



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología

### NOMBRE DEL TRABAJO

“Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales contra epítomos conservados del antígeno RAP-1 de *Babesia bovis* implicado en la invasión a eritrocitos”

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciado en Microbiología

#### Presenta:

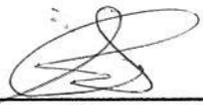
José Daniel Aguilar Loa

#### Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

### SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Firma

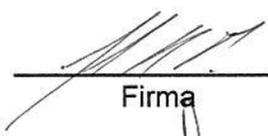
Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Biol. Yolanda Medina Flores  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Firma

M. C. Diego Josimar Hernández Silva  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
01/10/2018  
México



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



**NOMBRE DEL TRABAJO**

“Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales contra epítopos conservados del antígeno RAP-1 de *Babesia bovis* implicado en la invasión a eritrocitos”

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciado en Microbiología

**Presenta:**

José Daniel Aguilar Loa

**Dirigido por:**

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
01/10/2018  
**México**



“Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales contra epítomos conservados del antígeno RAP-1 de *Babesia bovis* implicado en la invasión a eritrocitos”

## RESUMEN

La Babesiosis bovina es una enfermedad parasitaria del ganado bovino generada por *B. bovis* y *B. bigemina* principalmente, que causa pérdidas económicas significativas al afectar a más del 65% del ganado bovino en México. A la fecha, el diagnóstico rápido por serología utiliza anticuerpos monoclonales poco específicos, por lo que su identificación se realiza por microscopía de campo claro al encontrar parásitos intraeritrocíticos en forma de pera. No obstante, varias proteínas de *Babesia* involucradas en el proceso de invasión al eritrocito han sido investigadas como blanco terapéutico y de diagnóstico, tal como la proteína asociada a roptrias (RAP-1) de *B. bovis* que proviene de dos genes idénticos con repeticiones en tándem y secuencias con homología entre distintas cepas geográficas. El antígeno RAP-1 fue utilizado como base en trabajos previos para la generación de un péptido sintético (RAP1-P3BBOV) con una secuencia de aminoácidos conservada entre las distintas cepas de *B. bovis* reportadas a nivel mundial. Dicho péptido se utilizó en el presente trabajo para la inmunización de ratones de la cepa *BABL/c* de donde se consiguió un animal que generó títulos de anticuerpos anti- RAP1-P3BBOV superiores al punto de corte del control negativo a una dilución 1:4000. A partir de ello, se realizó la fusión celular con el bazo de dicho ratón y posteriormente la selección bioquímica y evaluación de los hibridomas por ELISA indirecto, de donde resultó un total de tres líneas clonales distintas con un total de 29 sub-clonas que fueron congeladas y 50 sub-sub-clonas, de las que 12 se utilizaron para la identificación de la especificidad contra la proteína nativa RAP-1 de *B. bovis*, obteniendo dos de ellas con resultados positivos.



## SUMMARY

Bovine Babesiosis is a parasitic disease of bovine cattle generated by *B. bovis* and *B. bigemina* mainly, which causes significant economic losses by affecting more than 65% of cattle in Mexico. To date, the rapid diagnosis by serology uses nonspecific monoclonal antibodies, which are identified by light field microscopy when it finds pear-shaped intraerythrocytic parasites. However, several *Babesia* proteins involved in the process of invasion to the erythrocyte have been investigated as a therapeutic and diagnostic target, such as the roptries associated proteins (RAP-1) of *B. bovis* that comes from two identical genes with repetitions in tandem and sequences with homology between different geographical strains. The RAP-1 antigen was used as a basis in previous works for the generation of a synthetic peptide (RAP1-P3BBOV) with an amino acid sequence conserved among the different strains of *B. bovis* worldwide reported. This peptide was used in the present work for the immunization of mice of strain *BABL/c* from which an animal was obtained that generated titers of antibodies anti-RAP1-P3BBOV higher than the cut-off point of the negative control at a 1:4000 dilution. From this, cell fusion was performed with the spleen of the mouse and subsequently the biochemical selection and evaluation of the hybridomas by indirect ELISA, from which resulted a total of three different clonal lines with a total of 29 sub-clones that were frozen and 50 sub-sub-clones, of which 12 were used for the identification of specificity against the native protein RAP-1 of *B. bovis*, obtaining two of them with positive results.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



## **DEDICATORIAS**

El presente trabajo está dedicado para mi madre y hermano quienes sacrificaron parte de sus vidas para apoyarme incondicionalmente desde el inicio hasta el final, pues en mi pusieron su esfuerzo, dedicación y tiempo, ya que me brindaron el sustento económico y emocional requerido para culminar con este objetivo de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por proporcionarme las instalaciones académicas a lo largo de mi carrera como Lic. en Microbiología.

A mi director de tesis el Dr. Juan Mosqueda por haberme permitido trabajar en su línea de investigación y compartirme su conocimiento del área, además de su tiempo de trabajo y su tiempo libre, por instruirme y guiarme durante este proceso, además de brindarme su apoyo y comprenderme cuando lo necesitaba.

A mi asesora la Biol. Yolanda Medina Flores por haberme aceptado en su Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del InDRE y enseñarme, capacitarme y proporcionarme de su experiencia en todos los procesos que conlleva la generación de anticuerpos monoclonales, así como también por apoyarme durante mi estancia en la CDMX.

A mi asesor el M. C. Diego Josimar Hernández Silva por haberme instruido en todas las metodologías y técnicas realizadas durante mi estancia en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas y compartirme de su tiempo, material y conocimientos para mejorar mi eficiencia en el laboratorio.

A mi asesora la Dra. Angelina Rodríguez Torres quien me instruyó durante el proceso de caracterización de anticuerpos monoclonales, compartió protocolos y literatura y tiempo que me ayudaron a obtener resultados en esta parte del trabajo.

A mi asesora la Dra. Andrea Margarita Olvera Martínez de quien aprendí aspectos académicos muy relevantes en mi carrera y con quien llevo una excelente relación alumno-profesor.

A todos mis profesores por compartirnos sus conocimientos y siempre estar dispuestos a resolvernos dudas e instruirnos.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



A mi madre y hermano por brindarme su afecto y confianza y siempre darme sus mejores consejos.

A mi compañera Gabriela Ramírez Gudiño quien me apoyó dándome confianza cuando más la necesitaba durante este proceso.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas que me compartieron sus experiencias, materiales y reactivos y permitieron un buen ambiente de trabajo.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales quienes siempre estuvieron apoyándome, tanto académicamente como de manera personal para que pudiera culminar con mi proceso de titulación.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
DEDICATORIAS .....	4
AGRADECIMIENTOS .....	4
CONTENIDO .....	6
ÍNDICE DE CUADROS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
INTRODUCCIÓN .....	10
ANTECEDENTES.....	12
Babesiosis.....	12
Epidemiología de la babesiosis en México.....	13
Impacto económico.....	14
Taxonomía de <i>Babesia sp.</i> .....	15
Estructura celular del merozoito de <i>Babesia sp.</i> .....	15
Ciclo de vida de <i>Babesia bovis</i> .....	16
Mecanismos y proteínas involucradas en el proceso de invasión de <i>B. bovis</i> al eritrocito.....	17
Diagnóstico de la babesiosis bovina e importancia de los anticuerpos para su detección.....	18
Función y estructura de los anticuerpos.....	19
Generación de anticuerpos por la activación de linfocitos B específicos de antígenos.....	20
Historia y bases de la producción de anticuerpos.....	22
Tecnología en producción de anticuerpos monoclonales.....	23



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Estrategia experimental.....	26
1.- Cepa de ratón .....	28
2.- Péptido de Rap-1 de <i>B. bovis</i> .....	28
3.- Esquema de inmunización y toma de suero .....	28
4.- Evaluación de la respuesta inmune.....	30
5.- Fusión celular.....	30
5.1.- Preparación de células de mieloma de ratón línea X63Ag8.653 (Ag8).....	30
5.2.- Preparación de células de bazo del ratón <i>BALB/C</i> con mayor título de anticuerpos anti- RAP1-P3BBOV.....	31
5.3.- Fusión de las células de mieloma X63Ag8.653 y las células del bazo .....	32
6.- Selección bioquímica.....	32
7.- Evaluación de los hibridomas.....	33
8.- Selección de hibridomas positivos anti-RAP1-P3BBOV.....	34
9.- Clonación celular.....	34
10.- Isotipificación de los anticuerpos monoclonales .....	35
11.- Proliferación <i>in vitro</i> .....	36
12.- Obtención de sobrenadante de cultivo de clonas celulares.....	36
13.- Purificación de anticuerpos.....	36
14.- Cuantificación de anticuerpos monoclonales.....	37
15.- Identificación del antígeno nativo rap-1 por Western blot (WB).....	37



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



15.1.- Extracción de proteínas totales de <i>Babesia bovis</i> .....	37
15.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y electrotransferencia.....	38
15.3.- Incubación de anticuerpos.....	38
RESULTADOS.....	40
Evaluación de la respuesta inmune de los ratones inmunizados con el péptido RAP1-P3BBOV....	40
Selección Bioquímica.....	42
Evaluación de hibridomas.....	44
Isotipificación de anticuerpos monoclonales.....	47
Cuantificación de anticuerpos monoclonales.....	48
Identificación del antígeno nativo Rap-1 de <i>Babesia bovis</i> por Western blot (WB).....	48
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIÓN.....	55
LITERATURA CITADA.....	56
ANEXOS.....	61

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Esquema de sangrado.....	29
Cuadro 2: Esquema de inmunización .....	29
Cuadro 3: Esquema de selección bioquímica .....	33
Cuadro 4: Diluciones de BSA para método Bradford .....	37
Cuadro 5: Esquema de clonación de hibridomas .....	46
Cuadro 6: Concentración de anticuerpos monoclonales anti-RAP1-P3BBOV .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Evaluación de la respuesta inmune del suero preinmunización de cinco ratones <i>BALB/c</i> contra el péptido RAP1-P3BBOV .....	40
Figura 2: Evaluación de la respuesta inmune del suero de cinco ratones <i>BALB/c</i> después de la segunda inmunización contra el péptido RAP1-P3BBOV .....	41
Figura 3: Evaluación de la respuesta inmune del suero de cinco ratones <i>BALB/c</i> después de la cuarta inmunización contra el péptido RAP1-P3BBOV .....	41
Figura 4: Selección bioquímica HAT de hibridomas productores de anticuerpos anti-RAP1-P3BBOV.....	43
Figura 5: Evaluación de los hibridomas de las líneas clonales 1 al 5 .....	45
Figura 6: Isotipificación de anticuerpos de sub-clonas y sub-sub-clonas celulares por ELISA.....	47
Figura 7: Evaluación de los anticuerpos monoclonales con los extractos de proteína de eritrocitos no infectados (niRBC) e infectados con merozoitos de <i>Babesia bovis</i> (iRBC) mediante western blot.....	49



## INTRODUCCIÓN

La Babesiosis es una enfermedad parasitaria que afecta tanto a humanos como a animales; es causada por los parásitos del género *Babesia*, los cuales se caracterizan por infectar exclusivamente eritrocitos en hospederos vertebrados (Gohil et al., 2013). Esta enfermedad es considerada como zoonótica y es transmitida por garrapatas de la familia Ixodidae (Ord and Lobo, 2015).

La enfermedad conocida como babesiosis bovina es de gran importancia debido a que el ganado bovino en zonas tropicales es el principal afectado por dicha patología (Florin-Christensen et al., 2014), causando pérdidas económicas significativas (Mosqueda, 2002). La babesiosis bovina en el continente americano es causada por las especies *B. bovis* y *B. bigemina* que son transmitidos por las garrapatas *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus* y *Boophilus (Rhipicephalus) microplus* principalmente, pudiendo afectar a más del 65% del ganado bovino en México (Tapia and Millan, 2003; Suarez and Noh, 2011).

Los signos clínicos más comunes de la babesiosis bovina son anemia hemolítica, hemoglobinuria, fiebre y anorexia. *Babesia bovis* es la especie que más daño causa al ganado, pues además ocasiona una patología neurológica y signos clínicos más agudos y severos debido a alteraciones estructurales y funcionales que sufren los glóbulos rojos infectados (Wagner et al., 2002; Gohil et al., 2013).

A la fecha se han caracterizado varias proteínas de *Babesia* que están involucradas en la invasión del parásito al eritrocito; dentro de las más importantes están los antígenos de la superficie celular denominados antígenos variables de superficie de merozoito (VMSA) y las proteínas asociadas a las roptrias (RAP), las cuales participan en el proceso de anclaje e invasión, respectivamente (Carcy et al., 2006). Los antígenos de la familia RAP-1 son proteínas provenientes de dos genes idénticos con repeticiones en tándem y secuencias con homología entre distintas cepas para el caso de *Babesia bovis* (Yokoyama et al., 2002); además, estas proteínas inducen la orientación del parásito hacia la célula hospedera y participan en el proceso de unión irreversible parásito-célula durante la invasión, lo cual los hace blancos terapéuticos y de diagnóstico (Mosqueda, 2002).

Hasta la fecha, el diagnóstico de la babesiosis bovina sigue siendo el mismo que se realizaba hace más de 120 años cuando se descubrió la enfermedad por Victor Babes en 1888 a partir de microscopía convencional, lo cual complica el diagnóstico y tratamiento oportuno de la enfermedad en el ganado (Chauvin et al., 2009; Mosqueda et al., 2012). Lo que hace indispensable la generación



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



de nuevas pruebas de escrutinio que sean rápidas, de bajo costo y poco invasivas para la detección específica de estos parásitos (Mosqueda et al., 2012).

La generación de anticuerpos monoclonales resuelve varios de los problemas aquí mencionados, pues estas moléculas tienen la capacidad de unirse y reconocer antígenos específicos de *Babesia* mediante diversas técnicas para detectar la presencia y cantidad del antígeno (Mosqueda et al., 2012), como son la inmunoelectrotransferencia o el Western blot, los diferentes tipos de ELISA o también pruebas que detecten al antígeno en la célula entera como la inmunofluorescencia indirecta (Goff et al., 2003; Goff et al., 2006; Mosqueda et al., 2012), ya que los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de tener mayor homogeneidad, reproducibilidad en sus efectos y técnicas, así como una mayor afinidad y capacidad de reconocimiento (Mahmuda et al., 2017).

Una de las proteínas candidatas para la generación de anticuerpos monoclonales con propósitos de diagnóstico es RAP-1 de *Babesia bovis*. Esto por el grado de conservación que presenta entre cepas de distinto origen geográfico y su importancia en el ciclo biológico del parásito (Yokoyama et al., 2006; Lobo et al., 2012). Por lo que, en el presente trabajo se generaron y caracterizaron anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos conservados del antígeno RAP-1 de *Babesia bovis*, los cuales pueden ser utilizados para generar nuevas pruebas de diagnóstico.

Dirección General de Bibliotecas UNO



## ANTECEDENTES

### Babesiosis

La plaga del ganado de los antiguos egipcios llamada “Grievous murrain” descrita en el libro bíblico del Éxodo como una afección con fiebre y hemoglobinuria como principales signos fue probablemente la misma enfermedad denominada Fiebre del Ganado de Texas, Fiebre del Agua Roja o Fiebre de la Garrapata del Ganado (Homer et al., 2000; Florin-Christensen et al., 2014), la cual fue la primera enfermedad transmitida por un vector artrópodo en ser reportada por Theobald Smith y Frederick Kilborne en 1893 en Estados Unidos y confirmada por Cooper Curtice al demostrar que al erradicar el vector del ganado también se elimina la enfermedad (Bock et al., 2004; Mosqueda et al., 2012). No obstante, fue Viktor Babes en 1888 quien observó por primera vez cuerpos intraeritrocíticos en frotis sanguíneos de muestras de ganado infectado en fase aguda. A partir de este estudio surgió el nombre de Babesiosis para designar a la enfermedad originada por dichos microorganismos (Florin-Christensen et al., 2014).

La babesiosis es causada por protozoarios del género *Babesia* que infectan exclusivamente los eritrocitos de sus hospederos vertebrados (Gohil et al., 2013). Esta enfermedad es transmitida por garrapatas de la familia Ixodidae y afecta a animales silvestres y domésticos, así como a humanos (Gohil et al., 2013; Vannier et al., 2015). Esta enfermedad es considerada como zoonosis, pues los humanos son hospederos accidentales (Ord and Lobo, 2015).

En el continente americano los parásitos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* infectan específicamente al ganado bovino y son transmitidos por las garrapatas *Rhipicephalus annulatus* y *Rhipicephalus microplus* (Wagner et al., 2002; Bock et al., 2004), lo que genera la enfermedad conocida como babesiosis bovina (de Waal and Combrink, 2006).

El grado de patogenicidad de la enfermedad depende de la especie de *Babesia* y de la cepa que se encuentra involucrada (Wagner et al., 2002), siendo *B. bovis* la que más daño causa, pues además de ocasionar fiebre, anorexia, anemia y hemoglobinuria, también puede llegar a producir daño en pulmones, hígado y cerebro, además de otros órganos a causa de la acumulación de eritrocitos infectados en capilares sanguíneos y en endotelio (Suarez and Noh, 2011; Gohil et al., 2013).



### Epidemiología de la babesiosis en México

La distribución geográfica de la garrapata *R. annulatus* que se ha reportado tanto en África, el centro y sur de América y México, así como la garrapata *R. microplus* que además se ha encontrado en Asia, Australia y Europa (Guglielmone, 1995; de Waal and Combrink, 2006), está influenciada por condiciones climáticas de temperatura y humedad presentes en zonas tropicales y subtropicales donde el crecimiento del vector se favorece (Florin-Christensen et al., 2014). Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera 2018, en México existe un aproximado de 32.5 millones de cabezas de ganado bovino (Rodríguez-Vivas et al., 2017). Por su parte, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) por medio de la Campaña Nacional para el Control de la Garrapata *Boophilus spp.* reporta que el 65.96% del territorio se encuentra en estado de control, el 3.44% en erradicación y el 30.60% se encuentra libre de garrapatas, territorio que comprende a los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California Norte, el norte de Baja California Sur y Chihuahua con excepción, en este último, de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo (SENASICA, 2018), lo que significa que más de la mitad del territorio presenta riesgo de infección.

Los datos epidemiológicos que existen a la fecha acerca de la babesiosis bovina se basan en la proporción de ganado que presenta anticuerpos específicos contra el parásito; sin embargo, los datos y reportes recientes en México son limitados (Guglielmone, 1995). No obstante, el riesgo que presentan los animales de ser infestados por garrapatas según Rodríguez-Vivas y colaboradores (2017) es de más de 22 millones de animales y a su vez, de presentar babesiosis bovina y/o alguna otra enfermedad transmitida por garrapatas, lo que significa que más del 65% del total de ganado bovino se encuentra en riesgo de padecer la enfermedad (Tapia and Millan, 2003).



### Impacto económico

En México la producción animal con propósitos de comercio es un importante sector, pues ocupa el puesto número siete a nivel mundial, donde el ganado bovino es el segundo más importante a nivel nacional (Rodríguez-Vivas et al., 2017). Sin embargo, este sector se puede ver gravemente afectado a causa de los daños directos que pueden ocasionar las garrapatas en los animales e indirectamente mediante los daños que generan las enfermedades producidas por los parásitos que transmiten (de Castro, 1997; Marcelino et al., 2012; Lorusso et al., 2016).

Las pérdidas económicas estimadas en México ocasionadas únicamente por la presencia de las garrapatas *R. microplus* son de 643 millones de dólares (Rodríguez-Vivas et al., 2017), sin tomar en cuenta las pérdidas por morbilidad y mortalidad, así como abortos y costos monetarios para la prevención, tratamiento y erradicación de las garrapatas y la babesiosis, de los cuales no hay reportes para México (de Castro, 1997). No obstante, para India, Sudáfrica, China, Australia, Tanzania, Zimbawe, Kenia, Indonesia y Filipinas, para el control de la babesiosis se han reportado pérdidas de 57.2, 21.6, 19.4, 16.9, 6.8, 5.4, 5.1, 3.1 y 0.6 millones de dólares por año, respectivamente (Bock et al., 2004).

Dirección General de Bibliotecas UNQ



### **Taxonomía de *Babesia sp.***

De acuerdo a la clasificación taxonómica, *Babesia bovis* se encuentra dentro del filo Apicomplexa en la clase Sporozoa o Aconoidasida del orden Piroplasmida y la familia Babesiidae en el género *Babesia*, el cual tiene al menos 111 especies descritas (Levine, 1971; Schnittger et al., 2012; Petersen and Ahmed, 2016). Este género se caracteriza por incluir protozoarios pequeños y piriformes o con forma de pera que carecen de conoide y flagelos, pero presentan un complejo apical reducido en la parte anterior de sus fases invasivas, rodeado por un anillo polar de microtúbulos con vesículas llamadas roptrias, micronemas y cuerpos esféricos implicados en el proceso de invasión de los parásitos a los eritrocitos (Levine, 1971; Gaffar, 2004).

### **Estructura celular del merozoito de *Babesia sp.***

Estos parásitos pueden ser identificados y clasificados con base a sus rasgos fenotípicos y características morfológicas del merozoito en los eritrocitos infectados (Schnittger et al., 2012; Lempereur et al., 2017).

Con base a sus rasgos fenotípicos:

1. El grupo *Babesia sensu latu* (s.l.) de origen antiguo al no poseer caracteres derivados como esquizogonia y transmisión transovárica (Hunfeld et al., 2008; Schnittger et al., 2012; Florin-Christensen et al., 2014).
2. Y el grupo de parásitos *Babesia sensu strictu* (s.s) que carecen de esquizogonia, pero pueden transmitirse transovaricamente como *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* (Schnittger et al., 2012; Florin-Christensen et al., 2014).

Con base en sus características morfológicas del merozoito:

1. En babesias pequeñas de 0.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo, formando un ángulo obtuso entre sí al encontrarse en par dentro de los glóbulos rojos (Laha et al., 2015; Lempereur et al., 2017). En este grupo se incluye *B. bovis* con un tamaño aproximado de 2.0  $\mu\text{m}$  de largo por 1.5 de ancho (Laha et al., 2015; Muraleedharan, 2015)
2. Y babesias grandes con un ángulo agudo entre sí cuando están en par y con una longitud de 2.6 a 5  $\mu\text{m}$  (Laha et al., 2015).



### Ciclo de vida de *Babesia bovis*

El ciclo de vida de los parásitos *Babesia* es muy similar entre especies. Se caracteriza por que presenta tres fases; la merogonia o reproducción asexual por fisión binaria dentro de los eritrocitos del hospedero vertebrado (Levine, 1971; Petersen and Ahmed, 2016: 251–288). La gametogonia en la cual se da la formación y fusión de los gametos masculino y femenino en el intestino de la garrapata, y la esporogonia o reproducción asexual en las glándulas salivales del hospedero invertebrado (Homer et al., 2000; Hunfeld et al., 2008; Suarez and Noh, 2011).

El ciclo de *B. bovis* inicia cuando una garrapata infectada muerde a un bovino y transmite los esporozoítos que invaden directamente a los eritrocitos del vertebrado (Suarez and Noh, 2011). Éstos se transforman en trofozoítos para generar un cuerpo en forma de anillo llamado trofozoíto e iniciar la fisión binaria de la que resultan dos merozoítos inmaduros unidos, los cuales forman un ángulo obtuso al madurar y son liberados del eritrocito mediante lisis celular (Bock et al., 2004; Mosqueda et al., 2012; Petersen and Ahmed, 2016). Los nuevos merozoítos invaden más glóbulos rojos y forman trofozoítos con potencial de diferenciación a gametocitos, mismos que son adquiridos por garrapatas no infectadas cuando se alimentan de sangre de un animal infectado (Homer et al., 2000).

En el intestino del artrópodo se desarrolla la gametogonia; aquí los gametos sexuales masculino y femenino del parásito son liberados del eritrocito y se fusionan para formar un cigoto diploide (Homer et al., 2000). Posteriormente, surge una fase infectiva que penetra las células intestinales de la garrapata y genera un cuerpo de fisión que da lugar a quinetos motiles poliploides, los cuales viajan por la hemolinfa y se distribuyen en los diferentes tejidos incluyendo los ovarios (Mosqueda et al., 2012). En los ovarios de las garrapatas los quinetos de *Babesia* infectan los embriones y tejidos de las larvas que resultan infectadas incluyendo las glándulas salivales donde cada quinetos desarrolla un esporoblasto que contienen miles de esporozoítos inmaduros que son madurados y liberados una vez que la larva se alimenta de sangre de un animal (Bock et al., 2004; Hunfeld et al., 2008).



### **Mecanismos y proteínas involucradas en el proceso de invasión de *B. bovis* al eritrocito**

El mecanismo de invasión de *B. bovis* a los eritrocitos utiliza una serie de pasos que involucran antígenos del merozoito con receptores de la célula hospedera (Dubremetz et al., 1998), los cuales generan una unión de baja afinidad, reversible (Gaffar, 2004), seguido de una reorientación del complejo apical del parásito hacia la célula, donde surge una unión estrecha e irreversible para que los organelos secretores como roptrias y micronemas liberen su contenido y favorezcan el proceso de invasión (Sam-Yellowe, 1996; Gaffar, 2004; Giovannini et al., 2011).

Las proteínas que participan en el proceso de invasión de *B. bovis* a los eritrocitos se pueden clasificar con base en su localización en el parásito en: (1) proteínas de superficie del merozoito, las cuales representan a la familia de antígenos variables de superficie del merozoito o VMSA por sus siglas en inglés y (2) en antígenos de organelos apicales donde se encuentran las proteínas de roptrias, micronemas y cuerpos esféricos (Carcy et al., 2006; Yokoyama et al., 2006; Lobo et al., 2012; Florin-Christensen et al., 2014).

La proteína asociada a roptrias 1 (RAP-1) es una proteína que se almacena en las roptrias y está en la superficie apical de los merozoitos y esporozoítos de *B. bovis*. Es esencial para la formación de la unión estrecha con el eritrocito (Goff et al., 1988; Mosqueda, 2002; Yokoyama et al., 2002), pues participa tanto en la fase de reconocimiento de la célula por el complejo apical como en la fase de invasión por los organelos (Yokoyama et al., 2006). Esta proteína se destaca de entre las demás porque presenta menor grado de polimorfismo entre cepas de distinto origen geográfico, así como por la presencia de varios epítomos para células B y T conservados y que son neutralizados por anticuerpos (Suarez et al., 1994; Brown et al., 1996; Mosqueda, 2002). Su peso aproximado es de 60 kDa, tiene 565 aminoácidos y varias regiones hidrofóbicas involucradas en el anclaje a la membrana, así como fragmentos conservados a lo largo de la proteína y una secuencia en tándem de 23 residuos de aminoácidos repetida siete veces (Suarez et al., 1991). Es codificada por dos genes en tándem idénticos designados como *rap-1α* que presentan una región intergénica río arriba de su codón de inicio con un promotor para la regulación de su expresión y una región no traducida de 300 pb en el extremo 3' de cada gen (Suarez et al., 2004).



### **Diagnóstico de la babesiosis bovina e importancia de los anticuerpos para su detección**

En los laboratorios de diagnóstico, la babesiosis bovina se detecta por medio de microscopía con frotis sanguíneos finos y gruesos teñidos con colorante de Giemsa a partir de muestras de sangre periférica. El objetivo es detectar la morfología del parásito y aumentar la sensibilidad de la prueba (Mosqueda et al., 2012; Lempereur et al., 2017). Este método tiene la capacidad para detectar un parásito por cada millón de eritrocitos; sin embargo, para el caso de *B. bovis* la detección suele ser más complicada a causa de la acumulación de los eritrocitos infectados en los capilares sanguíneos y endotelio, lo cual reduce su presencia en sangre periférica (Böse et al., 1995). Además, se requiere una gran experiencia por parte del personal para analizar de 100 a 150 muestras de bovino por día con parasitemias de <math><0.1\%</math> (Böse et al., 1995; Mosqueda et al., 2012).

La baja sensibilidad y la inconsistencia y dificultad en la interpretación de los resultados del diagnóstico de la babesiosis por microscopía, han obligado al desarrollo de pruebas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta, la ELISA competitiva y la inmunocromatografía para el análisis de sueros de bovino positivos a anticuerpos anti-*B. bovis* y para la detección de antígenos (Goff et al., 2003; Goff et al., 2006; Kim et al., 2007; Kim et al., 2008; Mosqueda et al., 2012). No obstante, a pesar de que muestran una alta sensibilidad, todas estas pruebas son poco específicas, pues fueron generadas tomando como base los epítomos del extremo C y N terminal de Rap-1 que reconocen los anticuerpos monoclonales generados por Goff y Reduker (1988; 1989) a partir de una proteína recombinante completa identificada de una cepa de *B. bovis* de origen mexicano en 1979 (Suarez et al., 1991). Por ello, es necesario la generación de nuevas pruebas de diagnóstico y de anticuerpos más específicos que aseguren la identificación de cepas de distinto origen geográfico tanto en México como en el mundo, ya que las pruebas moleculares confirmatorias como PCR que se encuentran disponibles llegan a ser muy costosas al momento de analizar una gran cantidad de muestras (FAHRIMAL, 1992; Böse et al., 1995; Buling et al., 2007).



## **Función y estructura de los anticuerpos**

Los anticuerpos son glicoproteínas y son componentes esenciales de la respuesta inmune humoral al ser capaces de reconocer con diferente especificidad y afinidad una gama ilimitada de antígenos. Su principal función es proteger a los animales de los agentes infecciosos y de los compuestos que liberan (Mahmuda et al., 2017). Para ello, el sistema inmune de cada animal cuenta con un amplio repertorio de anticuerpos que reconocen una secuencia de aminoácidos específica llamada epítipo de los antígenos (Klinman, 1967; Mahmuda et al., 2017). Un suero policlonal, por ejemplo, contiene innumerables grupos de anticuerpos diferentes o anticuerpos policlonales cada uno producido por una célula o clona celular diferente contra diferentes epítopos de distintos antígenos (Klinman, 1967). Por otro lado, los anticuerpos monoclonales son homogéneos en especificidad y afinidad a un solo epítipo específico de un antígeno, al provenir de una sola célula o clona celular cultivada *in vitro* (Weis-García and Carnahan, 2017).

La estructura común de los anticuerpos está formada por dos heterodímeros de dos cadenas polipeptídicas cada uno; una cadena ligera (L) de 25,000 Da con una región constante (CL) y una cadena variable (VL) unida por puentes disulfuro a una cadena pesada (H) de 50,000 Da, formada por tres o cuatro regiones constantes (CH) y una variable (VH) (Pabello, 2010). Cada heterodímero (H + L) de 75,000 Da está unido entre sí por puentes disulfuro y juntos forman la estructura tipo Y de los anticuerpos. Al digerir la inmunoglobulina con papaína se liberan tres fragmentos; dos de 45,000 Da de unión a antígeno (Fab) y un fragmento cristalizante de 50,000 Da con función biológica distinta para cada una de las cinco clases de anticuerpos: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD (Harlow and Lane, 1988; Weis-García and Carnahan, 2017). En el sitio de unión al antígeno la región variable de cada heterodímero contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) heterogéneas, tres provenientes de la cadena ligera y tres de la cadena pesada responsables del contacto entre antígeno y anticuerpo (Weis-García and Carnahan, 2017).



### Generación de anticuerpos por la activación de linfocitos B específicos de antígenos

La generación de anticuerpos inicia cuando el sistema inmune de un animal detecta un antígeno por medio de los receptores de linfocitos B vírgenes (*B cell receptor* BCR) formados por un anticuerpo de membrana IgM o IgD y una cadena alfa y beta (Pabello, 2010; Mahmuda et al., 2017), el cual activará a la célula y generará la producción de moléculas coestimuladoras y receptoras de quimiocinas, así como la proliferación clonal y diferenciación en células B de memoria y plasmáticas productoras de anticuerpos (Harlow and Lane, 1988). Sin embargo, para que esto suceda es necesario que las células B internalicen, procesen y presenten el antígeno en fragmentos pequeños en la superficie celular en la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II). Este paso es indispensable para activar a los linfocitos T cooperadores (Th) vírgenes que salen del timo en fase  $G_0$  y migran a los tejidos linfoides secundarios como el bazo y los ganglios linfáticos (Harlow and Lane, 1988; Pabello, 2010). En los folículos primarios de dichos tejidos, los receptores de células T (*T cell receptor* o TCR), de los que puede haber más de 10 millones (Harlow and Lane, 1988), con ayuda de las moléculas CD3 y CD4 reconocen al complejo MHC II-antígeno e inducen la expresión de la molécula CD40L en los linfocitos Th (Pabello, 2010). A su vez, el receptor CD40 del linfocito B se une al CD40L y genera la expresión de moléculas coestimuladoras como la CD80 y/o CD86 en el linfocito B, las cuales se unirán al receptor CD28 del linfocito T produciendo grandes cantidades de citocinas como la interleucina 2 (IL-2) (Estes et al., 1998).

El contacto entre la célula B y la célula Th es primordial en la señalización para la producción de anticuerpos debido a que está regulado por la producción de citocinas como la interleucina 4 y 5 (IL4, IL5) (Pabello, 2010), así como la interacción entre moléculas coestimuladoras como la CD40L-CD40 que induce el cambio de isotipo de anticuerpo y la hipermutación somática, necesarias para la generación de una gran variedad de anticuerpos con distinta especificidad, afinidad y función biológica (Coffman et al., 1989; Estes et al., 1998). Razón por la cual no todos los antígenos son inmunógenos y no todos los anticuerpos tienen el cambio en su isotipo, ya que estos deben ser reconocidos primeramente por el BCR y después, los fragmentos del antígeno por el MHC II y el TCR (Harlow and Lane, 1988).



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



Finalmente, en el proceso conocido como maduración de la afinidad se lleva a cabo una serie de mutaciones y recombinaciones genéticas aleatorias. Esto sucede en los genes que codifican los anticuerpos (Harlow and Lane, 1988), los cuales tiene lugar en los linfocitos B alojados en los folículos secundarios de los tejidos linfoides secundarios, donde se lleva a cabo la proliferación de estas células y la selección positiva de aquellas que presentan mayor tiempo de unión o que tienen mayor afinidad hacia el antígeno en menor concentración, así como la selección negativa por apoptosis de las células que cuentan con menor afinidad (Pabello, 2010).

Dirección General de Bibliotecas UAQ



### Historia y bases de la producción de anticuerpos

La generación de anticuerpos homogéneos o monoclonales con especificidad definida fue el resultado de una larga investigación en inmunología que dio inicio a partir de 1940, cuando se descubrió que las células plasmáticas B presentes en los tejidos linfoides incrementan en cantidad al inmunizar ratones con antígenos y que, éstas al ser cultivadas *in vitro*, pueden formar una especie de anticuerpos homogéneos (Fagraeus, 1947; Nossal and Lederberg, 1958; Klinman, 1967). No obstante, fue a partir de las investigaciones acerca de la inducción de mielomas murinos que se realizaron en los años 60 (Potter and Boyce, 1962; Merwin and Redmon, 1963), cuando en 1973 se realizó una fusión celular entre dos mielomas de ratón productores de inmunoglobulinas (Cotton and Milstein, 1973), misma investigación que dio paso a los estudios realizados por Köhler y Milstein acerca de la fusión de dos tipos celulares distintos con características semejantes, la cual culminó en 1975 con la generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Esto a partir de la fusión de una célula de mieloma y un linfocito B de ratón inmunizado con eritrocitos de ovino (Köhler and Milstein, 1975). Esta técnica se basa en el concepto de que los anticuerpos son sintetizados por linfocitos B plasmáticos provenientes del bazo a causa de la inmunización de ciertas especies en contra de un antígeno de interés (Köhler and Milstein, 1975).



### Tecnología en producción de anticuerpos monoclonales

La generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales es el resultado de la fusión celular de un linfocito B y un mieloma de ratón de la misma cepa los cuales, al combinarse por medio de un desestabilizador de membranas como el polietilenglicol (PEG), les permite adquirir la habilidad de crecer indefinidamente en un medio de cultivo selectivo (Greenfield, 2014). Sin embargo, para que se logre lo anterior es necesario que dichas células cuenten con las siguientes características: a) los linfocitos B de ratón deben estar activados y madurados contra algún antígeno de interés, es decir, linfocitos B plasmáticos productores de anticuerpos específicos y b) contar con una línea celular de mieloma de ratón que tenga la capacidad de dividirse innumerablemente como las células cancerígenas, carente de inmunoglobulinas y de las enzimas hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT) y timidina cinasa (TK) necesarias para la síntesis de ADN por la ruta alterna (Liu, 2014). Estas características permiten que al agregar a la fusión celular un bloqueador de síntesis *de novo* de ADN como la aminopterina, solamente puedan sobrevivir las células o híbridos (Linfocito B-Mieloma) correctamente fusionados que contengan las enzimas HGPRT y TK aportadas por las células B y la habilidad de dividirse indefinidamente. (Harlow and Lane, 1988; Greenfield, 2014).

Durante el proceso de la fusión celular, el PEG es el responsable de fusionar las membranas de dos células para formar una sola célula con dos o más núcleos, los cuales al momento de la división celular liberan los cromosomas y éstos son segregados a las células hijas (Greenfield, 2014). No obstante, no siempre se libera el mismo número de cromosomas, ya que algunos se pueden perder durante la mitosis, razón por la que no todos los hibridomas (Linfocito B-Mieloma) correctamente fusionados logran sobrevivir, pues pueden perder los cromosomas que contienen la información genética necesaria para poder desarrollarse o para generar las cadenas polipeptídicas de las inmunoglobulinas (Cotton and Milstein, 1973; Greenfield, 2014), lo que se traduce a una supervivencia de un hibridoma viable por cada millón o de aproximadamente el 1% de eficiencia en la fusión celular (Köhler and Milstein, 1975; Greenfield, 2014).

El proceso para la generación de anticuerpos monoclonales continua cuando las células fusionadas son cultivadas en placas multipozos y evaluadas en un periodo de 12 a 15 días (Harlow and Lane, 1988; Greenfield, 2014), esto por medio de técnicas inmunológicas a partir del sobrenadante para determinar si los hibridomas viables presentes en cultivo producen el anticuerpo deseado en contra del antígeno o epítipo de interés (Weis-Garcia and Carnahan, 2017). Aquellos pozos con híbridos



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



que presenten resultados positivos a las pruebas, son expandidos a nuevas placas de cultivos (clonación celular), de tal manera que se logre aislar una sola célula por pozo para así poder obtener anticuerpos monoclonales, es decir, específicos y homogéneos al ser producidos por una misma célula (clona), evitando las reacciones cruzadas que son características de muchos sueros policlonales e incluso de anticuerpos monoclonales generados contra epítomos compartidos entre distintos antígenos (Greenfield, 2014; Weis-Garcia and Carnahan, 2017).

Dirección General de Bibliotecas UAQ



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



### **OBJETIVO GENERAL**

Generar y caracterizar un anticuerpo monoclonal que reconozca un epítipo conservado del antígeno RAP-1 de *Babesia bovis*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Generar un anticuerpo monoclonal que reconozcan un epítipo conservado de RAP-1 de *Babesia bovis*.
2. Caracterizar un anticuerpo monoclonal generado contra un epítipo conservado de RAP-1 de *Babesia bovis*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada (UMBA) del campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro, así como en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).

### Estrategia experimental

**Objetivo 1: Generar un anticuerpo monoclonal que reconozcan un epítipo conservado de RAP-1 de *Babesia bovis*.**

- 1 Cepa de ratón
- 2 Péptido de Rap-1 de *B. bovis*
- 3 Esquema de inmunización y toma de suero
- 4 Evaluación de la respuesta inmune
- 5 Fusión celular
- 6 Selección bioquímica
- 7 Evaluación de los hibridomas
- 8 Selección de hibridomas positivos anti-Rap1-P3BBOV
- 9 Clonación celular



**Objetivo 2: Caracterizar un anticuerpo monoclonal generado contra un epítipo conservado de RAP-1 de *Babesia bovis*.**

- 10 Isotipificación de anticuerpos monoclonales
- 11 Proliferación *in vitro*
- 12 Obtención de sobrenadante de cultivo de clonas celulares
- 13 Purificación de anticuerpos
- 14 Cuantificación de anticuerpos monoclonales
- 15 Identificación del antígeno nativo rap-1 por Western blot

Dirección General de Bibliotecas UAQ



### 1.- Cepa de ratón

El modelo animal utilizado para la generación de la respuesta inmune humoral fue la cepa *BALB/c* de *Mus musculus*. Se utilizó un lote de cinco ratones hembra de siete semanas de edad, proporcionado y manejado bajo las pautas bioéticas establecidas por el bioterio del INDRÉ en la Ciudad de México.

### 2.- Péptido de Rap-1 de *B. bovis*

El péptido de Rap-1 de *B. bovis* fue obtenido de investigaciones previas realizadas bajo la dirección del Dr. Juan Mosqueda en el LINVAS, Querétaro. Se trata de un péptido sintético producido por la empresa GL Biochem (Shanghai) Ltd de China denominado RAP1-P3BBOV que consta de 14 aminoácidos conservados entre las diferentes cepas geográficas reportadas a nivel mundial, el cual contiene epítomos B y regiones hidrofílicas que generan una respuesta humoral en bovinos, produciendo anticuerpos específicos que reconocen distintas cepas mexicanas de *Babesia bovis*.

### 3.- Esquema de inmunización y toma de suero

Los sangrados por vía retroorbital se llevaron a cabo de 5 a 10 min después de sedar los ratones vía intramuscular con 0.002 ml de anestésico Zoletil® 50 por medio de una jeringa de 1 ml. Para ello, se sujetó al animal y se colocó con el tórax hacia arriba, introduciendo un tubo capilar estéril en el ángulo externo del ojo hasta encontrar el seno venoso de donde la sangre fluye hacia el tubo. La sangre fue colocada y etiquetada en tubos de 0.5 ml y centrifugada a 3,000 rpm durante 5 min para la obtención del suero, el cual fue almacenado a -20°C (Harlow and Lane, 1988).

Se realizaron cuatro extracciones de sangre para obtención de suero de acuerdo al Cuadro 1: la primera se llevó a cabo antes de la primera inmunización para la obtención del suero preinmune como control negativo; la segunda y tercera se obtuvo días después de la segunda y cuarta inmunización, respectivamente. Esto para identificar la respuesta inmune humoral de los animales; mientras que el cuarto sangrado se realizó antes únicamente al animal seleccionado para realizar la fusión celular antes del sacrificio para la obtención del suero postinmune como control positivo (Harlow and Lane, 1988).



**Cuadro 1: Esquema de sangrado**

Número de sangrado	Número de ratones sangrados	Fecha	Volumen de sangre colectada
1er	5	10/03/17	150 µl
2do	5	28/03/17	150 µl
3er	5	18/04/17	150 µl
4to	1	26/04/17	2 ml

Durante un periodo de siete semanas se llevó a cabo el esquema de inmunización que incluyó cinco aplicaciones vía intraperitoneal por medio de una jeringa de 1 ml; cuatro con adyuvante a todos los ratones y una última de refuerzo sin adyuvante exclusiva para el ratón que presentó una respuesta humoral mayor. Las inmunizaciones se realizaron con base al Cuadro 2, tomando como base el volumen dosis indicado para inmunizar a cada ratón (Vol. dosis/ratón) a partir del volumen dosis preparado con solución de PBS 1X y Rap-1 (solución 2 y 3), así como con el adyuvante TiterMax® Gold (Sigma-Aldrich, Toluca, México).

**Cuadro 2: Esquema de inmunización**

Número de inmunización	Número de ratones inmunizados	Fecha	Vol. dosis/5 ratones	Vol. dosis/ratón	Dosis [RAP1-P3BBOV]
1er	5	10/03/17	100 µl sol. 3 150 µl TiterMax® 750 µl sol. 2	200 µl	20 µg
2da	5	24/03/17	200 µl sol. 3 150 µl TiterMax® 650 µl sol. 2	200 µl	40 µg
3ra	5	03/04/17	200 µl sol. 3 150 µl TiterMax® 650 µl sol. 2	200 µl	40 µg
4ta	5	10/04/17	200 µl sol. 3 150 µl TiterMax® 650 µl sol. 2	200 µl	40 µg
5ta	1	21/04/17	-	100 µl sol. 3 100 µl sol. 2	100 µg



#### 4.- Evaluación de la respuesta inmune

La respuesta inmunitaria humoral de los ratones fue evaluada mediante la prueba ELISA indirecta a partir del suero obtenido de cada uno de los sangrados, excepto del cuarto sangrado: suero preinmune y suero del segundo y tercer sangrado después de la segunda y cuarta inmunización, respectivamente (Harlow and Lane, 1988). Para ello, en dos placas de ELISA *Corning® 96 Well EIA/RIA Assay Microplate* se agregaron 100 µl/pozo de solución de tamizaje (solución 5) e incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 200 µl/pozo de solución de lavado (solución 6) en intervalos de 5 min con agitación suave y se bloqueó durante una hora a 37°C con 200 µl/pozo de solución de bloqueo (solución 7). Se repitieron los otros tres lavados y se incubó una hora a 37°C con 100 µl/pozo de diluciones de suero de cada uno de los ratones para los tres sangrados, empezando de 1:500 hasta 1:32000, incluyendo PBS (solución 2) y el suero de ratón no inmunizado en tres pozos de cada placa como control negativo, así como suero de ratón inmunizado con proteína total de *B. bovis* como control positivo. Transcurrido el tiempo se repitieron los lavados y las placas se incubaron durante una hora a 37°C con 100 µl/pozo de anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) a una concentración de 1:1000. Las diluciones de los sueros y del anticuerpo secundario se realizaron con PBS. Finalmente se llevaron a cabo tres lavados más y se agregaron 100 µl/pozo de solución de revelado (solución 10), se incubó en oscuridad por 20 min y la reacción se detuvo con 100 µl/pozo ácido sulfúrico (solución 11) hasta determinar las densidades ópticas a 492 nm en un espectrofotometro para microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Uusimaa, Finlandia).

#### 5.- Fusión celular

La fusión celular se realizó en tres pasos:

##### 5.1.- Preparación de células de mieloma de ratón línea X63Ag8.653 (Ag8)

La línea celular Ag8 preservada a -70°C se descongeló rápidamente de cuatro tubos de 2 ml mediante baño María a 37°C y el contenido de cada tubo por separado, se colocó en cuatro tubos cónicos estériles de 15 ml con 8 ml de medio DMEM (solución 12) en un lapso menor a 5 min. Rápidamente los tubos se centrifugaron durante 10 min a 1200 rpm, se descartó el sobrenadante y el botón celular de cada tubo se resuspendió con 10 ml de medio DMEM-10% SFB (solución 14). El volumen de los tubos se colocó en cuatro botellas para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> y se incubó a 37°C, 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Al día siguiente al verificar el crecimiento normal y la ausencia



de contaminación por microscopía de campo claro, a cada botella se agregaron 10 ml más de medio DMEM-10% SFB y se incubó bajo las mismas condiciones durante 48 horas hasta que las células se encontraran en crecimiento exponencial y no en confluencia. Finalmente, el día de la fusión celular el contenido de las cuatro botellas se resuspendió mediante agitación suave y se colocó en dos tubos estériles de 50 ml, lo cuales se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min y el botón celular de cada tubo se resuspendió con 17.5 ml de medio DMEM (solución 12), mismo volumen que se mezcló en un solo tubo cónico de 50 ml donde se obtuvo un volumen final de 35 ml (Harlow and Lane, 1988).

## 5.2.- Preparación de células de bazo del ratón *BALB/C* con mayor título de anticuerpos anti-RAP1-P3BBOV

El ratón que presentó el valor de densidad óptica mayor al punto de corte del control negativo en una dilución 1:4000 anti-RAP1-P3BBOV fue sangrado como se indica en el esquema de inmunización y posteriormente sacrificado por dislocación cervical. Después, el animal fue sumergido en etanol al 70% durante 5 min y en la cabina de bioseguridad sobre una tabla de disección de unisel forrada en aluminio y desinfectada con etanol al 70%, se colocó con el tórax hacia arriba y se sujetó de la piel del costado de sus patas por medio de agujas. Una vez inmobilizado, con ayuda de unas pinzas y tijeras de disección estériles se tomó y cortó la piel del costado derecho del animal, dejando libre y descubierto de pelo la capa interior del tejido dérmico, misma que fue tomada y cortada con otras pinzas y tijeras de disección estériles que se usaron para extraer el bazo. Éste último se colocó en una caja de Petri con 15 ml de medio DMEM (solución 12) y se limpió del tejido periférico que contenía con ayuda de las mismas tijeras y pinzas de disección estériles. Posteriormente, el bazo se colocó en otra caja de Petri estéril con 15 ml de medio DMEM sobre un cuadro de tela de organaza de 4 x 4 cm. La tela de organaza fue previamente hervida en HCl 0.1N y en NaOH 0.1N durante 30 min cada uno y lavada después de cada calentamiento con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro, para así ser introducirla dentro de la caja al momento de esterilizar. El bazo se envolvió totalmente con la tela de organaza y con ayuda del émbolo de una jeringa estéril se presionó suavemente hasta disgregar el tejido y con una pipeta serológica se resuspendió en los 15 ml de medio DMEM sin que los restos de tejido salieran de la tela. Posterior a ello, el volumen se pasó a un tubo cónico de 50 ml y con 5 ml más de medio DMEM se volvió a resuspender; el volumen final (20 ml) se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min y el botón celular se



lavó con 20 ml más de medio DMEM, se volvió a centrifugar y finalmente el botó se resuspendió en 15 ml de medio DMEM.

### 5.3.- Fusión de las células de mieloma X63Ag8.653 y las células del bazo

Se mezcló el volumen final de células de mieloma X63Ag8.653 con el volumen final de células de bazo y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min, el sobrenadante se descartó y el botón celular se disgregó suavemente. En seguida, en un baño maría a 37°C se colocó el tubo con las células y con agitación suave dentro del baño María por goteo se agregaron 0.7 ml de polietilenglicol (solución 15) durante 1 min, después se agregaron 7 ml de medio DMEM (solución 12) durante 3 min y se adicionaron 15 ml más de medio DMEM durante 1 min. Rápidamente la mezcla se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, el botón celular fue resuspendido en una charola estéril para cultivo celular con 100 ml de medio selectivo HAT (solución 18), mismos que fueron colocados en cinco placas de cultivo celular de 96 pozos con 200 µl/pozo. Por último, las placas se rotularon con número del 1 – 5 y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 6.- Selección bioquímica

Las cinco placas de cultivo se revisaron al microscopio diariamente para identificar la viabilidad de los hibridomas y la ausencia de contaminación, así como el requerimiento de cambio de medio de cultivo, mismo que se realizó cada tercer día durante poco más de dos semanas cuando el color del medio viraba de rojo a naranja claro. El cambio de medio se realizó en campana de flujo laminar con la ayuda de una micropipeta multicanal y con mucho cuidado de no desprender los hibridomas de la base de los pozos de las placas, se extrajeron 100 µl de sobrenadante de cada uno de los 96 pozos de las cinco placas por medio de puntas de 200 µl estériles distintas para cada pozo, esto con el objetivo de evitar contaminación de hibridomas entre los distintos pozos. Posterior a cada cambio de medio, con base al esquema de selección bioquímica (Cuadro 3) que dio inicio desde el día que se realizó la fusión celular se agregaron 100 µl de medio por pozo y las placas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub> hasta que finalizó el esquema (Harlow and Lane, 1988).



**Cuadro 3: Esquema de selección bioquímica**

Día	Tipo de medio	Vol/5-placas	Vol/pozo	Actividad
1	Solución 18	100 ml	200 µl	Fusión HAT
3	Solución 18	50 ml	100 µl	Cambio HAT
5	Solución 18	50 ml	100 µl	Cambio HAT
8	Solución 18	50 ml	100 µl	Cambio HAT
10	Solución 19	50 ml	100 µl	Cambio HT
12	Solución 19	50 ml	100 µl	Cambio HT
14	Solución 19	50 ml	100 µl	Cambio HT
16	Solución 14	50 ml	100 µl	Cambio de medio

### 7.- Evaluación de los hibridomas

Se realizó un total de tres evaluaciones por ELISA a las cinco placas de cultivo (Harlow and Lane, 1988); la primera se hizo tres días después del día 16 del esquema de selección bioquímica, la segunda cuatro días después de la primera evaluación y la tercera ocho días posteriores a la segunda evaluación. Para ello, en la cabina de bioseguridad se colocaron las cinco placas de cultivo celular, así como seis placas de ELISA previamente forradas con 100 µl/pozo de solución de tamizaje (solución 5), excepto en un pozo de la columna 12 al que se le agregó suero de ratón diluido 1:500 en PBS (solución 2) como base para el control de conjugado. Las placas fueron incubadas toda la noche a 4°C, lavadas tres veces con 200 µl/pozo de solución de lavado (solución 6) en intervalos de 5 min, bloqueadas durante una hora a 37°C con 200 µl/pozo de solución de bloqueo (solución 7) y vueltas a lavar tres veces. Una vez que las placas de ELISA estaban bloqueadas, a las cinco placas de cultivo se les extrajeron 100 µl de sobrenadante por pozo, esto de igual manera como se realizó el cambio de medio y este volumen se agregó en cada pozo de las placas de ELISA, excepto en la columna 12 donde se agregó sobrenadante de medio de cultivo de mieloma Ag8 y por duplicado 100 µl de control de suero preinmune y postinmune diluido 1:500 en PBS. Inmediatamente, a las placas de cultivo se les agregaron 100 µl/pozo de medio DMEM-10% SFB (solución 14) y se volvieron a incubar bajo las mismas condiciones, mientras que las placas de ELISA fueron incubadas toda la noche a 4°C. Al día siguiente se repitieron los lavados y se les agregaron 100 µl/pozo de anticuerpo secundario Anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) a una concentración de 1:1000 en PBS, se realizó una incubación de una hora a



37°C y lavó tres veces. Por último, se agregaron 100 µl/pozo de solución de revelado (solución 10), se incubó en oscuridad por 20 min y la reacción se detuvo con 100 µl/pozo de ácido sulfúrico (solución 11) hasta determinar las densidades ópticas a 492 nm como se describió arriba.

#### 8.- Selección de hibridomas positivos anti-RAP1-P3BBOV

La selección de pozos con hibridomas positivos anti-RAP1-P3BBOV se realizó con base a las densidades ópticas (DO's) obtenidas de la evaluación por ELISA. Para ello, de cada placa de ELISA se determinó el punto de corte del control negativo o suero preinmune a partir del promedio más tres desviaciones estándar de los resultados de densidad óptica. En seguida, en las placas de cultivo se marcaron todos los pozos que presentaron un valor de DO por encima del punto de corte y dichos pozos fueron observados en el microscopio para corroborar que si presentaban hibridomas libres de contaminación (Harlow and Lane, 1988).

#### 9.- Clonación celular

Los pozos positivos anti-RAP1-P3BBOV identificados por ELISA a partir de las cinco placas de cultivo rotuladas del 1 al 5, fueron seleccionados para realizar la clonación celular. Para ello, se contó el número total de pozos positivos de las cinco placas de cultivo y se determinaron las coordenadas de cada uno de ellos para su identificación clonal. Esto se realizó a partir de números y letras, donde el primer número correspondía a la placa en la cual se encontraba el pozo, seguido de la letra de la fila y el número de la columna de la placa a la cual pertenecía el pozo. Posteriormente, en la cabina de bioseguridad las nuevas placas de cultivo de 96 pozos se rotularon con la identificación clonal de cada uno de los distintos pocillos y se les colocaron 100 µl/pozo de medio DMEM-10% SFB (solución 14) en toda la fila A. Después, el paquete celular de cada pocillo positivo fue resuspendido y de éste se tomaron 100 µl que se colocaron en la posición A1 de su correspondiente placa nueva. En seguida, el pozo A1 se resuspendió y a lo largo de la fila A se realizaron diluciones doble seriadas con el mismo volumen; los 100 µl restantes se agregaron en un pozo de una placa de cultivo de 12 pocillos para resguardar los hibridomas provenientes del pozo clonado. La nueva placa de cultivo con las diluciones doble seriadas se dejó reposar 10 min, se analizó al microscopio y aquel pozo que contuviera de 30 a 40 células viables se diluyó en 18 ml de medio DMEM-10% SFB, mismo que fue distribuido en todos los pozos restantes de la placa, agregando 200 µl/pozo. Las placas se mantuvieron a 37°C con 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub> durante una semana o más, hasta que los pozos con híbridos presentaron clonas celulares que se caracterizan



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



por la formación de cúmulos de células. Finalmente, los nuevos pozos fueron seleccionados y evaluados nuevamente por ELISA, así como identificados a partir del punto de corte del control negativo y clonados por segunda vez, repitiéndose el proceso de evaluación por tercera ocasión, en la que se volvieron a clonar por última vez los híbridos. Sin embargo, aunque las placas presentaran un número elevado de pocillos positivos, solo se clonaron de 1 a 3 pozos con valores de DO superiores a los demás, esto por la cantidad de medio que requiere cada clonación. No obstante, todos los pozos positivos fueron cultivados en placas de 12 pocillos con 3 ml de solución medio DMEM-10% SFB, el cual después de tres días se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min y el paquete celular se resuspendió en 1 – 2 ml de solución de criopreservación (solución 20) y se colocó y almacenó en un vial de congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **10.- Isotipificación de anticuerpos monoclonales**

Después de la última clonación celular las placas de cultivo de 96 pozos fueron evaluadas por última vez por ELISA para determinar la clase de anticuerpo que producen las clonas celulares. Para esto, las placas se tamizaron y bloquearon de la misma manera como se realizó para la evaluación de los hibridomas y en seguida, de los pozos que presentaron cúmulos de hibridomas se tomaron por duplicado 50  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y se agregaron como anticuerpo primario en las placas de ELISA, así como 100  $\mu\text{l}$  de suero preinmune y postinmune en cuatro pozos cada uno, diluido 1:500 en PBS (solución 2) como controles para evaluar los pocillos con dos anticuerpos secundarios diferentes específicos anti-cadena gamma ( $\gamma$ ) y anti-cadena mu ( $\mu$ ). Inmediatamente, a las placas de cultivo se les agregaron 100  $\mu\text{l}$ /pozo de medio DMEM-10% SFB (solución 14) y se volvieron a incubar bajo las mismas condiciones, mientras que las placas de ELISA fueron incubadas toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se repitieron los lavados y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  del anticuerpo secundario Anti-IgM de ratón, conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno Research, Pensilvania, Estados Unidos) y 100  $\mu\text{l}$  del anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno Research, Pensilvania, Estados Unidos). Ambos a una concentración de 1:2000 en PBS. Se incubaron una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y lavaron tres veces. Por último, se agregaron 100  $\mu\text{l}$ /pozo de solución de revelado (solución 10), se incubó en oscuridad por 20 min y la reacción se detuvo con 100  $\mu\text{l}$ /pozo de ácido sulfúrico (solución 11) hasta que se determinaron las densidades ópticas a 492 nm con el espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Uusimaa, Finlandia).



### 11.- Proliferación *in vitro*

Todos los pozos que presentaron valores de densidad óptica por encima del punto de corte con respecto al control negativo fueron transferidos a placas de cultivo de 6 pocillos para posteriormente obtener el sobrenadante y resguardar las clonas celulares en congelación. Para ello, la suspensión celular de cada pozo de la placa de 96 fue resuspendida y después colocada en los pozos de la placa de 6 pocillos con 4 ml de medio DMEM-10% SFB (solución 14). Cuatro días después de incubación a 37°C con 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub>, la suspensión celular de cada clona fue centrifugada a 1200 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue resguardado a -20°C para posteriores evaluaciones, mientras que el paquete celular se resuspendió con 1 a 2 ml de solución criopreservadora (solución 20) y almacenó a -70°C.

### 12.- Obtención de sobrenadante de cultivo de clonas celulares

Para la obtención de cantidades de sobrenadante superiores a 50 ml para la purificación de anticuerpos, se seleccionaron seis pozos de clonas celulares con las densidades ópticas superiores en la evaluación del isotipo por ELISA. Los pozos fueron provenientes de líneas clonales distintas y transferidos a botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con 8 ml de medio DMEM-10% SFB (solución 14) e incubados durante cuatro días a 37°C con 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub> hasta que las células se encontraron en confluencia. Posteriormente, se les agregaron 10 ml más de medio DMEM-10% SFB y se volvieron a incubar bajo las mismas condiciones durante cuatro días. Se aisló el sobrenadante por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min y a la botella de cultivo se le volvió a agregar más medio DMEM-10% SFB hasta que se obtuvieron 50 ml de sobrenadante, el cual se mantuvo a -20°C hasta su uso en la purificación de anticuerpos.

### 13.- Purificación de anticuerpos

El sobrenadante de las seis clonas celulares obtenido del cultivo se utilizó para purificar los anticuerpos a partir de la columna comercial HiTrap de 1 ml (GE Healthcare, Upsala, Suecia) para purificación de anticuerpos tipo IgM, bajo sus instrucciones de uso. Los 12 volúmenes de anticuerpo obtenidos en amortiguador de elusión se distribuyeron en fracciones de 1 ml, de los cuales las dos primeras fracciones se unieron y las cuatro siguientes. Posteriormente, en una membrana de celulosa para diálisis previamente activada por ebullición en solución de activación (solución 21) durante 15 min, se agregaron las fracciones de anticuerpos, se incubaron en 300 ml de PBS



(solución 2) estéril a 4°C en agitación y se realizaron dos cambios del PBS cada 30 min. Finalmente, las fracciones fueron alicuotadas y almacenadas a -20°C.

#### 14.- Cuantificación de anticuerpos monoclonales

La cuantificación de anticuerpos monoclonales se realizó por el método de Bradford bajo el procedimiento establecido en el Laboratorio de Neurobiología Molecular de la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada de la UAQ mediante una curva BSA de 0 mg/ml a 1.4 mg/ml. Para ello, se hicieron diluciones seriadas a partir de una solución madre de BSA de 10 mg/ml como se indica en el Cuadro 4 de diluciones de BSA para método Bradford. Una vez que se realizó la curva de BSA, se colocaron 5 µl de cada una por duplicado, incluyendo las muestras de anticuerpo en una placa de 96 pocillos y a cada pozo se adicionaron 250 µl de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos), se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 6 min y se determinó la densidad óptica a 595 nm con agitación de 5 s.

**Cuadro 4: Diluciones de BSA para método Bradford**

Curva BSA [mg/ml]	BSA (µl)	Agua estéril (µl)	Volumen final (µl)
1.4	4.9 µl de BSA [10 mg/ml]	30.1	35
1	17.86 µl de BSA [1.4 mg/ml]	7.14	25
0.5	12.5 µl de BSA [1 mg/ml]	12.5	25
0.25	12.5 µl de BSA [0.5 mg/ml]	12.5	25
0	0	25	25

#### 15.- Identificación del antígeno nativo rap-1 por Western blot (WB)

La identificación del antígeno nativo Rap-1 por WB se realizó en cuatro pasos:

##### 15.1.- Extracción de proteínas totales de *Babesia bovis*

Un paquete eritrocitario infectado y no infectado con *B. bovis* almacenado con inhibidores de proteasas se dividió en volúmenes de 1ml en tubos de 1.5 ml y se centrifugó 25 min a 4500 rpm a 4°C. Se le retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió y almacenó en 500 µl de coctel de inhibidores de proteasas (solución 22) a -20°C toda la noche. Al día siguiente la muestra se descongeló en hielo, se agitó por intervalos de 20 s cada minuto por cinco veces y se volvió a centrifugar e incubar en coctel de inhibidores a -20°C; este proceso se repitió cinco veces hasta que



se obtuvo un paquete celular color gris. Posteriormente, se seleccionó un tubo conteniendo el paquete celular y los 500  $\mu$ l de coctel de inhibidores, se descongeló y centrifugó a 9000 rpm durante 5 min a 4°C y el paquete celular se resuspendió en 500  $\mu$ l de amortiguador de lisis (solución 23). Se incubó 15 min en hielo, agitando por pulsos de 20 s en vortex cada 5 min. Al término de la incubación se centrifugó a 4°C durante 5 min a 9000 rpm, se pasaron 450  $\mu$ l de sobrenadante a otro tubo y el pellet se resuspendió con mucho cuidado en los 50  $\mu$ l de solución restante. Finalmente, la suspensión se cuantificó por el método de Bradford y a partir de la concentración obtenida en mg/ml se preparó la solución de carga de proteínas (solución 25).

### 15.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y electrotransferencia

Se preparó un gel de poliacrilamida al 8% con un total de 10 carriles de acuerdo con las concentraciones del gel de corrida y el gel concentrador (solución 30 y 31); en los pozos se agregó la solución de carga de proteínas totales (solución 25) tanto de eritrocitos infectados como no infectados con *B. bovis* a una concentración y volumen de 20  $\mu$ g/15  $\mu$ l, así como 3  $\mu$ l de marcador de peso para western blot *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (Thermo Fisher Scientific, California, Estados Unidos) y el gel se corrió en frío con amortiguador de corrida (solución 32) a 100 volts durante 150 min. Posteriormente, el gel y una membrana de nitrocelulosa se colocaron en amortiguador de transferencia (solución 33) durante 5 min y en una cámara semiseca para WB se colocó un filtro empapado en buffer de corrida, después la membrana de nitrocelulosa, el gel y encima del nuevo filtro mojado con la misma solución y se transfirió durante 15 min a 15 volts.

### 15.3.- Incubación de anticuerpos

La membrana de nitrocelulosa se lavó brevemente con TBS (solución 36) y se tiñó con rojo de Ponceau (solución 34). Se rotularon y recortaron los carriles donde corrió la proteína y las tiras de membrana se destiñeron con TBS. Posteriormente, las membranas se bloquearon toda la noche a 4°C con solución de bloqueo para WB (solución 7) y después nuevamente se incubaron toda la noche a 4°C con 5 ml de sobrenadante de medio de cultivo de las clonas celulares diluido 1:20 o con suero de ratón preimmune y postimmune diluido 1:1000 en solución de incubación (solución 38). En seguida se realizaron tres lavados de 30 min cada uno con agitación rápida en solución de lavado TBS (solución 39) y un último en solución de lavado TBST (solución 40). Se incubaron por una hora a temperatura ambiente con anticuerpo Anti-IgM de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



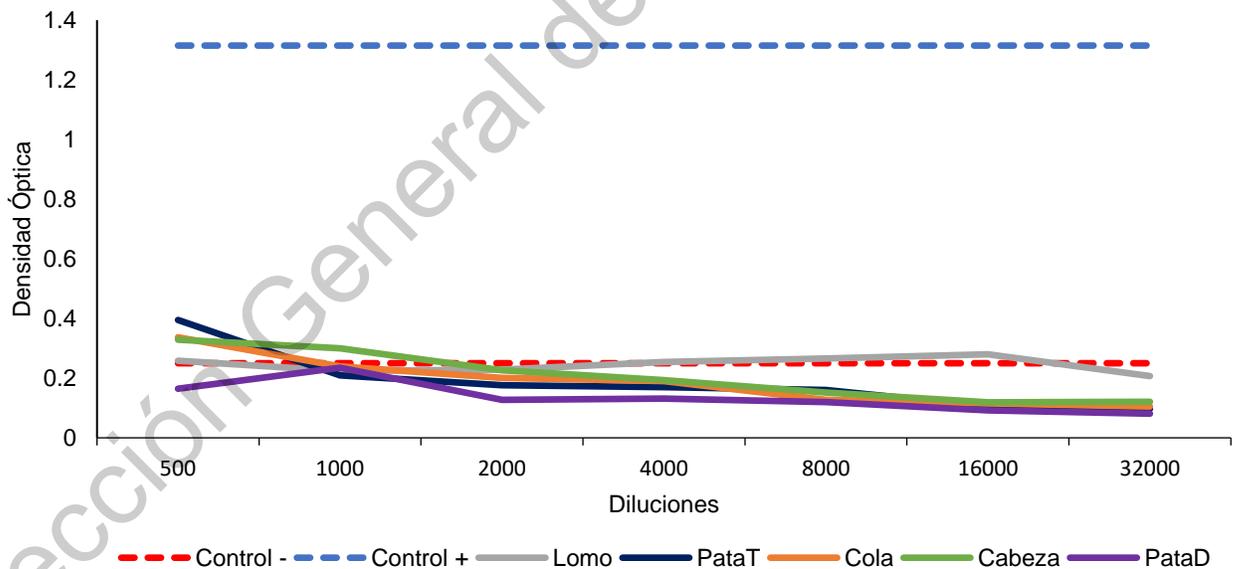
Immuno Research, Pensilvania, Estados Unidos) diluido 1:10000 y se volvieron a repetir los lavados. Finalmente, las membranas se enjuagaron en TBS (solución 36) y revelaron en cuarto oscuro por quimioluminiscencia.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

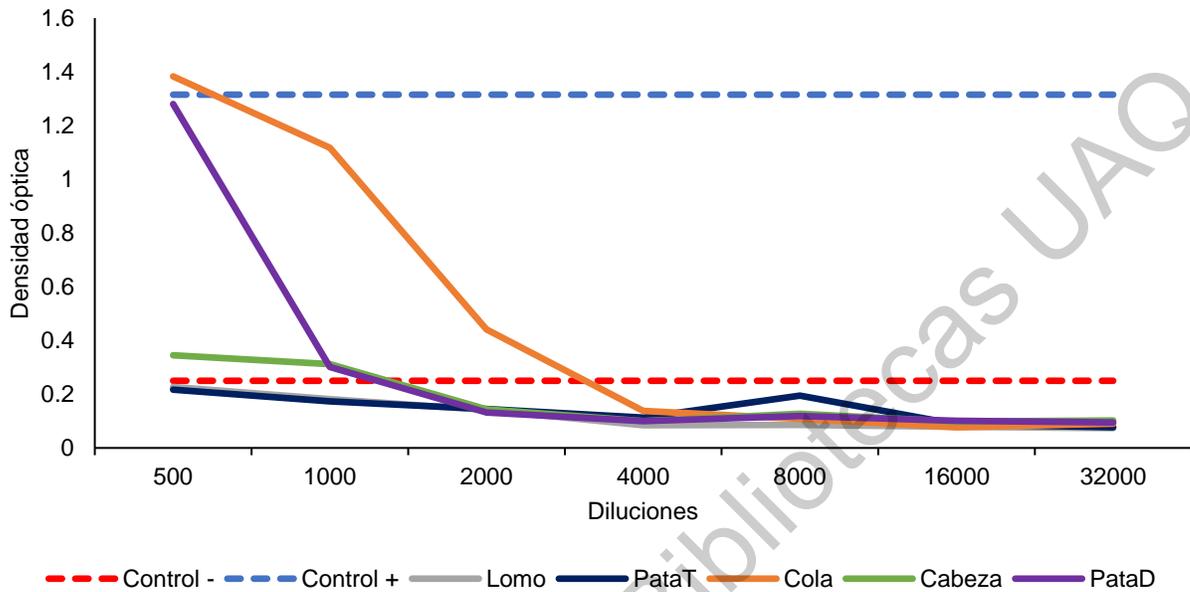
## RESULTADOS

### Evaluación de la respuesta inmune de los ratones inmunizados con el péptido RAP1-P3BBOV

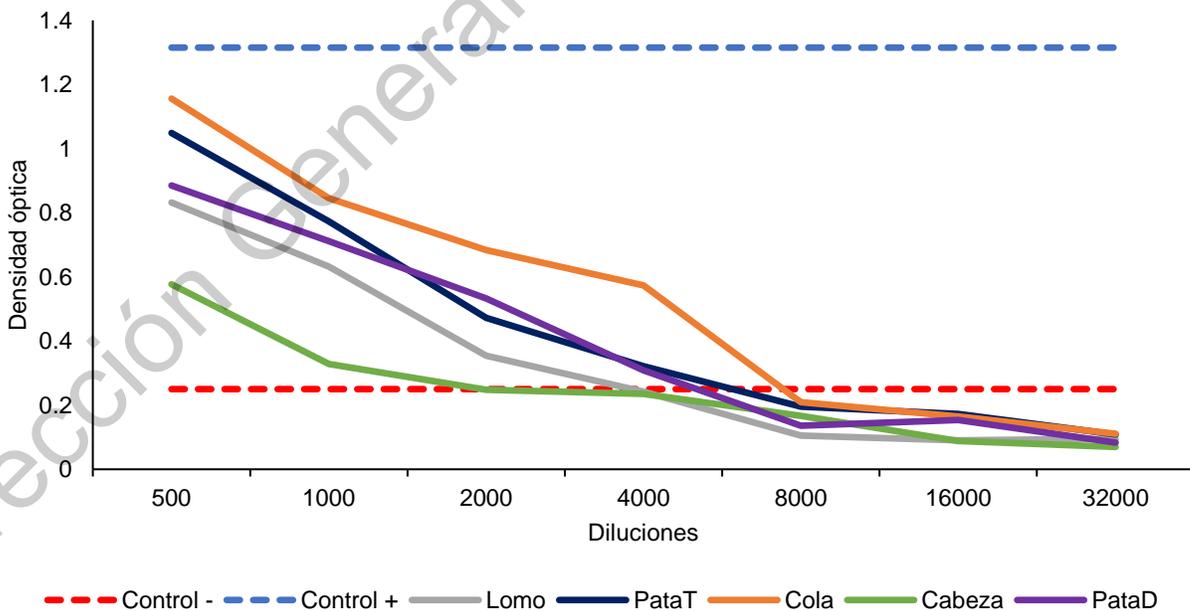
Los resultados obtenidos de las evaluaciones de los sueros mostraron que el suero preinmune de los ratones no tiene una respuesta específica de anticuerpos contra el péptido RAP1-PBBBOV (Figura 1), mientras que el suero del segundo sangrado después de la segunda inmunización muestra una respuesta positiva de anticuerpos que reconocen este péptido (Figura 2), esto con respecto al control negativo (suero de ratón no inmunizado) y control positivo (suero de ratón inmunizado con proteína total de *B. bovis*). Por otro lado, la evaluación del tercer sangrado después de la cuarta inmunización (Figura 3) indica que la respuesta inmune de los ratones marcados como PataT, PataD y Cola es mayor, ya que los valores de densidad óptica se encuentran por arriba del punto de corte del control negativo en una dilución 1:4000.



**Figura 1:** Evaluación de la respuesta inmune del suero preinmunización de cinco ratones *BALB/c* contra el péptido RAP1-P3BBOV.



**Figura 2:** Evaluación de la respuesta inmune del suero de cinco ratones *BALB/c* después de la segunda inmunización contra el péptido RAP1-P3BBOV.



**Figura 3:** Evaluación de la respuesta inmune del suero de cinco ratones *BALB/c* después de la cuarta inmunización contra el péptido RAP1-P3BBOV.



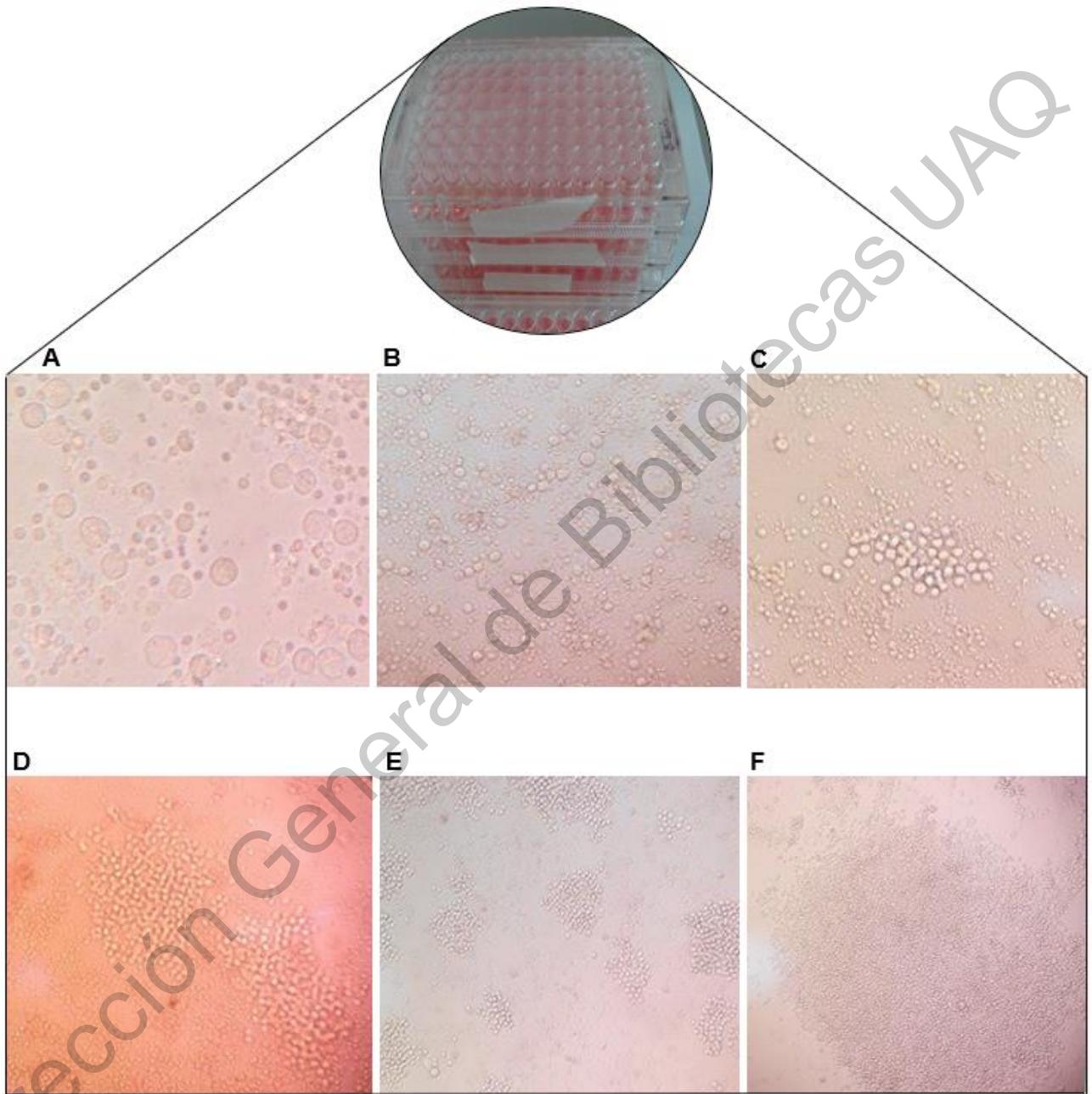
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



### **Selección bioquímica**

Las observaciones de los hibridomas bajo el microscopio a lo largo de la selección bioquímica muestra un proceso gradual de supervivencia y muerte de híbridos correctamente fusionados y de células que no adquirieron la carga genética necesaria para sobrevivir al medio selectivo HAT (Figura 4).

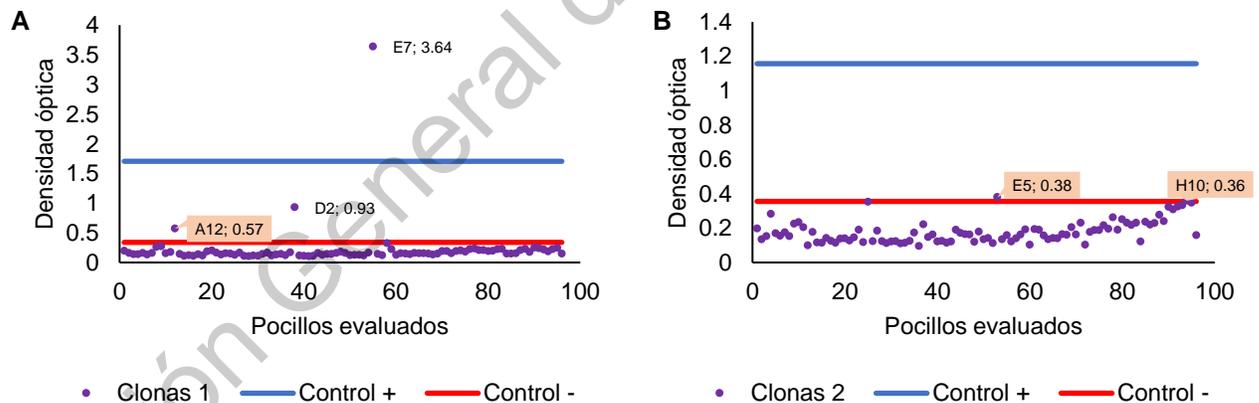
Dirección General de Bibliotecas UAQ

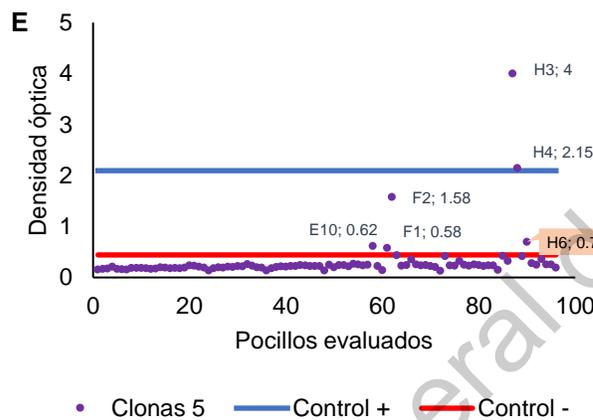
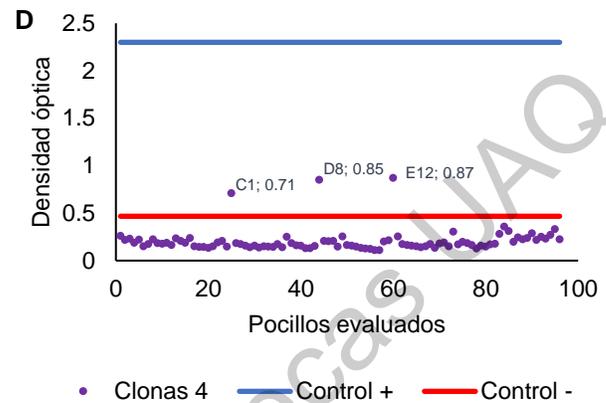
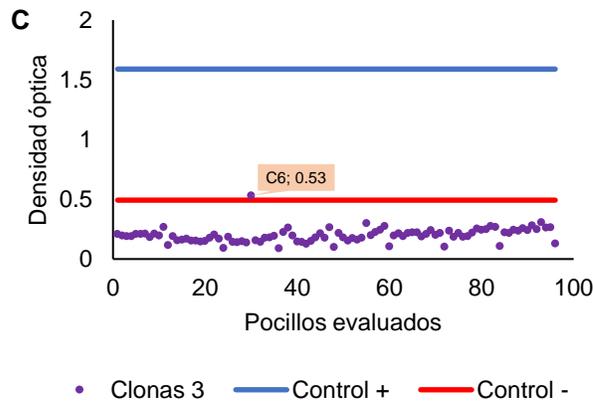


**Figura 4:** Selección bioquímica HAT de hibridomas productores de anticuerpos anti-RAP1-P3BBOV. Panel A: células B de ratón *BALB/c* (células pequeñas) y de mieloma (células grandes) al día 1 después de la fusión celular. Panel B: híbridos al día 2. Panel C: colonia de hibridomas al día 7; paneles D y E: colonias de híbridos al día 12 y panel F: grandes colonias de células al día 15. Imágenes tomadas con el objetivo 20X y 10X para los paneles A, B y C y los paneles D, E y F, respectivamente.

### Evaluación de hibridomas

En la evaluación por ELISA de los hibridomas de las cinco placas de cultivo rotuladas como 1, 2, 3, 4 y 5 se obtuvo un total de 15 clonas o pocillos de la placa que resultaron con valores de densidad óptica superiores al punto de corte del control negativo (suero preinmune), de los cuales tres tuvieron superaron al punto de corte del control positivo (1E7, 5H3 y 5H4), mientras que cinco clonas presentaron las células muertas (1A12, 2E5, 2H10, 3C6 y 5H6), por lo que solo 10 pozos fueron clonados; dos provenientes de la línea clonal 1 (1D2 y 1E7), tres de la línea 4 (4C1, 4D8 y 4E12) y cinco de la línea clonal 5 (5E10, 5F1, 5F2, 5H3 y 5H4) (Figura 5). Posteriormente, los resultados de las subsecuentes evaluaciones tanto de las 10 clonas como de las subclonas resultantes (gráficos no mostrados) revelaron un total de 29 subclonas positivas anti RAP1-P3BBOV y 50 sub-sub-clonas generadas a partir de seis de las 29 sub-clonas (Cuadro 5).





F	Línea clonal (Placa de cultivo)	Clona (Pozo)	DO	Supervivencia clonal +/-
1		A12	0.57	-
		D2	0.93	+
		E7	3.64	+
2		E5	0.38	-
		H10	0.36	-
3		C6	0.53	-
4		C1	0.71	+
		D8	0.85	+
		E12	0.87	+
		H6	0.7	-
5		E10	0.62	+
		F1	0.58	+
		F2	1.58	+
		H3	4	+
		H4	2.15	+
		H6	0.7	-

**Figura 5:** Evaluación de los hibridomas de las líneas clonales 1 al 5. Los paneles A, B, C, D y E muestran la evaluación de los 96 pocillos de las placas de cultivo de la línea clonal 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Las líneas en color rojo y azul muestran el punto de corte con respecto al control negativo y positivo, respectivamente. Los marcadores en color morado seleccionados para la clonación celular están identificados con sus coordenadas de la placa seguido de su densidad óptica. Aquellos marcadores con coordenadas resaltadas en color naranja presentaron los hibridomas muertos. Panel F: identificación del total de clonas celulares (pocillos de las placas) obtenidos de las cinco líneas clonales (placas de cultivo).



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**

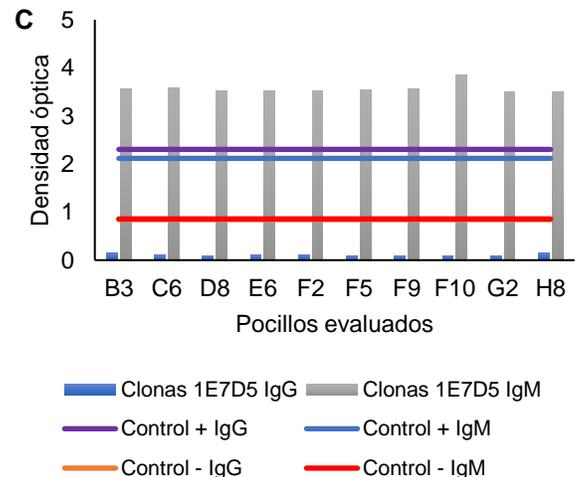
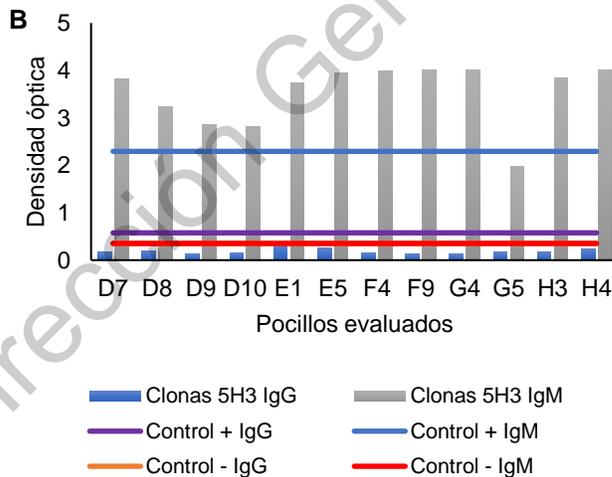
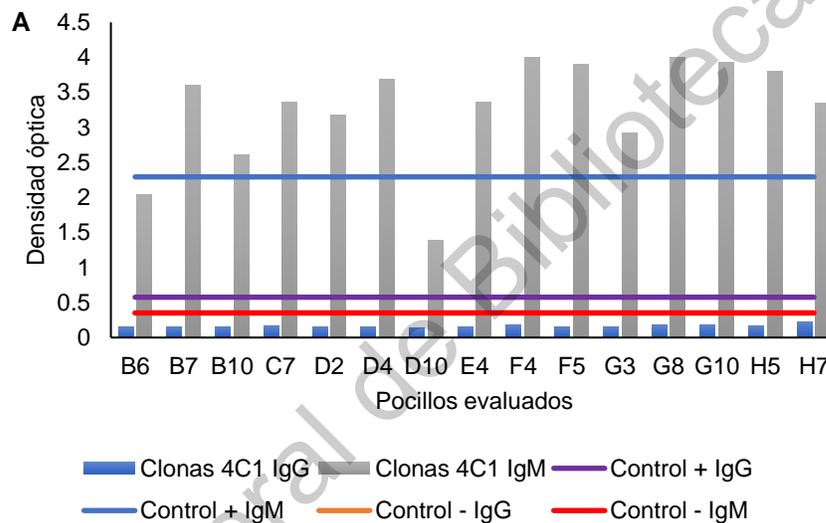


**Cuadro 5: Esquema de clonación de hibridomas**

Línea clonal	Clona	Sub-clona	Sub-sub-clona		
1	1A12	Muertas	10 de 1E7D5		
	1D2	Clonada		-	
	1E7	Clonada		1E7D5 Clonada	
2	2E5	Muertas			
	2H10	Muertas			
3	3C6	Muertas			
4	4C1	Clonada	4C1G8 Clonada	12 de 4C1G8	
			4C1G10 Clonada	4C1G10D2	
			+ 13 Sub-clonas Congeladas	-	
	4D8	Clonada	4D8B6 Clonada	-	
			4D8G2 Muerta		
	4E12	Clonada	-		
5	5E10	Clonada	-		
	5F1	Clonada	-		
	5F2	Clonada	-		
	5H3	Clonada	5H3E1	Clonada	5 de 5H3E1
			5H3F9	Clonada	11 de 5H3f9
			5H3G4	Clonada	11 de 5H3G4
			+ 9 Sub-clonas Congeladas	-	
5H4	Clonada	-			
5H6	Muerta				
<b>Total =</b>	<b>10 clonas</b>	<b>29 Sub-clonas</b>	<b>50 Sub-sub-clonas</b>		

### Isotipificación de anticuerpos monoclonales

Las densidades ópticas obtenidas de la evaluación por ELISA con anticuerpos específicos anti-inmunoglobulinas IgG e IgM de las sub-clonas y sub-sub-clonas de las líneas 1, 4 y 5 indican que todos lo hibridomas generados producen anticuerpos del tipo M (Figura 6). El resultado de la isotipificación de cada una de las 50 sub-sub-clonas obtenidas muestra que al igual que las 29 sub-clonas, el tipo de anticuerpos es IgM (resultados no mostrados).



**Figura 6:** Isotipificación de anticuerpos de sub-clonas y sub-sub-clonas celulares por ELISA. Panel A y B: determinación del tipo de inmunoglobulina de las sub-clonas generadas de la clona 4C1 y 5H3, respectivamente. Panel C: determinación del tipo de inmunoglobulina de las sub-sub-



clonas producidas por la sub-clona 1E7D5. Las líneas paralelas muestran el punto de corte de los controles positivo y negativo (suero de ratón postinmune y preinmune, respectivamente) evaluados tanto con anticuerpos específicos anti-IgG como anti-IgM, mientras que las barras perpendiculares azul y gris indican las densidades ópticas obtenidas de las clonas al evaluar el tipo de inmunoglobulina IgG e IgM, respectivamente.

### Cuantificación de anticuerpos monoclonales

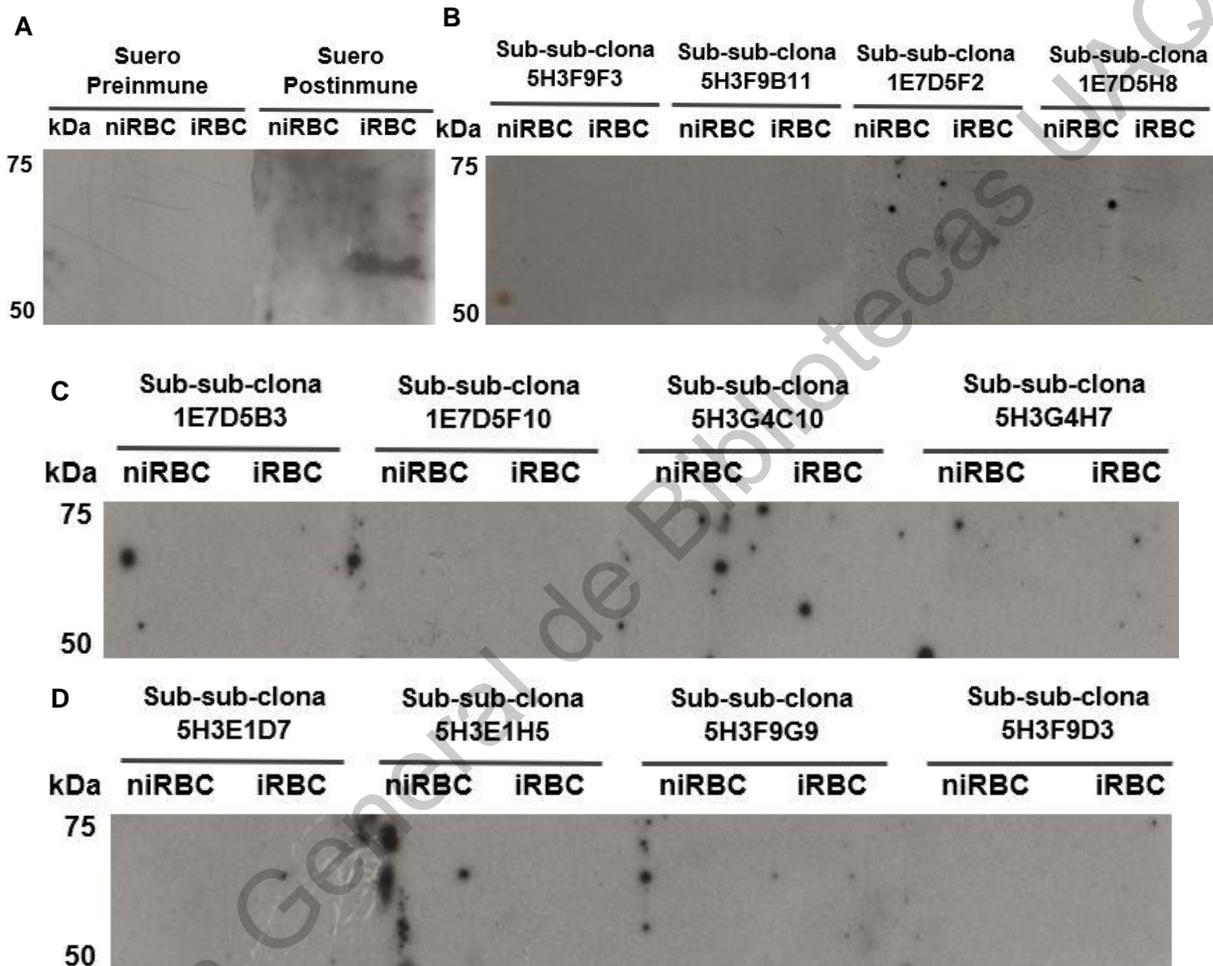
Los resultados de la purificación de anticuerpos monoclonales indican que el rendimiento en la concentración obtenida fue de 0.6407 hasta 0.9160 mg/ml en las distintas subclonas (Cuadro 6).

**Cuadro 6: Concentración de anticuerpos monoclonales anti-RAP1-P3BBOV**

Línea clonal	Sub-sub-clonas	Densidad óptica	Concentración mg/ml
1	1E7D5C6	0.9	0.8164
	1E7D5E6	0.96	0.9169
4	4C1G8E9	0.8	0.6315
	4C1G10D2	0.87	0.7605
5	5H3G4C10	0.87	0.7656
	5H3F9B11	0.80	0.6407

### Identificación del antígeno nativo Rap-1 de *Babesia bovis* por Western blot (WB)

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos monoclonales, se realizó un western blot utilizando extracto de proteínas de eritrocitos no infectados (niRBC) e infectados con merozoitos de *Babesia bovis* (iRBC). Ambos extractos se evaluaron con anticuerpos de suero de ratón previo a las inmunizaciones y después de las inmunizaciones como control negativo y positivo, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran una única banda a la altura del peso esperado de Rap-1 de *B. bovis* (60 kDa) en el carril con extracto de proteínas de iRBC cuando fue incubado con suero postinmunización (Figura 7, panel A). De los 12 anticuerpos monoclonales evaluados, solo dos anticuerpos provenientes de la línea clonal 1 de las sub-sub-clonas 1E7D5F2 y 1E7D5H8, mostraron resultados positivos. Al revelado de las placas se muestra una banda de intensidad débil con cada uno de los anticuerpos, a la altura del peso esperado de Rap-1 (Figura 7, paneles A y B). No se observó señal cuando se utilizaron los otros 10 anticuerpos (Figura 7, paneles B, C y D).



**Figura 7:** Evaluación de los anticuerpos monoclonales con los extractos de proteína de eritrocitos no infectados (niRBC) e infectados con merozoitos de *Babesia bovis* (iRBC) mediante western blot. Panel A: controles negativo y positivo (suero de ratón no inmunizado e inmunizado con RAP1-P3BBOV, respectivamente). Paneles B, C y D: incubación de los sobrenadantes de medio de cultivo de 12 sub-sub-clonas celulares a extractos de proteína de eritrocitos no infectados e infectados.



## DISCUSIÓN

A la fecha, el diagnóstico clínico de la babesiosis bovina se realiza por medio de microscopía de campo claro a partir del análisis de parásitos intraeritrocíticos de muestras de sangre periférica de bovinos con signos de fiebre, hematuria y anemia, tal como se realizaba hace más de 120 años. Así mismo, el diagnóstico serológico de oro en México es la inmunofluorescencia indirecta (Mosqueda et al., 2012). Esto se debe a que las pruebas de escrutinio que existen hasta el momento solo son útiles para ciertas regiones geográficas, ya que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales generados a partir de proteínas recombinantes completas de una cepa en específico para identificar al parásito y/o a sus antígenos (Goff et al., 2003; Kim et al., 2007; Kim et al., 2008), lo que disminuye su grado de especificidad contra las diversas cepas de *Babesia bovis* que existen en México y el mundo. No obstante, actualmente con la ayuda de herramientas bioinformáticas y distintos programas de software, así como los avances en tecnología genómica y proteómica, surgen nuevas estrategias de búsqueda de epítopos conservados en antígenos las distintas cepas reportadas a nivel mundial (Ponomarenko et al., 2008; Kringelum et al., 2012), permitiendo así recopilar y generar información más específica de cierto grupo de organismos para la generación de métodos de diagnóstico más específicos. Como ejemplo de ello se encuentra el péptido RAP1-P3BBOV generado en el Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro, el cual se trata de una cadena polipeptídica sintética de 14 aminoácidos conservados entre diferentes cepas geográficas, obtenido del análisis bioinformático de epítopos B, regiones hidrofílicas e hidrofóbicas y grado de conservación entre las distintas secuencias del antígeno nativo RAP-1 de *B. bovis* reportadas a nivel mundial.

El péptido sintético RAP1-P3BBOV promete resolver los problemas de especificidad y afinidad que presentan las pruebas de escrutinio para el diagnóstico de *B. bovis* al utilizar anticuerpos monoclonales sintetizados a partir de éste, pues cumple las bases con las que debe de contar un antígeno para ser utilizado en un método de diagnóstico, las cuales constan de una secuencia de aminoácidos del antígeno RAP-1 específica de *B. bovis*, conservada entre distintas cepas geográficas, así como su presencia en fases infectivas e intraeritrocíticas del parásito, tanto de manera externa en su membrana apical como interna en las roptrias (Mosqueda et al., 2012).

La evaluación de la respuesta inmune humoral de los ratones *BALB/c* ante el péptido RAP1-P3BBOV muestra una progresión en el nivel de los títulos de anticuerpos generados después de la segunda inmunización (Figura 2) con respecto al resultado obtenido de los sueros preinmunización. Sin



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



embargo, la densidad óptica en la evaluación de los sueros después de la cuarta inmunización (Figura 3) disminuye en la primera dilución 1:500; no obstante, la DO se mantiene elevada hasta la dilución 1:4000 a diferencia de los títulos después de la segunda inmunización, los cuales caen exponencialmente en la dilución 1:1000. Esto probablemente a que los suero de ratón después de la cuarta inmunización contienen una concentración muy elevada de anticuerpos anti-RAP1-P3BBOV, lo que provoca una saturación de la muestra a la hora del reconocimiento antígeno-anticuerpo, imposibilitando que la concentración total de antígeno que se encuentra cubriendo el pozo de la placa se una a los anticuerpos a causa de impedimentos estéricos (Weis-Garcia and Carnahan, 2017). Por otro lado, las evaluaciones de la respuesta inmune que se realizaron en el presente trabajo fueron básicas, ya que muchas veces se suelen realizar evaluaciones más específicas como la determinación de los títulos de anticuerpos tanto IgG como IgM con el objetivo de identificar el tipo de anticuerpos y respuesta que presentan los animales ante diferentes antígenos y así aumentar la probabilidad de obtener cierto tipo de inmunoglobulinas a la hora de realizar la fusión celular (Greenfield, 2014; Weis-Garcia and Carnahan, 2017), pues la evaluación de las densidades ópticas es una medida indirecta para conocer la cantidad de células B plasmáticas y el tipo de anticuerpos que se están generando (Weis-Garcia and Carnahan, 2017). Además, también es posible realizar evaluaciones de la respuesta inmune humoral no solo contra el antígeno sintético con el que fueron inmunizados los ratones, sino también contra la proteína nativa para reconocer desde un inicio si los anticuerpos generados podrán identificar al parásito. No obstante, para ello también es necesario contar con una técnica de evaluación ya estandarizada, así como se cuenta con la técnica de ELISA indirecto estandarizada para el antígeno sintético (Greenfield, 2014).

La fusión celular se realizó con el ratón identificado como “Cola”, pues además de presentar una densidad óptica superior al punto de corte del control negativo a una dilución 1:4000, fue el que generó mayor título de anticuerpos, lo que aumenta en probabilidad la obtención de mejores resultados de eficiencia en la generación de hibridomas productores de anticuerpos anti-RAP1-P3BBOV (Fuller et al., 1992). Este resultado se confirmó al finalizar el proceso de selección bioquímica, pues por cada una de las cinco placas de cultivo de 96 pozos se obtuvo un aproximado de 17 pocillos con dos a tres clonas celulares cada pozo, lo que se traduce en la generación de 200 a 250 clonas celulares por fusión (Figura 4). Sin embargo, de estos 85 pocillos que presentaron clonas celulares solo 10 pozos fueron positivos al evaluarse por ELISA anti-RAP1-P3BBOV (Figura 5), lo que indica una eficiencia del 2.08%, mismo que se encuentra por encima del valor teórico de eficiencia reportado por Köhler y Milstein (1975), ya que además de que se obtuvo un total de 50



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



sub-sub-clonas, faltó por clonar 22 sub-clonas más que fueron congeladas debido a la cantidad de medio de cultivo que se requería (Cuadro 5).

La evaluación de la isotipificación de anticuerpos se realizó tanto a las sub-clonas como a las sub-clonas celulares, mostrando que los valores de densidad óptica solo superaban al punto de corte del control negativo cuando éstos fueron evaluados con un anticuerpo secundario contra la cadena específica  $\mu$  presente en las inmunoglobulinas de tipo IgM (Figura 6). Estos resultados pueden deberse a cuatro principales factores: 1) el antígeno utilizado no tiene la capacidad de generar una respuesta inmunitaria humoral prolongada en los ratones a causa de que sus secuencia de aminoácidos no es reconocida por el MHC de tipo II del ratón al ser procesado por las células B y por lo tanto no es presentado a las células T, o que los receptores de las células T del ratón no pueden reconocer el fragmento peptídico presentado por el MHC II, imposibilitando una respuesta mediada por correceptores y citocinas que ayudan en el proceso de cambio del tipo de inmunoglobulina; 2) el adyuvante utilizado con el antígeno en las inmunización no genera una respuesta inmunológica eficiente por las células B al momento de ser reconocido y procesado (Harlow and Lane, 1988); 3) el esquema de inmunización para dicho antígeno requiere más inmunizaciones y/o tiempo entre las mismas para permitir una mejor maduración de la afinidad y 4) la técnica de evaluación necesita más restricciones a la hora de la selección de los pocillos positivos (Fuller et al., 1992; Greenfield, 2014; Weis-Garcia and Carnahan, 2017), por ejemplo al realizar la evaluaciones únicamente con anticuerpos secundarios que reconozcan la cadena  $\gamma$  de las inmunoglobulinas IgG y/o utilizar tanto el antígeno sintético RAP1-P3BBOV como la proteína nativa RAP-1 en el tamizaje de las placas de ELISA. Todo ello, dependiendo de los requerimientos y la finalidad para la que vayan a ser utilizados los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpo monoclonales purificados (Cuadro 6) fueron seleccionados debido a que presentaron densidades ópticas muy por encima del punto de corte del control positivo y a que se pretende realizar evaluaciones futuras por medio de ELISA para la determinación de su afinidad contra el antígeno, además de que las células híbridas de cada clona seleccionada presentaban un crecimiento y división celular normal a diferencia de algunas otras clonas celulares que aún exhibían inestabilidad durante el cultivo (Greenfield, 2014). No obstante, a pesar de que la purificación de dichos anticuerpos se realizó con las columnas comerciales *HiTrap IgM Purification HP* y que se mostraron rendimientos de concentración considerables, es necesario realizar dicho proceso bajo condiciones de temperatura más favorables como lo puede ser dentro de un cuarto frío, ya que éste



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



método y los que existen al momento son poco eficientes para el aislamiento de anticuerpos del tipo IgM al ser tardados, laboriosos, costosos y muchas veces poco específicos (Harlow and Lane, 1988), además de que dichos anticuerpos a diferencia de los de tipo IgG muestran mayor degradación a diferentes condiciones. Por otro lado, es preferible realizar la purificación de los anticuerpos monoclonales una vez que han sido evaluadas por métodos rápidos como inmunofluorescencia y western blot estandarizados contra la proteína nativa para la que están destinados a reconocer, utilizando el sobrenadante del medio de cultivo, preferentemente libre de suero fetal bovino y proteínas, para ello se puede utilizar el medio *Hybri-Max*<sup>TM</sup> Sigma con el objetivo de eliminar inespecificidades en las pruebas.

Los resultados de la identificación del antígeno nativo RAP-1 de *B. bovis* por western blot mostraron que el suero postinmunización utilizado como control positivo presenta anticuerpos capaces de reconocer la proteína nativa de 60 kDa en los extractos de proteína de eritrocitos infectados, mientras que en el suero preinmunización no se identificó la proteína (Figura 7). Estos resultados indican que a partir del péptido sintético RAP1-P3BBOV se puede generar una respuesta humoral en ratones capaz de reconocer al antígeno RAP-1 de *B. bovis*, por lo que se espera que resulte algún hibridoma productor de anticuerpos que no solo reconozca al péptido sintético, sino también a la proteína nativa. Hecho que se confirma por las clonas celulares 1E7D5F2 y 1E7D5H8, las cuales también reconocieron la proteína de 60 kDa. No obstante, esto lo hacen con baja afinidad ya que para el caso de la clona 1E7D5H8, la banda observada fue débil. Ello puede deberse a que para la prueba se utilizó el sobrenadante de medio de cultivo proveniente de pocillos de placas de cultivo de 12 pozos con 2 a 4 ml de medio, donde en muchas ocasiones los nutrientes del medio son utilizados por las células para la producción de moléculas esenciales para su crecimiento y división celular y una baja cantidad para la generación de anticuerpos, produciendo así diminutas concentraciones de estos (Greenfield, 2014). Además, no fue posible utilizar el sobrenadante sin diluir por la inespecificidad que causaban las proteínas del suero fetal que contiene, así como tampoco se pudieron evaluar las 50 sub-sub-clonas celulares obtenidas debido a la cantidad de extracto de proteínas que se necesita para realizar cada evaluación. Una forma de solucionar los problemas derivados de la señal débil observada sería mediante la concentración de los sobrenadantes por membranas de talla molecular específica, reduciendo el volumen hasta 50 veces. Por todo ello, es preciso contar con diferentes técnicas ya estandarizadas para la evaluación de los hibridomas tanto para la detección de anticuerpos IgG como IgM por medio de ELISA así como también para la identificación de antígenos nativos y de esta manera poder reducir el número de evaluaciones a



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



realizar, ya que una vez que se inicia el proceso de evaluación de hibridomas es muy complicado efectuar las estandarizaciones por el trabajo que consume dar el seguimiento a las clonas celulares (Greenfield, 2014; Weis-Garcia and Carnahan, 2017).

A pesar de que el péptido sintético RAP1-P3BBOV parece ser un excelente candidato para la generación de anticuerpos monoclonales no solo porque fue generado a partir de secuencias de aminoácidos específicos y conservados dentro de la especie *B. bovis*, sino también porque demostró que es posible generar una respuesta humoral en ratones capaz de identificar la proteína nativa RAP-1, es necesario realizar más pruebas para una caracterización más detallada de los anticuerpos monoclonales generados en el presente trabajo, así como realizar modificaciones en los protocolos utilizados para las evaluaciones de los hibridomas, tomando como base los resultados que se obtuvieron de este trabajo y los resultados esperados o que se pretenden conseguir. Esto debido a que el sistema inmunológico de los ratones responde de manera muy diferente frente a un antígeno en específico, lo que resulta en ensayos de prueba y error a la hora de generar una respuesta inmunitaria deseada (Fuller et al., 1992). Además, es posible también dirigir los resultados de la fusión celular para la obtención de anticuerpos monoclonales de mayor afinidad, especificidad contra la proteína nativa y/o cambiar el isotipo de inmunoglobulina. Esto al utilizar distintas concentraciones de antígeno para las evaluaciones de afinidad, incluir la proteína nativa para las evaluaciones desde un inicio, realizar la evaluaciones específicamente contra la clase de anticuerpos que se pretendan obtener, etc (Weis-Garcia and Carnahan, 2017). Sin embargo, todo esto conlleva a una reducción significativa de los resultados positivos, lo que implica generar un cambio en los parámetros de selección entre resultados positivos y negativos para así impedir la pérdida de muestras valiosas.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



## **CONCLUSIÓN**

Se generaron 50 anticuerpos monoclonales contra el péptido RAP1-P3BBOV, de los cuales 12 fueron caracterizados y dos de ellos reconocieron el antígeno nativo Rap-1 de *B. bovis*, por lo que se acepta la hipótesis planteada en el presente trabajo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## LITERATURA CITADA

- Bock, R., L. Jackson, A. De Vos, and W. Jorgensen. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 129:S247–S269. doi:10.1017/S0031182004005190.
- Böse, R., W. K. Jorgensen, R. J. Dalgliesh, K. T. Friedhoff, and A. J. de Vos. 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57:61–74. doi:10.1016/0304-4017(94)03111-9.
- Brown, W. C., T. F. McElwain, B. J. Ruef, C. E. Suarez, V. Shkap, C. G. Chitko-McKown, W. Tuo, A. C. Rice-Ficht, and G. H. Palmer. 1996. *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains. *Infect. Immun.* 64:3341–3350.
- Buling, A., A. Criado-Fornelio, G. Asenzo, D. Benitez, J. C. Barba-Carretero, and M. Florin-Christensen. 2007. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* 147:16–25. doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.031.
- Carcy, B., E. Précigout, T. Schetters, and A. Gorenflot. 2006. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet. Parasitol.* 138:33–49. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.038.
- de Castro, J. J. 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol.* 71:77–97.
- Coffman, R. L., H. F. Savelkoul, and D. A. Leberman. 1989. Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. *Semin. Immunol.* 1:55–63.
- Cotton, R. G. H., and C. Milstein. 1973. Fusion of Two Immunoglobulin-producing Myeloma Cells. *Nature*. 244:42–43. doi:10.1038/244042a0.
- Dubremetz, J. ., N. Garcia-Réguet, V. Conseil, and M. N. Fourmaux. 1998. Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28:1007–1013. doi:10.1016/S0020-7519(98)00076-9.
- Estes, D. ., W. . Brown, and A. Hirano. 1998. CD40 ligand-dependent signaling of bovine B lymphocyte development and differentiation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63:15–20. doi:10.1016/S0165-2427(98)00077-4.
- Fagraeus, A. 1947. Plasma Cellular Reaction and its Relation to the Formation of Antibodies *in vitro*. *Nature*. 159:499. doi:10.1038/159499a0.
- Fahrimal, Y. 1992. Detection of *Babesia bovis* Carrier Cattle by Using Polymerase Chain Reaction Amplification of Parasite DNA. *J Clin Microbiol.* 30:6.
- Florin-Christensen, M., C. E. Suarez, A. E. Rodriguez, D. A. Flores, and L. Schnittger. 2014. Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*. 141:1563–1592. doi:10.1017/S0031182014000961.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



- Fuller, S. A., M. Takahashi, and J. G. R. Hurrell. 1992. Immunization of Mice. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 18:11.4.1-11.4.6. doi:10.1002/0471142727.mb1104s18.
- Gaffar, F. R. 2004. Invasion of Erythrocytes by *Babesia bovis*. Utrecht University, Utrecht.
- Giovannini, D., S. Späth, C. Lacroix, A. Perazzi, D. Bargieri, V. Lagal, C. Lebugle, A. Combe, S. Thiberge, P. Baldacci, I. Tardieux, and R. Ménard. 2011. Independent Roles of Apical Membrane Antigen 1 and Rhoptry Neck Proteins during Host Cell Invasion by Apicomplexa. *Cell Host Microbe.* 10:591–602. doi:10.1016/j.chom.2011.10.012.
- Goff, W. L., W. C. Davis, G. H. Palmer, T. F. McElwain, W. C. Johnson, J. F. Bailey, and T. C. McGuire. 1988. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56:2363–2368.
- Goff, W. L., T. F. McElwain, C. E. Suarez, W. C. Johnson, W. C. Brown, J. Norimine, and D. P. Knowles. 2003. Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Rhoptry-Associated Protein 1 Epitope Specifically Identifies *Babesia bovis*-Infected Cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:38–43. doi:10.1128/CDLI.10.1.38-43.2003.
- Goff, W. L., J. B. Molloy, W. C. Johnson, C. E. Suarez, I. Pino, A. Rhalem, H. Sahibi, L. Ceci, G. Carelli, D. S. Adams, T. C. McGuire, D. P. Knowles, and T. F. McElwain. 2006. Validation of a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against *Babesia bovis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:1212–1216. doi:10.1128/CVI.00196-06.
- Gohil, S., S. Herrmann, S. Günther, and B. M. Cooke. 2013. Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *Int. J. Parasitol.* 43:125–132. doi:10.1016/j.ijpara.2012.09.008.
- Greenfield, E. A. 2014. Generating Monoclonal Antibodies. 21.
- Guglielmone, A. A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57:109–119.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Homer, M. J., I. Aguilar-Delfin, S. R. Telford, P. J. Krause, and D. H. Persing. 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:451–469.
- Hunfeld, K., A. Hildebrandt, and J. Gray. 2008. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38:1219–1237. doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.001.
- Kim, C., A. Alhassan, R. A. Verdida, N. Yokoyama, X. Xuan, K. Fujisaki, S. Kawazu, and I. Igarashi. 2007. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. *Vet. Parasitol.* 148:137–143. doi:10.1016/j.vetpar.2007.05.016.
- Kim, C.-M., L. B. C. Blanco, A. Alhassan, H. Iseki, N. Yokoyama, X. Xuan, and I. Igarashi. 2008. Development of a Rapid Immunochromatographic Test for Simultaneous Serodiagnosis of Bovine Babesioses Caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:117–121. doi:10.4269/ajtmh.2008.78.117.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



- Klinman, N. R. 1967. Antibody with homogeneous antigen binding produced by splenic foci in organ culture. *Immunochemistry*. 6:757–759. doi:10.1016/0019-2791(67)90140-1.
- Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256:495–497. doi:10.1038/256495a0.
- Kringelum, J. V., C. Lundegaard, O. Lund, and M. Nielsen. 2012. Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. *PLOS Comput. Biol.* 8:e1002829. doi:10.1371/journal.pcbi.1002829.
- Laha, R., M. Das, and A. Sen. 2015. Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. *Trop. Parasitol.* 5:94. doi:10.4103/2229-5070.162490.
- Lempereur, L., R. Beck, I. Fonseca, C. Marques, A. Duarte, M. Santos, S. Zúquete, J. Gomes, G. Walder, A. Domingos, S. Antunes, G. Baneth, C. Silaghi, P. Holman, and A. Zintl. 2017. Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* Parasites. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 17:51–65. doi:10.1089/vbz.2016.1955.
- Levine, N. D. 1971. Taxonomy of the Piroplasms. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 90:2. doi:10.2307/3224894.
- Liu, J. K. H. 2014. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann. Med. Surg.* 3:113–116. doi:10.1016/j.amsu.2014.09.001.
- Lobo, C. A., M. Rodriguez, and J. R. Cursino-Santos. 2012. *Babesia* and red cell invasion: *Curr. Opin. Hematol.* 19:170–175. doi:10.1097/MOH.0b013e328352245a.
- Lorusso, V., M. Wijnveld, A. O. Majekodunmi, C. Dongkum, A. Fajinmi, A. G. Dogo, M. Thrusfield, A. Mugenyi, E. Vaumourin, A. C. Igweh, F. Jongejan, S. C. Welburn, and K. Picozzi. 2016. Tick-borne pathogens of zoonotic and veterinary importance in Nigerian cattle. *Parasit. Vectors.* 9. doi:10.1186/s13071-016-1504-7. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1504-7>
- Mahmuda, A., F. Bande, K. J. Kadhim Al-Zihiry, N. Abdulhaleem, R. A. Majid, R. A. Hamat, W. O. Abdullah, and Z. Unyah. 2017. Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects. *Trop. J. Pharm. Res.* 16:713. doi:10.4314/tjpr.v16i3.29.
- Marcelino, I., A. M. de Almeida, M. Ventosa, L. Pruneau, D. F. Meyer, D. Martinez, T. Lefrançois, N. Vachiéry, and A. V. Coelho. 2012. Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *J. Proteomics.* 75:4232–4250. doi:10.1016/j.jprot.2012.03.026.
- Merwin, R. M., and L. W. Redmon. 1963. Induction of Plasma Cell Tumors and Sarcomas in Mice by Diffusion Chambers Placed in the Peritoneal Cavity. 31:21.
- Mosqueda, J. 2002. *Babesia bovis* Merozoite Surface Antigen 1 and Rhoptry-Associated Protein 1 Are Expressed in Sporozoites, and Specific Antibodies Inhibit Sporozoite Attachment to Erythrocytes. *Infect. Immun.* 70:1599–1603. doi:10.1128/IAI.70.3.1599-1603.2002.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



Mosqueda, J., A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamu, and G. J Canto. 2012. Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr. Med. Chem.* 19:1504–1518.

Muraleedharan, K. 2015. *Babesia* and Babesiosis in Livestock of Karnataka State, India- An Overview. 3:8.

Nossal, G. J. V., and J. Lederberg. 1958. Antibody Production by Single Cells. *Nature.* 181:1419–1420. doi:10.1038/1811419a0.

Ord, R. L., and C. A. Lobo. 2015. Human Babesiosis: Pathogens, Prevalence, Diagnosis, and Treatment. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 2:173–181. doi:10.1007/s40588-015-0025-z.

Pabello, J. Á. G. 2010. *Inmunología veterinaria*. Editorial El Manual Moderno.

Petersen, B., and J. S. Ahmed. 2016. *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 251–259. Available from: [https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-43978-4\\_337](https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-662-43978-4_337)

Ponomarenko, J., H.-H. Bui, W. Li, N. Fusseder, P. E. Bourne, A. Sette, and B. Peters. 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics.* 9:514. doi:10.1186/1471-2105-9-514.

Potter, M., and C. R. Boyce. 1962. Induction of Plasma-Cell Neoplasms in Strain *BALB/c* Mice with Mineral Oil and Mineral Oil Adjuvants. *Nature.* 193:1086–1087. doi:10.1038/1931086a0.

Reduker, D. W., D. P. Jasmer, W. L. Goff, L. E. Perryman, W. C. Davis, and T. C. McGuire. 1989. A recombinant surface protein of *Babesia bovis* elicits bovine antibodies that react with live merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35:239–247.

Rodríguez-Vivas, R. I., L. Grisi, A. A. Pérez de León, H. Silva Villela, J. F. de J. Torres-Acosta, H. Frago Sánchez, D. Romero Salas, R. Rosario Cruz, F. Saldierna, and D. García Carrasco. 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. *Review. Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8:61. doi:10.22319/rmcp.v8i1.4305.

Sam-Yellowe, T. Y. 1996. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today.* 12:308–316.

Schnittger, L., A. E. Rodriguez, M. Florin-Christensen, and D. A. Morrison. 2012. *Babesia*: A world emerging. *Infect. Genet. Evol.* 12:1788–1809. doi:10.1016/j.meegid.2012.07.004.

Suarez, C. E., T. F. McElwain, I. Echaide, S. T. de Echaide, and G. H. Palmer. 1994. Interstrain conservation of babesial RAP-1 surface-exposed B-cell epitopes despite *rap-1* genomic polymorphism. *Infect. Immun.* 62:3576–3579.

Suarez, C. E., and S. Noh. 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet. Parasitol.* 180:109–125. doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.032.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



Suarez, C. E., G. H. Palmer, D. P. Jasmer, S. A. Hines, L. E. Perryman, and T. F. McElwain. 1991. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46:45–52.

Suarez, C. E., G. H. Palmer, T. LeRoith, M. Florin-Christensen, B. Crabb, and T. F. McElwain. 2004. Intergenic regions in the rhoptry associated protein-1 (*rap-1*) locus promote exogenous gene expression in *Babesia bovis*. *Int. J. Parasitol.* 34:1177–1184. doi:10.1016/j.ijpara.2004.07.001.

Tapia, D. G., and J. V. F. Millan. 2003. Babesiosis bovina: características relevantes de la respuesta inmune.

Vannier, E. G., M. A. Diuk-Wasser, C. Ben Mamoun, and P. J. Krause. 2015. Babesiosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 29:357–370. doi:10.1016/j.idc.2015.02.008.

de Waal, D. T., and M. P. Combrink. 2006. Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet. Parasitol.* 138:88–96. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.042.

Wagner, G. G., P. Holman, and S. Waghela. 2002. Babesiosis and heartwater: threats without boundaries. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 18:417–430.

Weis-Garcia, F., and R. H. Carnahan. 2017. Characterizing Antibodies. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2017:pdb.top093823. doi:10.1101/pdb.top093823.

Yokoyama, N., M. Okamura, and I. Igarashi. 2006. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet. Parasitol.* 138:22–32. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.037.

Yokoyama, N., B. Suthisak, H. Hirata, T. Matsuo, N. Inoue, C. Sugimoto, and I. Igarashi. 2002. Cellular Localization of *Babesia bovis* Merozoite Rhoptry-Associated Protein 1 and Its Erythrocyte-Binding Activity. *Infect. Immun.* 70:5822–5826. doi:10.1128/IAI.70.10.5822-5826.2002.

Dirección General de Bibliotecas



## ANEXOS

### Soluciones

Solución 1.- Solución de fosfatos (PB 10X)

- 1) Medir 800 ml de agua destilada
- 2) Agregar 2.62 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- 3) Agregar 11.5 g de Fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 4) Aforar a 1000 ml con agua destilada
- 5) Guardar a 4°C

Solución 2.- Solución salina de fosfatos (PBS 1X)

- 1) Medir 800 ml de agua destilada
- 2) Agregar 100 ml de solución 1
- 3) Agregar 8.75 g de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )
- 4) Disolver y ajustar el pH a 7.2
- 5) Aforar a 1000 ml con agua destilada
- 6) \*Si se va a utilizar para disolver el péptido RAP1-P3BBOV liofilizado, filtrar con un filtro para jeringa estéril con poros de 0.2  $\mu\text{m}$ .
- 7) Guardar a 4°C

Solución 3.- Solución RAP1-P3BBOV 1mg/ml

- 1) En un tubo de 1.5 ml pesar 1 mg de péptido RAP1-P3BBOV liofilizado
- 2) Agregar 1 ml de solución 2 filtrada y disolver
- 3) Guardar a 20°C

Solución 4.- Solución amortiguadora de carbonatos, 0.1 M.

- 1) Medir 800 ml de agua destilada
- 2) Agregar 3.18 g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- 3) Agregar 5.86 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )
- 4) Ajustar el pH a 9.6
- 5) Aforar a 1000 ml con agua destilada
- 6) Guardar a 4°C



Solución 5.- Solución de tamizaje para una placa de ELISA: 10 µg/ml de RAP1-P3BBOV

- 1) Medir 10 ml de solución 4
- 2) Agregar y disolver 100 µl de solución 3

\*Preparar al momento de usar

Solución 6.- Solución de lavado para ELISA: PBS-tween 20, 0.05%

- 1) Agregar 500 µl de Tween 20 a un litro de solución 2
- 2) Guardar a 4°C

Solución 7.- Solución de bloqueo para ELISA y Western blot, 5%

Para una placa de ELISA

- 1) Medir 20 ml de solución 2
- 2) Agregar y disolver 1 g de leche descremada

Para Western blot

- 1) Medir 50 ml de solución 36
- 2) Agregar y disolver 1 g de leche descremada

\*Preparar al momento de usar

Solución 8.- Solución de ácido cítrico, 0.1M

- 1) Medir 500 ml de agua destilada
- 2) Agregar y disolver 9.6 g de ácido cítrico
- 3) Guardar a 4° C

Solución 9.- Solución de citrato de sodio, 0.1M

- 1) Medir 500 ml de agua destilada
- 2) Agregar y disolver 12.9 g de citrato de sodio
- 3) Guardar a 4°C

Solución 10.- Solución cromógena de revelado por peroxidasa para una placa de ELISA

- 1) Medir y mezclar 5 ml de solución 8 y 5 ml de solución 9



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



- 2) Agregar 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD)
- 3) Agregar 4  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  al 30%

\*Preparar al momento de usar

Solución 11.- Solución de ácido sulfúrico, 2N

- 1) Medir 350 ml de agua destilada
- 2) Agregar cuidadosamente en campana de extracción 28.03 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ )
- 3) Aforar a 500 ml con agua destilada

Solución 12.- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)

- 1) Disolver un sobre de medio DMEM (Gibco™ DMEM, Powder, High Glucose, No Sodium Bicarbonate Buffer, No. Cat. 12100046) en 800 ml de agua tridestilada y desionizada o en Agua inyectable PiSA®.
- 2) Agregar 2 g de bicarbonato de sodio
- 3) Agregar 2 g de HEPES (Sigma-Aldrich®, No. Cat. H3375)
- 4) Agregar con una jeringa estéril 10 ml de antibiótico-antimicótico 100X (Gibco™, No. Cat. 15240-062)
- 5) Agregar con una jeringa estéril 10 ml de aminoácidos no esenciales 100X (Gibco™, No. Cat. 11140050)
- 6) Agregar 0.2 g de piruvato de sodio
- 7) Agregar con una jeringa estéril 1 ml de Tilosina 1000X
- 8) Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N
- 9) Aforar a 1000 ml con agua tridestilada desionizada o agua inyectable PiSA®.
- 10) En cabina de bioseguridad filtrar el medio en unidad de filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m
- 11) Almacenar en frascos estériles de 250 o 500 ml a 4°C.

Solución 13.- Suero Fetal Bovino (SFB) descomplementado

- 1) Mantener en baño María el suero fetal bovino grado cultivo celular (HyClone™ *Fetal Bovine Serum* (U.S.), *Defined*, No. Cat. SH3007003) a 56°C durante 30 min.
- 2) En cabina de bioseguridad fraccionar el suero en tubos estériles de 50 ml y almacenar a -20°C.

Solución 14.- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con 10% de SFB descomplementado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



- 1) En cabina de bioseguridad mediante una unidad de filtración de 500 ml medir y mezclar 450 ml de solución 12 y 50 ml de solución 13.
- 2) Filtrar el medio DMEM-10% SFB en unidad de filtración con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .
- 3) Almacenar en frascos estériles de 250 o 500 ml a 4°C.

Solución 15.- Solución de polietilenglicol (PEG),

- 1) Fraccionar una ampolleta de PEG (mol wt. 1300-1600) en alícuotas de 0.5 ml en tubos para criopreservación de 2 ml.
- 2) Almacenar hasta seis meses a 4°C.

Solución 16.- Suplemento hipoxantina, aminopterina y timina (HAT 50X) para medio

- 1) Reconstituir con el contenido de un vial HAT (*HAT Media Supplement (50x) Hybri-Max™*, Sigma-Aldrich®, No. Cat. H0262) con 10 ml de solución 12.
- 2) Guardar a 4°C

Solución 17.- Suplemento hipoxantina y timina (HT 50X) para medio

- 1) Reconstituir con el contenido de un vial HT (*HT Media Supplement (50x) Hybri-Max™*, Sigma-Aldrich®, No. Cat. H0137) con 10 ml de solución 12.
- 2) Guardar a 4°C

Solución 18.- Medio selectivo con hipoxantina, aminopterina y timina (HAT)

- 1) En una charola estéril de aproximadamente 10 – 12 cm de largo agregar 1 ml de solución 16 por cada 50 ml de solución 14.

\*Preparar 100 ml para resuspender los hibridomas de la fusión celular o 50 ml para cambiar el medio de los hibridomas de cinco placas de cultivo de 96 pozos en cabina de bioseguridad al momento de usar.

Solución 19.- Medio selectivo con hipoxantina y timina (HT)

- 1) En una charola estéril de aproximadamente 10 – 12 cm de largo agregar 1 ml de solución 17 por cada 50 ml de solución 14.

\*Preparar 50 ml para cambiar el medio de los hibridomas de cinco placas de cultivo de 96 pozos en cabina de bioseguridad al momento de usar.



Solución 20.- Solución de criopreservación

- 1) Mezclar nueve partes de solución 13 con una parte de dimetilsulfóxido (DMSO) calidad cultivo celular.
- 2) Filtrar la mezcla con un filtro para jeringa estéril con poros de 0.2  $\mu\text{m}$ .
- 3) Guardar a 4°C

Solución 21.- Solución de activación para membrana de diálisis

- 1) Medir 200 ml de agua destilada
- 2) Agregar 0.075 g de EDTA
- 3) Agregar 4 g de bicarbonato de sodio

\*Preparar al momento de usar y calentar hasta ebullición

Solución 22.- Coctel de inhibidores de proteasas

- 1) Medir 10 ml de solución 2 estéril
- 2) Agregar una tableta de inhibidores de proteasas (*cOplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, No. Cat. 04693159001) y resuspender
- 3) Guardar a 4°C

Solución 23.- Amortiguador de lisis

- 1) Medir 30 ml de agua destilada
- 2) Agregar 0.394 g de Tris-HCl
- 3) Agregar 0.438 g de NaCl
- 4) Agregar 0.018 g de EDTA
- 5) Resuspender y ajustar el pH de 9 a 9.5
- 6) Agregar 250  $\mu\text{l}$  de Triton X-100
- 7) Guardar a 4°C

Solución 24.- Buffer de carga 4X

- 1) Medir 5.5 ml de agua destilada en un tubo cónico de 15 ml
- 2) Agregar 0.1453 g de Tris-HCl
- 3) Agregar 0.8 g de SDS
- 4) Agregar 0.004 g de azul de bromofenol



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Licenciatura en Microbiología**



- 5) Disolver con mucho cuidado de no hacer espuma por calentamiento de 2 – 3 s en horno
- 6) Ajustar el pH a 6.8
- 7) Agregar 4 ml de glicerol al 100%
- 8) Agregar 0.5 ml de β-mercaptoetanol en campana de extracción
- 9) Guardar a -20°C en tubos de 1.5 ml

Solución 25.- Solución de carga de proteínas para Western blot

- 1) Preparar un volumen final de solución de carga de 150 µl a una concentración de 200 µg con alcance para 10 cargas de 20 µg/15 µl.
- 2) A partir de la concentración obtenida de la proteína total de *B. bovis* de la cuantificación Bradford, sustituir el valor en la incógnita  $[Proteína \frac{\mu g}{\mu l}]$  en las ecuaciones A y B y obtener el volumen de proteína (*Vol. Proteína*) que se utilizará para preparar la solución de carga.

Seguir las siguientes ecuaciones:

$$A. [Proteína \frac{mg}{ml}] = [Proteína \frac{\mu g}{\mu l}]$$

*Ejemplo:*

$$[2.5 \frac{mg}{ml}] = [2.5 \frac{\mu g}{\mu l}]$$

$$B. Vol. Proteína = \frac{[\frac{20 \mu g}{15 \mu l}][150 \mu l]}{[Proteína \frac{\mu g}{\mu l}]}$$

- 3) En un tubo de 1.5 ml agregar el *Vol. Proteína* obtenido, 37.5 ml de solución 24 y el resto de agua destilada hasta completar el volumen final de 150 µl.

Seguir el siguiente cuadro:

**Preparación de solución de carga de proteínas**

[Proteínas totales <i>B. bovis</i> ]	Solución 24 4X	Agua destilada	Volumen final
Vol. Proteína (µl)	37.5 µl	H <sub>2</sub> O = 150 µl – (Vol. Proteína (µl) + 37.5 µl)	150 µl

- 4) Guardar la solución de carga de proteínas hasta su uso a -20°C
- 5) Al momento de usas calentar la solución a 95°C por 5 min.



Solución 26.- Tris-base, 1.5M

- 1) Medir 15 ml de agua destilada
- 2) Agregar 3.634 g de Tris-base
- 3) Ajustar el pH a 8.8 y aforar a 20 ml con agua destilada
- 4) Guardar a 4°C

Solución 27.- Tris-HCl, 1M

- 1) Medir 15 ml de agua destilada
- 2) Agregar 3.152 g de Tris-base
- 3) Ajustar el pH a 6.8 y aforar a 20 ml con agua destilada
- 4) Guardar a 4°C

Solución 28.- Sodio dodecil sulfato, 10%

- 1) Medir 20 ml de agua destilada
- 2) Agregar 2 g de SDS
- 3) Disolver por calentamiento y almacenar a 4°C

Solución 29.- Persulfato de amonio, 10%

- 1) Pesar 0.01 g de persulfato de amonio en un tubo de 1.5 ml
- 2) Agregar 100 µl de agua destilada y disolver

\*Preparar al momento de usar

Solución 30.- Gel de corrida al 8% (1 gel, 5 ml)

- 1) Medir 2.3 ml de agua destilada
- 2) Agregar 1.3 ml de mix de poliacrilamida al 30%
- 3) Agregar 1.3 ml de solución 26
- 4) Agregar 0.05 ml de solución 28
- 5) Agregar 0.05 ml de solución 29
- 6) Agregar 0.003 ml de TEMED

\*Preparar al momento de usar

Solución 31.- Gel concentrador (1 gel, 2 ml)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



- 1) Medir 1.4 ml de agua destilada
- 2) Agregar 0.33 ml de mix de poliacrilamida al 30%
- 3) Agregar 0.25 ml de solución 27
- 4) Agregar 0.02 ml de solución 28
- 5) Agregar 0.02 ml de solución 29
- 6) Agregar 0.002 ml de TEMED

\*Preparar al momento de usar

Solución 32.- Amortiguador de corrida SDS-PAGE

- 1) Medir 800 ml de agua destilada
- 2) Agregar 3.027 g de Tris base
- 3) Agregar 14.26 g de glicina
- 4) Agregar 1 g de SDS previamente disuelto por calentamiento
- 5) Ajustar el pH a 8.3 y aforar a 1000 ml con agua destilada
- 6) Guardar a 4°C

Solución 33.- Amortiguador de transferencia para Western blot

- 1) Medir 800 ml de agua destilada
- 2) Agregar 3.0285 g de tris-base
- 3) Agregar 14.2632 g de glicina
- 4) Ajustar el pH a 8.3
- 5) Aforar a 1000 ml con metanol
- 6) Guardar a 4°C

Solución 34.- Rojo de Ponceau

- 1) Medir 5 ml de agua destilada
- 2) Agregar 0.01 g de rojo de Ponceau
- 3) Agregar 0.25 g de ácido acético glacial
- 4) Guardar a 4°C

Solución 35.- Solución TBS, 10X

- 1) Medir 300 ml de agua destilada



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología



- 2) Agregar 6.057 g de Tris-base
- 3) Agregar 43.85 g de NaCl
- 4) Ajustar el pH a 7.5 y aforar con agua destilada a 500 ml

Solución 36.- Solución de TBS, 1X

- 1) Medir 900 ml de agua destilada
- 2) Agregar 100 ml de solución 35
- 3) Guardar a 4°C

Solución 37.- Solución de TBST, 1X

- 1) Medir 1000  $\mu$ l de Tween 20
- 2) Agregar a 1 lt de solución 36
- 3) Guardar a 4°C

Solución 38.- Solución de incubación de anticuerpos para Western blot, 1% leche

- 1) Medir 5 ml de solución 36
- 2) Agregar 0.05 g de leche descremada
- 3) Agregar 250  $\mu$ l de sobrenadante de medio de cultivo de una clona celular (1:20), 5  $\mu$ l de suero preinmune o postinmune (1:1000) o 0.5  $\mu$ l de anticuerpo secundario *Anti-Mouse IgM,  $\mu$  chain specific-Peroxidase*.

\*Preparar al momento de usar

Solución 39.- Solución de lavado TBS-leche para Western blot, 2%

- 1) Medir 500 ml de solución 36
- 2) Agregar 10 g de leche descremada

\*Preparar al momento de usar

Solución 40.- Solución de lavado TBST-leche para Western blot, 2%

- 1) Medir 100 ml de solución 37
- 2) Agregar 2 g de leche descremada

\*Preparar al momento de usar