su supervivencia intracelular, así como la supervivencia de otros microorganismos como *Coxiella burnetii*, y *Rickettsiella grylli*, debido a que un gran repertorio de proteínas efectoras son liberadas a través del sistema, lo que contribuye al establecimiento de un fagosoma replicativo que es capaz de evadir la respuesta inmune. El T4SSb también involucra la transferencia de material nucleico a la célula huésped (Chandran y Waksman, 2015).
- Otros tipos de sistema de secreción (SST4s): aquí son agrupados todos los SST4 que no son similares al SST4a o al SST4b. La mayoría de los sistemas que componen este grupo son responsables de la resistencia a antibióticos debido a la transferencia horizontal de genes, originando islas genómicas y contribuyendo a la adaptación de bacterias patógenas (Chandran y Waksman, 2015).

### Proteína VirB3.

VirB3 es una proteína que participa en el montaje del sistema de secreción tipo IV y que se encuentra asociada con las membranas bacterianas interior y exterior (figura 4), conteniendo dos regiones transmembranales que sugieren que probablemente se encuentra anclada a la membrana interna. Sin embargo su función es aún desconocida.

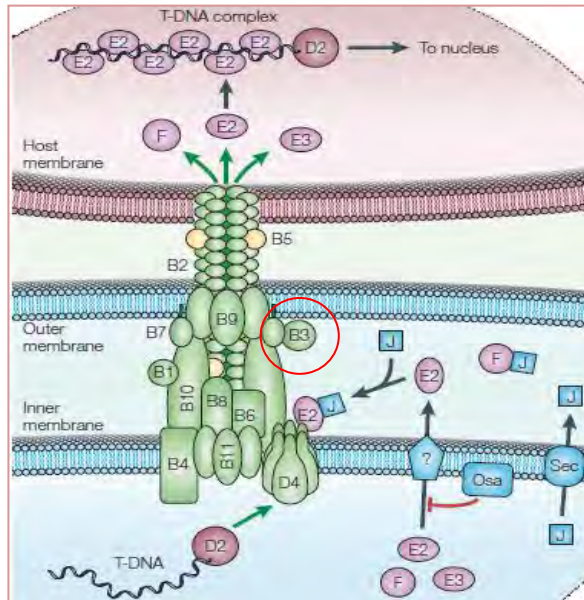


Figura 4. Sistema de secreción tipo IV de *Agrobacterium tumefaciens*. El círculo en rojo indica la ubicación de la proteína VirB3 en el SST4 de *A. tumefaciens* (Seubert *et al.*, 2004).

La familia de esta proteína también incluye proteínas de transferencia conyugal con la familia TrbD, un motivo de unión a nucleótidos y la posibilidad de proporcionar energía para la exportación de DNA u otras proteínas Trb (Chandran y Waksman, 2015; Marchler-Bauer *et al.*, 2011).

Se ha referido también que VirB3 puede ayudar a modular la actividad de VirB4 en *Campylobacter jejuni*, así como su inserción en la membrana interna y que en *A. tumefaciens* puede estar participando en la formación de complejos proteicos. Estudios recientes demuestran también un efecto estabilizador de VirB3 en VirB4, VirB6, VirB7 y VirB8 (Mossey *et al.*, 2010; Chandran y Waksman, 2015).

## JUSTIFICACIÓN

Las pérdidas que ocasiona la anaplasmosis bovina se reflejan en la disminución de la producción de carne y leche, retraso en el crecimiento, mortalidad, reducción en la eficiencia reproductiva por abortos, infertilidad o esterilidad y disminución de la natalidad, más aun, limita la introducción de razas mejoradas a zonas endémicas. El control de la enfermedad en la actualidad es de gran importancia comercial, sin embargo, las metodologías utilizadas no pueden considerarse completamente efectivas debido a que presentan desventajas que restringen su uso. De entre los métodos disponibles y/o en desarrollo, el uso de vacunas representa la opción más viable, ya que previenen las pérdidas en la producción y la muerte de los animales infectados. En México y en el resto del mundo, no existen vacunas comerciales disponibles para el control de la enfermedad y aunque existen algunos inmunógenos inactivados, estos son de uso limitado debido a que la bacteria es diversa y posee mecanismos de alta variabilidad genética que utiliza para evadir el sistema inmune del hospedero. Por esta razón se han propuesto como blanco vacunal proteínas expuestas en la membrana, ligadas a funciones importantes o de virulencia dentro del microorganismo, de tal forma que su variabilidad dentro de diferentes cepas de la misma especie sea poca o nula y que a su vez, tengan potencial inmunogénico. Tal es el caso de la proteína VirB3, una proteína de membrana, altamente conservada entre cepas de la bacteria y teóricamente importante para la estabilidad del SST4. A partir del estudio de esta proteína puede dilucidarse si la proteína recombinante tiene potencial para ser utilizada como un antígeno vacunal y de esta forma prevenir la enfermedad y brindar protección a los animales susceptibles.

## HIPÓTESIS

La proteína recombinante VirB3 de *Anaplasma marginale* será reconocida por anticuerpos de bovinos inmunes a la anaplasmosis bovina.

## OBJETIVO GENERAL

Expresar la proteína recombinante VirB3 de *Anaplasma marginale* y demostrar que es reconocida por anticuerpos provenientes de bovinos inmunoprotegidos contra la anaplasmosis bovina.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener las secuencias del gen *virB3* de diferentes aislados de *A. marginale* y mediante estudios bioinformáticos, analizar el potencial inmunogénico, así como la variabilidad con respecto de la cepa St. Maries y entre los aislados secuenciados.
2. Clonar el gen *virB3* en el vector Champion™ pET SUMO y expresar la proteína de manera recombinante en las células One Shot® BL21 DE3.
3. Verificar el potencial inmunogénico de la proteína VirB3 mediante ensayos inmunológicos.
4. Verificar su ubicación como proteína de membrana.

## METODOLOGÍA

### 1. Análisis bioinformático.

Con base en el genoma publicado para la cepa St. Maries de *A. marginale* (Brayton *et al.*, 2005), en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se hizo una búsqueda de secuencias, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, correspondientes al gen *virB3* del SST4 de *Anaplasma marginale*, verificando diferentes características importantes que a continuación se describen.

Para determinar la ubicación de la proteína VirB3 putativa, con respecto de la membrana externa, y conocer la presencia de dominios transmembranales se hizo un análisis utilizando los programas TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y TMPred ([http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)), además, se calculó el índice de hidrofobicidad con el programa ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) para hacer una comparación de los resultados. Mediante una revisión bibliográfica se tomó en consideración que el gen *virB3* fuera parte importante y vital para la bacteria y que además, de acuerdo a lo obtenido por los programas ya mencionados, la proteína codificada fuera extracelular. Sin embargo, los análisis predictivos arrojaron resultados en los que se sugiere que la proteína codificada contiene dominios transmembranales, por lo tanto, se optó por trabajar únicamente con la secuencia que codifica para la región extracelular.

El punto isoeléctrico y el peso molecular de la proteína putativa, se obtuvieron con el programa SMS2 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>).

El programa Antigenicity Plot (<http://www.bioinformatics.org/JaMBW/3/1/7/>) se utilizó para analizar las posibles regiones antigénicas que pueda presentar la secuencia de aminoácidos y para analizar la presencia de epítomos de tipo B se utilizaron los programas BCEPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>).

La insolubilidad y composición en aminoácidos de la proteína putativa se calculó con el programa Recombinant Protein Solubility Prediction (<http://www.biotech.ou.edu/>) y se utilizó el programa SignalP

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para detectar la presencia o ausencia de péptido señal.

## **2. Organismos.**

Para este trabajo se utilizaron seis cepas mexicanas de *Anaplasma marginale* previamente caracterizadas con respecto de los marcadores moleculares Msp1 $\alpha$  y Msp4 como sigue: Aguascalientes, Ags., Mex-01-001-01 (Jiménez *et al.*, 2008); Soto la Marina, Tamps. Mex-28-037-02, (Jiménez *et al.*, 2012); Tlapacoyan Ver. Mex-30-184-03; Playa Vicente, Ver. Mex-30-130-01; Yautepec, Mor. Mex-17-030-01; Tizimín, Yuc. Mex-31-096-01, (De la Fuente *et al.*, 2001).

## **3. Diseño de Iniciadores y condiciones de la amplificación del gen *virB3*.**

Para la amplificación del gen *virB3* se diseñaron iniciadores con base en la secuencia reportada en la base de datos NCBI, correspondiente a la cepa St. Maries, a partir del nucleótido 45 el cual corresponde al inicio de la región extracelular de la proteína. Para este efecto se utilizó el programa Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>); la síntesis de los mismos se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (sentido: AAC GAC TTT AGA GTC TTG CTC, antisentido: CTA CAT CAC ATC GTA AGA ATT GGC ATT G). Con ellos se prepararon soluciones de cada uno a una concentración de 10  $\mu$ M y en un volumen final de 100  $\mu$ L en agua libre de nucleasas.

Las condiciones del PCR se establecieron con respecto al tamaño del fragmento a amplificar de la proteína VirB3 (168 pb), por lo tanto la temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 1 minuto, la de alineamiento fue de 58°C por 45 segundos y la de elongación fue de 72°C por 15 segundos.

## **4. Extracción de DNA genómico y amplificación.**

El DNA genómico de *A. marginale* se extrajo a partir de sangre de bovino infectado con los aislados mexicanos antes mencionados, con el Kit Ultraclean® Blood Spin® ADN Isolation, siguiendo las instrucciones del productor: 200  $\mu$ L de sangre de cada aislado se colocaron en tubos de 2 mL, se adicionaron 7.6  $\mu$ L de proteinasa K 20 mg/ml y 200  $\mu$ L de solución B1 a cada uno para desnaturalizar las macromoléculas,

se agitaron en un Vortex por 15 segundos y se incubaron a 65° C por diez minutos. Las muestras se centrifugaron brevemente para remover las gotas de la tapa y se agregaron 200 µL de solución B2, se agitaron nuevamente por 15 segundos en el Vortex, se centrifugaron para remover gotas y se transfirieron a una columna sobre un tubo, se centrifugaron por un minuto a 13,000xg y la columna se transfirió a un tubo nuevo. Se agregaron 500 µL de solución B3 y se centrifugó a 13,000xg por 30 segundos. Se agregaron 500 µL de solución B4 para lavar el DNA y remover el exceso de sales y se centrifugó de nuevo a 13,000xg por 30 segundos desechándose el sobrenadante.

El gen *virB3* fue amplificado a partir del DNA genómico extraído de sangre infectada de los aislados antes mencionados en un volumen final de 50 µL, utilizando iniciadores previamente diseñados a partir de la secuencia de dicho gen: 25 µL de Master Mix, 17 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de cada iniciador y 4 µL de DNA. Los amplicones obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 1% durante 35 minutos a 110 Voltios en amortiguador Tris, Acetato y EDTA (TAE) adicionado con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. El gel se expuso en un fotodocumentador Gel Logic® 1500 Imaging System.

## **5. Secuenciación de amplicones.**

### **5.1. Ligación y Transformación.**

Para obtener la secuencia de cada amplicón para estudios de predicción, se procedió a clonar en un vector comercial pJET 1.2 como sigue: una vez que se verificó que los amplicones tuvieran el peso molecular esperado (168 pb) se procedió a hacer la ligación con el Kit CloneJET™ PCR Cloning Kit. La reacción Blunting se llevó a cabo a 4°C con 10 µL de buffer de reacción 2x, 2 µL de producto de PCR, 5 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de enzima ADN blunting. Una vez que los extremos del amplicón estaban romos, se procedió a ligar en el vector pJet 1.2 como sigue: la mezcla se agitó despacio en un Vortex, se centrifugó por cinco segundos y se incubó por cinco minutos a 70°C, pasado este tiempo se enfrió brevemente en hielo y a continuación se agregó 1 µL del vector de clonación y 1 µL de ADN-ligasa T4 para que la reacción ocurriera a

temperatura ambiente (22°C). La mezcla se utilizó directamente para transformar bacterias competentes TOP10.

Un volumen de 2 µL de reacción de ligación se transfirió a un vial que contenía células competentes Top10, se mezcló ligeramente dando vueltas y se incubó por 30 minutos en hielo. El vial se colocó en un baño maría a 42°C por un minuto e inmediatamente se transfirió a hielo por cinco minutos. Se agregaron 250 µL de medio SOC a temperatura ambiente y se agitó horizontalmente por una hora a 37°C. Volúmenes de 50, 100 y 150 µL de células se sembraron en placas con medio Luria Bertani (LB) con 50 µg/mL de ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Tres clonas de cada placa se seleccionaron, se inocularon en 12.5 mL de medio LB líquido con 50 µg/mL de ampicilina por separado y se incubaron a 37°C toda la noche.

## **5.2. Extracción de DNA plasmídico.**

El DNA plasmídico se extrajo a partir de las bacterias transformadas con el Kit GeneJET™ Plasmid miniprep como sigue: 10 mL de cada cultivo, se colocaron en tubos de 15 mL, se centrifugaron por dos minutos a 3,200xg y se desechó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 250 µL de solución de resuspensión en tubos de 2 mL con ayuda de un Vortex. Se agregaron 350 µL de solución de neutralización, se mezcló por inversión de cuatro a seis veces y se centrifugó por cinco minutos a 13,000xg. El sobrenadante se transfirió a una columna y se centrifugó a 13,000xg por un minuto, descartando el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de solución de lavado y se centrifugó a 13,000xg por un minuto, se descartó el sobrenadante y se repitió esto último. La columna se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL y se agregaron 40 µL de buffer de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) en el centro de la columna para eluir el ADN plasmídico, se incubó por dos minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000xg por dos minutos más descartándose la columna.

Se verificó que el inserto se encontrara ubicado de la manera correcta por PCR mediante la combinación de iniciadores. Para la primer mezcla se agregaron 12.5 µL de Master Mix, 8.5 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de iniciador sentido del amplicón VirB3, 1 µL de iniciador antisentido del vector y 2 µL de ADN genómico de



cada aislado. Para la segunda mezcla se utilizaron las mismas cantidades de cada componente pero tomando 1  $\mu\text{L}$  de iniciador sentido del vector y 1  $\mu\text{L}$  de iniciador antisentido del inserto.

El ADN plasmídico de cada muestra se cuantificó en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 1000, colocando 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra en el lector. Una vez obtenidas las concentraciones se eligieron las tres más altas de cada aislado que estuvieran por encima de los 41  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y se ajustó la concentración de cada uno, colocando la cantidad de ADN y agua libre de nucleasas necesarias para obtener una concentración final de 16  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Finalmente las muestras se enviaron a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se alinearon con respecto a la cepa St. Maries utilizando los programas CLC Sequence Viewer (con el cual se obtuvo la secuencia consenso) y ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para finalmente realizar los análisis *in silico* corroborativos.

## **6. Expresión de la Proteína.**

### **6.1. Ligación y transformación.**

Se obtuvieron amplicones del gen *virB3* a partir de DNA genómico del aislado de Aguascalientes, Ags. Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) descrita anteriormente y se llevó a cabo la ligación del amplicón en el vector comercial Champion™ pET SUMO Protein Expression System. Cabe mencionar, que la Taq polimerasa añade una desoxiadenosina a los productos de PCR en sus extremos 3' y por su parte, el vector pET SUMO linearizado contiene desoxitimidinas en sus extremos 3', lo que permite que los productos de PCR se inserten de manera eficiente y se lleve a cabo la ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa. Para ello se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de producto de PCR fresco, 1  $\mu\text{L}$  de buffer de ligación 10x, 2  $\mu\text{L}$  de vector pET SUMO (25  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 4  $\mu\text{L}$  agua libre de nucleasas (hasta un volumen de 9  $\mu\text{L}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa, teniendo un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . La reacción se incubó a 15°C durante toda la noche para proceder a transformar células competentes One Shot® Mach1™-T1R de la forma antes descrita. Volúmenes de 50, 100 y 150  $\mu\text{L}$  de células se sembraron

en placas con medio LB con 50 µg/mL de kanamicina y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las clonas transformadas se seleccionaron y se crecieron en medio líquido LB con 50 µg/mL de kanamicina durante toda la noche a 37°C.

El DNA plasmídico se extrajo a partir de las bacterias transformadas utilizando el Kit GeneJET™ Plasmid miniprep como se explicó anteriormente. Posteriormente se verificó que el inserto se encontrara ubicado de la manera correcta por PCR mediante la combinación de iniciadores.

El DNA plasmídico obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 1000 y, una vez obtenida la concentración, se eligieron tres clonas (todas correspondientes al aislado de Aguascalientes Ags.) que tuvieran una concentración por encima de los 41 ng/µL. Se hicieron diluciones para obtener una concentración final de 16 ng/µL y finalmente las muestras se enviaron a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, esto con la finalidad de saber si la secuencia insertada en el vector de expresión, correspondía al gen virB3. Las secuencias obtenidas se alinearon con respecto a la cepa St. Maries utilizando el programa ClustalW.

Células competentes One Shot® BL21 DE3 fueron transformadas con el DNA plasmídico recuperado de la extracción, siguiendo el protocolo de transformación antes mencionado. Posterior a la transformación bacteriana, las células fueron cultivadas en medio SOC con agitación de 250 rpm durante 1 hora a 37°C. Pasado ese tiempo, todo el cultivo se inoculó en 10 mL de medio LB con 50 µg/mL de kanamicina seguido de la incubación durante toda la noche a 37°C con agitación de 250 rpm.

## **6.2. Expresión de la proteína.**

Las células transformadas de *E. coli*, cultivadas durante toda la noche, se inocularon en medio LB líquido con una relación de 1:15, adicionando 50 µg/mL de kanamicina. El cultivo se mantuvo a 37°C con una agitación de 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Posteriormente, se realizó la expresión agregando IPTG 1 mM (final) y se tomaron muestras de 1.5 mL a las cero, una, dos, tres, y cuatro horas después de la inducción. Las muestras se centrifugaron a

14,000xg eliminando el sobrenadante y guardando el botón celular en congelación para su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida por SDS-PAGE y de esta manera identificar el tiempo óptimo de expresión.

## **7. Purificación de la proteína.**

Una vez que se determinó el tiempo óptimo de expresión, se procedió a realizar la expresión a escala media con IPTG 1 mM, inoculando 5 mL de un cultivo fresco en 250 mL de medio líquido LB con 50 µg/mL de kanamicina e incubando durante 4 horas a 37 °C y 250 rpm. El botón celular se obtuvo por centrifugación a 6,500xg por 15 minutos a 4°C y se guardó en congelación durante toda la noche.

Al botón celular se le adicionaron 5 mL de buffer de guanidina 6 M, pH 7.8 por gramo obtenido, preparado como sigue:

- Stock A: 200 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 5 M de NaCl
- Stock B: 200 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 5 M de NaCl

Se pesaron 57.3 g de guanidina, se añadieron 0.58 mL de stock A y 9.42 mL de stock B, se ajustó pH a 7.8 y se aforó a 100 mL con agua destilada.

Posteriormente se sonicó manteniendo en hielo y sin tocar las paredes del tubo. La muestra se centrifugó por media hora a 6,500xg a 4°C, obteniéndose únicamente el sobrenadante.

Una columna de agarosa-níquel (Thermo Scientific HisPur Ni-NTA, no. Cat. 88221) fue lavada con 10 mL de buffer de Urea 8 M (48.05 g de Urea, 1.38 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.21 g de tris-HCl, aforado a 100 mL), pH 8 y posteriormente se adicionó el sobrenadante y se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación horizontal. El sobrenadante se drenó, se colectó y se etiquetó como fracción 1. A la columna se le agregaron 20 mL de buffer de Urea 8 M, pH 6.3. El buffer se drenó, se colectó y se etiquetó como fracción 2. Por último, a la columna se le adicionaron 8 mL de buffer de Urea 8 M, pH 4.5, se drenaron y colectaron, etiquetando como fracción 3. Las muestras se prepararon para su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida por SDS-PAGE. Una vez que se identificó la fracción en la que se encontraba la proteína, se llevó a cabo una diálisis utilizando PBS 1x pH 7.4.

## **8. Preparación del inóculo.**

Con la proteína dializada, se procedió a preparar 20 mL de inóculo con una concentración de 50 µg/mL de proteína. Se realizaron los cálculos correspondientes para obtener las cantidades de muestra dializada requerida: la muestra dializada contenía 1,489 µg/mL de proteína (cuantificación hecha previamente por el método de Bradford). Con respecto al volumen final del inóculo se calcularon también las cantidades de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 200 mM y de gentamicina con una concentración de 80 µg/mL. Por lo tanto, los volúmenes utilizados de cada componente fueron los siguientes: 680 µL de proteína dializada, 100 µL de PMSF 200 mM y 32 µL de gentamicina 80 µg/mL.

La preparación del inóculo consistió en agregar primeramente la gentamicina 80 µg/mL a 5 mL de solución fisiológica (NaCl 0.15 M), seguida del PMSF 200 mM y de la proteína dializada. La preparación se aforó a 10 mL con solución fisiológica 0.15 M y fue agregada lentamente a 10 mL de adyuvante SEPPIC Montanide ISA 70 VG, el cual comenzó a homogenizarse a una velocidad baja antes de agregar dicha solución. Todo se preparó bajo condiciones estériles y en hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Una vez agregada la totalidad de la muestra, se aumentó la velocidad de homogeneización y se mantuvo así por seis minutos. Pasado ese tiempo, la muestra se vertió en un frasco estéril de vidrio, se colocó un tapón de goma con cubierta de aluminio y se guardó a 4 °C.

## **9. Inoculación en conejos.**

Para las inoculaciones se utilizaron tres conejos de aproximadamente dos a tres meses de edad, que fueron proporcionados por el Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).

Para los controles negativos, se tomaron muestras de 1 mL de sangre de la oreja antes de hacer la inoculación. La sangre se centrifugó durante 15 minutos a 6,500xg para posteriormente obtener únicamente el suero. Se agregó un volumen de glicerol por volumen de suero (1:1) y una vez hecho esto, las muestras se guardaron a -20 °C.

Se inoculó 1 mL de emulsión a cada conejo de forma subcutánea y después de 15 días se repitió la operación, seguido de la toma de muestra de sangre a partir de la

oreja. Después de 15 días posteriores a la última inoculación, se realizó una toma de sangre, obteniendo el suero como se describió anteriormente.

### 10. Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE.

Las diferentes muestras a analizar, se separaron en geles de poliacrilamida al 12% y 15% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE/Laemmli), utilizando una cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell de Bio-Rad Laboratories Inc. La electroforesis se realizó en dos fases, las condiciones para la primera fase fueron de 45 Voltios (V) durante 20 minutos para alinear las muestras y las condiciones para la segunda fase fueron 110 V durante una hora con 40 minutos. Se utilizó la fuente de poder PowerPac Universal Power Supply de Bio-Rad Laboratories Inc.

### 11. Identificación de la proteína VirB3 mediante Western blot.

Para llevar a cabo la identificación de la proteína VirB3 recombinante y nativa, se realizó inmunotransferencia en membrana de difluoruro de polivideno (PVDF). A continuación, en el cuadro 2, se enlistan los anticuerpos utilizados, el antígeno y la finalidad por la que se realizó la inmunotransferencia.

**Cuadro 2. Descripción de anticuerpos y antígenos utilizados para Western blot.**

Anticuerpo 1	Anticuerpo 2	Antígeno	Finalidad	Figuras
Anticuerpos monoclonales contra etiqueta de histidinas.	Anticuerpos de cabra anti-ratón.	Proteína VirB3 recombinante.	Determinar que la proteína expresada es VirB3.	20.
Anticuerpos bovinos inmunizados con <i>A. marginale</i> .	Anticuerpos de cabra anti-IgG de bovino.	Proteína VirB3 recombinante y membranas de eritrocitos de bovino.	Determinar la presencia de IgG de bovino en contra de VirB3 recombinante.	22, 23 y 24.
Anticuerpos de conejos inmunizados con VirB3 recombinante y control negativo.	Anticuerpos de ratón anti- conejo.	Proteína VirB3 recombinante.	Determinar la presencia de anticuerpos de conejo en contra de VirB3 recombinante.	25, 26 y 27.
Anticuerpos de conejos inmunizados con VirB3 recombinante y control negativo.	Anticuerpos de ratón anti- conejo.	Cuerpos iniciales de <i>A. marginale</i> .	Determinar si los anticuerpos producidos por el conejo reconocen a la proteína nativa.	28.
Anticuerpos de bovino de tipo G2 comercial.	Anticuerpos de cabra anti-IgG2 de bovino, acoplado a fosfatasa alcalina.	Proteína VirB3, proteína SUMO purificada.	Determinar la presencia de IgG2 en contra de la proteína VirB3 nativa.	29.

Para realizar la inmunotransferencia, la membrana PVDF se humectó en metanol al 100% por 15 segundos y se lavó con agua miliQ por cinco minutos con agitación. A la par, se incubaron el gel y la membrana en buffer de transferencia 1x (25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 20 % de metanol, pH 8.3) por 15 y cinco minutos respectivamente. Se formó el sándwich colocando un papel filtro humedecido con buffer de transferencia 1x, la membrana, el gel y un segundo papel filtro, el cual se humedeció con buffer de transferencia 1x una vez que se formó el sándwich. Se realizó la transferencia por 75 minutos a 250 mA en condiciones semi-húmedas utilizando la cámara Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell de Bio-Rad Laboratories Inc y posteriormente, la membrana se bloqueó por una hora con TBS + 3% de Leche. Se realizaron tres lavados con TBS 1X + Tween 20 y a continuación, se adicionó el primer anticuerpo. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación horizontal, se realizaron tres lavados con TBS 1X + Tween 20 y se incubó por una hora a 37°C con el segundo anticuerpo. La membrana se lavó nuevamente tres veces con TBS 1X + Tween 20 y por último se reveló con BCIP/NBT.

## **12. Preparación de controles.**

### **12.1. Extracción de proteínas de membrana de eritrocitos.**

Una muestra con un volumen de 50 mL de sangre de un bovino normal se sedimentó por centrifugación a 3,200xg durante 20 minutos. El plasma y las células blancas se eliminaron y se agregó solución salina fisiológica 0.15 M, aforando al volumen original. Este paso se repitió dos veces más. Después del tercer lavado, el sobrenadante se desechó cuidando no tomar nada del sedimento ya que en dicha fracción se encuentran los eritrocitos. Se aforó al volumen original con solución de lisis la cual fue preparada con 0.83% de cloruro de amonio y Tris 0.01 M pH 7.5. La muestra se incubó por 15 minutos en baño de hielo y posteriormente se centrifugó a 3,200xg durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó y el botón celular se resuspendió en solución de lisis aforando hasta el volumen original. Este paso se repitió varias veces hasta que se eliminó la mayor cantidad de hemoglobina (el sedimento debe tener un color rosa pálido).

El sedimento se reconstituyó en solución salina de Puck (0.065 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 g de KCl, 0.75 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.77 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 g de NaCl, 1.45 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 5.5 g de glucosa) adicionada con PMSF 1 mM y gentamicina 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en una proporción de 1:3 estroma/solución Puck. El estroma se sonicó en volúmenes de no más de 10 mL en tubos de 50 mL de fondo cónico, en baño de hielo con un sonicador Fisher sonic Dis-membrator Model 300 a 50% de potencia sobre un baño de hielo por tres periodos de dos minutos con un minuto de descanso entre cada periodo de dos minutos. Al sonicado se le agregaron tres volúmenes más de solución Puck y se cuantificó proteína por el método de Bradford.

### **12.2. Extracción de cuerpos iniciales.**

Cuatro muestras con un volumen de 10 mL de Sangre infectada con *A. marginale*, contenida en tubos de fondo cónico de 50 mL, se mezclaron con solución salina de Puck suplementada con PMSF 1 mM y gentamicina 80 mg/mL en una proporción de 1:4 (glóbulos rojos infectados/Solución de Puck).

Las muestras se centrifugaron a 3,200xg durante 30 minutos para eliminar células blancas y núcleos de las mismas. El sobrenadante se colectó y centrifugó a 3,200xg durante 30 minutos en tubos Nalgene de policarbonato de 50 mL, conteniendo no más de 30 mL cada uno. El sobrenadante se desechó cuidando que no se tomara nada del sedimento y se aforó al volumen original con solución de Puck suplementada en cada ocasión. Se centrifugó nuevamente a 3,200xg durante 30 minutos y se repitió este procedimiento hasta que se eliminó la mayor cantidad de hemoglobina (el sedimento tenía un color rosa pálido).

Al sedimento se le agregó un volumen de solución salina de Puck suplementada y se sonicó en volúmenes de no más de 10 mL en tubos de 50 mL de fondo cónico, con un sonicador Fisher sonic Dis-membrator Model 300 a 50% de potencia, siempre sobre un baño de hielo, por tres periodos de dos minutos con un minuto de descanso entre cada periodo. Al sonicado se le agregaron dos volúmenes más de solución salina de Puck suplementada y se colocó nuevamente en tubos Nalgene para centrifugar a 3,200xg durante 15 minutos, con la finalidad de concentrar los cuerpos iniciales y eliminar parcialmente las membranas. El sobrenadante se eliminó y el botón

celular se refrigeró mientras se preparaba el gradiente de sacarosa. Para ello se preparó una solución de sacarosa al 60% en NaCl 0.15 M.

Se utilizó un formador de gradientes en el que se añadieron 15 mL de sacarosa al 60%, en el tubo que comunica hacia la salida, manteniendo siempre con agitación (se utilizó una barra magnética) y en el otro tubo se colocaron 15 mL de NaCl 0.15 M. Se colocó la manguera del formador de gradiente sobre un tubo Nalgene de policarbonato y se abrió rápidamente el pase de los tubos comunicantes para que se formara el gradiente. Una vez formado el gradiente, se añadió 1 mL de muestra y se centrifugó a 3,200xg durante 30 minutos.

Se colectaron los cuerpos iniciales con mucho cuidado, con ayuda de una micropipeta, tanto los que se encontraban en la parte de en medio del tubo, como los que se encontraban en la pared del mismo. Las muestras se colocaron en tubos limpios y se centrifugaron a 3,200xg durante 15 minutos. Se hicieron dos lavados más con solución de Puck y enseguida se hizo un frotis para observar que los cuerpos iniciales estuvieran limpios. Finalmente se cuantificaron proteínas totales mediante la técnica de Bradford, se repartieron en volúmenes de 200  $\mu$ L y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **12.3. Controles para la identificación de VirB3 recombinante.**

Se transformaron células competentes One Shot® BL21 DE3 con DNA plasmídico que contenía el vector pET SUMO religado y a su vez, se cultivaron células One Shot® BL21 DE3 sin transformar, únicamente realizando choque térmico. Los viales que contenían células transformadas con el vector religado y células sin transformar, se inocularon en 10 mL de medio LB con 50  $\mu$ g/mL kanamicina y 10 mL de medio sin antibiótico, respectivamente y se incubaron durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación de 250 rpm.

El pre cultivo se inoculó en medio LB líquido con una relación de 1:10, adicionando para las células con el vector no recombinante religado, 50  $\mu$ g/mL de kanamicina. Ambos cultivos se crecieron a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación de 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Posteriormente, se realizó la expresión con IPTG 1 mM y se tomaron muestras de 1.5 mL a las 0, 2, 4 y 6 horas después de la



inducción. Las muestras se centrifugaron a 13,000xg eliminando el sobrenadante y guardando el botón celular en congelación para su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida por SDS-PAGE.

## RESULTADOS

### **Análisis *in silico*.**

Para conocer las secuencias reportadas de la proteína VirB3 se hizo una revisión de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos publicadas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) del genoma publicado para la cepa St. Maries de *A. marginale*. Los resultados de la búsqueda mostraron que este gen consta de 297 nucleótidos y por lo tanto, la proteína putativa es de 98 aminoácidos.

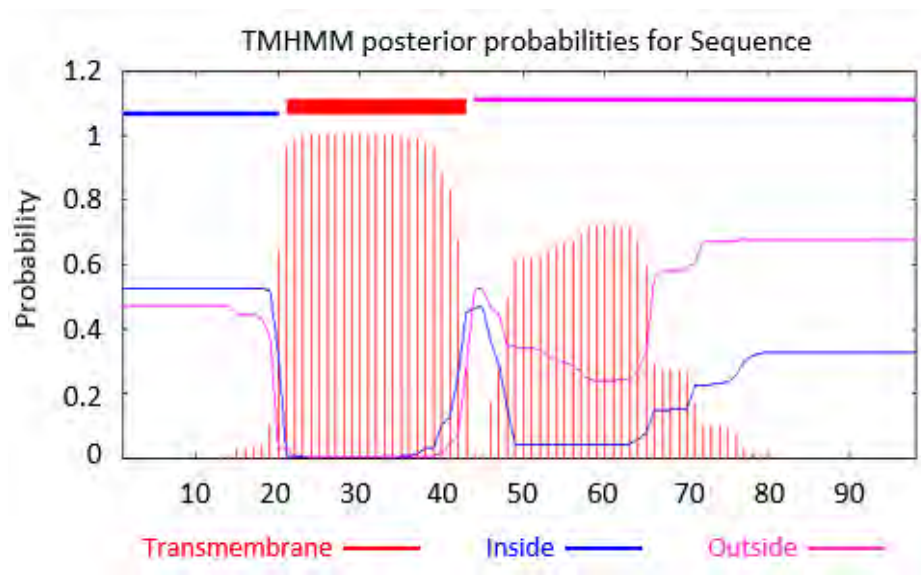
### **Secuencia de Nucleótidos, No. Acceso: AAV86742.1**

```
ATGTCGTCGGTAGCGTAAAGACGGATCAGCTGTTTTAAAGGGCTCACAAAGGCCACTATGCTTTTCGGTGTAAGCTATACATTTGCGATACTGAATTTTCATGATCTCTATCATGCTTTTCATGTACAGCAACGACTTTAGAGTGTTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCATCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAAATGCAAAAAGTGCAGCAAGTGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG
```

### **Secuencia de Aminoácidos, No. Acceso: AAV86742.1**

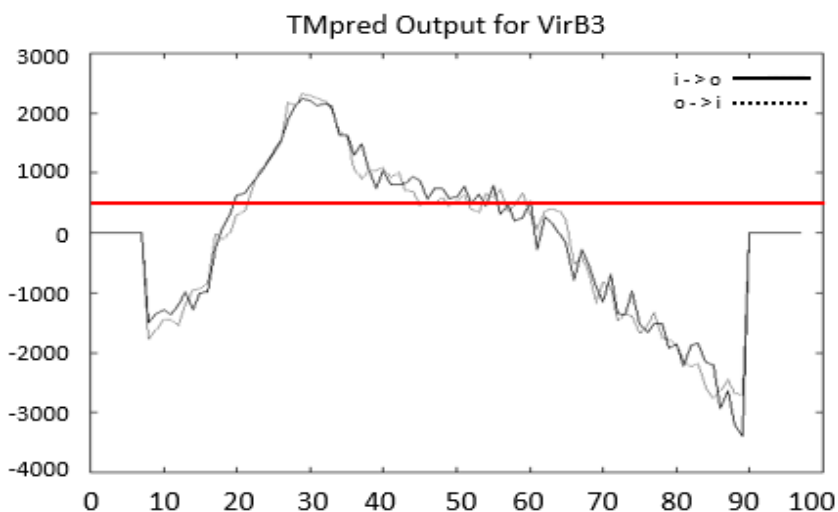
```
MSSGSVKTDQLFKGLTRPTMLFGVSYTFAILNFMISIMLFMYSNDFRVLVLLVLPGMHAIGFAASAKDPLFMDL  
FVIKMQKCSKCLNRFYHNANSYDVM-
```

Para determinar la potencial presencia en membrana de la proteína VirB3, se hizo un análisis bioinformático utilizando el programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Con este programa se encontró que existe una región citosólica que se localiza del aminoácido 1 al 20, un dominio transmembranal del aminoácido 21 al 43 y el resto de la proteína (del aminoácido 44 al 98) se encuentra en la región extracelular (Figura 5).



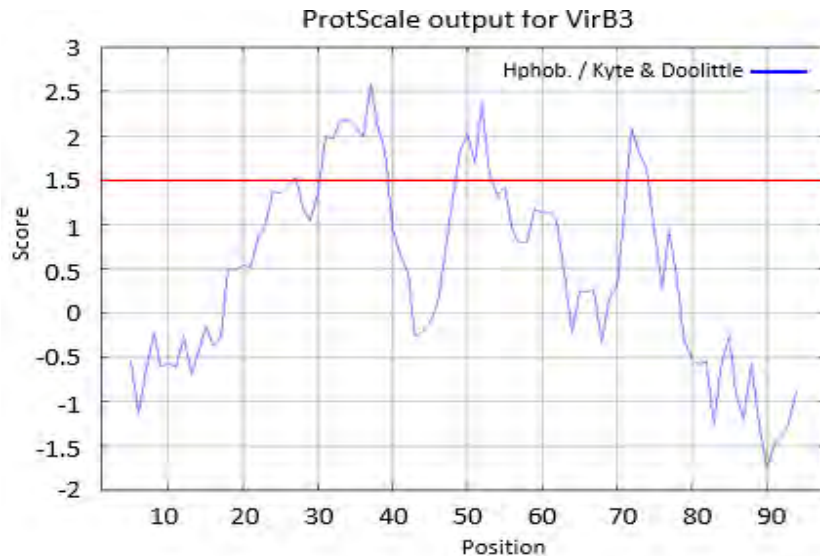
**Figura 5. Determinación de hélices transmembranales con el programa TMHMM.** El segmento en color azul muestra la región intracelular de la proteína (aminoácidos 1-20), el segmento en color rojo muestra la región transmembranal (aminoácido 21-44) y el segmento en color rosa muestra la región extracelular (aminoácido 45-98).

Para confirmar la presencia de regiones transmembranales en la proteína codificada por el gen *virB3* y hacer una comparación con el programa TMHMM, se utilizó el programa bioinformático Tmpred ([http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)). A partir de estos resultados se puede deducir que existe una región transmembranal que va del aminoácido 20 al 43 (Figura 6).



**Figura 6. Predicción de hélices transmembranales con el programa Tmpred.** La línea en color rojo divide la región externa de la región interna, basándose en la membrana celular. Sólo los puntajes por encima de 500, en el eje de las Y, son significativos.

Con ayuda del programa ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) se predijo el índice de hidrofobicidad, encontrándose tres regiones hidrofóbicas, una de las cuales coincide con los resultados de los programas TMHMM y Tmpred (Figura 7).



**Figura 7. Predicción de índice de hidrofobicidad con el programa ProtScale.** La línea en color rojo divide a la región hidrofóbica (parte superior) de la región hidrofílica (parte inferior). Los puntajes por encima de 1.5 son significativos.

La composición en aminoácidos del fragmento extracelular y de la proteína completa (cuadro 3) se determinó con el programa Recombinant Protein Solubility Prediction (<http://www.biotech.ou.edu/>), al igual que el porcentaje de solubilidad que muestra que la proteína completa tiene un 80.9% de insolubilidad y el fragmento extracelular un 76.6% (cuadro 4). El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) de la proteína se analizaron con el programa SMS2 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) y se obtuvo que la proteína predicha tiene un PM de 11.11 kDa y un pI de 9.57, en contraste, los análisis sólo para el fragmento extracelular mostraron un PM de 6.25 kDa y un pI de 8.76 (Cuadro 4).

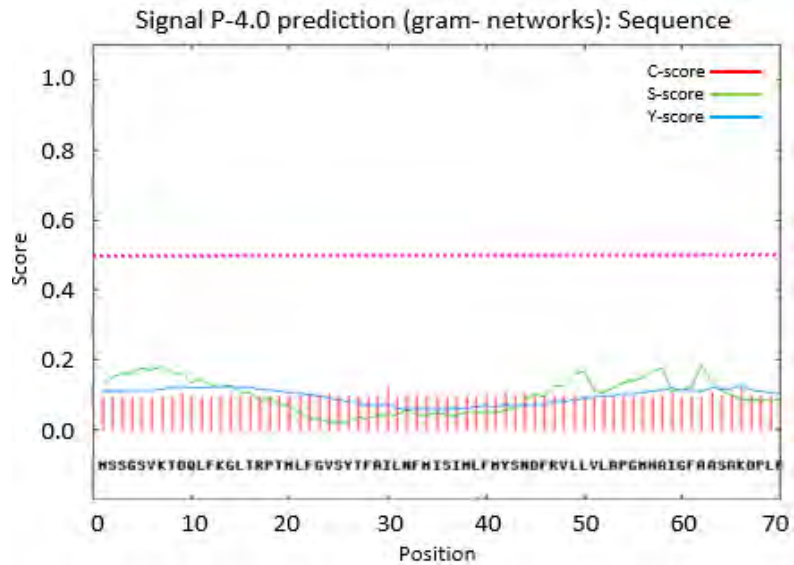
**Cuadro 3. Composición en aminoácidos de la proteína VirB3 de *A. marginale*.**

Aminoácido	Proteína completa	Fragmento extracelular
Alanina (A)	7	6
Arginina (R)	3	2
Aspartato (D)	5	4
Asparagina (N)	5	4
Cisteína (C)	2	2
Glutamina (Q)	2	1
Glicina (G)	5	2
Histidina (H)	2	2
Isoleucina (I)	5	2
Leucina (L)	11	6
Lisina (K)	6	4
Metionina (M)	9	4
Fenilalanina (F)	10	5
Prolina (P)	3	2
Serina (S)	9	3
Treonina (T)	4	0
Tirosina (Y)	4	2
Valina (V)	6	4

**Cuadro 4. Características de la secuencia completa de VirB3 y del fragmento extracelular.**

	Secuencia completa	Fragmento extracelular
<b>Peso molecular</b>	11.11 kDa	6.25 kDa
<b>Punto Isoeléctrico</b>	9.57	8.76
<b>Insolubilidad</b>	80.9%	76.6%

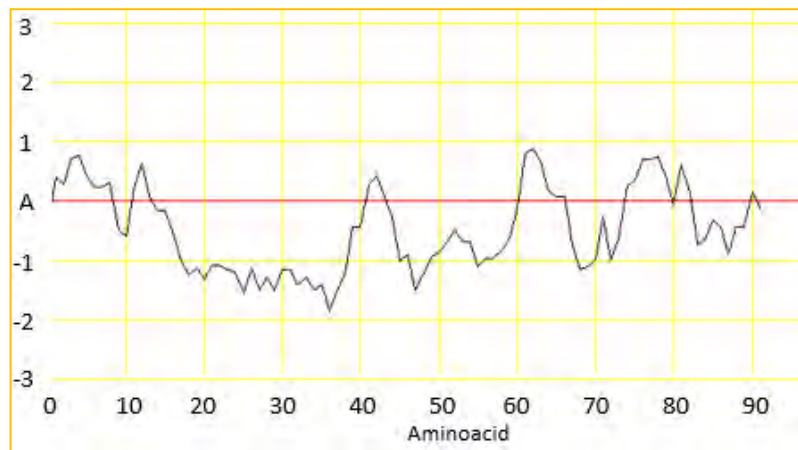
La presencia o ausencia del péptido líder, se evaluó mediante el programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A partir de este programa se predijo que dicho péptido se encuentra ausente en la secuencia que codifica para la proteína VirB3 (Figura 8).



**Figura 8. Péptido señal.** Las líneas verticales paralelas en rojo muestran si hay o no una significancia en la secuencia y la región en la que se presenta, la línea en color verde muestra un promedio de la secuencia marcando únicamente la región más relevante y la línea en color azul muestra una combinación entre las puntuaciones de la línea azul y las líneas rojas. Solo son significativas si sobrepasan la línea punteada en color rosa.

### Analisis *in silico* de antigenicidad

El índice antigénico de la proteína VirB3 se analizó con el programa Antigenicity Plot (<http://www.bioinformatics.org/jambw/3/1/7/>). Con este análisis se predijo la presencia de 6 posibles regiones antigénicas, hablando de la secuencia completa (Figura 9).



**Figura 9. Determinación del índice antigénico.** La gráfica muestra la variación del índice antigénico de la proteína VirB3 en función de la posición de aminoácido.

Los epítomos lineales de tipo B de la proteína se evaluaron con los programas BCEPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), teniendo como resultado para el primer programa mencionado que VirB3 presenta únicamente tres epítomos, considerando como relevantes solo a los epítomos presentes en la región extracelular (figura 10). El programa ABCPred predijo que la secuencia de VirB3 presenta cuatro epítomos y de la misma forma, solo son considerados relevantes aquellos epítomos que se encuentran en la región extracelular (Cuadro 5).

**Secuencia** MSSGSVKTDQLFKGLTRPTMLFGVSYTFAILNFMISIMLFMYSNDFRVLLVLAPGMHAIGFA  
ASAKDPLFMDLFLVIKMQKCSKCLNRFYHNANSYDVM

**Epítopo** MSSGSVKTDQLFKGLTRPTMLFGVSYTFAILNFMISIMLFMYSNDFRVLLVLAPGMHAIGFA  
ASAKDPLFMDLFLVIKMQKCSKCLNRFYHNANSYDVM

**Figura 10. Regiones inmunogénicas analizadas con el programa BCEPred.** Las regiones marcadas con color azul muestran la predicción de epítomos de tipo B. Las regiones marcadas con color rojo indican la región extramembranal de la proteína.

Cuadro 5. Secuencias inmunogénicas encontradas con el programa ABCPred.		
Epítopo	Posición de inicio	Score
SGSVKTDQLFKGLTRP	3	0.82
MISIMLFMYSNDFRVL	34	0.75
LAPGMHAIGFAASAKD	52	0.84
QKCSKCLNRFYHNANS	79	0.85

### Diseño de iniciadores.

El diseño de los iniciadores se realizó con ayuda del programa Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) y los resultados se muestran en el cuadro 6. Para su diseño se verificó que ambos cumplieran ciertas especificaciones importantes, las cuales se describen a continuación:

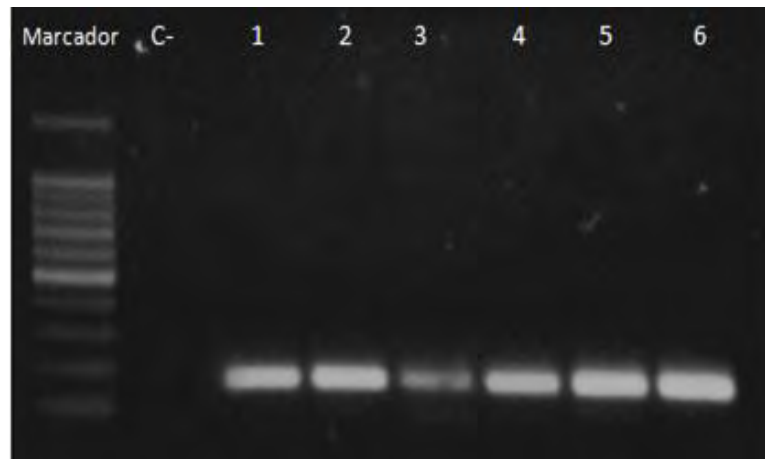
1. Cada iniciador individual debe contar con una longitud de 18-24 bases.
2. Se debe mantener un contenido de G:C entre 40 y 60 %.
3. El contenido de G:C de los iniciadores de la misma reacción debe ser similar.

4. Deben ser complementarios a las regiones deseadas, aunque admiten degeneraciones.
5. Las temperaturas de fusión de los iniciadores usados en la misma reacción deben ser similares, normalmente  $T_m > 58$ .
6. Es requisito que las secuencias de los iniciadores no formen horquillas internas ni sean complementarias entre sí.

Cuadro 6. Características de los iniciadores diseñados y sintetizados.		
Iniciador	Sentido	Antisentido
Secuencia 5'-3'	AAC GAC TTT AGA GTC TTG CTC	CTA CAT CAC ATC GTA AGA ATT GGC ATT G
Longitud	21 pb	28 pb
Contenido de GC	42.9%	39.3%
$T_m$	52.2°C	56.3°C
Horquillas	NO	NO
$\Delta G$	-2.3	-0.93

#### Extracción de DNA genómico.

La verificación del amplicón *virB3* en el DNA genómico de los aislados de *A. marginale*, se realizó por electroforesis en gel de agarosa. Los resultados muestran que el amplicón se encuentra presente en todos los aislados con un tamaño aproximado de 168 pb (Figura 11).



**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa del amplicón *virB3* a partir de DNA genómico de aislados mexicanos de *A. marginale*. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, en el segundo carril se encuentra el control negativo y a partir del tercer carril por numeración, las muestras se ubican de la siguiente forma: **1.** Aguascalientes, Ags.; **2.** Tlapacoyan, Ver.; **3.** Soto la Marina, Tamps.; **4.** Playa Vicente, Ver.; **5.** Yautepec, Mor.; **6.** Tizimín, Yuc.



### Análisis de secuencias.

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación de los diferentes aislados del gen *virB3* que codifican para la región extracelular de la proteína, no presentaron variaciones con respecto de la cepa St. Maries de *A. marginale*. En la figura 12 se muestra el alineamiento de todas las secuencias, en el que se observa que todas tienen un porcentaje de identidad del 100% con respecto de la cepa base. También se realizó un alineamiento utilizando el aislado de Aguascalientes (debido a que todas las secuencias resultaron idénticas) con respecto a cepas americanas para conocer qué tan conservado se mantenía el gen *virB3* en lo que corresponde a la región extracelular (figura 13).

```

StMaries          AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGGCTGCA 60
Aguascalientes_Ags AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGGCTGCA 60
Yautepec_Mor     AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGGCTGCA 60
SotoLaMarina_Tamps AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGGCTGCA 60
Tizimin_Yuc      AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGGCTGCA 60
PlayaVicente_Ver AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGGCTGCA 60
Tlapacoyan_Ver  AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGGCTGCA 60
*****

StMaries          TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAAGTGCAGCAAG 120
Aguascalientes_Ags TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAAGTGCAGCAAG 120
Yautepec_Mor     TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAAGTGCAGCAAG 120
SotoLaMarina_Tamps TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAAGTGCAGCAAG 120
Tizimin_Yuc      TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAAGTGCAGCAAG 120
PlayaVicente_Ver TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAAGTGCAGCAAG 120
Tlapacoyan_Ver  TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAAGTGCAGCAAG 120
*****

StMaries          TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
Aguascalientes_Ags TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
Yautepec_Mor     TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
SotoLaMarina_Tamps TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
Tizimin_Yuc      TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
PlayaVicente_Ver TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
Tlapacoyan_Ver  TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
*****

```

**Figura 12. Alineamiento de las secuencias consenso del gen *virB3*.** Las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación del gen *virB3*, se alinearon con el programa ClustalW tomando como referencia a la cepa St. Maries de *A. marginale*.

```

Aguascalientes      AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA 60
StrFlorida          AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA 60
StrPuertoRico      AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA 60
StrVirginia         AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA 60
StrMississippi     AACGACTTTAGAGTGTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA 60
*****

Aguascalientes      TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG 120
StrFlorida          TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG 120
StrPuertoRico      TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG 120
StrVirginia         TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG 120
StrMississippi     TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG 120
*****

Aguascalientes      TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
StrFlorida          TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
StrPuertoRico      TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
StrVirginia         TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
StrMississippi     TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG 168
*****

```

**Figura 13. Alineamiento de las secuencias de cepas americanas.** Se realizó el alineamiento entre cepas diferentes de *A. marginale* y la secuencia consenso de Aguascalientes obtenida.

### Ligación y transformación.

Con los amplicones de *virB3* obtenidos a partir de la PCR se procedió a realizar la ligación en el vector de expresión pET SUMO, para posteriormente transformar células competentes One Shot® BL21 DE3. Se secuenciaron tres clonas del aislado de Aguascalientes, Ags. A partir de las cuales se obtuvo la secuencia consenso para compararla con la cepa de referencia, con la finalidad de saber si la secuencia insertada correspondía a la región extracelular de la proteína codificada por el gen *virB3*. En la figura 14 se muestra el alineamiento de las secuencias. Además se verificó que el amplicón estuviera insertado en la dirección correcta en el vector y para ello se realizó una PCR utilizando una combinación de iniciadores que se describe al pie de la figura 15. Los amplicones con orientación correcta son los de las clonas 2, 3, 5, 7 y 9, según este experimento.

```

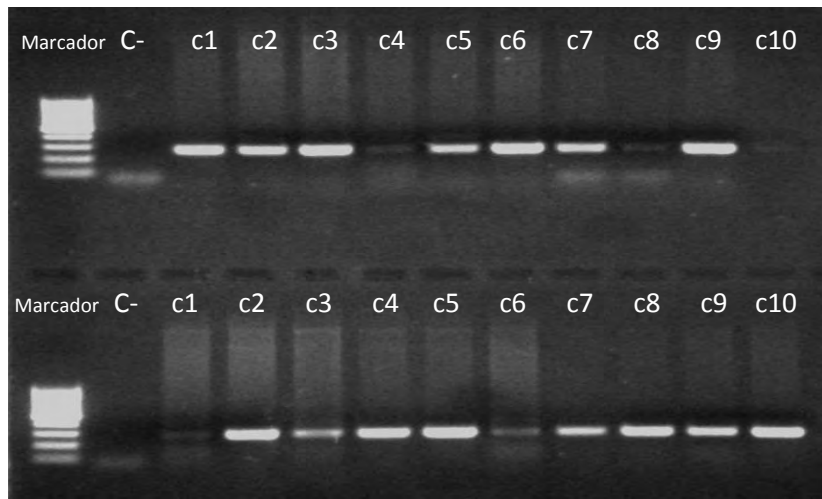
StMaries      AACGACTTTAGAGTGTTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA
Clona1        AACGACTTTAGAGTGTTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA
Clona2        AACGACTTTAGAGTGTTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA
Clona3        AACGACTTTAGAGTGTTGCTCGTTCTGGCCCCGGGCATGCACGCCATAGGCTTCGCTGCA
*****

StMaries      TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG
Clona1        TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG
Clona2        TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG
Clona3        TCTGCGAAAGACCCGTTGTTTCATGGATCTGTTTGTTCATCAAAATGCAAAAGTGCAGCAAG
*****

StMaries      TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG
Clona1        TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG
Clona2        TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG
Clona3        TGTCTTAATCGTTTCTATCACAATGCCAATTCTTACGATGTGATGTAG
*****

```

**Figura 14. Alineamiento de las secuencias consenso obtenidas de DNA plasmídico.** Las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación de DNA plasmídico, se alinearon con el programa ClustalW tomando como referencia a la cepa St. Maries de *A. marginale*.

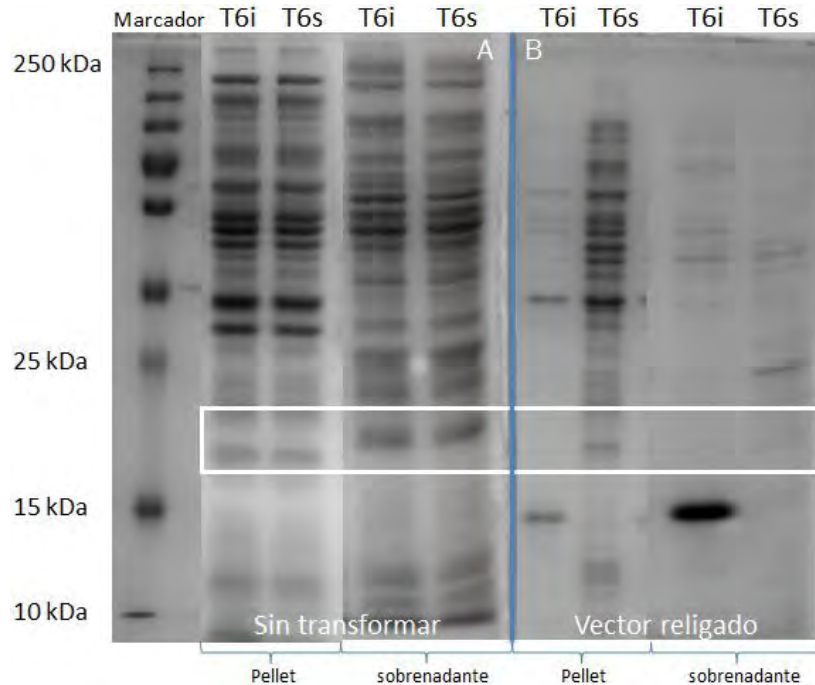


**Figura 15. Verificación de la inserción correcta del amplicón en el vector de expresión.** Las muestras ubicadas en la parte de arriba son amplicones que se obtuvieron usando el iniciador sentido del inserto y el iniciador antisentido del vector en la PCR. Las muestras ubicadas en la parte de abajo son los amplicones que se obtuvieron usando el iniciador sentido del vector y el iniciador antisentido del inserto en la PCR. En el primer carril se encuentra el marcador, en el segundo carril se encuentra el control negativo y del carril 3 al 12, las clonas marcadas de la 1 a la 10 como c1-c10.

### Expresión de la proteína.

Los controles negativos se realizaron utilizando células One Shot® BL21 DE3 sin transformar y células One Shot® BL21 DE3 transformadas con el vector no recombinante religado. Para ambos casos se indujo la expresión de proteínas con IPTG

1mM durante 6 horas. De esta forma, en la figura 16, se demuestra que la proteína expresada en posteriores experimentos es rVirB3 y no algún otro componente proteómico del vector o de *E.coli*.

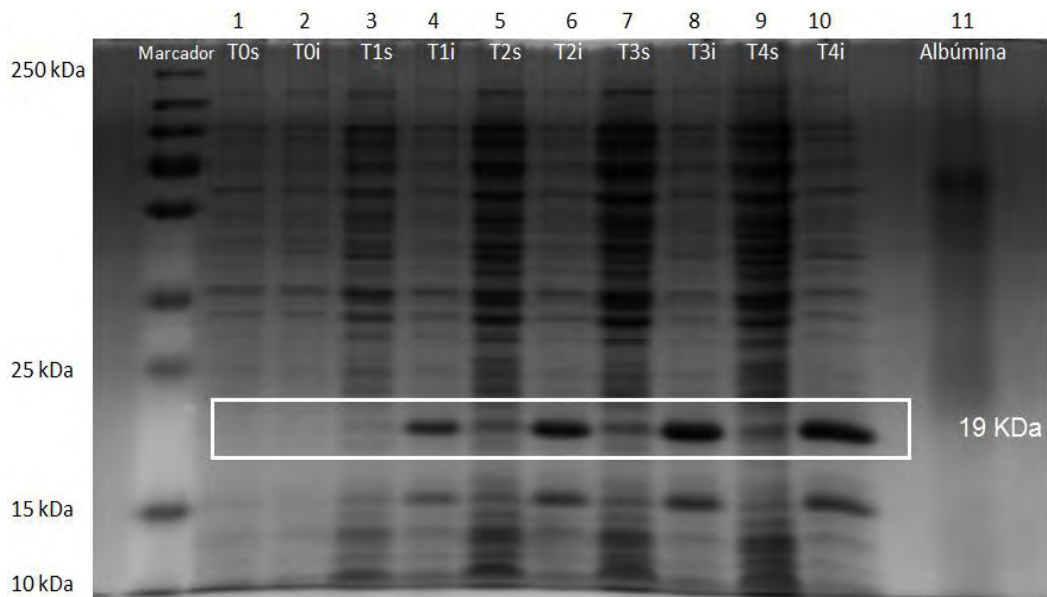


**Figura 16. Controles negativos.** El recuadro blanco indica el tamaño en el que debería ubicarse la proteína recombinante VirB3. **A)** Expresión de células sin transformar. **B)** Expresión de células transformadas con el vector no recombinante religado. T6= Tiempo de expresión después de 6 horas, i= Inducido con IPTG y s= Sin inducir.

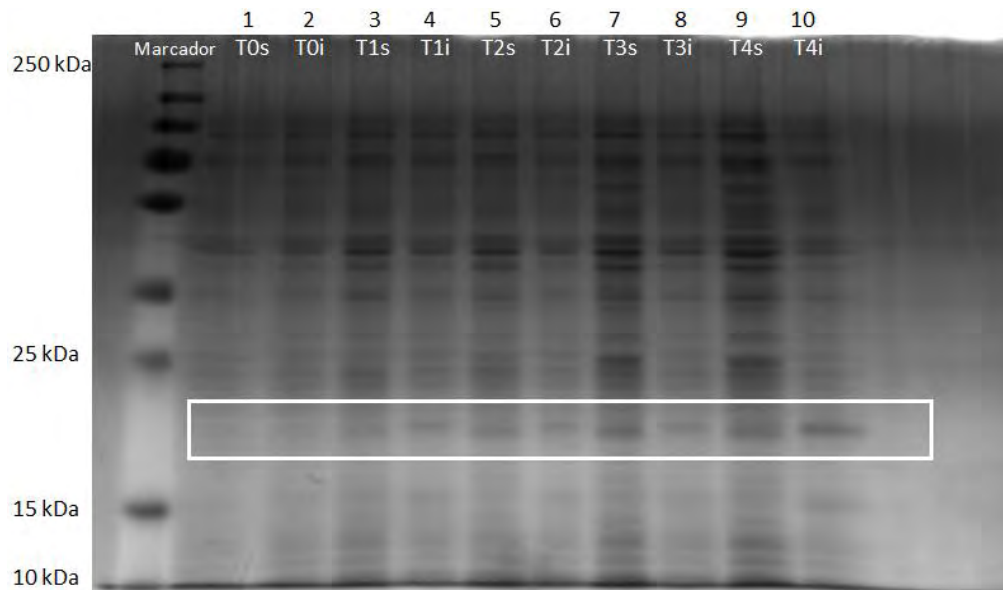
Posterior a la expresión de la proteína VirB3, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida por SDS-PAGE para conocer si la proteína realmente se estaba expresando. Como se puede observar en la figura 17, que corresponde al botón celular, la proteína comenzó a expresarse a partir de la primera hora después de la inducción y continuó expresándose en mayor cantidad con respecto al tiempo, por lo que no fue necesario llevar a cabo la inducción a más de cuatro horas.

La región seleccionada del gen *virB3* con la que se trabajó, codifica para una proteína de 6.25 kDa, sin embargo, la proteína recombinante presenta un tamaño aproximado de 19 kDa debido a que se añaden 12 kDa correspondientes a la proteína de fusión Modificadora Pequeña Relacionada a la Ubiquitina (SUMO, por sus siglas en inglés) y 0.8 kDa de la etiqueta de histidinas. Se realizó a su vez, una electroforesis SDS-PAGE con el sobrenadante obtenido después de la lisis (figura 18), sin embargo,

la proteína parece ser que la proteína no se localizó en dicha muestra, o que se expresó en un nivel muy bajo.



**Figura 17. Expresión de la proteína VirB3 recombinante en células BL21-botón celular.** En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, del carril 1 al 10 (por numeración) se encuentran los precipitados de las muestras que se expresaron, inducidas con IPTG y no inducidas. La expresión de la proteína se remarca con un cuadro blanco. En carril 11 se encuentra albúmina como control positivo. T= Tiempo de expresión, i= Inducido con IPTG y s= Sin inducir.

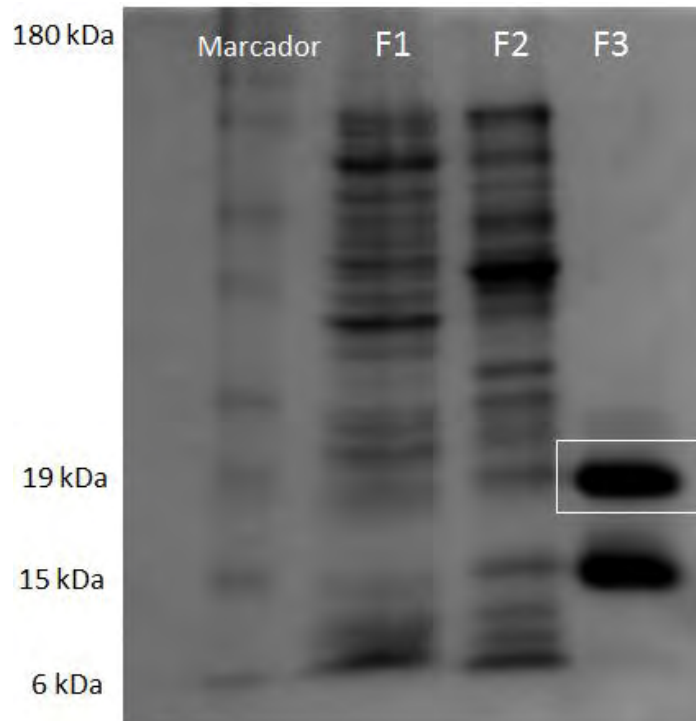


**Figura 18. Expresión de la proteína VirB3 en células BL21-Sobrenadante.** En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, del carril 1 al 10 (por numeración) se encuentra el sobrenadante de las muestras que se expresaron, inducidas con IPTG y no inducidas. El recuadro blanco muestra el lugar en que debería estar la proteína. T= Tiempo de expresión, i= Inducido con IPTG y s= Sin inducir.

### Purificación de la proteína.

La proteína VirB3 recombinante (rVirB3) se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel, debido a que el vector pET SUMO añade una etiqueta de 6 histidinas en el extremo amino, las cuales presentan afinidad por éste elemento.

Se utilizaron buffers de urea 8 M con distintos pH (8, 6.3 y 4.5) para eluir la muestra en diferentes fracciones. Posteriormente, se comprobó mediante un gel de poliacrilamida en cual fracción se encontraba la proteína VirB3 recombinante. El gel de poliacrilamida referido como figura 19, muestra las fracciones obtenidas, en la cual se puede observar claramente que VirB3 recombinante se encuentra en la fracción 3 (recuadro blanco), que corresponde a la elución con el buffer de urea 8 M, pH 4.5.

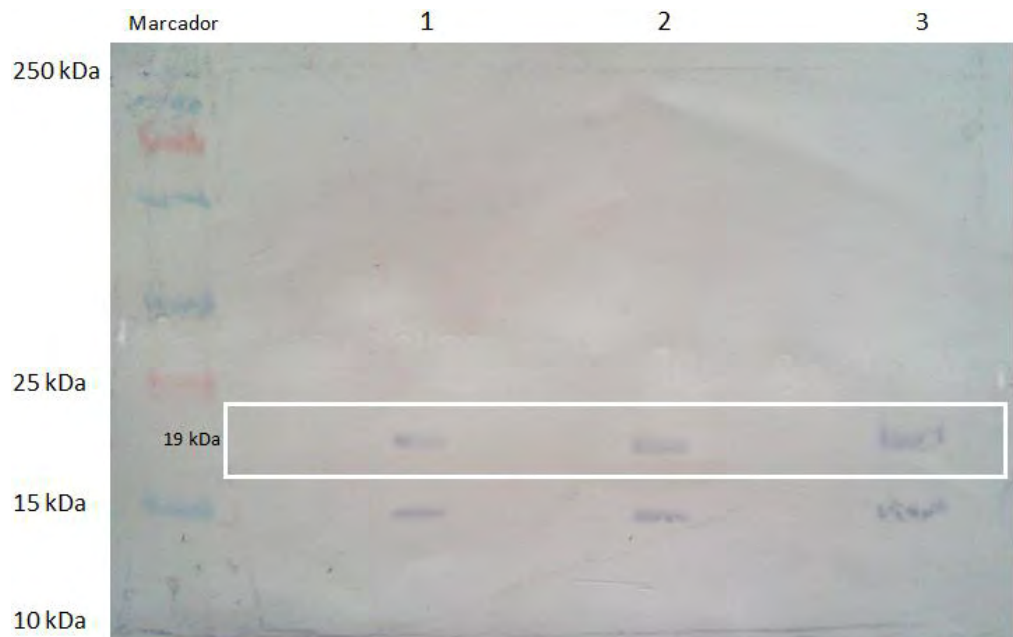


**Figura 19. Proteína purificada.** F1= Fracción 1, elución con buffer de urea 8 M, pH 8; F2= Fracción 2, elución con buffer de urea 8 M, pH 6.3; F3= Fracción 3, elución con buffer de urea 8 M, pH 4.5.

### Identificación de la proteína VirB3 mediante Western blot.

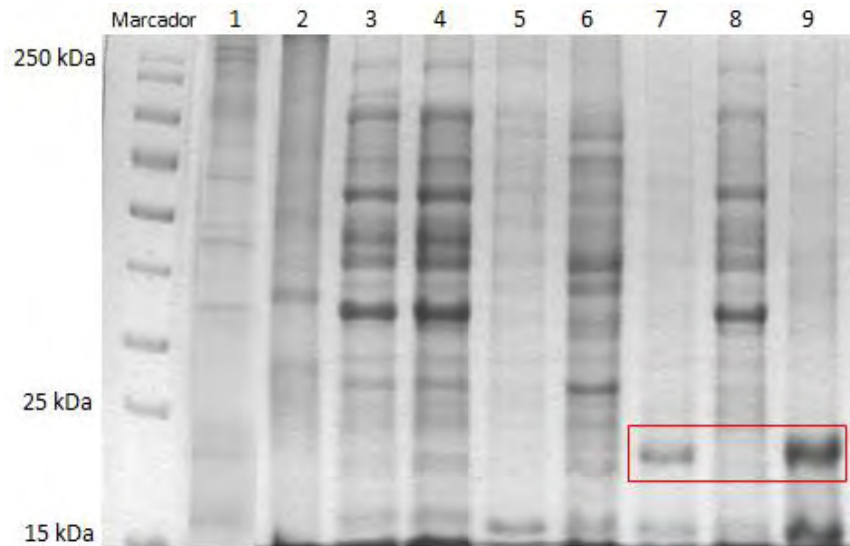
La figura 20 muestra el resultado de un Western blot en el que se utilizó el anticuerpo anti-histidinas Anti-His Tag Purified (dilución 1:5000), esto para comprobar que la proteína expresada y purificada es realmente VirB3. Como resultado se obtuvo

que las muestras expresadas fueran reconocidas por el anticuerpo Anti-His Tag Purified, indicadas con el recuadro blanco.



**Figura 20. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3, reconocida por un anticuerpo anti-histidinas.** En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, en los carriles 1 y 2 (por numeración) se encuentran las muestras después de la tercera y cuarta hora de inducción respectivamente, y en el último carril se encuentra la proteína purificada.

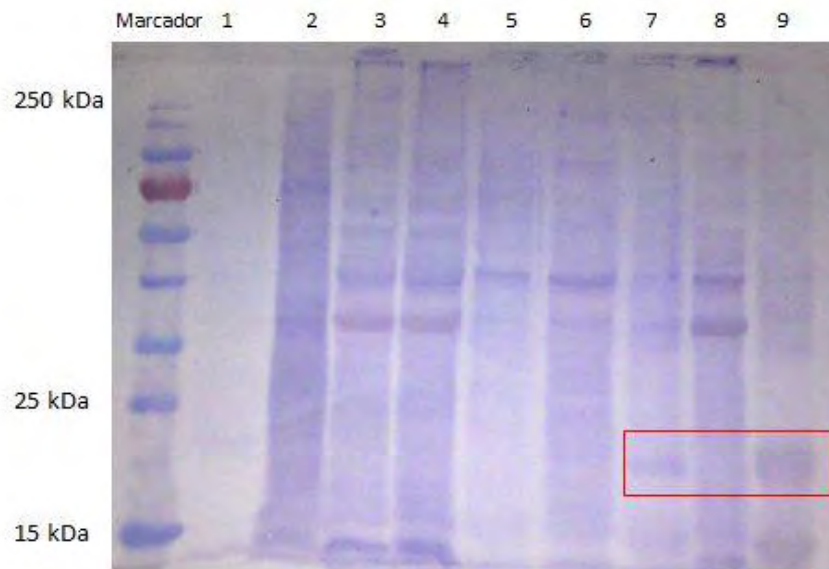
En la figura 21 se muestra un gel de poliacrilamida en el cual se cargaron los controles negativos de la proteína VirB3, incluidas las proteínas de membrana de los eritrocitos de un bovino sano (carril 1) y los cuerpos iniciales de *A. marginale* (carril 2). Se puede deducir, por lo tanto, que la proteína expresada (recuadro rojo, carriles 7 y 9) es VirB3 recombinante debido a que, en ninguna de las muestras control se observa una banda con un tamaño similar a ésta.



**Figura 21. Identificación de la proteína recombinante VirB3 en comparación con sus controles negativos, mediante electroforesis SDS-PAGE. 1.** Proteínas de membrana de eritrocitos; **2.** Cuerpos iniciales de *A. marginale*; **3.** *E. coli* sin transformar, después de inducir la expresión con IPTG; **4.** *E. coli* sin transformar, sin inducir la expresión; **5.** *E. coli* transformada con el vector no recombinante religado, después de inducir la expresión con IPTG; **6.** *E. coli* transformada con el vector no recombinante religado, sin inducir la expresión; **7.** *E. coli* transformada con el gen *virB3*, después de inducir la expresión con IPTG; **8.** *E. coli* transformada con el gen *virB3*, sin inducir la expresión; **9.** Proteína VirB3 purificada.

Con el fin de saber si la proteína recombinante es reconocida por anticuerpos presentes en el suero de bovinos protegidos contra la anaplasmosis bovina, se realizaron tres inmunotransferencias de geles de poliacrilamida que contenían las mismas muestras y en el mismo orden que el gel correspondiente a la figura 21; cada inmunotransferencia se expuso a un suero de bovino infectado con *A. marginale*, utilizando una dilución de anticuerpo 1:5000. La figura 22 corresponde a un Western blot probado contra el suero del bovino 135, inoculado con la cepa de Aguascalientes Ags. (Mex-01-001-01), la figura 23 corresponde a un Western blot probado contra el suero del bovino 027, inoculado con la cepa de Tlapacoyan, Ver. (Mex-30-184-03) y la figura 24 corresponde a un Western blot probado contra el suero del bovino 4388, infectado de manera natural.

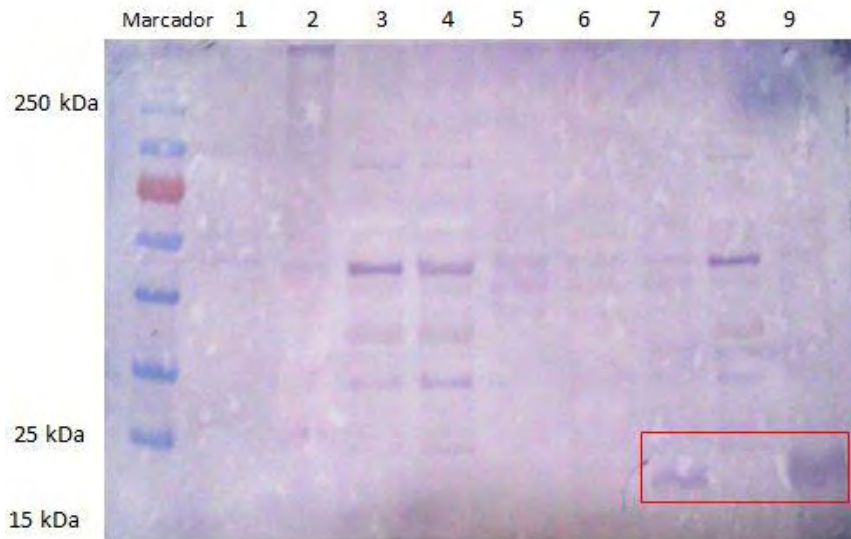




**Figura 22. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3 y sus controles negativos para la detección de anticuerpos presentes en suero del bovino 135 infectado con *A. marginale*.** 1. Proteínas de membrana de eritrocitos; 2. Cuerpos iniciales de *A. marginale*; 3. *E. coli* sin transformar, después de inducir la expresión con IPTG; 4. *E. coli* sin transformar, sin inducir la expresión; 5. *E. coli* transformada con el vector no recombinante religado, después de inducir la expresión con IPTG; 6. *E. coli* transformada con el vector no recombinante religado, sin inducir la expresión; 7. *E. coli* transformada con el gen *virB3*, después de inducir la expresión con IPTG; 8. *E. coli* transformada con el gen *virB3*, sin inducir la expresión; 9. Proteína VirB3 purificada.

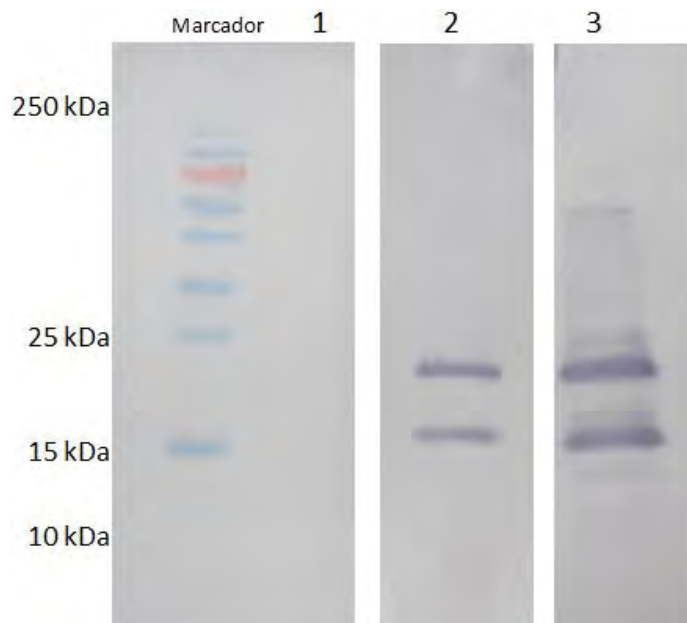


**Figura 23. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3 y sus controles negativos para la detección de anticuerpos presentes en suero del bovino 027 infectado con *A. marginale*.** 1. Proteínas de membrana de eritrocitos; 2. Cuerpos iniciales de *A. marginale*; 3. *E. coli* sin transformar, después de inducir la expresión con IPTG; 4. *E. coli* sin transformar, sin inducir la expresión; 5. *E. coli* transformada con el vector no recombinante religado, después de inducir la expresión con IPTG; 6. *E. coli* transformada con el vector no recombinante religado, sin inducir la expresión; 7. *E. coli* transformada con el gen *virB3*, después de inducir la expresión con IPTG; 8. *E. coli* transformada con el gen *virB3*, sin inducir la expresión; 9. Proteína VirB3 purificada.

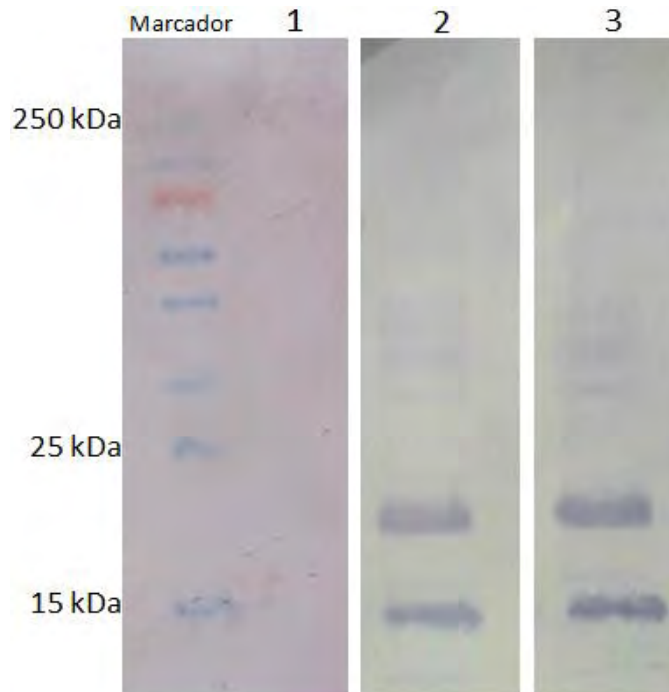


**Figura 24. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3 y sus controles negativos para la detección de anticuerpos presentes en suero del bovino 4338 infectado con *A. marginale*.** 1. Proteínas de membrana de eritrocitos; 2. Cuerpos iniciales de *A. marginale*; 3. *E. coli* sin transformar, después de inducir la expresión con IPTG; 4. *E. coli* sin transformar, sin inducir la expresión; 5. *E. coli* transformada con el vector no recombinante religado, después de inducir la expresión con IPTG; 6. *E. coli* transformada con el vector no recombinante religado, sin inducir la expresión; 7. *E. coli* transformada con el gen *virB3*, después de inducir la expresión con IPTG; 8. *E. coli* transformada con el gen *virB3*, sin inducir la expresión; 9. Proteína VirB3 purificada.

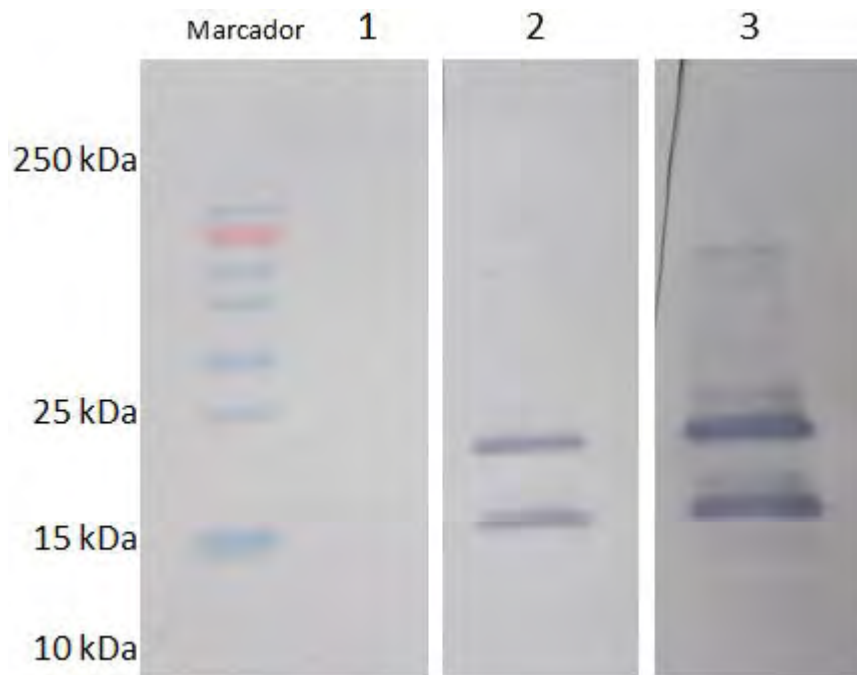
Se inocularon tres conejos con la proteína rVirB3, identificados como 1, 2 y 3, para posteriormente obtener el suero de estos conejos antes y después de las inoculaciones. La proteína rVirB3 se transfirió a la membrana de nitrocelulosa para realizar un Western blot utilizando dichos sueros con una dilución 1:5000. Los resultados obtenidos muestran que los tres conejos produjeron anticuerpos en contra de la proteína rVirB3, como se puede observar en las figuras 25, 26 y 27. A su vez, se realizó una inmunotransferencia a partir de un gel de acrilamida en el que se incluyeron la proteína pET SUMO purificada, la proteína rVirB3 purificada y los cuerpos iniciales de *A. marginale* del aislado Mex-17-030-01; sin embargo, no hubo reconocimiento de la proteína VirB3 nativa por parte de los anticuerpos presentes en suero de conejo, aún con una dilución del suero de 1:100 (Figura 28, línea 3, panel B).



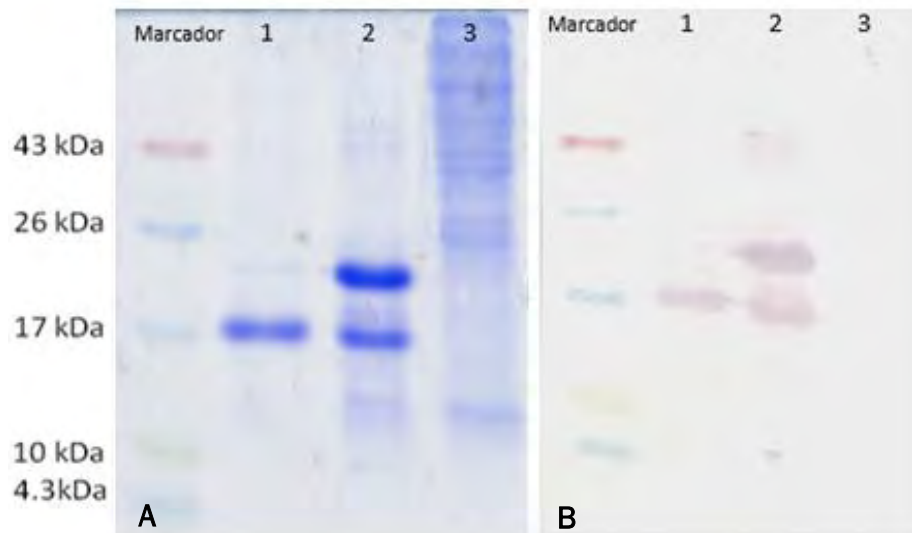
**Figura 25. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3, reconocida por anticuerpos presentes en el suero del conejo 1.** En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular. Por numeración, el carril 1 corresponde al suero de conejo pre-inmunización y los carriles 2 y 3 corresponden a los sueros de conejo después de la primera y segunda inmunización, respectivamente.



**Figura 26. . Inmunotransferencia de la proteína rVirB3, reconocida por anticuerpos presentes en el suero del conejo 2.** En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular. Por numeración, el carril 1 corresponde al suero de conejo pre-inmunización y los carriles 2 y 3 corresponden a los sueros de conejo después de la primera y segunda inmunización, respectivamente.

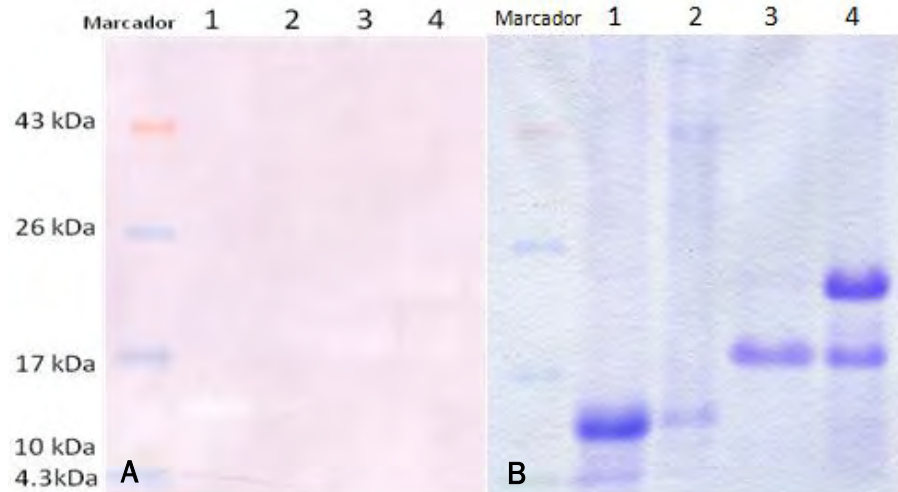


**Figura 27. Inmunotransferencia de la proteína rVirB3, reconocida por anticuerpos presentes en el suero del conejo 3.** En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular. Por numeración, el carril 1 corresponde al suero de conejo pre-inmunización y los carriles 2 y 3 corresponden a los sueros de conejo después de la primera y segunda inmunización, respectivamente.



**Figura 28. Reconocimiento de la proteína nativa por anticuerpos de conejo mediante la técnica de inmunotransferencia.** A) Gel de poliacrilamida al 15% B) Inmunotransferencia. En ambas imágenes el primer carril corresponde al marcador de peso molecular, a partir del segundo carril, por numeración, las muestras se ubican en el siguiente orden: **1.** Proteína pET SUMO purificada, **2.** proteína VirB3 purificada, **3.** Cuerpos iniciales de *A. marginale* del aislado Mex-17-030-01.

Por otra parte, con la finalidad de comprobar que en el suero de bovinos inmunizados con *A. marginale* existía la presencia de anticuerpos de tipo G2 que fueran capaces de reconocer a la proteína rVirB3 y a la proteína nativa, se realizó un Western blot (Figura 29) en el que se incluyeron las membranas de eritrocitos de bovino como control negativo (Línea 1), los cuerpos iniciales de la bacteria para localizar a la proteína nativa (línea 2), la proteína de fusión SUMO para confirmar que no haya presencia de anticuerpos en contra de esta proteína (línea 3) y finalmente, la proteína rVirB3 (línea 4). Sin embargo no hubo reconocimiento por parte de IgG2 tanto de la de la proteína recombinante como de la proteína nativa (Figura 29).



**Figura 29. Determinación de la presencia de IgG2 en contra de la proteína VirB3 nativa y rVirB3 mediante de la técnica de inmunotransferencia. A) Inmunotransferencia. B) Gel de poliacrilamida al 15%. En ambas imágenes el primer carril corresponde al marcador de peso molecular, a partir del segundo carril, por numeración, las muestras se ubican en el siguiente orden: 1. Membranas de eritrocitos, 2. Cuerpos iniciales, 3. SUMO purificada, 4. VirB3 purificada.**

## DISCUSIÓN

Los estudios sobre potenciales candidatos vacunales en *A. marginale* se han enfocado en las proteínas de membrana (Junior *et al.*, 2010). Dentro este grupo de proteínas se han caracterizado componentes del complejo principal de superficie (MSP). Sin embargo, algunas de estas proteínas son altamente variables entre aislados y no se han podido usar como inmunógenos (Palmer *et al.*, 1984). Estudios más recientes han identificado otras proteínas de superficie incluyendo las que componen el sistema de secreción tipo IV. Este conjunto de proteínas está relacionado con el sistema de conjugación en las bacterias gram negativas y ha sido descrito en una variedad de bacterias capaces de infectar una gran cantidad de hospederos tales como plantas y animales, siendo su función principal transportar macromoléculas a través de la membrana de manera ATP-dependiente (Lockwood *et al.*, 2011; Junior *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2016). Este sistema en las bacterias tiene una relevancia vital que se deduce por su naturaleza altamente conservada, por lo que sus proteínas se han convertido en blancos vacunales importantes y significativos (Lopez *et al.*, 2007).

En el presente trabajo el gen *virB3* fue analizado de manera *in silico* y posteriormente clonado y expresado en un sistema heterólogo con la finalidad de determinar su potencial inmunogénico, el grado de variabilidad genética que presenta y la presencia en membrana de la proteína codificada. Los análisis bioinformáticos indicaron que la secuencia codificada por el gen *virB3* llenó de manera preliminar los requisitos para ser usada como candidato vacunal, incluyendo posible exposición o ubicación en la membrana externa de la rickettsia y presencia de epítomos tipo B. Para el presente trabajo se tomó únicamente la secuencia que codifica para la región extracelular (aminoácidos 45 a 98, figura 5).

Con los iniciadores que se diseñaron con base en el fragmento extracelular se amplificaron los fragmentos de 6 cepas mexicanas. Tanto las secuencias de nucleótidos como las de aminoácidos derivadas mostraron 100% de identidad entre ellas y la cepa St. Maries, por lo que se presenta a esta proteína como un excelente candidato vacunal, considerando la gran variabilidad y diversidad reportada para un gran número de proteínas de superficie de esta rickettsia (figuras 12 y 13).

Anteriormente, en un estudio llevado a cabo por Junior *et al.*, (2010), se comparó el grado de variabilidad de los aminoácidos de diferentes genes que codifican para proteínas de membrana aislados de una cepa brasileña, entre ellos el gen *virB3*. Los resultados mostraron que *virB3* presenta un 100% de homología comparado con la cepa Brasil, las cepas St. Maries, y Florida de Estados Unidos, y, en un 96% de homología con *A. marginale* subespecie *centrale*. Esto indica que VirB3 podría ser un potencial blanco ante el sistema inmune del bovino, así como para promover protección cruzada (Junior *et al.*, 2010).

Es importante notar que VirB3, en organismos como *Brucella abortus*, tiene acción moduladora en la actividad de otras proteínas y presenta un efecto estabilizador en la estructura del sistema de secreción (den Hartigh *et al.*, 2008; Chandran y Waksman, 2015). En general, VirB3 en conjunto con el resto de las proteínas que conforman el SST4, cumplen un papel importante en la invasión y patogénesis de la bacteria (Lockwood *et al.*, 2011).

La expresión de algunas proteínas del SST4, tales como VirB9-1 y 2 y VirB10 de *A. marginale*, se ha llevado a cabo de manera exitosa, además han demostrado ser inmunogénicas debido a que activan linfocitos TCD4+, inducen la producción de IFN- $\gamma$  y la producción de inmunoglobulinas tipo G<sub>2</sub>, asociados a una respuesta inmune protectora (Lopez *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2016); sin embargo, hasta el momento no se han encontrado reportes que indiquen que el gen *virB3* de *A. marginale* haya sido expresado por lo que su función real es desconocida, aun cuando se conoce su alto grado de conservación.

En este trabajo, la expresión del gen *virB3* se llevó a cabo en el vector Champion™ pET SUMO como cuerpos de inclusión. Este vector también fue utilizado para expresar *virB9-2* debido a que se ha demostrado que tiene un alto nivel de expresión y aumenta la solubilidad de las proteínas, además de que hace posible la generación de la proteína recombinante sola gracias a la enzima SUMO proteasa, que remueve a SUMO del extremo N-terminal de la proteína recombinante (Malakhov *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2016).

La comparación de las muestras que contenían la secuencia insertada al vector, con los controles hechos a partir de la cepa DE3 de *E. coli* sin transformar y transformada con el vector no recombinante religado, permitió demostrar la expresión de *virB3* y además, la proteína pudo ser identificada por Western blot mediante el uso de un anticuerpo anti-histidinas (figura 20). Sin embargo, no fue posible obtener a la proteína recombinante sola ya que a pesar de estar unida a SUMO, se presentó como precipitados y por lo tanto fue necesario utilizar diferentes buffers de urea y guanidina en la metodología de purificación con la finalidad de aumentar su solubilidad. Dicha metodología dificultó la separación de ambas proteínas debido a que se conoce que algunas proteínas que llevan a cabo la remoción de ubiquitinas, como lo es la SUMO proteasa, resultan ser enzimas inestables bajo condiciones caotrópicas, por lo que las altas concentraciones de urea pudieron afectar la actividad de la enzima y por lo tanto su uso no resultó eficiente para separar a SUMO de la rVirB3 (Malakhov *et al.*, 2004).

La secuencia para la región extracelular codifica para una proteína de 6.25 kDa pero tomando en cuenta el tamaño de la proteína de fusión SUMO y la etiqueta de histidinas, el tamaño aproximado es de 19 kDa (figura 17). Al analizar la proteína en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y Western blot puede observarse también una segunda banda con un tamaño aproximado de 13 kDa. Esta banda corresponde a la proteína de fusión SUMO y se identifica por inmunodetección debido a que contiene la etiqueta de histidinas en su extremo amino. Algunos trabajos han reportado que es común que las proteínas recombinantes sean degradadas durante la expresión por proteólisis debido a la inestabilidad que presentan, por esta razón se obtiene como producto a la proteína de fusión por sí sola, que resulta ser más estable que la proteína de interés aun cuando se han utilizado inhibidores de proteasas (Guan *et al.*, 1988; Lopez *et al.*, 2007).

El método utilizado para llevar a cabo la purificación de la proteína fue cromatografía de afinidad. Ésta se basa en la interacción específica y reversible que presentan los residuos de histidinas añadidas por el vector con el níquel que se encuentra inmovilizado en un soporte sólido (Amersham Pharmacia Biotech, 2001). Por ende, las proteínas que no contenían la etiqueta de histidinas, fueron eliminadas



mediante lavados con buffers desnaturalizantes a distintos pH, debido a que la carga de las proteínas cambia dependiendo al pH al que se encuentran, lo que hace que se eluyan en diferentes fracciones. La proteína VirB3 con un PI de 8.76, fue localizada en la fracción número tres al ser eluída con un buffer a pH 4.5. Las proteínas, dependiendo de su punto isoeléctrico, se desprenden de la columna de níquel a pH ácido, que también tiene carga positiva (Porath *et al.*, 1983).

La secuencia de aminoácidos del gen *virB3* mostró tres epítomos relevantes de tipo B. La proteína recombinante unida a SUMO (rVirB3-SUMO) fue reconocida por anticuerpos de tres bovinos inmunoprotegidos contra la anaplasmosis, dos de ellos inmunizados con aislados mexicanos de la bacteria y el restante, infectado de manera natural. Cabe mencionar que tras la inoculación de rVirB3-SUMO, a tres conejos, se obtuvieron anticuerpos que reconocieron a la construcción. Ambos resultados conducen a pensar que VirB3 es una proteína antigénica que podría fungir como inmunógeno. Sin embargo, debido a que la proteína recombinante no se generó sola, es difícil asegurar que la respuesta producida se encuentre dirigida hacia rVirB3 y no hacia SUMO, puesto que los anticuerpos producidos por los conejos reconocieron a la proteína SUMO purificada (figura 28).

Es interesante que en ensayos de inmunoblot usando IgG<sub>2</sub> purificada de bovino, no hubiera reconocimiento de rVirB3 pero tampoco de SUMO purificada (Figura 29). Esto es contrario a lo esperado debido a que se ha demostrado que la respuesta inmune protectora que desencadena un bovino requiere de inmunoglobulinas de tipo G<sub>2</sub> (Barigye *et al.*, 2004) y aunque a primera impresión podrían indicar que no es inmunogénica, no podemos descartar que VirB3 pueda estar involucrada en la respuesta inmune protectora, por otro lado, tampoco podemos descartar que VirB3 pudiera ser usada para la inmunización de bovinos, considerando que aun cuando de manera natural no induzca una respuesta inmunoprotectora, de manera artificial si se pueda generar protección.

El último objetivo de la tesis fue verificar la ubicación de VirB3 como proteína de membrana, objetivo que no se pudo cumplir debido a que los conejos inmunizados con rVirB3-SUMO no generaron anticuerpos contra la proteína nativa. Estos anticuerpos

eran requeridos para llevar a cabo un ensayo de inmunofluorescencia, pero una vez más la proteína de fusión SUMO afectó de manera negativa y no permitió que se llevara a cabo la metodología planeada, por lo que se sugiere utilizar otros vectores de expresión que permitan la obtención de la proteína recombinante sola. Una opción podría ser el uso del vector de expresión pDEST™17, que utiliza la tecnología de recombinación a través del uso de un vector de entrada y un vector destino para producir a la proteína de interés, sin añadir una proteína de fusión (Katzen, 2007). De esta forma se podrían concluir los experimentos pendientes y se podría conocer cuál es realmente el papel inmunológico que cumple rVirB3.

## CONCLUSIÓN

La secuencia del gen *virB3* codifica para una proteína presuntamente localizada en la membrana externa que forma parte del SST4 y que presenta nula variabilidad entre aislados mexicanos y algunas cepas americanas, por lo que se considera una proteína de importancia vital para la bacteria. Además, la secuencia del gen que codifica para la región extracelular de la proteína, fue expresada unida a la proteína de fusión SUMO y se demostró que esta construcción (rVirB3-SUMO) es reconocida por anticuerpos de bovinos inmunoprotegidos en contra de la anaplasmosis bovina.

## REFERENCIAS

1. Amersham Pharmacia Biotech. Affinity chromatography principles and methods. Handbooks from Amersham Pharmacia Biotech. 2001: 156pp.
2. Aubry P, Geale DW. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 2011; 58(1):1-30.
3. Aubry P, Paré J. Sensitivity and specificity of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay relative to quantitative reverse transcriptase PCR for detection of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(8):28-38.
4. Barigye R, García OM, Rojas EE, Rodríguez SD. Identification of IgG2 specific antigens in three Mexican *Anaplasma marginale* strains. *Téc Pecu Méx.* 2004; 42(2):219-236.
5. Brayton KA. Tick transmission of *Anaplasma marginale*. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2012; 3(1):41-50.
6. Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP Jr. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(3): 844-9.
7. Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH. CD4(+) T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect Immun.* 1998; 66(11):5406-13.
8. Brown WC. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 35:241–252.
9. Chandran DV, Waksman G. Structural biology of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Biochem.* 2015; 84:603-29.
10. Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, Cronin N, Navaza J, Waksman G. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature.* 2009; 462:1011-1015.

11. Corona B, Rodríguez M, Martínez S. *Anaplasmosis bovina*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVE - ISSN 1695-7504. 2004; 6(4):27 pág.
12. Corrier DE, Johnson JS, Wagner GG. Demonstration of vaccine-induced immunity to anaplasmosis without induction of persistent postvaccinal complement-fixing and agglutinating antibodies in yearling steers. *Am J Vet Res*. 1985; 46(3):583-586.
13. Dark MJ, Al-Khedery B, Barbet AF. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine*. 2011; 29(31):4923-4932.
14. de la Fuente J, Ayoubi P, Blouin EF, Almazán C, Naranjo V, Kocan KM. Anaplasmosis, focusing on host-vector-pathogen interactions for vaccine development. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2006; 1078: 416-423.
15. de la Fuente J, García JC, Blouin FE, Rodríguez SD, García-Ortíz MA, Kocan KM. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Animal Health Research Reviews*. 2001; 2(2):163-173
16. de la Fuente J, García JC, Blouin FE, Saliki TJ, Kocan MK. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular Ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9(3):658-668.
17. Den Hartigh AB, Rolán HG, de Jong MF, Tsolis RM. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *Journal of bacteriology*. 2008; 190(13): 4427-4436.
18. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with *Anaplasma*, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of

- Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. JSEM. 2001; 51:2145–2165.
- 19.FAO. Tendencias en la producción bovina. 2009. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/eeb/tendencia.htm>.
  - 20.Futse JE, Ueti MW, Knowles DP Jr, Palmer GH. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(8):3829-34. Erratum in: J. Clin. Microbiol. 2003 Nov; 41(11):5354.
  - 21.García Ortiz MA, Angeles Ojeda LE, Hernández Salgado G, García Tapia D, Aboytes Torres R, Rodríguez Camarillo S D. Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. Tec. Pecu. Mex. 1998; 36(3); 197-202.
  - 22.García Ortiz-MA, Aboytes TR, Hernández SG, Cantó AJG, Rodríguez SD. *Anaplasma marginale*: Diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos. Veterinaria México 2000; 31(2); 157-160.
  - 23.GOLD Genomes Online Databases. Information of *Anaplasma marginale* St Maries. 2011. Disponible en <http://genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/bin/GOLDCards.cgi?goldstamp=Gi09544>.
  - 24.González PB, Dreyfus G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico. 2003; 27:45-63.
  - 25.Günter Blobel. Protein Targeting (Nobel Lecture). ChemBioChem. 2000; 1(2):86-102.
  - 26.Jiménez Ocampo R, Vega y Murguía CA, Oviedo Ortega Nayelli, Rojas Ramírez EE, García Ortiz MA, Preciado de la Torre JF, Rosario Cruz R, Domínguez García, D, Rodríguez SD. Diversidad genética de la región variable de los genes *msp1a* y *msp4* en cepas de *Anaplasma marginale* de México. Rev Mex Cienc Pecu. 2012; 3(3):373-387.
  - 27.Junior DSG, Araújo FR, Almeida NF, Adi SS, Cheung LM, Fragoso SP, Ramos ACN, de Oliveira RHM, Santos SS, Bacanelli G, Soares CO, Grácia MS, Fonseca

- AH. Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2010; 105(7):843-849.
28. Katzen F. Gateway recombinational cloning: a biological operating system. Expert Opin Drug Discov. 2007; 4:571-589.
29. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborn BA. Inmunología de Kuby, sexta edición. Mc Graw Hill. 2010; 697pp.
30. Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Melendez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(4):698-712. Review.
31. Kuttler KL. Comparative response to premunization using attenuated *Anaplasma marginale* virulent *A. marginale* and *A. centrale* in different age groups. Trop Anim Health Prod. 1972; 4(4):197-203.
32. Lee TV, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. Genes Dev. 2001; 15:1725-1752.
33. Lockwood S, Voth DE, Brayton KA, Beare PA, Brown WC, Heinzen RA, Broschat SL. Identification of *Anaplasma marginale* Type IV secretion system effector proteins. PLoS ONE. 2011; 6(11):e27724.
34. Lopez JE, Siems WF, Palmer GH, Brayton KA, McGuire TC, Norimine J, Brown WC. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. Infection and immunity. Dec. 2005; 73(12):8109-8118.
35. Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. Journal of Structural and Functional Genomics. 2004; 5:75-86.
36. Marchler-Bauer A. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. Nucleic Acids Res. 2011; 41:384-52.
37. Mazzola V, Amerault TE, Roby TO. Survival of *Anaplasma marginale* in *Aedes albopictus* cells. Am J Vet Res. 1976; 37(8):987-9.

38. Mossey P, Hudacek A, Das A. *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *J Bacteriol.* 2010; 192(11):2830-2838.
39. Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, Goodman JL. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *ELSEVIER, Veterinary Microbiology.* 2004; 101:53-64
40. Ocampo Espinoza V, Salazar Vázquez JE, Durán Aguilar M, García Ortiz MA, Cantó Alarcón GJ, Rodríguez SD. *Anaplasma marginale*: Lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. *Veterinary Microbiology,* 2006; 114(1-2):34-40.
41. Orozco-Vega LE, Rodríguez SD, Alarcón GJ, Flores RL, Ocampo RJ, Ortiz MA, de la Torre JF, Ramírez EE. *Anaplasma marginale* field challenge: protection by an inactivated immunogen that shares partial sequence of msp1alpha variable region with the challenge strain. *Vaccine.* 2007; 25(3):519-25.
42. Osorno MB, Solana PM, Perez JM, Lopez TR. Study of an attenuated *Anaplasma marginale* vaccine in Mexico natural challenge of immunity in an enzootic area. *Am J Vet Res.* 1975; 36(5):631-633.
43. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. *Inmunología de Kuby, séptima edición.* Mc Graw Hill. 2014; 692pp.
44. Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes and Infection.* 2000; 2:167-176.
45. Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today.* 1999; 15:281-286.
46. Palmer GH. Sir Arnold Theiler and the discovery of anaplasmosis: a centennial perspective. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2009; 76:75-79.
47. Parham P. *The immune system.* Buenos Aires: Médica Panamericana. 2006.
48. Pipano E. Live vaccines against hemoparasitic diseases in livestock. *Vet Parasitol.* 1995 Mar; 57(1-3):213-31.



49. Reinbold JB, Coetzee JF, Hollis LC, Nickell JS, Riegel C, Olson KC, Ganta RR. The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infection. *Vet Microbiol.* 2010; 145(1-2):69-75.
50. Rodríguez Camarillo SD, García Ortiz MA, Rojas REE, Cantó AGJ, Preciado de la Torre JF, Cruz RR, Ramos AJA, Aboytes TR. *Anaplasma marginale* Yucatán (México) Strain: assessment of low virulence and potential use as a live vaccine. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1149:98-102.
51. Rodríguez SD, García Ortiz MA, Hernández Salgado G, Santos Cerda NA, Aboytes Torre R, Cantó Alarcón GJ. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2000 Oct; 23(4):239-52.
52. Rodríguez SD, García-Ortiz MA, Jiménez-Ocampo RJ, Vega y Murguía CA. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in México. *Infect Genet Evol.* 2009; 9(6):1092-1101.
53. Rodríguez SD, García-Ortiz MA, Torres RA, Alarcón J, Barigye R. Inmunología e inmunoprofilaxis de la *anaplasmosis bovina*. *Ciencia Veterinaria.* 2003; 9(4).
54. Rodríguez SD, Gracia-Ortiz MA, Jiménez-Ocampo RJ, Vega y Murguía CA. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in México. *InfectGenetEvol.* 2009; 9(6):1092-1101.
55. Rymaszewska A, Grenda S. Bacteria of the genus *Anaplasma*: characteristics of *Anaplasma* and their vectors. *Veterinarni Medicina,* 2008; 53(11):573–584.
56. Scoles GA, Bronze AB, Lysyk TJ, Palmer GH. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* 2005; 42(4):668-675.
57. Scoles GA, Miller JA, Foil AD. Comparison of the efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* stiles (Acari: Ixodidae) with mechanical transmission by

- the horse fly, *Tabanus fuscicostatus* hine (Diptera: Muscidae). J. Med. Entomol. 2008; 45(1): 109-114.
58. Scoles GA, Ueti MW, Noh SM, Knowles DP, Palmer AH. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among Dermacentor and Rhipicephalus ticks (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 2007; 44(3):484-491.
59. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Programa de carne y leche de bovino. Bovino y sus derivados. 2014.
60. Seubert A, Rappuoli R, Covacci A. Type IV secretion. Microbiology, Nature. 2004. 13(12):1pp.
61. Shamaei-Tousi, Cahill R, Frankel G. Interaction between protein subunits of the type IV secretion system of *Bartonella henselae*. J. Bacteriol. 2004; 186(14):4796-4801.
62. Simpson CF, Neal FC, Edds GT. Gamma irradiation of *Anaplasma marginale*. AmJVet Res. 1964; 25:1771-2.
63. Singh H, Jyoti, Haque M, Singh NK, Rath SS. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. Ticks and Tick-borne Diseases. 2012; 3(1):55-58.
64. Suarez CE, Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. Vet Parasitol. 2011 Aug 4; 180(1-2):109-25.
65. Zechner EL, Lang S, Schildbach JF. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. Phil. Trans. R. Soc. B. 2012; 367:1073-1087.
66. Zhao L, Mahony D, Cavallaro AS, Zhang B, Zhang J, Deringer JR. Immunogenicity of Outer Membrane Proteins VirB9-1 and VirB9-2, a novel nanovaccine against *Anaplasma marginale*. PLoS ONE. 2016 Apr 26; 11(4): e0154295.