

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Identificación y caracterización molecular del gen de la *enolasa* de
*Babesia bigemina***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

ANA LAURA LUNA RODRÍGUEZ

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

México, Ciudad de México, 07 Junio 2019.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CODIRECTOR

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Profesor-Investigador en la Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

LECTORES

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Profesora-Investigadora Responsable del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Lilia López Cánovas

Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Elisa Azuara Liceaga

Profesora-Investigadora del Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

En testimonio de gratitud limitada mi institución, la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y al Posgrado en Ciencias genómicas por mi formación académica durante mi Licenciatura, por el apoyo y estímulo brindado mismos que posibilitaron la conquista de esta meta: Mi formación profesional con admiración y respeto.

A la UACM por el financiamiento del Proyecto en la modalidad Sembrando Propuestas: Inmunolocalización de la proteína enolasa del hemoparásito bovino *Babesia bigemina* y el apoyo para impresión y empastado de tesis.

A la Dra. Minerva Camacho y a la Dra. Jacqueline Castañeda como una muestra de mi cariño y agradecimiento, por todo el conocimiento transmitido y el apoyo brindado, por ser grandes científicas, guía, y apoyo en los momentos difíciles, porque hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida, les agradezco la orientación que siempre me han otorgado. Gracias

A la Universidad Autónoma de Querétaro, especialmente al Dr. Juan Joel Mosqueda por las facilidades otorgadas y permitirnos trabajar en conjunto

DEDICATORIA

A mis padres quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo: amor. A quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho. A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por esto y más... Gracias.

A mis hermanas Diana, Angélica y Cristina por haber significado la inspiración que necesitaba para terminar mi carrera profesional, prometiendo superación y éxitos sin fin, para devolver el apoyo brindado, y la mejor de las ayudas que puede haber.

Con amor.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Características generales de la babesiosis bovina	1
2. Etiología de la enfermedad	2
a) Signos clínicos de la enfermedad	4
b) Distribución geográfica de la babesiosis bovina	4
3. Estrategias de control y erradicación de la babesiosis bovina	6
4. Generalidades del parásito <i>Babesia bigemina</i>	8
a) Taxonomía del parásito	8
b) Aspectos estructurales del <i>phylum apicomplexa</i>	8
c) Transmisión	10
d) Ciclo de vida	11
e) Genómica de <i>Babesia bigemina</i>	15
f) Familias de proteínas de <i>Babesia spp</i>	18
II. ANTECEDENTES PARTICULARES	21
1. La proteína enolasa	21
2. La enolasa en protozoarios	25
3. Importancia del estudio de la proteína enolasa en <i>B. bigemina</i>	28
III. HIPÓTESIS	30
IV. JUSTIFICACIÓN	31
V. OBJETIVO GENERAL	32
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	32
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	33
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	35

1. Material biológico	35
2. Extracción de DNA de <i>B. bigemina</i> cepa Chiapas	36
3. Extracción de RNA	36
4. Amplificación del gen de la <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i> mediante PCR	37
5. Determinación de la expresión del gen mediante RT-PCR	38
6. Clonación en el vector TOPO® TA y análisis de clonas	39
7. Secuenciación	41
8. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del gen y la proteína enolasa de <i>B. bigemina</i>	42
9. Clonación del gen de la <i>enolasa</i> en el vector de expresión y análisis de clonas	43
10. Inducción y Análisis de expresión de la proteína enolasa recombinante	45
11. Purificación de la proteína enolasa recombinante y análisis de fracciones	46
12. Obtención de anticuerpos específicos para la enolasa	47
13. Titulación de anticuerpos contra la enolasa	47
14. Inmunodetección de la proteína enolasa de <i>B. bigemina</i> en sangre infectada con anticuerpos anti-enolasa	48
15. Inmunolocalización de la proteína enolasa con anticuerpos anti-enolasa	49
IX. RESULTADOS	50
1. Análisis <i>in silico</i> del gen de la <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i>	50
2. Amplificación del gen, clonación en TOPO y análisis de clonas	51
3. Secuenciación y análisis <i>in silico</i> del gen y la proteína enolasa	53
4. Expresión del gen de la <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i> en fase eritrocítica y el vector	57
5. Clonación en el vector de expresión pCold I y análisis de clonas	58
6. Análisis de expresión de la proteína recombinante y su purificación	60
7. Titulación de anticuerpos contra la enolasa obtenidos en conejos	63
8. Inmunodetección de la proteína enolasa en fase eritrocítica	65
9. Inmunolocalización de la proteína enolasa con anticuerpos anti-enolasa	66
X. DISCUSIÓN	67
XI. CONCLUSIONES	72
XII. BIBLIOGRAFÍA	73
XIII. ANEXOS	82

1. Soluciones y medios de cultivo	82
2. Congresos	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características genómicas de <i>B. bovis</i> , <i>T. parva</i> y <i>P. falciparum</i> .	15
Tabla 2.	Propiedades de siete secuencias genómicas de <i>Babesia</i>	17
Tabla 3.	Iniciadores para secuenciación del gen de la <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i>	41
Tabla 4.	Matriz de porcentaje de identidad creada por Clustal2.1 del alineamiento múltiple.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distintas especies de <i>Babesia</i> en hospederos y tejidos	3
Figura 2.	Situación actual del control de la garrapata <i>Boophilus</i> spp	5
Figura 3.	Morfología de parásitos del <i>phylum apicomplexa</i>	9
Figura 4.	Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp	14
Figura 5.	Mecanismo de reacción de la enolasa en la glicólisis	21
Figura 6.	Estructura tridimensional de la enolasa de <i>Trypanosoma brucei</i> en complejo con su inhibidor fosfonoacetohidroxamato (PAH)	23
Figura 7.	Representación de la unión de la enolasa y el plasminógeno y su efecto en la invasión de tejido	27
Figura 8.	Programa de ciclado para PCR del gen de la <i>enolasa</i> de <i>Babesia bigemina</i>	38
Figura 9.	Programa de ciclado para RT-PCR para un fragmento del gen de la <i>enolasa</i> y <i>ama-1</i>	39
Figura 10.	Programa de Ciclado de PCR para secuenciación	42
Figura 11.	Análisis y localización del gen de la <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i>	52
Figura 12.	Amplicón del gen de la <i>enolasa</i> mediante PCR	53
Figura 13.	DNAP de las clonas TOPO-enolasa completa	53
Figura 14.	Análisis de restricción con la enzima <i>EcoRI</i> de las clonas TOPO-enolasa	53
Figura 15.	Electroferograma de la secuencia del gen que codifica para la proteína enolasa de <i>B. bigemina</i> .	54
Figura 16.	Análisis <i>in silico</i> de regiones transmembranales de la proteína Enolasa	55
Figura 17.	Alineamiento Múltiple de la secuencias de aminoácidos de la enolasa de <i>B. bigemina</i> (cepa Chiapas), <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Babesia bovis</i> y <i>Theileria</i>	

annulata, analizadas mediante el programa ClustalW2 y representado por el programa BoxShade

		57
Figura 18.	Expresión del gen <i>enolasa</i> en fase eritrocítica y del vector mediante RT-PCR	58
Figura 19.	Análisis electroforético del vector-inserto para la transformación de células DH5 α de <i>Escherichia coli</i> .	59
Figura 20.	Análisis electroforético de las clonas pCold- <i>enolasa</i> DH5 α	60
Figura 21.	Análisis de la inducción de la proteína recombinante <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i>	62
Figura 22.	Cromatograma de la purificación de la proteína <i>enolasa</i> recombinante donde se empleó el protocolo “On column refolding”.	63
Figura 23.	Fracciones obtenidas mediante FPLC	63
Figura 24.	Gráficos de titulación de anticuerpos de suero de conejo	65
Figura 25.	Inmunodetección de la proteína <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i> en fase eritrocítica	66
Figura 26.	Inmunolocalización de la proteína <i>enolasa</i> de <i>B. bigemina</i>	67

ABREVIATURAS

PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
TBS-T	Amortiguador Tris-NaCl-Tween
kDa	Kilodaltones
rpm	revoluciones por minuto
g	Gramos
PM	Peso Molecular
pb	pares de bases
kb	Kilobases
μg	Microgramo
μl	Microlitro
°C	Grado Celsius
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
BSA	Albúmina de Suero Bovino
xg	Gravedades
S.O.C.	Caldo superóptimo con represión por catabolito
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
μm	Micras
U	Unidad
min	minutos

RESUMEN

Babesia bigemina es un patógeno transmitido por vectores que causa importantes pérdidas económicas a la industria ganadera en México y otros países. Los parásitos de *Babesia* tienen un ciclo de vida complejo, que incluye estadios asexuales en el huésped bovino y estadios sexuales en las garrapatas; se sabe poco acerca de los eventos moleculares y las proteínas que conducen a la invasión del intestino medio de las garrapatas. La enolasa es una enzima glicolítica con múltiples funciones. En muchos patógenos transmitidos por vectores, esta enzima desempeña una función importante en el proceso de invasión, ya que actúa como un receptor para la unión del plasminógeno en la superficie de una variedad de células, activando el plasminógeno a plasmina quien ayuda a degradar la fibrina de la matriz extracelular y favorece el proceso de invasión de patógenos. El objetivo de este trabajo fue identificar y estudiar el gen de la enolasa de *Babesia bigemina*. Para cumplir nuestro objetivo, amplificamos el gen por PCR, lo clonamos en el vector TOPO-TA y lo secuenciamos. Además, analizamos la expresión del gen mediante RT-PCR en muestras de la fase eritrocítica y en muestras de garrapatas. Por otra parte se clonó y expresó un fragmento de 300 aminoácidos de la enolasa *B. bigemina* para obtener anticuerpos específicos que se utilizaron para la inmunolocalización de la proteína en la fase eritrocítica. La longitud de la secuencia completa del gen es de 1366 pares de bases la cual contiene un intrón de 37 pb y codifica para una proteína de un peso molecular aparente de 47.51 kDa. El gen se expresa en eritrocitos infectados y garrapatas infectadas. La inmunofluorescencia mostró la localización de la proteína en el citosol, pero también se encontró asociada con membranas, lo que sugiere que posiblemente la proteína esté desarrollando otra función no glicolítica en *B. bigemina*. Este es el primer reporte de algunas de las características y posible función de la enolasa de *B. bigemina*, sin embargo es necesario realizar estudios adicionales para conocer la función de la enolasa de *B. bigemina*.

I. INTRODUCCIÓN

1. Características generales de la babesiosis bovina

La babesiosis bovina es una enfermedad infecciosa del ganado bovino causada por parásitos del género *Babesia* y transmitida por garrapatas (CFSPH., 2008). Esta es una de las enfermedades transmitida por ectoparásitos hematófagos más importantes a nivel mundial (Rojas et al., 2011). En el año de 1888 Víctor Babes reportó la babesiosis bovina en Rumania, el observó en la sangre del ganado cuerpos intraeritrocíticos, tiempo después en 1933 Theobald Smith y Frederick Kilborne revelaron los resultados de sus experimentos en los cuales se demuestra que la garrapata *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus* es el vector que transmite el parásito *Babesia* (Mosqueda et al., 2004; Smith et al., 1978).

En estudios de babesiosis se le ha dado prioridad al ganado por su importancia como reservorio y por lo tanto se le confiere relevancia epidemiológica debido al impacto en la economía pecuaria (CFSPH., 2008).

La babesiosis puede afectar a otras especies como el búfalo de agua (*Bubalis bubalis*) el búfalo africano (*Syncerus caffer*) y al venado de cola blanca que reside en México (*Odocoileus virginianus*) (SENASA., 2006). Alrededor de 1.3 billones de animales domésticos se encuentran en riesgo de ser infectados por este parásito y una gran parte de la población bovina del mundo, aproximadamente 1.2×10^9 , está potencialmente en riesgo de ser infectada por una o más especies de *Babesia* spp (Solorio et al., 1997).

En el año 1906 se presentó en Estados Unidos un fenómeno infeccioso en el ganado bovino; lo nombraron la fiebre de Texas o fiebre por garrapatas que en ese entonces le costó a EEUU cerca de 130.5 millones de dólares. Para el año 1943, se logró eliminar a la garrapata de estas zonas gracias a una campaña de erradicación. Actualmente estas zonas se encuentran en vigilancia por el Servicio de Inspección de Sanidad Agropecuaria (APHIS, por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA, por sus siglas en inglés) debido a que en algunas zonas de México no

se ha erradicado el vector, se ha registrado un aumento de infecciones en las zonas tropicales de México y puede llegar a propagarse (Benavides et al., 2016).

Las consecuencias ocasionadas por la babesiosis bovina se ven reflejadas en el impacto a la economía pecuaria y a la industria ganadera, directamente a través de la muerte de bovinos, desnutrición, abortos, baja en la producción de leche y pieles o cueros dañados, problemas de fertilidad, modificaciones en el hato y disminución del bienestar animal. El impacto indirecto se relaciona con los costos extras causados por el control de las garrapatas y los ingresos que no son recuperados. Estos gastos incluyen: vacunas contra las infecciones, acaricidas, servicios veterinarios y diagnóstico (CFSPH., 2007).

2. Etiología de la enfermedad

Seis especies de *Babesia* pueden ser causantes de babesiosis bovina, estas son *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. ovata* y *B. jakimovi*, estas se agrupan por tamaño en grandes y pequeñas y su especie está determinada por la diferenciación morfológica y serológica (Figura 1). Tres de estas especies se encuentran frecuentemente en el ganado bovino; *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*^{48, 49}. De estas, *B. bovis* se considera de mayor importancia seguida por *B. bigemina*, que con ayuda de su vector, infectó por un tiempo grandes áreas de EE.UU., gracias a estudios realizados en aquella época el parásito *B. bigemina* fue descubierto (CFSPH., 2008).

Las especies *B. bovis* y *B. bigemina* son las causantes fundamentales de esta infección y su importancia se debe a que el vector está ampliamente distribuido, estos parásitos pertenecen al *phylum apicomplexa* y llevan a cabo su ciclo de vida de manera sexual y asexual en el vector y en el hospedero mamífero, respectivamente (Cantu et al., 2007).

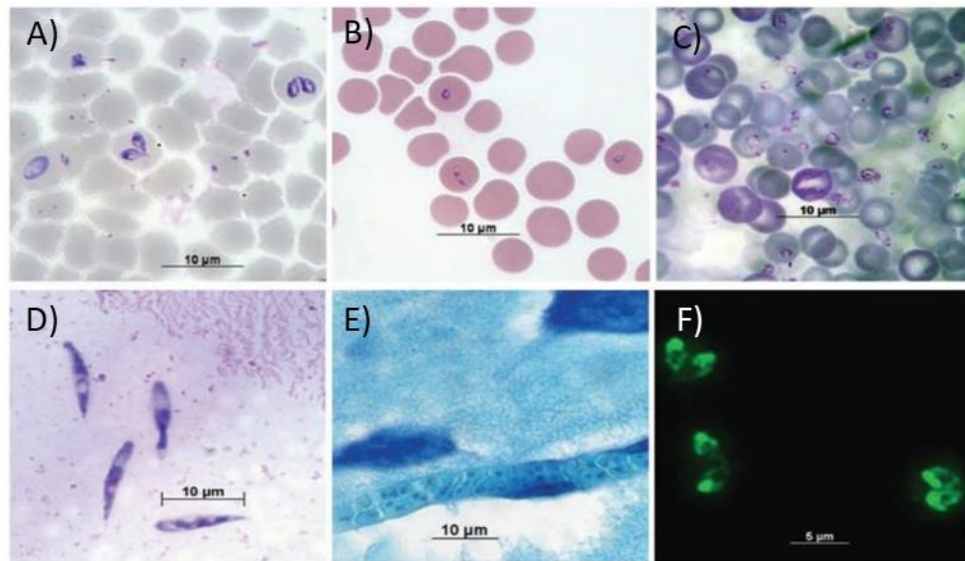


Figura 1. Distintas especies de *Babesia* en hospederos y tejidos. A) *B. bigemina* en eritrocitos bovinos. B) *B. bovis* en eritrocitos bovinos. C) *B. microti* en eritrocitos de ratón. D) *B. bigemina* en *Rhipicephalus*. E) *B. bovis* en un capilar de cerebro bovino. F) detección de *Babesia bigemina* mediante anticuerpos (IFAT) (Mosqueda et al., 2004).

B. bigemina se puede observar de forma intraeritrocítica en frotis sanguíneos y puede tomar forma redonda, ovalada o irregular (ameboide), ocupa el espacio intracelular del centro a la superficie. El nombre de *bigemina* le fue asignado porque peculiarmente forma dos corpúsculos en forma de pera dentro de los glóbulos rojos con sus extremos puntiagudos de forma encontrada. El parásito mide entre 3 a 4 µm de largo por 0.8 a 1.2 µm de ancho. Esta especie de *Babesia* pertenece a la forma grande y no a las pequeñas que miden aproximadamente la mitad de las grandes (Figura 1.a).

B. bigemina es considerada la menos patógena pero aun así esta especie suele causar casos severos de babesiosis en bovinos. Generalmente infecta en conjunto con otros parásitos expresando patogenicidad sinérgica y cuando alcanza una parasitemia del 1.0 % se agudiza la enfermedad (Solorio et al., 1997).

a) Signos clínicos de la enfermedad

Las manifestaciones clínicas que se presentan en los bovinos varían de acuerdo a la edad del bovino, generalmente los adultos muestran los signos clínicos a diferencia de bovinos menores a 9 meses que son asintomáticos. La especie y cepa del parásito también son factores influyentes en la manifestación de la infección (Coleman et al., 2001).

La babesiosis bovina causada por *B. bigemina* causa en el animal altas fiebres, anorexia y anemia a causa de la hemólisis, acompañada de hemoglobinuria y hemoglobinemia. Las membranas mucosas se observan pálidas. El bovino pierde rápidamente el apetito, su frecuencia cardíaca y respiratoria se acelera, se muestran débiles, deprimidos y con poco movimiento. Generalmente se alejan del hato bovino (SENASA., 2006).

Signos como ictericia, estreñimiento o diarrea pueden ser indicadores de un caso subagudo y en casos agudos se presenta insuficiencia respiratoria con disnea. En ocasiones el aumento en la temperatura corporal del animal puede ocasionar abortos en vacas preñadas y en el caso de toros se ha visto disminución de la fertilidad (Alonso et al., 2005).

En infecciones causadas por *B. bigemina* no se han reportado casos con daño en el Sistema Nervioso Central (SNC). Los animales que se sobreponen a la crisis anémica suelen encontrarse con debilidad y generalmente terminan recuperándose.

La transmisión intrauterina no es muy frecuente pero en estos casos los productos nacen débiles, anémicos, con ictericia y deshidratados, en algunos casos convulsionan y presentan fiebre (CFSPH., 2008).

b) Distribución geográfica de la babesiosis bovina

La distribución geográfica de la babesiosis bovina como tal no ha sido determinada pero se asocia a la distribución de su vector transmisor. Las garrapatas habitan en áreas tropicales del mundo debido a que las condiciones de los factores abióticos como

humedad y temperatura les benefician en su desarrollo y proliferación (Rojas et al., 2011).

Las garrapatas, al igual que muchos otros parásitos suelen diseminarse muy rápido; este fenómeno se da debido al transporte de sus hospederos ya que permanecen prendidos de ellos durante días, así llegan a otros lugares con la posibilidad de prenderse de nuevos hospederos para reproducirse y desarrollar otra población de garrapatas (Gale et al., 2012).

R. microplus es la garrapata más distribuida en el mundo y habita las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Esta garrapata afecta con regularidad zonas de la India, Asia tropical y subtropical, el nordeste de Australia, Madagascar, el sudeste de África, el Caribe, México, varios países en América Central, del Sur y aún se haya en la zona de cuarentena en Texas y California (Uilengberg et al., 2006).

El medio ambiente en las zonas ganaderas de México en áreas tropicales y subtropicales favorecen la proliferación de la garrapata *R. microplus*. La situación actual de la garrapata *R. microplus* en México muestra que el 30.6 % de la superficie se encuentra libre, pero el 65.96 % se encuentra en control y solo el 3.44% en erradicación (Figura 2) (SENASICA., 2017).



Figura 2. Situación actual del control de la garrapata *Boophilus* spp (SENASICA, 201).

La respuesta genética de las garrapatas a los acaricidas por la frecuencia y la cantidad de su uso, ha hecho que el vector desarrolle resistencia a éstos. En el año de 1981, en México en las áreas tropicales del país (Golfo de México y península de Yucatán) se identificaron poblaciones de garrapatas resistentes a acaricidas, los organofosforados (Solis., 1991; Solorio et al., 1997).

Lo anterior representa una problemática importante ya que de la misma manera que el vector se distribuye geográficamente mediante el movimiento del ganado infestado, es que la resistencia pueda ser llevada a zonas donde no se ha presentado este fenómeno.

3. Estrategias de control y erradicación de la babesiosis bovina.

La erradicación de la garrapata era considerada la manera eficaz para el control de la babesiosis bovina. El descubrimiento de moléculas con propiedades acaricidas llevó a la producción y consumo de químicos como organofosforados, carbamatos, inhibidores de quitina, piretroides y fenilpirazolonas por mencionar algunos, pero su

fácil acceso y mal uso provocó resistencia en las garrapatas del género *R. microplus* además de tener un impacto negativo en el ambiente (Araque et al., 2014).

El tratamiento de la babesiosis bovina por muchos años se ha limitado a algunos fármacos, luego de que los acaricidas resultaron contraproducentes, los fármacos más comunes son el imidocarb y el aceturato de diminazeno. En teoría, el imidocarb inhibe la producción de poliaminas y previene que el inositol entre en los eritrocitos infectados conteniendo al parásito, pero este no es recomendable puesto que tiene alta toxicidad y se han identificado residuos en la leche y la carne. El aceturato de diminazeno, un antiparasitario que actúa inhibiendo la glucólisis aeróbica y la síntesis de DNA, se retiró de algunos mercados por comercialización y ambos por causar resistencia en parásitos. Los antiparasitarios son eficaces cuando se logra hacer un diagnóstico temprano, suelen funcionar acompañados de transfusión sanguínea y algunas otras terapias de apoyo, sin embargo en casos avanzados de la enfermedad donde ya se presenta anemia, no muestran eficacia. Las drogas anti *Babesia* que se han desarrollado y que presentan mayor eficacia se han eliminado del mercado por problemas de seguridad o de residuos (Mosqueda et al., 2012).

La era posgenómica donde se ha desarrollado la secuenciación de genomas, provee información en masa para interpretar y estudiar los genomas y proyectos de *Babesia* spp, lo que facilita su estudio en conjunto con otras metodologías ya antes usadas para el control de la babesiosis bovina como el desarrollo de las vacunas vivas atenuadas, estas vacunas generadas contra *B. bovis* y *B. bigemina* fueron generadas en algunos países para aplicarlas al ganado bovino antes de la exposición a la enfermedad, descubriendo que es mejor vacunar a los bovinos menores de un año debido a que presentan problemas de hipersensibilidad a proteínas sanguíneas, estas vacunas presentaron potencial de virulencia y contaminación con otros patógenos en adultos, por lo que posiblemente podrían adquirir otra enfermedad, en caso de vacunación en adultos deben tomarse precauciones en cuanto a signos clínicos (Benavides et al., 2016). Las vacunas atenuadas confieren una rápida inmunidad al animal, entre 3 a 4 semanas, aun así no son del todo seguras. Se recomienda no exceder su uso en terneros y en

animales de edad avanzada, se sugiere también llevar acabo un tratamiento extra con fármacos anti Babesia (OIE., 2004). También se desarrollaron distintas vacunas recombinantes contra el vector, entre las que destaca como mejor inmunógeno la vacuna Bm86 obtenida de las microvellosidades intestino de la garrapata *R. microplus*. Esta vacuna genera reducción en el número de garrapatas, en su peso y la capacidad reproductiva de las hembras, sin embargo su efectividad es distinta de acuerdo a la ubicación geográfica, por la variación antigénica (Mosqueda et al., 2012).

4. Generalidades del parásito *Babesia bigemina*

a) Taxonomía del parásito

El científico Levine se dedicó a estudiar la taxonomía de los protozoarios *apicomplexa* y a su vez desarrolló un sistema de clasificación para *Babesia* spp el cual se muestra a continuación:

Reino	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Piroplasmorida</i>
Orden	<i>Piroplasmorida</i>
Familia	<i>Theileriidae, Dactylosomatidae, Babesiidae</i>
Género	<i>Entopolypoides, Echinozoon, <u>Babesia</u></i>

Levine también nombró y describió cada una de sus estructuras, etapas y procesos de los protozoarios *apicomplexa* (Levine., 1971).

b) Aspectos estructurales del *phylum apicomplexa*

Los Protozoos del *Phylum apicomplexa* se distinguen de otros protozoarios por 3 aspectos; el primero es que contienen un grupo de orgánulos exclusivo nombrado complejo apical y siempre está presente y bien diferenciado en la fase de zoíto donde se dispone a penetrar alguna célula. La segunda característica es que estos protozoarios llevan a cabo su ciclo biológico dentro del citoplasma es decir, son parásitos intracelulares y durante esta etapa el parásito se propaga de manera asexual en el hospedero. El tercer aspecto hace referencia a las fases de reproducción; la reproducción asexual donde el parásito se divide por fisión binaria, la fase sexual donde se generan los gametos los cuales se fusionan para formar un cigoto el cual mediante un proceso de división da lugar a los esporozoítos los cuales son transportados a un nuevo hospedero (Gallego., 2007).

Estos organismos no contienen orgánulos de locomoción ni de digestión, la forma de alimentarse es absorbiendo los nutrientes de su medio y el ejemplo más común de este *Phylum* es el *Plasmodium* (Morrissette & Sibley., 2002).

La figura 3 muestra los orgánulos característicos de los parásitos *apicomplexa* en la fase de merozoíto, en la figura se observa el complejo apical, éste se sitúa en el extremo de la punta cónica del parásito para ayudar a la invasión de las células y su función se lleva a cabo por contracción y dilatación de los anillos. El complejo apical a su vez está compuesto por el anillo polar, el conoide, las roptrias, las micronemas y los túbulos subpeliculares. Los gránulos densos junto con las roptrias y micronemas secretan productos que ayudan en la motilidad e invasión del parásito. También poseen otro orgánulo llamado apicoplasto que contiene su propio genoma que codifica para proteínas. Este fue adquirido por la mayoría de los protistas *apicomplexa* con la hipótesis de su origen en éstos organismos basada en la teoría endosimbiótica (Morrissette & Silbley., 2002).

El género *Babesia* pertenece al *phylum apicomplexa*, éste es una de las clasificaciones del linaje eucarionte. La clave para comprender la biología del parásito está en la comparación de los genomas y genes involucrados en el desarrollo entre parásitos similares como lo son los *apicomplexa*, a pesar de que ya existen suficientes genomas en

las bases de datos aún no existe suficiente información que nos haga comprender la evolución de los parásitos (Chauvin et al., 2009).

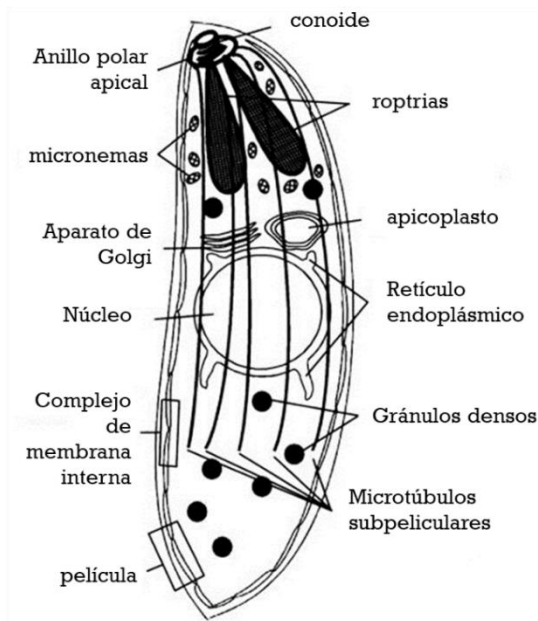


Figura 3. Morfología de parásitos del *phylum apicomplexa*. Adaptada de Morrissette, 2002.

c) Transmisión

El científico Riek en el año 1968 presentó los resultados de su investigación sobre el ciclo biológico de *B. bigemina* en *Boophilus microplus* concluyendo que al igual que en *Plasmodium* su ciclo biológico consta de dos fases, una sexual en el vector y otra asexual en el hospedero mamífero (Smith., 1978).

Diversos factores intervienen en la transmisión del parásito como son el desarrollo de la garrapata y su alimentación. En este caso, *B. bigemina* es transmitida por medio de ninfas, hembras adultas y también por machos adultos de *R. microplus*. No todas las garrapatas desarrollan la infección, esto depende en gran manera de la densidad de parásitos que ingirieron en la sangre de bovino infectado (Riek., 1964; Smith., 1978).

B. bigemina tiene distintas formas de transmisión que dependen en gran manera del ciclo biológico de la garrapata.

Transmisión transovárica: cuando la garrapata ingiere los parásitos éstos se convierten, en cigotos que penetran el intestino medio de la garrapata y comienzan a multiplicarse a vermículos. Los vermículos o quinetos invaden los órganos del vector incluyendo los ovarios y de esta manera *B. bigemina* pasa a la siguiente generación de garrapatas en el huevo. Los parásitos maduran a los nueve días después de que la larva se prende del bovino y cuando las larvas crecen a ninfas y adultas es que el parásito alcanza su maduración (Dalglish et al., 1978).

Transmisión transestadial: Esta transmisión se da cuando la infección surge en el artrópodo en el estadio de larva y permanece en cuanto se desarrolla a ninfa y/o adulta (Riek., 1964).

Transmisión transplacentaria: *B. bigemina* sobrevive en el bovino tan solo unos meses, los terneros pueden ser infectados *in útero* vía transplacentaria aunque no es muy frecuente (CFSPH., 2008).

Transmisión vía vector mecánico: A este tipo de transmisión no se le da gran importancia, los vectores mecánicos pueden ser moscas y/o fomites contaminados de sangre infectada, el mecanismo es por inoculación directa (CFSPH., 2008).

d) Ciclo de vida

El ciclo biológico de *Babesia* se considera un ciclo de vida complejo porque tiene tres elementos: el parásito (*B. bigemina*), el vector (invertebrado, la garrapata) y el hospedero (vertebrado, los bovinos), además de distintos factores que influyen en el ciclo biológico del parásito (Smith., 1978).

El ciclo de vida de *Babesia* spp generalmente se divide en 2 etapas de reproducción, la asexual y la sexual que se describen a continuación.

La reproducción asexual comienza cuando una garrapata infectada con *Babesia* spp se alimenta del bovino y por medio de sus secreciones salivales inocula los parásitos en forma de esporozoítos al torrente sanguíneo. Los esporozoítos penetran a los eritrocitos

y son cubiertos por una membrana plasmática formando una vacuola parasitófora (Figura 4, A). Cuando el protozoo se encuentra dentro del eritrocito, sufre una diferenciación temprana perdiendo todos sus orgánulos especializados y formando un trofozoíto con apariencia de anillo (Figura 4, B). En esta etapa el parásito entra en fase de alimentación y en contacto directo con el citoplasma de los glóbulos rojos del bovino, posteriormente se divide por fisión binaria o merogonia (Figura 4, C), la cual es un tipo de reproducción asexual. Como resultado se obtienen dos merozoítos haploides que en un inicio se encuentran unidos por la porción anterior que es la parte angosta de su cuerpo (Figura 4 D). Una vez maduros se separan por completo y promueven la hemólisis para liberarse e infectar a otras células sanguíneas y reproducirse de manera asexual indefinidamente hasta que el parásito se elimina o el hospedero mamífero muere o hasta que son ingeridos por las garrapatas cuando estas se alimentan de sangre infectada y así pueden continuar con el ciclo de vida sexual (Figura 4, E Y F) (Chauvin et al., 2009; Mosqueda et al., 2012; Smith., 1978).

La reproducción sexual comienza cuando la garrapata se alimenta de sangre de bovino infectada con *Babesia* spp. En este caso la garrapata ingiere a los parásitos en forma de merozoítos dentro de los eritrocitos. Las formas intraeritrocíticas de *Babesia* spp son liberadas de los eritrocitos mediante el proceso de digestión de la garrapata, un porcentaje de parásitos mueren debido al microambiente del intestino mientras que otros permanecen dentro de los eritrocitos. La infección comienza en el lumen intestinal donde se presentan variaciones en la temperatura, oxígeno, pH, CO₂ y glucosa, con estas condiciones se ve propiciado el desarrollo sexual y la formación de gametocitos (Figura 4, G). En las primeras 24 horas post- repleción de las garrapatas infectadas los gametocitos se diferencian en gametos masculinos y femeninos, los gametos comienzan un proceso denominado singamia dónde estos se fusionan para dar lugar a un cigoto diploide con un tamaño de 8 a 10 µm (Figura 4, H). A las 48 horas post-repleción, el cigoto se diferencia en un oocito, tomando una forma característica que le permite entrar por las células intestinales para infectarlas selectivamente, esta forma invasiva se debe a un orgánulo con forma de flecha que la ayuda a penetrar a través de las membranas celulares, al parecer lisa la membrana del epitelio intestinal, no

mediante membrana parasitófora, esto gracias a una enzima liberada de una estructura con forma de espiral en el parásito invasor (Mehlhorn & Schein., 1984). Después de realizar esta función, el oocito se degenera y el cigoto se divide por meiosis generando formas móviles llamadas quinetos que destruyen las células intestinales para salir a otros tejidos. Éstos vermículos maduros tienen una medida en un rango de 9-13 μ por 2-2.9 μ (*Figura 4, I, J Y K*) (Mosqueda et al., 2012; Riek., 1964).

A las 72 horas los quinetos ya escaparon de las células intestinales a los túbulos de Malpighi y a la hemolinfa, ahí se dividen de manera similar que en las células intestinales para distribuirse en distintos tejidos y órganos de la garrapata. Uno de los destinos son los ovarios en las hembras (*Figura 4, L*), ahí el parásito penetra las células embrionarias de tal manera que cuando la garrapata ovoposite, los quinetos ya han invadido y los embriones estarán infectados (*Figura 4, M*). La temperatura y humedad son factores sumamente importantes durante la transmisión. En la ovoposición una temperatura de 30-37°C y un 80% de humedad son ideales para el desarrollo de las formas infectivas de *B. bovis* y *B. bigemina* en los huevos de la garrapata *R. microplus*. Una vez que las larvas eclosionen, los quinetos viajarán a las glándulas salivales de la ninfa para diferenciarse en esporoblastos (*Figura 4, N*), un estadio multinucleado, perdiendo sus características, transformándose en cuerpos polimórficos piriformes (merozoítos pequeños haploides) (*Figura 4, O*), de esta manera la célula que alberga estos esporoblastos se romperá para liberar esporozoítos. Este proceso requiere de un estímulo de temperatura próxima a los 37°C, miles de esporozoítos son liberados de cada célula infectada de la glándula salival y reiniciar el ciclo de vida (*Figura 4, P*) (Mosqueda et al., 2004; Mosqueda et al., 2012; Riek., 1964).

Por otra parte temperaturas ambientales por debajo de los 20°C pueden inhibir el desarrollo del parásito en el invertebrado (Riek., 1964).

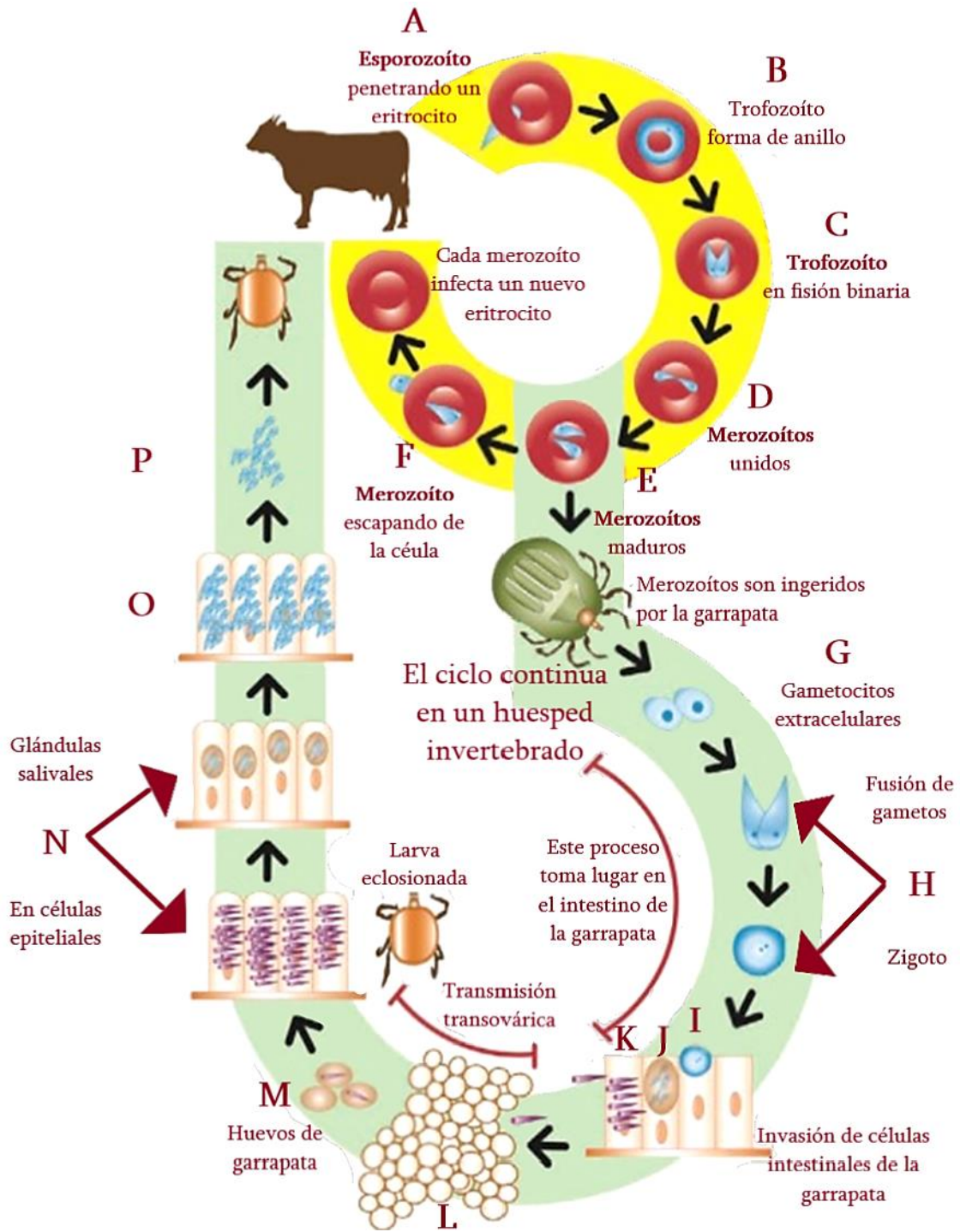


Figura 4. Ciclo de vida de *Babesia* spp. Modificado de Mosqueda, col 2012.

e) Genómica de *Babesia bigemina*

Los genomas de las distintas especies de *Babesia* no se encuentran en el mismo nivel de secuenciación, por ejemplo el genoma de *B. bovis* ya ha sido secuenciado de una cepa de Texas (T2Bo) con la finalidad de hacer genómica comparativa con otros protozoos integrantes del *phylum apicomplexa* como *P. falciparum* (Tabla 1) (Brayton et al., 2007).

Tabla 1. Características genómicas de *B. bovis*, *T. parva* y *P. falciparum* (modificado de Brayton et al., 2007)

Características genómicas	Especies		
	<i>P. falciparum</i>	<i>T. parva</i>	<i>B. bovis</i>
Tamaño (Mpb)	22.8	8.3	8.2
Número de cromosomas	14	4	4
Composición total G+C (%)	19.4	34.1	41.8
Tamaño del genoma del apicoplasto (Kpb)	35	39.5	33
Tamaño del genoma mitocondrial (Kpb)	~ 6 linear	~6 linear	~6 linear
Número de genes codificantes para proteínas nucleares.	5,268	4,035	3,671
Longitud promedio de genes codificantes para proteínas (pb, s/intrones)	2,283	1,407	1,514
Porcentaje de genes con intrones	53.9	73.6	61.5
Longitud media de región intergénica (pb)	1,694	405	589
Composición de G+C de región intergénica	13.8	26.2	37
Composición de G+C de exones (%)	23.7	37.6	44
Composición de G+C de intrones (%)	13.6	25.4	35.9
Porcentaje de codificación	52.6	68.4	70.2
Densidad génica	4.338	2.057	2.228

En la base de datos del instituto de Sanger se encuentran los contigs de la secuencia de DNA del genoma de *B. bigemina*. El genoma no ha sido publicado porque aún no se han ensamblado estos fragmentos, están sobrelapados y no está completo el genoma. Ellos estiman que el genoma nuclear de un aislado de Australia es de aproximadamente 10 Mega pares de bases (Mpb) contenidas en 4 cromosomas. El proyecto de secuenciación de la especie *bigemina* se está llevando a cabo con la finalidad de encontrar diferencias y/o similitudes con el genoma de *B. bovis* para ampliar el panorama en cuestión de patogenicidad de éstas cepas en relación con la babesiosis bovina (Willadsen & Jackson 2017). Los datos anteriores coinciden con los resultados de Ray y sus colaboradores, los cuales fueron obtenidos mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante (Ray et al., 1992).

En el año 2014 mediante un análisis de genómica comparativa de *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* es que se obtienen datos más próximos del genoma de *B. bigemina*, en el que se menciona que su genoma consta de 13.8409 Mpb distribuidas en 5 cromosomas nucleares y una secuencia extra nuclear, el genoma codifica para aproximadamente 5079 proteínas y contiene un 50.6 % de GC, este estudio se llevó a cabo con la cepa *B. bigemina* BOND proveniente de la misma cepa de Australia (Tabla 2) (Willadsen & Jackson 2017).

Tabla 2. Propiedades de siete secuencias genómicas de *Babesin* (Jackson et al., 2014).

Cepa	<i>B. divergens</i>	<i>B. divergens</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>
Origen	Francia	Francia	México	Argentina	Puerto	Argentina	Argentina	México
Hospedero	Humano	Bovino	Bovino	Bovino	Bovino	Bovino	Bovino	Bovino
Tamaño (Mpb)	8.97	9.58	15.9	12.94	12.68	13.84	7.61	
pGC	46	42	50	50	50	51	42	
No. De Scaffolds	482	81	1299	533	320	6	46	
N.50 (Mb)	NA	1.12	2.1	3.0	2.46	3.52	2.05	
Cobertura media	736	43	262	218	362	8	591	
No. De genes	4097	4134	5689	4948	4723	4457	3726	
% codificante	NA	64.0	NA	NA	NA	66.3	70.5	
Longitud media	1439	1487	1752	1805	1812	1531	1501	
% de genes con intrones	57.51	59.02	54.23	58.59	59.26	58.44	62.53	
Densidad génica (pb)	ND	2321	ND	ND	ND	2306	2154	

f) Familias de proteínas de *Babesia* spp.

Familias de proteínas están involucradas en los procesos de invasión de *Babesia* spp, estas son secretadas por el complejo apical y tienen un alto grado de conservación génica siendo consideradas como candidatos potenciales a vacunas. Dentro de estas familias de proteínas se encuentran productos de pequeños marcos de lectura abiertos (SmORF), Antígenos Variables de la Superficie de Eritrocitos (VESA) y Antígenos Variables de la Superficie del Merozoíto (VMSA) (Brayton et al., 2007). Otras proteínas importantes son AMA-1 (Associated Membrane Antigen-1), RAP-1 (Rhoptry Associated Protein-1), TRAP (Thrombospondin Related Anonymous Protein) y las Proteínas Del Cuerpo Esférico (SBPs) (Niu et al., 2015).

SBPs: Estas proteínas pertenecen a un cuerpo esférico localizado en el complejo apical del parásito, un ejemplo es la SBP2 quien se libera en el eritrocito y se localiza en la membrana celular del lado citoplásmico, es una proteína de 225 kDa, el gen *SBP2* tiene 12 regiones variables del extremo 5' pero no así del extremo 3' (Brayton et al., 2007), otro ejemplo es la proteína SBP4 la cual se compone de 372 aminoácidos y se localiza en el citoplasma de los eritrocitos infectados con *B. bovis*. El gen que codifica para esta proteína tiene un ORF de 1119 pb. Entre las funciones asociadas a la SBP4 están la modificación del citoesqueleto y el ambiente intracelular con la finalidad de adherirse a endotelio vascular y evitar el paso por el bazo (Alaa et al., 2011).

VESA 1: esta familia de proteínas consta de 2 tipos las VESA1a y VESA1b codificadas por los genes *ves1a* y *ves1b* respectivamente. En general es una proteína >300 kDa heterodimérica que al ser producida se dirige a la membrana del eritrocito confiriendo variabilidad antigénica ya que se han encontrado cerca de 119 genes que codifican para VESA 1 de los cuales se predice que solo 7 cuentan con un péptido señal en el extremo N-terminal. Gran parte de estas proteínas cuentan con un dominio extracelular y un dominio transmembranal finalizando con un extremo citoplásmico pequeño (Brayton et al., 2007).

SmORF: esta familia consta de 44 genes de 381 a 1.377 nucleótidos. Estos pequeños marcos de lectura tienen un péptido señal y pueden intervenir en la función de VESA1 confiriendo variación antigénica y/o finalmente ayudando a la evasión de la respuesta inmune (Brayton et al., 2007).

VMSA: familia de proteínas inmunoestimuladoras codificadas por genes de antígenos variables de superficie del merozoíto que bloquean la invasión de anticuerpos, éstos genes no tienen homólogos en otros parásitos como *P. falciparum*. Una de las cepas mexicanas T2Bo contiene 2 genes los *msa1* el cual es único y el *msa2* el cual tiene 4 copias arregladas en tándem (Brayton et al., 2007).

AMA-1: esta proteína de 69 kDa aproximadamente es un antígeno de superficie del merozoíto en protozoos *apicomplexa*, específicamente y como su nombre lo dice es un antígeno de la membrana apical tipo I del parásito. Es liberada por el micronema y su función no ha sido descrita pero se cree que es importante durante la invasión de del hospedero (Hoell et al., 2003). AMA-1 se caracteriza por conservar un dominio transmembranal seguido de una cola citoplásmico en su región carboxilo terminal y una región extracelular rica en cisteínas que participa en la formación de puentes disulfuro (GAFFAR ET AL., 2004).

RAP-1: esta proteína es considerada importante por inducir inmunidad parcial en *B. bovis* y *B. bigemina*. RAP-1 como su nombre lo dice es una proteína asociada a la roptrias en el complejo apical pero también se encuentra presente en la superficie del merozoíto, se sabe que existen 4 transcritos para RAP-1 en una cepa mexicana característicos por la variación en sus sitios amino y carboxilo terminal, su peso molecular oscila entre los 58 y 60 kDa (Brown et al., 1998; McElwain et al., 1991).

TRAP: las proteínas que integran esta familia son proteínas que se encuentran en todos los parásitos de tipo *apicomplexa*, específicamente del micronema y son proteínas conservadas. Las proteínas anónimas relacionadas con trombospondina se caracterizan por tener una región hidrofóbica corta en su extremo N-terminal, una secuencia del factor A de von Willebrand (vWFA), un dominio TSP-1 y una región transmembrana

hidrofóbica unida a una cola citoplásmica corta (Morahan et al., 2009). Se cree que estas moléculas funcionan como adhesivos, se ha demostrado que anticuerpos contra TRAP recombinante de algunas especies de *Babesia* inhiben la invasión del parásito en el hospedero. El genoma de la cepa T2Bo de *B. bovis* posee 4 genes que codifican para la proteína TRAP de los cuales BbTRAP2 es la que más alta expresión muestra en la fase eritrocítica (Terkawi et al., 2013).

El conjunto de todas estas familias se han estudiado en otros parásitos del *phylum apicomplexa* en donde juegan un papel importante en el secuestro, citoadhesión y evasión autoinmune, usando así la homología para estudios que ayuden a comprender el metabolismo del parásito y crear terapias farmacológicas (Bryton et al., 2007).

La invasión de los parásitos *apicomplexa* se desarrolla a través de distintas fases en las que interaccionan moléculas o proteínas del parásito con su hospedero, existen también otras proteínas que por estudios anteriores se han visto involucradas en el proceso de invasión y que no han sido estudiadas en *Babesia*.

II. ANTECEDENTES PARTICULARES

1. La proteína enolasa

La enzima enolasa es una proteína glicolítica que cataliza la conversión del D-2-fosfoglicerato (2PGA) y fosfoenol piruvato (PEP) en el noveno paso de la glicólisis y la gluconeogénesis (primer paso) respectivamente mediante la deshidratación en 2 pasos en presencia de iones Mg^{2+} , función vital para las células (figura 5). La dirección del flujo metabólico se modifica en cuanto a las necesidades de las células, tejido u organismo, ya sea catabólico o anabólico, por esta razón existen distintas isoformas de la enolasa con propiedades cinéticas que favorecen la glucólisis o gluconeogénesis (Avilán et al., 2011; Nelson & Cox., 2007).

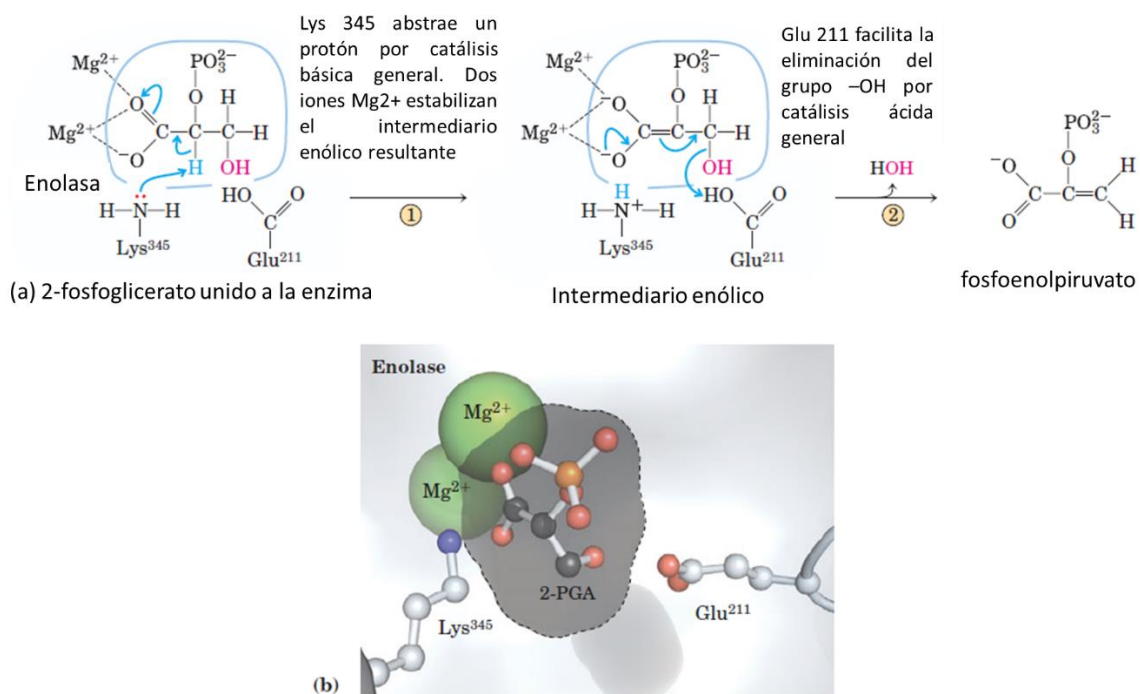


Figura 5. Mecanismo de reacción de la enolasa en la glicólisis. (a) conversión del 2-PGA a fosfoenolpiruvato, el grupo carboxilo de 2-PGA está coordinado por dos iones de magnesio en el sitio activo. (b) El sustrato, 2-PGA, en relación con los iones Mg^{2+} , Lys³⁴⁵ y Glu²¹¹ en el sitio activo de la enolasa, el nitrógeno se muestra en azul, el fósforo en naranja. Modificado de Nelson & Cox 2007.

La enolasa existe en distintas isoformas que dependen de la agrupación de sus subunidades α , β y γ -enolasa en homodímeros generalmente o heterodímeros, exclusivamente en bacterias se han encontrado estructuras cuaternarias octaméricas. Cada una de estas subunidades se ve asociada a una diferentes funciones (Avilán et al., 2011; Pancholi., 2001).

La β -enolasa (isoformas $\beta\beta$ o $\alpha\beta$) es la isoforma que se encuentra en células del músculo esquelético y cardiaco, ésta lleva a cabo la función general, en la vía glicolítica (Nomura et al., 1987). La γ -enolasa es una subunidad que sólo se expresa en células neuronales, también se le nombra Enolasa Neuronal Específica (NSE), su función es proteger y mantener la supervivencia (Gim et al., 2015). La subunidad α se encuentra en una variedad de tejidos y se le señala como una proteína glicolítica de células procarióticas y eucarióticas, también se le reconoce como proteína multifuncional ya que se expresa en superficie celular además del citoplasma, en la superficie celular su principal función es unir el plasminógeno, pero también cumple otras funciones celulares y se expresa en otros compartimentos celulares (Díaz-Ramos et al., 2012).

La estructura tridimensional de la proteína enolasa en su forma apo unida a ligandos está disponible en bases de datos para distintos organismos. Su estructura y su sitio catalítico están altamente conservados lo que conlleva a la proteína a adquirir propiedades cinéticas similares entre organismos distintos. El homodímero está formado por dos subunidades y cada subunidad generalmente contiene un dominio N-terminal característicamente pequeño formado de tres α -hélices y cuatro hojas beta y un dominio C-terminal en forma de barril α/β con ocho vueltas en el que se encuentra el sitio activo. Es importante recalcar que la forma monomérica en teoría es activa ya que contiene todos los elementos esenciales en su secuencia y estructura como son el sitio activo, en las formas diméricas solo se implican los residuos del sitio activo de una subunidad para llevar a cabo la función (Figura 6) (Kornblatt et al., 1998).

La enolasa más estudiada es la de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la cual consta de 436 residuos de aminoácidos en cada subunidad, de estos aminoácidos la Lys³⁴⁵ y la Glu²¹¹son los que actúan como receptores y donadores de protones dentro del sitio

activo. La expresión de ésta depende de la glucosa del medio, también existe otra isoforma que se expresa con un sustrato no glucolítico pero ambas conservan sus propiedades cinéticas. La unión de dos iones metálicos divalentes activa a la enzima causando cambios en su conformación, específicamente en los tres bucles cercanos al sitio activo exhibiendo el sitio de unión a sustrato en conformación abierta, una vez que el sustrato y los iones se unen la conformación cambia en los residuos 37 y 44 del bucle 1, 150 y 166 del bucle 2, 248 y 272 del bucle 3 a conformación cerrada. La enolasa se encuentra muy conservada en archaeas, bacterias y eucariotas, en todos estos organismos contiene residuos idénticos en su sitio catalítico y un plegamiento muy similar (Avilán et al., 2011; Nelson & Cox., 2007).

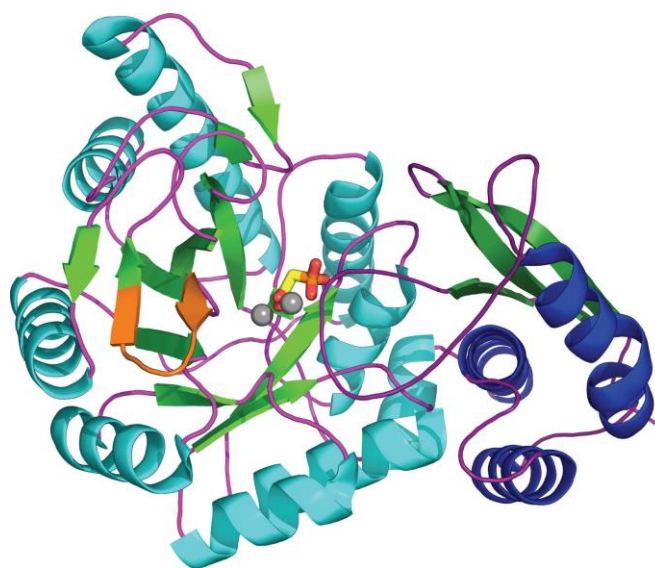


Figura 6. Estructura tridimensional de la enolasa de *Trypanosoma brucei* en complejo con su inhibidor fosfonoacetohidroxamato (PAH). A-hélices en color azul, hojas beta en color verde, bucles en color púrpura, el dominio N-terminal en colores oscuros y el dominio C-terminal en tonos claros, los metales se muestran como esferas y el ligando con barras, de color naranja se muestra el supuesto sitio de unión a plasminógeno modificado de Avilán et al., 2011.

La enzima enolasa suministra el ATP necesario a las células para sobrevivir a través de una reacción ya antes mencionada en el proceso glicolítico en el citosol de la célula pero además se ha reportado que está presente en la membrana plasmática, núcleo y vacuola llevando a cabo otras funciones no glicolíticas, por este motivo se le clasifica como una proteína multifuncional o “moonlight”. Este tipo de proteínas pueden desempeñar distintas funciones bioquímicas fisiológicamente relevantes además de la función “común” que desenvuelven y se dan a conocer precisamente por sus distintas localizaciones en la célula (Keller & Lin-Chao., 2009).

Las funciones que pueden desarrollar estas proteínas son receptores, enzimas, factores de transcripción, adhesinas, andamios entre otras. No todas las proteínas “moonlight” pueden cumplir todas las funciones, se ha descubierto que algunas tienen funciones simultáneas o su función cambia en respuesta al entorno coordinando así actividades celulares (Jeffery., 2014).

Las funciones no glicolíticas en las que se ha visto involucrada a la enzima enolasa generalmente son en el desarrollo, en la transcripción y en la apoptosis, se ve involucrada en la regulación de la morfología celular y en el tráfico de material mediante interacciones con moléculas del citoesqueleto (Prado et al., 2015), ejemplos de esto son los siguientes: la enolasa en plantas y en células cancerosas funciona como factor de transcripción, en mamíferos se ha reportado como factor de transcripción de genes involucrados en la proliferación celular y morfología y forma parte del componente estructural del ojo (Keller & Lin-Chao., 2009).

Otras funciones de la enolasa descritas en los microorganismos son como receptor de plasminógeno en la superficie celular, es una proteína de choque térmico en levaduras y funciona como ligando para receptores epiteliales del intestino de mosquito (Brayton et al., 2007).

La enolasa en bacterias se cree que influye en la estabilidad del RNAm, función que no ha sido muy estudiada hasta ahora (Kaberdin & Lin-Chao., 2009; Segovia-Gamboa et al., 2010).

En *Entamoeba invadens*, la enolasa se asocia con estructuras en forma de vesículas que translocan la proteína del citoplasma a la superficie celular del quiste, la función que desempeña ahí es esencial pero hasta ahora se desconoce (Segovia-Gamboa et al., 2010).

Los parásitos del género *Schistosoma* expresan la enzima enolasa en la superficie de los gusanos adultos y se cree que esta interviene en la inhibición de la formación de coágulos, también se ha reportado que en *Streptococcus pyogenes* la proteína enolasa se excreta al medio extracelular y se ve involucrada en la degradación de tejido para la invasión del parásito (De la Torre-Escudero et al., 2010; Walker et al., 2005).

2. La enolasa en protozoarios

Muchos reportes científicos han descrito que la enzima enolasa se expresa en la superficie celular de organismos patógenos y no patógenos, ejemplos de esto son *S. cerevisiae* y *Candida albicans*, en la levadura patógena se establece como un antígeno inmunodominante, en algunos parásitos de tipo *apicomplexa* se describe que la enolasa participa en la invasión tisular cuando se expresa en la superficie celular (Pancholi., 2001).

T. brucei es un protozoario que depende en gran manera de la glucólisis, se alimenta de la glucosa la cual abunda en la sangre de su hospedero para obtener ATP, este fundamento sugiere que si se interrumpe el metabolismo de la glucosa, el parásito muere rápidamente. La enolasa que presenta esta función en *Trypanosoma* se encuentra en el citosol, y ha sido validada como blanco de RNAi, este RNAi disminuye la actividad de la enzima enolasa y elimina el patógeno en 2 días (Albert et al., 2005).

El gen de la *enolasa* en parásitos *T. africano*, *T. americano*, y *Leishmania* se encuentra en sus genomas en una única copia, todos codifican para 429 aminoácidos con un peso aproximado de 46 kDa y tienen un 60% de identidad entre ellas. Todas las proteínas enolasa conservan residuos esenciales para la unión al sustrato, sitios de unión a Mg^{2+} y su actividad catalítica. La enzima enolasa en *Trypanosoma* a pesar de coincidir en un

60 % de identidad con otras enolasas de otros organismos contiene tres aminoácidos únicos que se cree pueden involucrarse en una reacción reversible inhibiendo la unión del sustrato y su sitio de unión (Hannaert et al., 2003).

La centrifugación diferencial es una de las metodologías que se usan para localizar proteínas, ésta metodología se aplicó en *Leishmania mexicana* y se encontró que la enolasa participa principalmente en reacciones en el citosol pero también se localizó en la pared celular, en ensayos de inmunofluorescencia no se localizó la enolasa en la membrana plasmática pero si se asoció a la superficie externa del parásito (Quiñones et al., 2007).

En numerosos reportes se habla de que el protozooario *Plasmodium* spp expresa la enzima enolasa, la cual además de cumplir su función glicolítica se localiza en otros compartimentos celulares para cumplir otras funciones (Bhowmick 2007), por ejemplo en *P. falciparum* la enolasa se encontró en la superficie de los merozoítos (Bhowmick 2009) y en la superficie de los ooquistos como receptor de plasminógeno y ligando de receptores epiteliales del intestino (Gosh et al., 2011; Gosh & Jacobs., 2011).

Un estudio reciente de proteínas “moonlight” halladas en superficie de *Plasmodium* spp reportó que su función es la de unir plasminógeno, en la mayoría de los casos el plasminógeno se une a una región de la enzima rica en lisina ubicado en el extremo C-terminal, aunque en algunas proteínas se encontró en la región media (Amblee et al., 2015), además se demostró que bloqueando con anticuerpos anti-enolasa se impide la penetración del parásito y por lo tanto la formación de oocitos por impedimento de ambas funciones en *P. falciparum* y *P. berguei*. Dos de las funciones importantes de la enolasa encontrada en estos parásitos son mediar el reconocimiento del epitelio intestinal del mosquito durante la invasión y unirse al plasminógeno del hospedero mamífero dando lugar a la plasmina la cual degrada los componentes del lumen intestinal facilitando que los oocinetos atraviesen y alcancen la superficie del intestino del mosquito para continuar su ciclo de vida (Mukherjee et al., 2016).

La enzima enolasa en la mayoría de los casos se encuentra en la superficie celular de los protozoarios actuando como una proteína de unión a plasminógeno. El plasminógeno es el zimógeno de la plasmina, una serín proteasa del sistema fibrinolítico que contiene cinco dominios “kringle” responsables de la unión a sustratos mediante el reconocimiento de regiones ricas en Lys. La relación que se ha encontrado entre enolasas de superficie celular y el plasminógeno se da mediante la interacción de una lisina ubicada en el dominio C- terminal de la enolasa. No obstante algunos estudios han revelado que la enolasa contiene un motivo de unión a plasminógeno ubicado en el mismo lugar y el cual no incluye lisina (Miles et al., 2005; Vanegas et al., 2007).

La figura 7 ilustra la unión de la enolasa y el plasminógeno, esta unión representa un paso importante en el mecanismo de invasión y establecimiento en el hospedero, la activación de la plasmina se ve reflejada en la degradación de la fibrina y en general la matriz extracelular (Lähteenmäki et al., 2001). La fibrina es una proteína que frena la invasión de parásitos como parte de la respuesta inmune activando la inflamación y restringiendo la propagación (Degen et al., 2007).

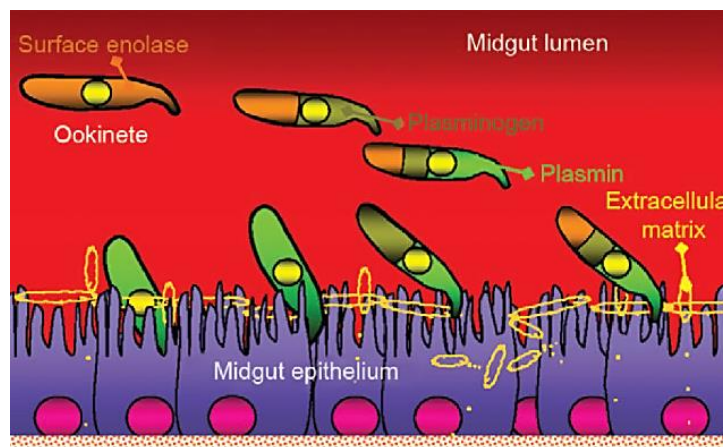


Figura 7. Representación de la unión de la enolasa y el plasminógeno y su efecto en la invasión de tejido. Este modelo se cree que es para todos los parásitos *apicomplexa*. El parásito expresa la proteína enolasa en su superficie por un mecanismo aún

desconocido, la enolasa se une al plasminógeno del hospedero mamífero y es activado en plasmina, la plasmina degrada la matriz extracelular del tejido del vector (Gosh & Jacobs., 2011).

La enzima enolasa ha sido propuesta como antígeno protector contra *P. yoelii* causante de la malaria. Esto se demostró al inmunizar ratones con la enolasa recombinante, éstos produjeron respuesta inmune contra una cepa letal (Pal-Bhowmick et al., 2007), también se ha propuesto como vacuna de bloqueo de la transmisión de malaria por *Plasmodium* spp. Actualmente se ha desarrollado un péptido llamado EPIP (ENO - plasminogen interaction peptide) capaz de bloquear la interacción entre la enolasa y el plasminógeno (Wang et al., 2012).

3. Importancia del estudio de la proteína enolasa en *B. bigemina*

B. bigemina para completar su ciclo de vida en el hospedero invertebrado y poder transmitirse a su hospedero vertebrado debe adquirir la capacidad de evadir la respuesta inmune del vector, el primer obstáculo para el protozooario es el epitelio intestinal de la garrapata, el parásito al llegar a la superficie del lumen intestinal debe lograr traspasarlo para distribuirse, desarrollarse y ser transmitido a otros bovinos.

Escasos reportes se han hecho de investigaciones acerca de moléculas que intervienen en la fase de invasión de *B. bigemina* al intestino del vector.

El mecanismo por el cual la enzima enolasa es trasladada a la superficie celular de otros parásitos es desconocido y estudios acerca de esta enzima relacionados con *B. bigemina* son nulos.

Los análisis recientes acerca de la babesiosis bovina se enfocan en el vínculo entre el parásito y su hospedero o vector, generando conocimiento y estrategias posteriores para el control de la babesiosis.

A la fecha no se han reportado estudios con respecto a la proteína enolasa de *B. bigemina*, la cual con base en los conocimientos de la función representa un posible factor de virulencia y posible candidato para generar una vacuna o estrategias para la erradicación o control de la enfermedad.

Con base en los conocimientos de la función de la enolasa en organismos similares como son los parásitos *apicomplexa* nosotros decidimos estudiar la enzima enolasa de *B. bigemina* para comprender más a detalle la biología del parásito y así aumentar el conocimiento con la finalidad de generar nuevas estrategias de control de la babesiosis bovina.

III. HIPÓTESIS

El genoma de *Babesia Bigémina* contiene un gen funcional que codifica para la enzima enolasa.

IV. JUSTIFICACIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad que causa severas pérdidas económicas a la industria ganadera, esta enfermedad es causada por parásitos del género *Babesia* que son transmitidos por garrapatas. México se localiza en una zona tropical con una alta incidencia de garrapatas *R. microplus* por tanto un gran porcentaje del ganado en México está expuesto a este ectoparásito. Las medidas de erradicación de la garrapata no han sido favorables debido a que ésta ha desarrollado resistencia a garrapaticidas y tampoco se cuenta con vacunas efectivas contra el hemoparásito.

La identificación del gen de la *enolasa EnoBb* en *B. bigemina* representará un avance para el conocimiento como un nuevo factor de virulencia y un posible blanco para erradicar la babesiosis. Se conoce que esta enzima de la vía glicolítica puede localizarse en diferentes compartimentos celulares donde cumple diferentes funciones. Específicamente en los parásitos como *Plasmodium* (del mismo *phylum* que *Babesia*) su función en la membrana externa es degradar el plasminógeno durante el proceso de invasión del parásito a las células del intestino del mosquito el cual es su vector, por lo tanto se hipotetiza que cumple la misma función en *B. bigemina* en el momento en que éste parásito traspasa las células intestinales del vector, en este caso la garrapata.

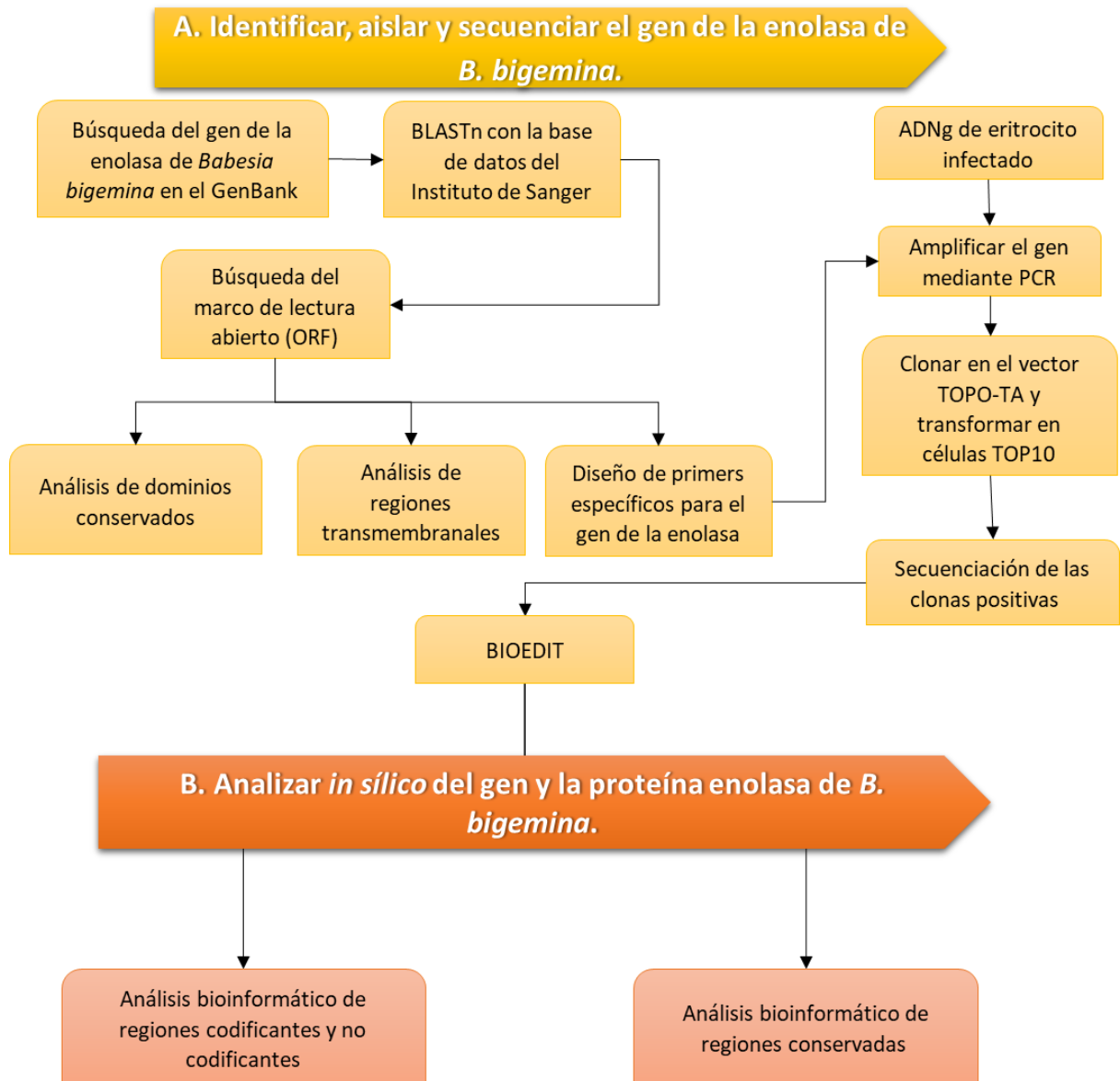
V. OBJETIVO GENERAL

Identificar el gen de la *enolasa* en *B. bigemina* y e inmunolocalizar la proteína.

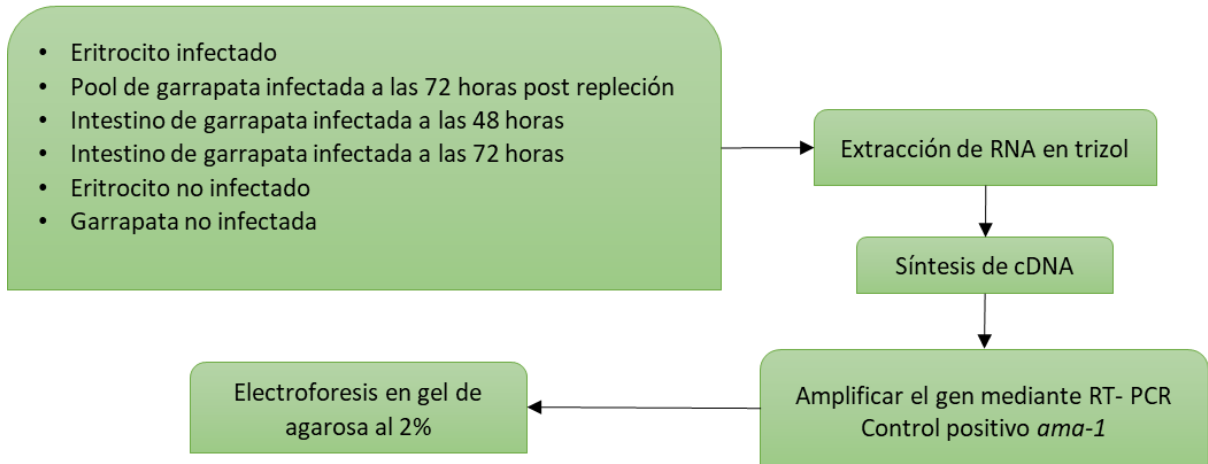
VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar, aislar y secuenciar el gen de la *enolasa* de *B. bigemina*.
2. Analizar *in silico* del gen y la proteína *enolasa* de *B. bigemina*.
3. Analizar la expresión del gen en la fase eritrocítica y en el vector transmisor.
4. Inmunolocalizar a la proteína *enolasa* de *B. bigemina* en eritrocitos infectados.

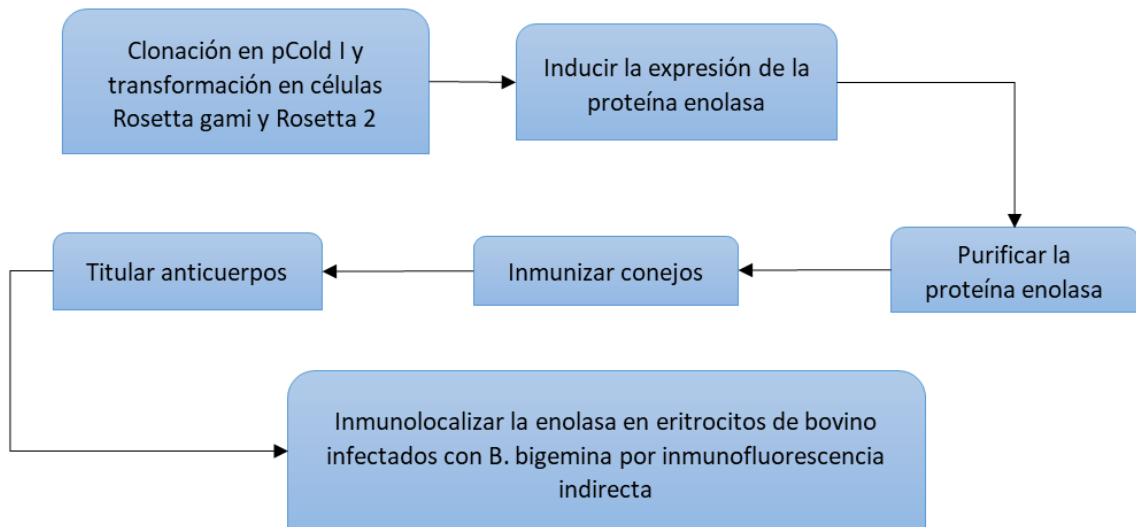
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



C. Analizar la expresión del gen en la fase eritrocítica y en el vector transmisor



D. Inmunolocalizar la proteína enolasa de *B. bigemina* en eritrocitos infectados



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Cepas de *Escherichia coli*

Para la clonación del gen de la *enolasa* se utilizaron células competentes de *E. coli* One Shot® (Life Technologies) y para la expresión de un fragmento del gen se utilizaron células competentes *E. coli* Rosetta™ 2 (Novagen®) las cuales contienen un plásmido llamado pRARE el cual tiene genes que codifican para RNAt no comunes en *E. coli*.

Cepa de *B. bigemina*

Se usó *B. bigemina* cepa Chiapas proporcionada por la Universidad Autónoma de Querétaro. La cepa se obtuvo mediante pases en bovinos esplenectomizados y los eritrocitos infectados se almacenaron en el medio de inducción M199 suplementado con suero de bovino al 20%, ácido xanturénico 100 µM (Sigma) y antibiótico-antimicótico (Invitrogen); también se usó *B. bigemina* cepa Texas, esta fue mantenida *in vitro*, se usó medio M119 (Sigma) suplementado con 40% de suero bovino y antibiótico-antimicótico (Sigma). Cuando se obtuvo una parasitemia > 4% los eritrocitos infectados se lavaron con el mismo medio y se resuspendieron en VYM.

Fases sexuales de *B. bigemina*

Garrapatas *R. microplus* no infectadas se mantuvieron en el laboratorio, al eclosionar las larvas se colocaron en un ternero y a los 21 días se desprendieron sólo las garrapatas hembras. Por otra parte, se infectó un ternero esplenectomizado con larvas de *R. microplus* en. A los 14 días, se le inyectó al ternero 5 ml de sangre infectada con *B. bigemina* (cepa Chiapas), luego a los 21 días se recolectaron las garrapatas hembras. Las garrapatas que se obtuvieron se utilizaron como un pool para disectar su intestino medio de las 48 y 72 horas post repleción.

2. Extracción de DNA de *B. bigemina* cepa Chiapas

A 100 μ l de sangre de bovino infectada con *B. bigemina* se le adicionaron 300 μ l de amortiguador de lisis RBC. De la mezcla se obtuvo la pastilla por centrifugación a 16,000 x g 5 min y se resuspendió con un poco del sobrenadante. Se adicionó 450 μ l de solución de lisis y 50 μ l de proteinasa k [2mg/ml], la reacción se incubó 2 horas a 55°C y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 300 μ l de solución precipitadora de proteínas y agitó 20 segundos. Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación a 16,000 x g 5 min, se le adicionaron 750 μ l de isopropanol y se mezcló suavemente. Nuevamente se centrifugó a 16,000 x g 5 min para obtener el DNA en el pellet el cual se dejó secar, una vez seco se lavó con 500 μ l de etanol al 70%. Se agitó suavemente y se centrifugó 1 minuto a 16,000 x g, el sobrenadante se desechó y se dejó secar el pellet el cual posteriormente fue diluido en 50 μ l de solución hidratante de DNA y se incubó a 65°C 5 min.

3. Extracción de RNA

Las muestras de las cuales se extrajo RNA fueron los eritrocitos de un bovino infectado, el pool de garrapata infectada a las 72 horas, los intestinos de garrapatas infectadas a las 48 y 72 horas, los eritrocitos de bovino no infectados y garrapatas no infectadas. Las muestras estaban contenidas en 1 ml de TRIzol™ Reagent (no. de catálogo 15596026) por muestra. Las muestras se homogeneizaron en un Vortex y se dejaron incubar 5 min a temperatura ambiente, se adicionaron 0.2 ml de cloroformo a cada muestra y se agitó vigorosamente y se incubó por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó 15 min a 12,000 x g a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionó 0.5ml de isopropanol, se dejó incubar 10 min y se centrifugó 10 min a 12,000 x g a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó 5 min a 7,500 x g a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar 10 min. El RNA se solubilizó en 25 μ l de agua libre de nucleasas y se incubó a 55°C por 15 min.

El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro realizando lecturas de absorbancia a 260nm y 280nm. La concentración se calculó utilizando la relación 1OD=1 ng/ μ l y se

determinó la integridad y pureza del material genético mediante electroforesis en gel de agarosa.

2 µg de RNA se trataron con 2µl de RQ1 RNase-Free DNase (Promega, no. de catálogo M6101), la reacción incluyó 2µl de amortiguador 10x, y se llevó a un volumen final de 20 µl. Las reacciones se incubaron durante una hora a 37 °C seguido de la adición de 1 µl de solución STOP para terminar con una incubación de 10 min a 65°C.

4. Amplificación del gen de la *enolasa* de *B. bigemina* mediante PCR

Para la amplificación del gen se usaron 2.5 µl de DNAg de *B. bigemina* en concentración de 29 ng/µl, el producto de PCR fue polimerizado por una enzima de alta fidelidad con actividad proofreading, se usaron 45µl de Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (no. de catálogo 12532016) y 1 µl de cada iniciador en concentración 20µM los cuales flanquean el gen completo, el iniciador forward 5'ATGGCTTCGACTTTCGATTC3' y el iniciador reverse 5'TGTAAAGCTTTCAGTTTCCGCAAGTGCGG3', finalmente la reacción se llevó a un volumen total de 50 µl con agua grado PCR.

Otra amplificación se realizó con una Taq DNA polimerasa usando el kit PCR Master Mix de Promega (no. de catálogo M7501) y otro par de oligos los cuales poseen las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, las cuales vienen subrayadas en la secuencia de cada iniciador respectivamente con su sitio de corte (forward 5'CGTG-GATCCATGAACGAGTGGGGTCACTG3' y reverse 5'TGTA-AGCTTTCAGTTTCCGCAAGTGCGG3'), estos oligos flanquean la región del gen desde el nucleótido 338 al 1366, se usaron 12.5 µl de Master mix, 10.5 µl de agua, 0.5 µl de cada iniciador, y 1 µl del DNAg en concentración 26 ng/µl.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 con el programa representado en la figura 8.

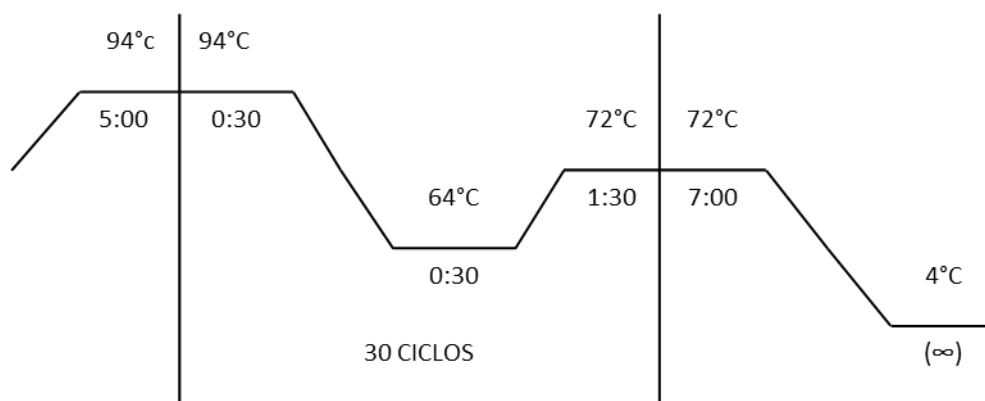


Figura 8. Programa de ciclado para PCR del gen de la *enolasa* de *B. bigemina*

Las reacciones de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% con la tinción Gelred™ Nucleic Acid (no. catálogo 41003), comparando con un marcador de 1kb DNA Ladder de Promega (no. de catálogo g5711) y con ayuda de un sistema de documentación en gel con cámara CCD/con transiluminador GEL DOC XR+.

5. Determinación de la expresión del gen mediante RT-PCR

La reacción se llevó a cabo con el kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase con número de catálogo 10928-042. Se prepararon reacciones con 12.5 µl del mix de reacción, 1.25 µl de cada 425/ en concentración 10µM, para un fragmento de 100 pb del gen de la *enolasa* se usó el iniciador forward 5'-CGCTGCCGTTTCAGATTGTG-3' y el iniciador reverse 5'-CTTCAACAAAAGAGCGTTGCAA-3', 500 ng de RNA tratado con DNasa, 0.5 µl RT/Platinum™ Taq Mix y se llevó a un volumen final de 25 µl con H₂O libre de nucleasas. Para comparar y verificar el resultado se amplificó el gen constitutivo AMA-1 como control positivo usando el iniciador forward 5'-ATTGACCCGAAGTGGGATCA-3' y el iniciador reverse 5'-AAGCAGATTCGAGGGCAACA-3'.

Para verificar la ausencia de DNAg en las preparaciones de RNA se prepararon las mismas muestras pero se sustituyó la RT/Platinum™ Taq Mix por la Platinum™ Taq DNA Polymerase.

Para el control positivo se usó 0.5 µl de DNAg y la Platinum™Taq DNA Polymerase en la reacción.

Los componentes en cada tubo se mezclaron gentilmente, se centrifugaron rápidamente y se llevó a cabo la amplificación en un termociclador GeneAmp™ PCR System 9700, con un programa diseñado específicamente para ambos fragmentos de 100 pb a amplificar representado en la figura 9.

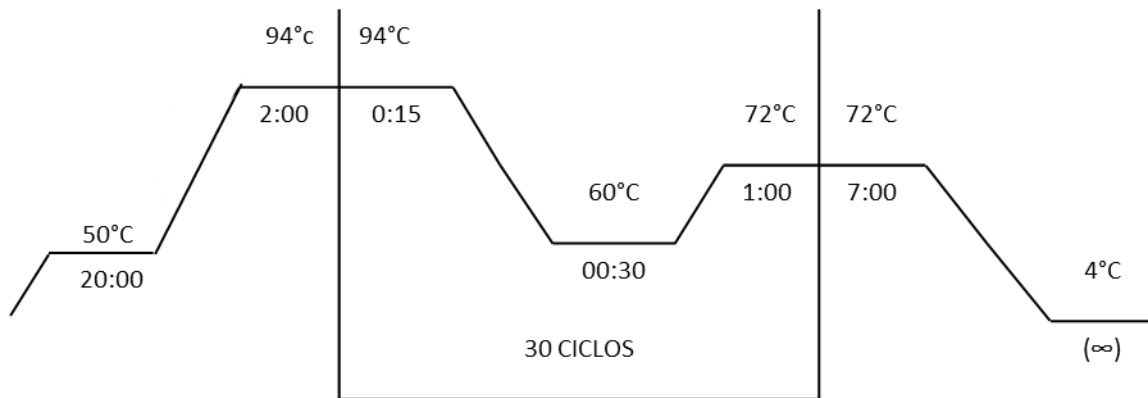


Figura 9. Programa de ciclado para RT-PCR para un fragmento del gen de la *enolasa* y *ama-1*.

Las reacciones de RT-PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con la tinción GelRed™ Nucleic Acid (no. Catálogo 41003), comparando con un marcador de 100bp DNA Ladder de Promega (no. de catálogo G2101) y con ayuda de un sistema de documentación en gel con cámara CCD/con transiluminador GEL DOC XR+.

6. Clonación en el vector TOPO® TA y análisis de clonas.

Posterior a la amplificación del gen completo con una polimerasa High Fidelity es necesario llevar a cabo la adición de adeninas en la región 3', puesto que esta enzima deja los extremos parejos o romos del producto, con esta adición se puede llevar a cabo la clonación en el vector TOPO® TA el cual posee extremos cohesivos de Timina, para esto se adicionó 1 U de Taq polimerasa y se incubó durante 10 min a 72°C, después de éste tratamiento se colocó en hielo para seguir con la clonación.

El producto de PCR se limpió de sales y enzimas con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, el DNA fue eluído en un tampón con una concentración muy baja de sales alcalinas. La reacción de clonación se llevó acabo con el kit TOPO® TA Cloning® (Invitrogen no. Cat. K457502). Se mezcló la reacción de clonación con 4 µl de PCR, 1 µl de solución salina y 1 µl de TOPO® TA y se incubó 30 min a temperatura ambiente y se prosiguió con la transformación, para ésta se usaron 2 µl de la reacción de clonación al vial de células competentes *E. coli* Top10 del kit One Shot® Invitrogen (no. de catálogo C4040-10) y se incubaron 30 min en hielo y se le dio un choque térmico a 42°C 30 segundos e inmediatamente se transfirió al hielo. Se le adicionó 250 µl de medio S.O.C. y se dejó creciendo a 37°C y 200 rpm durante una hora. Las células se sembraron tomando 50 µl de la transformación para plaquearse en una caja Petri con LB agar-ampicilina, el resto de la transformación se concentró y se plaquearon 50 µl concentrados en otra caja Petri, ambas cajas se dejaron crecer en una incubadora Imperial III Incubator a 37 °C durante 16 horas.

Para verificar que las clonas estuvieran transformadas con la construcción vector-inserto (TOPO-enolasa) se tomaron 10 clonas y se dejaron crecer cultivos de 5 ml de LB-ampicilina, se incubaron a 37°C a 200rpm 16 horas. Los cultivos se empastillaron por centrifugación a 10,000xg 5 min. Después se purificó el DNAP con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (no. de catálogo A1460) de la siguiente manera, la pastilla se resuspendió en 250 µl de solución de resuspensión de células, se adicionaron 250 µl de solución de lisis. Cuando se observó el clarificado se adicionaron 10 µl de proteasa alcalina y se incubó 5 min a temperatura ambiente, luego se adicionaron 350 µl de solución de neutralización y se centrifugó a máxima velocidad 10 min a temperatura ambiente, después se decantó el lisado en una columna y se centrifugó un minuto. La columna se lavó con 750 µl de solución de lavado y se centrifugó un minuto, nuevamente se lavó la columna pero con 250 µl de solución de lavado, se centrifugó por 2 min y se adicionó 100 µl de agua libre de nucleasas para eluir el DNA en un tubo estéril de 1.5 ml mediante centrifugación durante 1 minuto. La columna se desechó y las miniprep se cuantificaron en un espectrofotómetro con lecturas a una absorbancia de 260nm y 280nm en ng/µl y se determinó la integridad

y pureza del material genético. Se visualizó el DNA en un gel de agarosa al 1% con un marcador de 1Kb de Promega número (no. de catálogo G5711) y se almacenaron a -20°C.

Para confirmar la presencia del inserto se digirió el DNAp con la enzima *EcoRI* (Assembly of Restriction Enzyme Digestions Promega, no. de catálogo R6011), por cada reacción se mezcló 100 ng de DNAp, 1 µl de enzima, 0.2 µl de BSA, 2 µl de amortiguador 10X y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua. Las reacciones se visualizaron en un gel de agarosa al 1%.

7. Secuenciación

A partir del DNAp de las clonas positivas se prepararon reacciones de secuenciación con el kit BigDye® Direct Cycle Sequencing para cada oligo representado en la Tabla 3, se usaron distintos iniciadores con la finalidad de que cada secuencia obtenida de cada uno se empalmara y así asegurar la secuencia completa del gen, se usaron 400 ng de DNAp con 2 µl de Big Dye, 3 µl de amortiguador 5X y se completó la reacción con agua a un volumen final de 20 µl. El programa de amplificación por PCR para secuenciación se representa en la figura 10.

Tabla 3. Iniciadores para secuenciación del gen de la *enolasa* de *B. bigemina*

Oligo	Secuencia
M13 forward	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13 reverse	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
Forward completo	5' ATGGCTTCGATTACTTCGATTC 3'
Forward intermedio 1	5' CGT <u>GGATCC</u> ATGAACGAGTGGGGTCACTG 3'
Forward intermedio 2	5' CTTGGGTTTCAAGTGCGAGC 3'

Reverse completo	5' TGT <u>AAGCTT</u> TTCAGTTTCCGCAAGTGCGG 3'
Reverse intermedio	5' TGT <u>AAGCTT</u> TTCAGTTTCCGCAAGT 3'

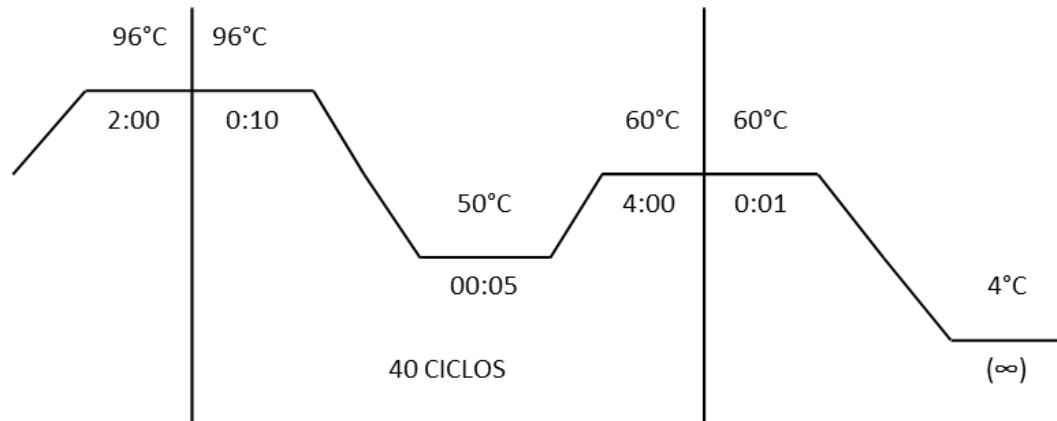


Figura 10. Programa de Ciclado de PCR para secuenciación.

Los productos se purificaron haciendo uso del kit DyeEx™2.0 Spin con número de catálogo 63204 siguiendo las indicaciones del instructivo, Esta purificación tiene un principio de separación basado en la cromatografía de filtración en gel el cual separa los componentes por peso molecular, el material de filtración en forma de esferas porosas atrapa los terminadores Dye de la reacción de secuenciación permitiendo eluir el DNA purificado.

Se llevó a cabo la secuenciación automatizada en un equipo 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystem™.

Las secuencias del gen de la *enolasa* representadas en el electroferograma se revisaron, se alinearon y editaron con el programa Bio Edit Secuence Alignment Editor.

8. Análisis *in silico* de la secuencia del gen y la proteína enolasa de *B. bigemina*

La búsqueda del gen se llevó a cabo en el GenBank, una base de datos internacional situada en la página del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), la secuencia fue comparada contra la base de

datos del Instituto de Sanger la cual contiene la secuencia del genoma de *B. bigemina*, para esto se realizó un alineamiento de nucleótidos (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/b_bigemina) y se analizó para encontrar el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en ingles Open Reading Frame) mediante la herramienta ExPASy-Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>). La secuencia de aminoácidos se usó como templatado para un alineamiento múltiple con la finalidad de analizar los dominios conservados (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Las regiones codificantes y no codificantes de la secuencia del gen, cepa Chiapas se buscaron mediante el programa GeneWise (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/>).

Con la secuencia de aminoácidos también se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTAL OMEGA (1.2.4) para reconocer las regiones conservadas del gen.

También se realizó una búsqueda de regiones transmembranales usando la herramienta ExPASy-ProtScale basada en la escala de hidropatía de aminoácidos de Kyte J., Doolittle R.F. (<http://web.expasy.org/protscale/pscale/Hphob.Doolittle.html>) y mediante la herramienta SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) se analizaron posibles péptidos señal.

9. Clonación del gen de la *enolasa* en el vector de expresión y análisis de clonas.

El producto de PCR de un fragmento del gen de la *enolasa* de 1029 pb, mencionado anteriormente en el punto número 4, se purificó con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up y se llevó a cabo la restricción de 4µg del producto de PCR con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, nuevamente se purificaron las reacciones de sales y enzimas, se cuantificó y se visualizó en un gel de agarosa al 1%. Por otra parte para expandir el plásmido de expresión pCold se tomó una clona que se tenía previamente en el laboratorio y se dejó crecer en 5 ml de medio LB-ampicilina durante 16 horas a 37 °C y

200 rpm se purificó con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. El DNAp pCold se cuantificó y se visualizó en un gel de agarosa al 1% con un marcador de 1Kb. El plásmido (2µg) se cortó con las mismas enzimas que el producto de PCR para linearizarlo y se visualizó en un gel de agarosa al 1%, una vez verificada la restricción, se cargó toda la reacción en un gel de agarosa al 0.8%, se dejó correr para observar la banda a través de la luz UV en un transiluminador y se cortó con un bisturí. El plásmido linearizado contenido en el gel se extrajo siguiendo el instructivo del kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up gel extraction y se tomaron 30ng para desfosforilarlo con fosfatasa alcalina de intestino de camarón (CIAP Cat. #2250). El amplicón se insertó en el sitio de multiclonación del plásmido pCold I en relación molar 1:3 de vector: inserto (50 ng: 150 ng) con 1 µl de enzima T4 ligasa, 4 µl de amortiguador de ligasa en un volumen final de 20µl, como control se preparó otra reacción sin el inserto y otra reacción sin el inserto y sin la T4 ligasa la reacción se incubó toda la noche a 16°C. La transformación se llevó a cabo con 10 µl de cada reacción y control de ligación y 50 µl del vial de células competentes MAX Efficiency™ DH5α™ Competent Cells (no. de catálogo 18258012), se incubaron 30 min. en hielo y se le dio choque térmico a 42°C por 30 segundos, inmediatamente se colocaron en hielo 2 min y se agregaron 250µl de medio S.O.C., se dejaron recuperar las células a 37°C con agitación suave 1 hora. La siembra de células transformadas se llevó a cabo en 3 cajas LB-ampicilina por cada transformación, una con 50 µl de la transformación, otra con 100 µl y una última con el resto de la transformación, las cajas se dejaron crecer en una incubadora a 37°C durante 16 horas.

Se seleccionaron clonas con la construcción pCold-enolasa para analizar mediante la técnica de miniprep antes mencionada. Para transformar y expresar la proteína se eligió a la cepa *E. coli Rosetta 2*, esta cepa es derivada de la cepa BL21, ideales para la expresión de proteínas eucarióticas que requieren el uso de codones que *E. coli* no usa, esta cepa provee así una traducción universal. La transformación se llevó a cabo con 1 µl de DNAp de una clona positiva en concentración 564 ng/µl y 50 µl del vial de células competentes, como control negativo se transformaron células con el plásmido pCold vacío, las condiciones de incubación fueron las mismas que para DH5α™. La siembra

de células transformadas se llevó a cabo en 3 cajas LB-ampicilina, la caja 1 con 5 μ l de la transformación más 45 μ l de medio S.O.C., la caja 2 con 50 μ l de la transformación y la caja 3 con 50 μ l de transformación concentrada, se incubaron a 37°C por 16 horas.

10. Inducción y análisis de expresión de la proteína enolasa recombinante.

Se tomaron colonias aisladas de cada transformación y se conservaron en una caja LB-agar ampicilina a la vez que se dejaron crecer preinóculos en 10 ml de LB-ampicilina a 37°C, 200 rpm durante 16 horas. En un matraz con 500 ml de LB-ampicilina se le adicionaron los 10 ml del preinóculo con la construcción pCold-enolasa, por otra parte a 10 ml de medio se le adicionó 1 ml de preinóculo del control pCold vacío y nuevamente se dejaron crecer a 37°C y 200 rpm, mientras tanto la densidad óptica (OD) fue monitoreada hasta alcanzar un valor entre 0.4-0.6, llegando a este valor se tomaron 2 ml de cada muestra como control no inducido, al resto de los cultivos se les adicionó IPTG 0.1mM, los cultivos se dejaron creciendo a 15°C, 200 rpm durante 24 horas.

Los valores de la OD se tomaron de cada cultivo inducido y no inducido y se usaron para igualar las concentraciones con PBS y amortiguador de carga de proteínas 2x, se prepararon 100 μ l de cada muestra para analizar en un gel de poliacrilamida al 10%. Por otra parte para determinar si la proteína recombinante era soluble o no se empastilló 1 ml de cultivo inducido y se resuspendió en 1 ml de PBS, se tomaron 100 μ l y se sonicó durante 6 min con 80% de amplitud 30/30, después se centrifugó 5 min a 22,000 x g, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml y la pastilla se resuspendió en 100 μ l de PBS, a ambos pastilla y sobrenadante se les adicionó 100 μ l de amortiguador de carga 2x, todas las muestras se hirvieron 5 min a baño maría y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para la cual se usó un marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards Dual Color de Bio-Rad (no. de catálogo 161-0374). El gel se tiñó con azul de Coomassie de Bio-Rad (no. de catálogo 161-0786) toda la noche en agitación suave y se lavó con solución desteñidora por 30 min.

Para corroborar la presencia de la proteína recombinante se llevó a cabo el protocolo de Western Blot. Se corrió un gel SDS-PAGE al 10% con las mismas muestras y se transfirió durante 1 hora a una membrana de nitrocelulosa en condiciones húmedas. La membrana se bloqueó con TBS-Tween leche 5% durante toda la noche a 4°C, después se le dieron 3 lavados de 15 min con TBS-Tween con agitación suave, se adicionó el anticuerpo primario: anti tag Histidinas en dilución 1:3000 en TBS-Tween leche al 1% y se dejó incubando 1 hora a 37°C con agitación suave. Nuevamente se le dieron 3 lavados y se adicionó el anticuerpo secundario: Goat anti-mouse IgG HRP en dilución 1:5000 en TBS-Tween leche al 1% y se incubó una hora exacta a 37°C y agitación suave. Se lavó nuevamente 3 veces la membrana y se prosiguió a la detección. En un cuarto oscuro se preparó la solución de trabajo 1:1 (solución de peróxido y luminol) del Kit ECL Western Blotting Substrate de Promega (no. de catálogo W1001) se le adicionó a la membrana y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de líquido y se protegió la membrana con acetatos por ambos lados, se colocó en un cassette y encima la placa fotográfica, se cerró el cassette y se incubó 5 min. La placa se incubó 3 min en solución reveladora, se lavó con abundante agua y se incubó otros 3 min con solución fijadora, nuevamente se lavó con abundante agua y se dejó secar.

11. Purificación de la proteína enolasa recombinante y análisis de fracciones.

Una vez localizada la proteína en la fracción insoluble se llevó a cabo una cromatografía líquida mediante el protocolo “on column refolding” estandarizado en el manual del equipo ÄKTAprime plus GE Healthcare.

A partir de 80 ml de cultivo inducido se obtuvo una pastilla por centrifugación a 10,000 x g durante 20 min, esta se resuspendió en 10 ml de PBS y se sonicó de 1ml en 1 ml durante 3 min a 80% de amplitud 30/30, al final los 10 ml se recolectaron en un tubo y se volvieron a centrifugar para descartar el sobrenadante, la pastilla que contiene la proteína se resuspendió en 10 ml de amortiguador de unión y se filtró con 0.45µm, la muestra se inyectó en el equipo y se analizaron 50 µl de cada una de las fracciones por SDS-PAGE al 10% y Western Blot.

Las fracciones que contenían la proteína recombinante se dializaron usando 6 litros de PBS durante 2 días y se recolectó nuevamente en tubos de 1.5 y se almacenó a 4°C

La proteína purificada y diluida en PBS se cuantificó por el método de Bradford. Se realizó una curva estándar con 5 diluciones partiendo de una concentración inicial de 80 µg/ml de BSA, las siguientes diluciones 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml y 5 µg/ml, como blanco se usó PBS y para la muestra una dilución 1:1 y sin diluir. De cada una de estas soluciones se cargaron 160 µl en cada pozo de una placa de microtitulación y por triplicado más 40 µl de Dye Reagent concentrado de Bio-Rad, se mezcló, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se leyeron en un espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm.

12. Obtención de anticuerpos específicos para la enolasa

Para la inmunización se usaron cuatro conejos de la raza Nueva Zelanda proporcionados por la Universidad Autónoma de Querétaro, dos de ellos se tomaron como grupo control y los otros como grupo tratado. Antes de inmunizar se tomó sangre para obtener el suero preinmune y posteriormente se llevaron a cabo 4 inmunizaciones cada 21 días con 100µg de proteína enolasa resuspendida en PBS pH7.4 y adyuvante Montanide 1:1 para el grupo tratado y para el grupo control solo se usó PBS pH7.4 y adyuvante Montanide 1:1, antes de cada inmunización se tomó una muestra de sangre de cada conejo en un tubo vacutainer para obtener el suero.

13. Titulación de anticuerpos contra la enolasa

Para evaluar los títulos de anticuerpos contra la enolasa en los sueros se llevó a cabo la técnica de ELISA mediante el siguiente protocolo:

Para fijar el antígeno se utilizó la proteína recombinante en una concentración de 2 µg/ml en amortiguador carbonato pH 9.6, se adicionaron 100µl de esta solución a cada pozo y se incubó la placa durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.05% y se bloqueó 30 min con PBS y leche descremada "svelty2 Nestlé al 5%, nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.05% y se adicionaron 100 µl del

anticuerpo primario en este caso cada uno de los sueros en dilución 1:500 y el suero de la 3ª inmunización en diluciones 1:500; 1:1,000, 1:2,000; 1:4,000; 1:8,000; 1:16,000; 1:32,000; 1:64,000; 1:128,000 y el control negativo PBS Tween 0.05% leche al 5%, todos por triplicado y se dejaron incubando 1 hora a 37°C, posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS Tween 0.05% y se adicionó el anticuerpo secundario en dilución 1:500 en PBS Tween 0.05% leche al 5%, se incubó una hora a 37°C, después se realizaron 5 lavados y se adicionó la solución sustrato OPD (o-Phenylenediamine, Sigma P9029) en condiciones de oscuridad y se dejó actuar durante 20 min exactos para leer la absorbancia en un lector de ELISA de Bio-Rad (iMark microplate absorbance reader) a 492nm.

14. Inmunodetección de la proteína enolasa de *B. bigemina* en sangre infectada con anticuerpos anti-enolasa

Se preparó el antígeno frío para Western Blot de sangre infectada y no infectada. En un tubo falcon se centrifugó la muestra 10 min a 1,000xg y se lavó varias veces en 10-20 ml de PBS frío con inhibidor de proteasas hasta que el sobrenadante estuviera claro, se congeló a -80°C 2 horas. Se descongeló y se lavó nuevamente varias veces centrifugando a 2,500 x g 10 min. El sedimento final se resuspendió en amortiguador de lisis 2x para aislar proteínas, se guardó a -80°C toda la noche, se sonicó 2 veces durante 20 segundos a 100 watts y se cuantificó por el método de Bradford. Para cargar en el gel se hirvieron 38µg de cada muestra con amortiguador de carga de proteínas 6x, se centrifugaron a 12,000 x g durante 5 min y se cargó el sobrenadante en un SDS-PAGE al 10%. Las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, las membranas con las muestras de sangre infectada y no infectada se bloquearon toda la noche con TBS Tween y leche al 5%, se lavaron 3 veces durante 15 min con TBS Tween 0.1% y se cortaron tiras de 0.4 cm. El suero preinmune se preparó en dilución 1:2,000 y el suero de la 2ª inmunización 1:500, se adicionaron 700µl de cada suero por tira y se dejaron incubando toda la noche a 4°C con agitación suave, se le dieron 5 lavados con TBS Tween 0.1% y se les adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP en dilución 1:5000 y se incubaron una hora a temperatura ambiente y

agitación suave, posteriormente se le dieron 5 lavados con TBS Tween 0.1% y se prosiguió con el revelado en cuarto oscuro, la exposición se llevó a cabo 48 horas a 4°C cubierto de la luz.

15. Inmunolocalización de la proteína enolasa con anticuerpos anti-enolasa

Se realizó una Inmunofluorescencia Indirecta con frotis de sangre de bovino infectada con una cepa de *B. bigemina* Texas la cual se mantuvo *in vitro*. Los frotis sanguíneos se fijaron en metanol por 5 min y se guardaron a -80°C. Las laminillas se secaron en campana durante 20 min y se fijaron con solución de acetona 90% y metanol 10% por una hora a -20°C, después se bloquearon con suero de caballo al 5% en PBS Tween-20 al 0.2%, se adicionaron 100 µl del suero de conejo anti-enolasa en dilución 1:10 de la última inmunización y suero preinmune. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda, se incubaron una hora a 37 °C, después se hicieron 10 lavados con PBS Tween 0.2% y se secaron en campana, posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado con Alexa-488 (Thermo Scientific) en dilución 1:200 en PBS-Tween con Hoechst 33342 el cual tiñe los núcleos (Thermo Scientific), se incubó en cámara húmeda una hora a 37 °C, posteriormente se hicieron 10 lavados con PBS Tween. Como control negativo se usó suero preinmune y se llevó a cabo el mismo protocolo. Para observar las laminillas se usó medio de montaje antifade con un cubreobjetos y se analizaron en un microscopio confocal (Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope) con amplificación de luz en una frecuencia específica para Alexa-488, Hoechst 33342 y campo claro.

IX. RESULTADOS

1. Análisis *in silico* del gen de la *enolasa* de *B. bigemina*

El gen de la *enolasa* en la base de del Gen Bank se encuentra con el nombre: ***Babesia bigemina* enolase (2-phosphoglycerate dehydratase), putative partial mRNA** y tiene como numero de acceso: **XM_012913498.1**

La información revela datos genómicos, transcritos y productos de este gen el cual está ubicado en el cromosoma III de *B. bigemina* en el locus BBBOND_0306700, tiene un tamaño de 1,366 pb y se encuentra flanqueado por dos genes que codifican para proteínas hipotéticas, una de ellas conservada, el gen de la *enolasa* comienza con una región codificante de 39 pb seguida de un único intrón de 37 pb y finalmente otro exón de 1,290 pb (figura 11 panel A y B).

El alineamiento de esta secuencia con la base de datos del Instituto de Sanger muestra homología con el contig 4172.1 y 4172.0, al analizar el transcrito se encontró un marco de lectura abierto el cual codifica para la enzima *enolasa*, la cual tiene una función hipotética en la glucólisis y gluconeogénesis, la proteína contiene sitios de unión a metales como el Mg^{2+} con la finalidad de causar un cambio en la conformación, tiene sitios de unión a sustratos como son el 2-fosfo-D-glicerato o el fosfoenolpiruvato, contiene interfaces diméricas y un dominio de barril llamado TIM perteneciente a una superfamilia de proteínas que comparten un motivo de unión a fosfato con una estructura de ocho hojas β/α

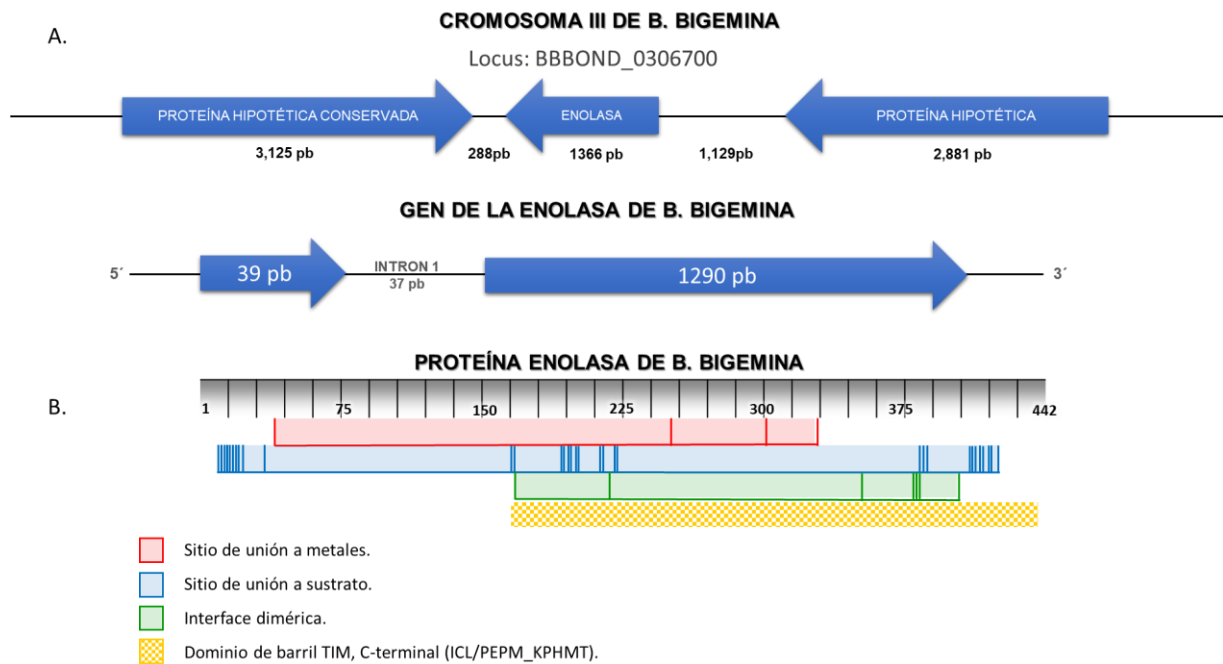


Figura 11. Análisis y localización del gen de la *enolasa* de *B. bigemina*. **A.** Esquema de la localización del gen de la proteína enolasa en el cromosoma III de *B. bigemina*. **B.** Esquema de la proteína donde se señalan sitios funcionales importantes.

2. Amplificación del gen, clonación en TOPO y análisis de clonas

El transcrito del gen de la *enolasa* tuvo un tamaño de 1,366 pb (figura 12).

Diez clonas se analizaron mediante la técnica de miniprep y se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, seis de éstas clonas fueron positivas. En la figura 13 se observa la diferencia entre el tamaño de los plásmidos de las clonas positivas de 5.3 Kb contra las clonas negativas que sólo contienen el vector vacío con un tamaño de 3,956 pb.

Para corroborar que las clonas estuvieran transformadas con el inserto se llevó a cabo una digestión enzimática con la enzima *EcoRI*, la restricción se llevó a cabo en todas las clonas para visualizar de mejor manera el inserto liberado del plásmido (figura 14).

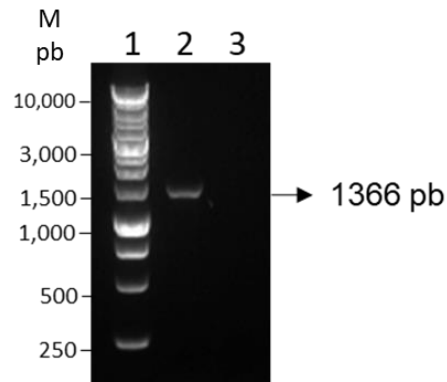


Figura 12. Amplicón del gen de la *enolasa* de *B. bigemina*. Gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ Nucleic Acid. (1) Marcador de 1 kb, (2) amplificación del gen de la *enolasa*, (3) PCR negativa.

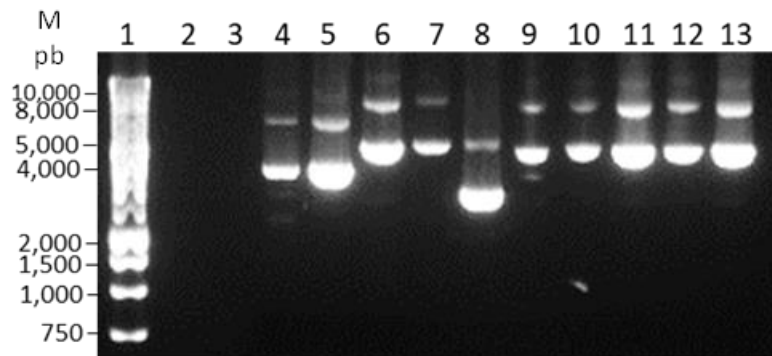


Figura 13. DNAp de las clonas TOPO-*enolasa* completa. Gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™ Nucleic Acid. (1) marcador de 1kb DNA Ladder Promega, (4-13) DNAp de las clonas 1 a la 10.

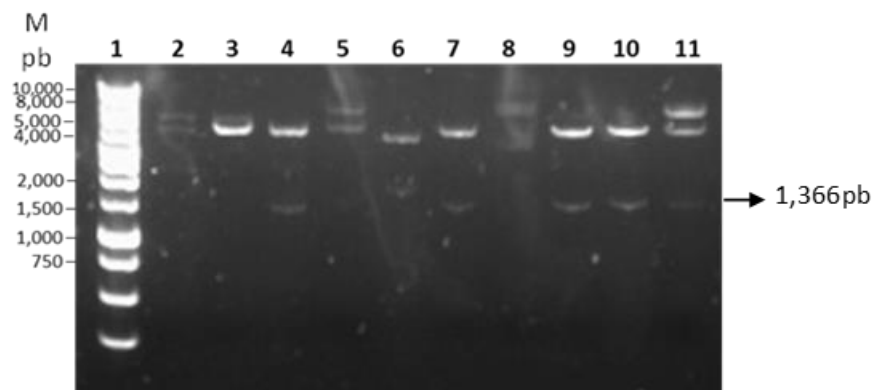


Figura 14. Análisis de restricción con la enzima *EcoRI* de las clonas TOPO-*enolasa*. (1) Marcador de 1kb DNA Ladder Promega, (2-11) DNAp de las clonas 1 a la 10.

3. Secuenciación y análisis *in silico* del gen y la proteína enolasa.

Una vez confirmadas las clonas positivas se seleccionaron para llevar a cabo las reacciones de secuenciación con los distintos iniciadores, para el análisis y edición de secuencia se tomaron en cuenta aquellas secuencias que se resultaron de mejor calidad en el Cromatograma, es decir, donde se observaron picos bien diferenciados de cada base y donde el ruido es muy bajo o casi nulo como se muestra en el ejemplo de la figura 15 panel A.

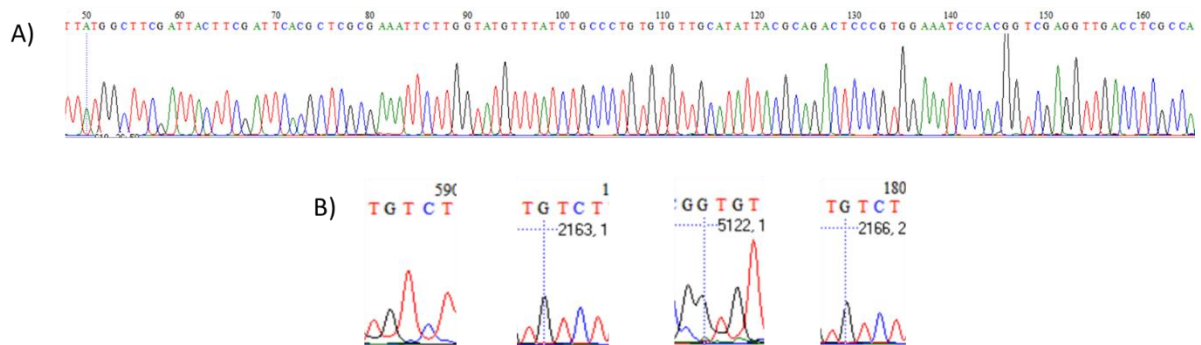


Figura 15. Electroferograma del DNA de la enolasa. A) Secuencia de nucleótidos y datos crudos leídos por el secuenciador de un fragmento del gen. B) Cromatograma donde se señala el único cambio de nucleótido G (128) en las secuencias de cada clona.

La secuencia del gen obtenida mediante secuenciación (Figura 10. Panel A) consta de 1366 pb. Las regiones codificantes y no codificantes se analizaron con el programa GeneWise, el análisis mostró que el gen de la *enolasa* comienza con una región codificante de 39 pb seguida de un único intrón de 37 pb y finalmente otro exón de 1290 pb (figura 11 paneles A y B). La secuencia se subió al GenBank y se encuentra bajo la siguiente referencia: BankIt2190296 EnoBb MK490919.

Al traducir las regiones codificantes se obtuvo una secuencia de 422 aminoácidos con dominios conservados (figura 11 panel B) que se describen a continuación, los sitios de unión a metales que facilitan las reacciones de deshidratación reversible, los sitios de unión a sustrato como el 2-fosfo-D- glicerato o el fosfoenolpiruvato, las interfaces dimericas que también facilitan las reacciones para la gluconeogénesis y glicólisis y un

dominio de barril llamado TIM el cual se ubica en la región carboxilo terminal y pertenece a una superfamilia de proteínas las cuales comparten un motivo de unión a fosfato, para esta secuencia específica se predice que el sitio de unión a fosfato se encuentra entre las hebras 7 y 8 de las hojas beta que forman la estructura conservada de barril. Este último dominio pertenece a una familia de enzimas (ICL/PEPM_KPHMT) que catalizan la formación o ruptura de enlaces formados por fosfato-carbono (P-C) o carbono-carbono (C-C).

Al analizar la hidrofobicidad de cada aminoácido, la tabla de hidropatía no reveló regiones transmembranales significantes (Figura 16 panel A), y mediante el análisis de péptidos señal tampoco se reveló señales que transporten a la proteína a la superficie (Figura 16 panel B).

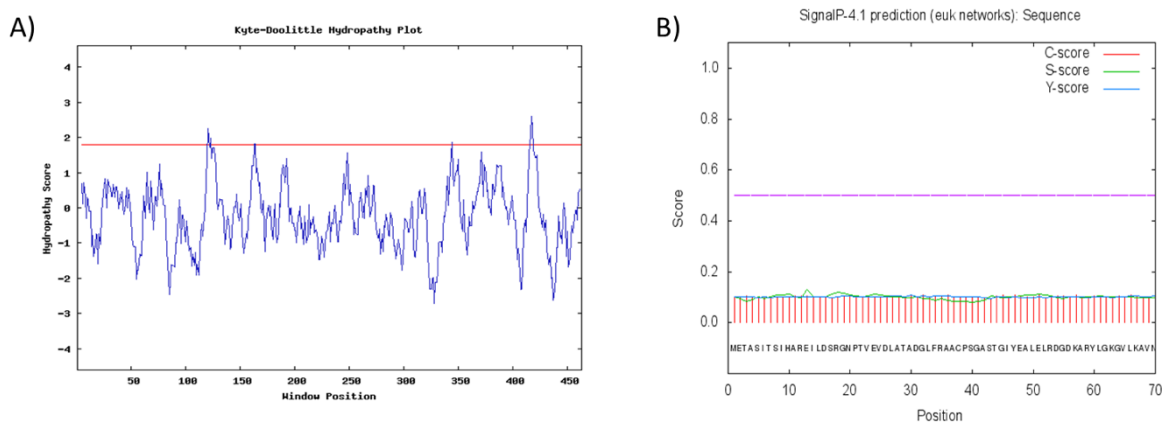


Figura 16. Análisis *in silico* de regiones transmembranales. A) Gráfico de hidropatía de la secuencia de aminoácidos de la enolasa de *B. bigemina* cepa Chiapas. B) Gráfico de predicción de péptido señal en la proteína enolasa de *B. bigemina* cepa Chiapas.

En el alineamiento múltiple representado en la figura 17 se muestran las secuencias de aminoácidos de la enzima enolasa de 5 organismos similares incluyendo la secuencia obtenida en este proyecto nombrada cepa Chiapas. Las regiones marcadas en negro

son regiones altamente conservadas debido a que no se observa un cambio de aminoácido, las regiones marcadas en gris son regiones conservadas en donde se hace evidente un cambio de aminoácido pero este no es un cambio relevante ya que las propiedades de tales aminoácido son similares y no difieren en gran manera, las regiones blancas representan cambios de los aminoácidos entre las secuencias que pueden llevar a la proteína a un cambio en su estructura o función por la diferencia entre las propiedades de aminoácidos. Con base en lo anterior podemos argumentar que la enzima enolasa es una proteína altamente conservada entre organismos del *phylum apicomplexa*.

Tabla 4. Matriz de porcentaje de identidad creada por Clustal2.1 del alineamiento múltiple.

	<i>Toxoplasma</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>Theileria</i>
<i>Toxoplasma</i>	100				
<i>Plasmodium</i>	66.22	100			
<i>B. bovis</i>	62.81	70.36	100		
<i>B. bigemina</i>	63.72	70.81	88.01	100	
<i>Theileria</i>	64.63	71.49	78.51	78.51	100

<i>Toxoplasma</i>	1	-M V VIK I IVAREILDSRGNPTIEVDV S TEGGVFRAAVPSGASTGIYEAL E LRD K DPKRYL
<i>Plasmodium</i>	1	MAHVIT E INAREILDSRGNPTVEVD E TNLGIFRAAVPSGASTGIYEAL E LRD N DKSRYL
<i>B. Bovis</i>	1	-MATIKSVHAREILDSRGNPTVEVD I ITVDGLFRAACPSGASTGIYEAL E LRD G DKIRYL
<i>B. Bigemina</i>	1	-MASI T SIHAREILDSRGNPTVEVD L ATADGVFRAACPSGASTGIYEAL E LRD G DKARYL
<i>Theileria</i>	1	-MSVVKSLKAREILDSRGNPTVEVD L VTEAGLFRAACPSGASTGIYEAL E LRD G DKSRYL
<i>Toxoplasma</i>	60	GKGVINAVEIVRQ E IKFALLGK H PC D QKGDMLMVE C LDG T KNEWGYSKSKLGANAILGV
<i>Plasmodium</i>	61	GKGV C KAL E KNINEI I APKLI G MNCT E QKKIDNLMVE E LDGSKNEWG S KSKLGANAILAI
<i>B. Bovis</i>	60	GKGVLKAVANVNSTLASGV T GHDAT R Q R CLDDY M VK T LDGSENEWGYCKSKLGANAILVV
<i>B. Bigemina</i>	60	GKGVLKAVANVNTITIAAGV K GHDV R QKGLDILMV K LDGSMNEWG H CKSKLGANAILVV
<i>Theileria</i>	60	GKGVLKAVENVNTIVVKN A VVGF D TLN Q ELDTLMV Q R L DG T QNEWGYCKSKLGANAILVV
<i>Toxoplasma</i>	120	SIACC R AGAASK E IPLYKY I ATLAG K TIDKMVMPV F EN V INGGEGHAGN L LAQ E FLIAP
<i>Plasmodium</i>	121	SMAVCRAGAAPNKV S LYKY L AGLAGK S SD M VLPV P CLN V INGGSHAGN L SE Q E F MIVP
<i>B. Bovis</i>	120	SMAAARAAA A PK K IPLY Q H L AELAG K PTDKY M LPV P CLN V INGGSHAGN S LAM Q E F MILP
<i>B. Bigemina</i>	120	SMAAARAAA E SK V P L Y Q H L AELAG K PTD N Y I LPV P CLN V INGGSHAGN S LAM Q E F MILP
<i>Theileria</i>	120	SMAAARAAA A KK V P L Y V H L AELAG K PTDK F V L PV P CLN V INGGSHAGN S LAM Q E F MILP
<i>Toxoplasma</i>	180	VGAPNIREAIRV G SE T YH L LK V I R KKY G L D ATN V GDEGGFAPN V ATAE E AL L LVEA I K
<i>Plasmodium</i>	181	VGAPSFREAIR G AEVY H TLK S E I KKY G I D ATN V GDEGGFAPN I LNA E AL L LV T A I K
<i>B. Bovis</i>	180	VGAPSFREAIR M GC E VY H NL K V I NAKY Q DATN V GDEGGFAPN I KS A E E AL L LV E S I K
<i>B. Bigemina</i>	180	VGAPSFREAIR M GC E VY H NL K V I NAKY Q DATN V GDEGGFAPN I KS A E E AL L LV E S I K
<i>Theileria</i>	180	TGANTFREAIR M GC E VY H TLK S V I KKY Q D T TN V GDEGGFAPN I KS A E E AL L LV D AV K
<i>Toxoplasma</i>	240	AAGYEGK I KI A ED A AASEFYK D PK R Y I LDY K CKTKNASK H ITG E K I KEVYEGWL K KY P I
<i>Plasmodium</i>	241	SAGYEGK V KIAM D VAAASEFY N SEN K TY I LD F K T PN N DKSLV K TGAC L VEL I Y D LV K KY P I
<i>B. Bovis</i>	240	KAGFEG V KIAM D VAAASEFY V KE S SY N LGF K CE---TP N M K S G AEMV P YY K ELC C KY P I
<i>B. Bigemina</i>	240	KAGFEG V KIAM D VAAASEFY V KE S SY N LGF K CE---Q P M K S G EEMV P YY K ELC C KY P I
<i>Theileria</i>	240	KAGFEG V NEIAM D VAAASEFY V KE S SY N LGF K CE---K E L L K T G E MV P YY T N L C E KY P I
<i>Toxoplasma</i>	300	ISVEDPFDQDD E ASE S AF T K D V G R T Q V I G DD I LV T N I IR E K A L K E K AC N GL L L L K V N Q I
<i>Plasmodium</i>	301	VSIEDPFDQDD W ENY A K L TAA I G K T V Q I V G DD L L V T N F R I T H A L E K N AC N ALL L K V N Q I
<i>B. Bovis</i>	297	VSIEDPFDQDD W EAY T LIT K E I G I K V Q I V G DD L L V T N PK R I C TAL D KK K AC N ALL L K V N Q I
<i>B. Bigemina</i>	297	VSIEDPFDQDD W ESY K M L T D E I G A V Q I V G D D L L V T N PK R I E TAL A KK K AC N ALL L K V N Q I
<i>Theileria</i>	297	VSIEDPFDQDD W ECY N K L T S K L G K V Q I V G D D L L V T N PK R I C TAL E KK K AC N ALL L K V N Q I
<i>Toxoplasma</i>	360	GSVTEAIEAC L LACK S CGV V SV H RSGETED S FIAD L V V GL R CG Q I K S G S P CRSER L CKY
<i>Plasmodium</i>	361	GS I TEAIEAC L LS S CK N NW G VMV S HRSGETED V FIAD L V V AL T GT Q I K TGAP C RSER N AKY
<i>B. Bovis</i>	357	GSV S EAI D AC V L S H K NN W G V MV S HRSGETED T FIAD L V V AL T GT Q I K TGAP C RSER N AKY
<i>B. Bigemina</i>	357	GSVTEAID A CL L SH A NS W G V MV S HRSGETED T FIAD L V V AL T GT Q I K TGAP C RSER N AKY
<i>Theileria</i>	357	GSVTE S VEAC L L A H K NN W G V MV S HRSGETED T FIAD L V V GL S TG Q I K TGAP C RSER N AKY
<i>Toxoplasma</i>	420	NQLMRIEE S LGAD C VYAGESFR H PK-
<i>Plasmodium</i>	421	NQLLRIEE S LG N NA V EAGE K FRL Q LN
<i>B. Bovis</i>	417	NQLIRIEE E LG S RASYAGA A FR T CA Q
<i>B. Bigemina</i>	417	NQLIRIEE Q LG S RAF Y AGA A FR T CG N
<i>Theileria</i>	417	NQLLRIEE E LG P RAT Y AG V NFR L SH

Figura 17. Alineamiento Múltiple de la secuencias de aminoácidos de la enolasa de *B. bigemina* (cepa Chiapas), *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Babesia bovis* y *Theileria annulata*, analizadas mediante el programa ClustalW2 y representado por el programa BoxShade.

4. Expresión del gen de la *enolasa* de *B. bigemina* en fase eritrocítica y el vector.

Para analizar la expresión del gen de la *enolasa* en el hospedero y en el vector se llevó a cabo una RT-PCR con muestras de eritrocitos infectados y no infectados como control (-) de eritrocito, muestras de pool de garrapatas *R. microplus* e intestinos de garrapata a distintas horas post-repleción. Los resultados mostrados en la figura 18 indican que el gen de la *enolasa* se expresa tanto en la fase asexual en el eritrocito como en la fase sexual dentro de la garrapata y su expresión varía a diferentes tiempos post-repleción de la garrapata.

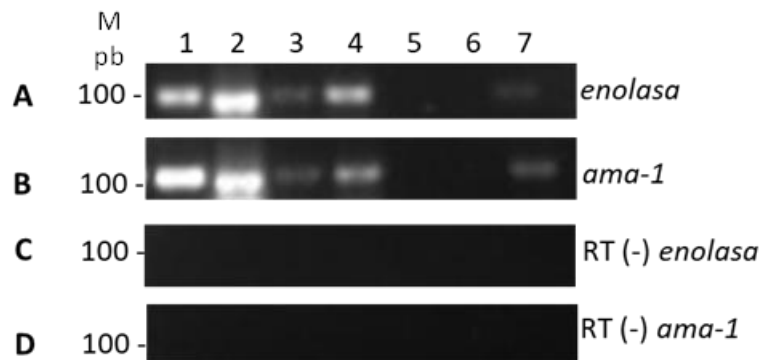


Figura 18. Expresión del gen de la *enolasa* en fase eritrocítica y el vector mediante RT-PCR. Gel de agarosa al 2% teñido con GelRed™ Nucleic Acid. Panel A: amplicón de 100 pb del gen de la *enolasa* de *B. bigemina* Panel B: amplicón de 100 pb del gen *ama-1*. Panel C y D: controles RT- de las reacciones *enolasa* y *ama-1* respectivamente. En los carriles (1) eritrocito infectado, (2) pool de garrapata infectada, (3) intestino de garrapata infectada a las 48 horas, (4) intestino de garrapata infectado a las 72 horas, (5) eritrocito no infectado, (6) garrapata no infectada y (7) PCR.

5. Clonación del gen de la *enolasa* en el vector de expresión pCold I y análisis de clonas.

Se llevó a cabo la amplificación de un fragmento del gen de la *enolasa* de 1029 pb que no contiene el intrón. Posteriormente se preparó el inserto y el vector pCold I cortando con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, la digestión se hizo con la finalidad de linearizar el plásmido y crear extremos complementarios entre el inserto y el vector, después el plásmido fue tratado con fosfatasa alcalina para eliminar el fosfato del 5' del vector y así impedir su autoligación, posteriormente el plásmido y el inserto se limpiaron de residuos de agarosa, enzimas y sales provenientes de las reacciones anteriores (Figura 19). La ligación del inserto con el vector se llevó a cabo con la enzima *T4* ligasa y como controles una reacción sin el inserto y otra reacción sin el inserto y la *T4* ligasa. Para replicar esta construcción se transformaron células competentes DH5 α TM y se analizaron, las clonas se analizaron mediante miniprep y por digestión enzimática con *Bam*HI y *Hind*III para identificar cuáles de ellas contenían la construcción pCold-*enolasa* (Figura 20).

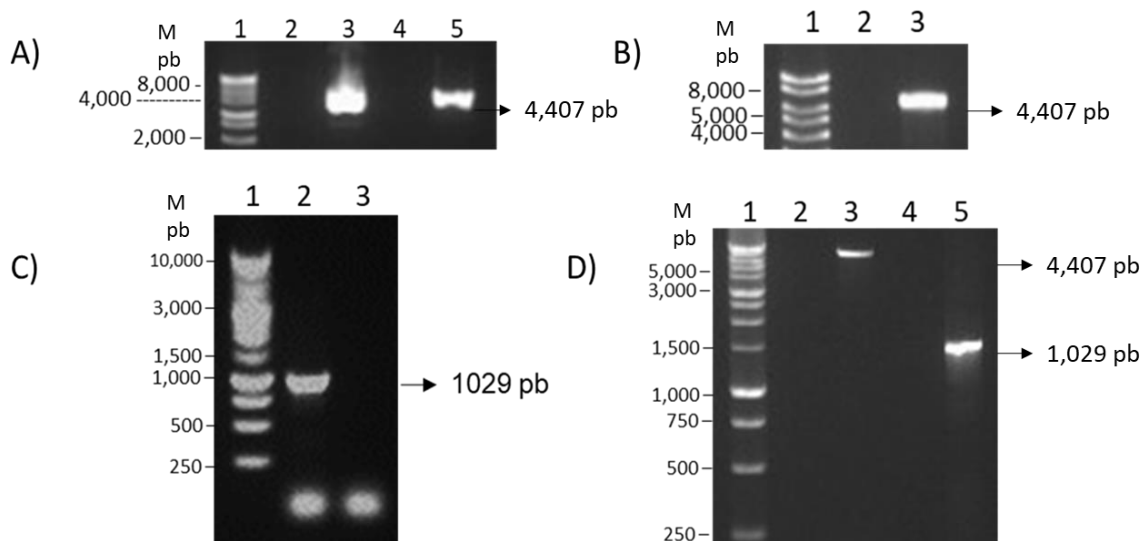


Figura 19. Análisis electroforético del vector-inserto para la transformación en células DH5 α . A) pCold (1) Marcador de 1 kb DNA Ladder Promega, (3) miniprep pCold, (5)

pCold linearizado. B) (1) Marcador de 100 pb DNA Ladder Promega, (3) pCold linearizado, extraído del gel. C) Amplicón de un fragmento del gen de la *enolasa* de 1029 pb por PCR. (1) Marcador de 1 kb DNA Ladder Promega, (2) PCR enolasa, (3) PCR (-). D) Amplicón y plásmido listos para ligar. (1) Marcador de 1 kb DNA Ladder Promega, (3) pCold desfosforilado, (5) Enolasa restringida.

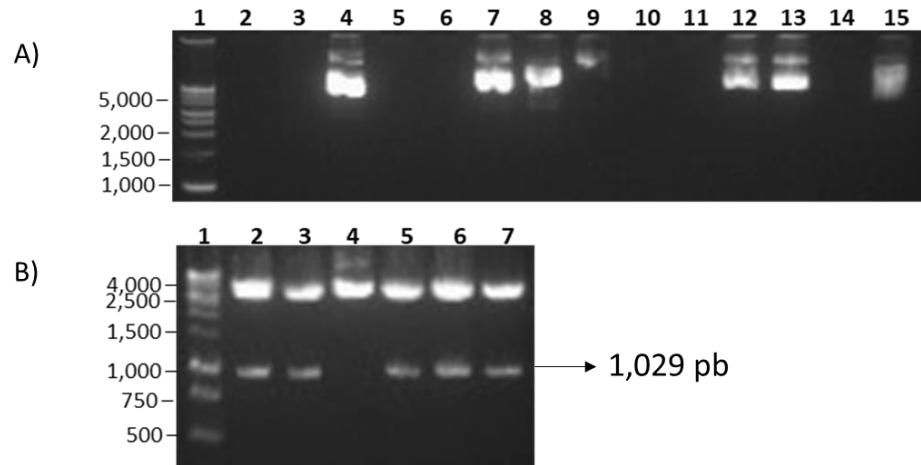


Figura 20. Análisis electroforético de las clonas pCold-enolasa DH5 α . A) Minipreps pCold-Enolasa. (1) Marcador de 100 pb DNA Ladder Promega, (2-15) DNAs de las clonas 1 a la 10 considerando que el carril 6, 11 y 14 están vacíos. B) Doble restricción con enzimas *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pCold-enolasa. (1) Marcador de 100 pb DNA Ladder Promega, (2-7) clona 3, 5, 6, 7, 9 y 10, cabeza de flecha indica el tamaño del gen *enolasa*.

6. Análisis de expresión de la proteína recombinante y su purificación

La clonación molecular de un fragmento del gen de la *enolasa* nos permitió expresar la proteína recombinante en células competentes *E. coli BL21 Rosetta 2*, al hacer el análisis de inducción mediante SDS-PAGE se observó una banda enriquecida de 38 kDa (figura 21 panel A) y se detectó por Western Blot usando anticuerpos anti tag de histidina (Figura 21 panel B), después de analizó la fracción soluble e insoluble de la inducción y encontramos que la proteína se encontraba en la pastilla, fase insoluble, de igual manera esto se detectó mediante Western Blot (figura 21 panel C y D).

La proteína se purificó mediante cromatografía líquida a alta velocidad con una columna de Ni²⁺ con afinidad al tag de histidinas, al estar la proteína en fase soluble se llevó a cabo el protocolo “on column refolding” el cual es específico para proteínas insolubles o cuerpos de inclusión y consiste en desnaturalizar la proteína y replegarla para obtenerla en su forma nativa (figura 22). Las fracciones que se recolectaron se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% (Figura 23 panel A), en este ensayo se observan las fracciones enriquecidas con la proteína recombinante enolasa en un peso esperado, también se llevó a cabo el Western Blot con un ab anti-tag de histidinas.

Las fracciones se dializaron en PBS y se cuantificó la proteína, se obtuvo una concentración de 96.44µg/ml

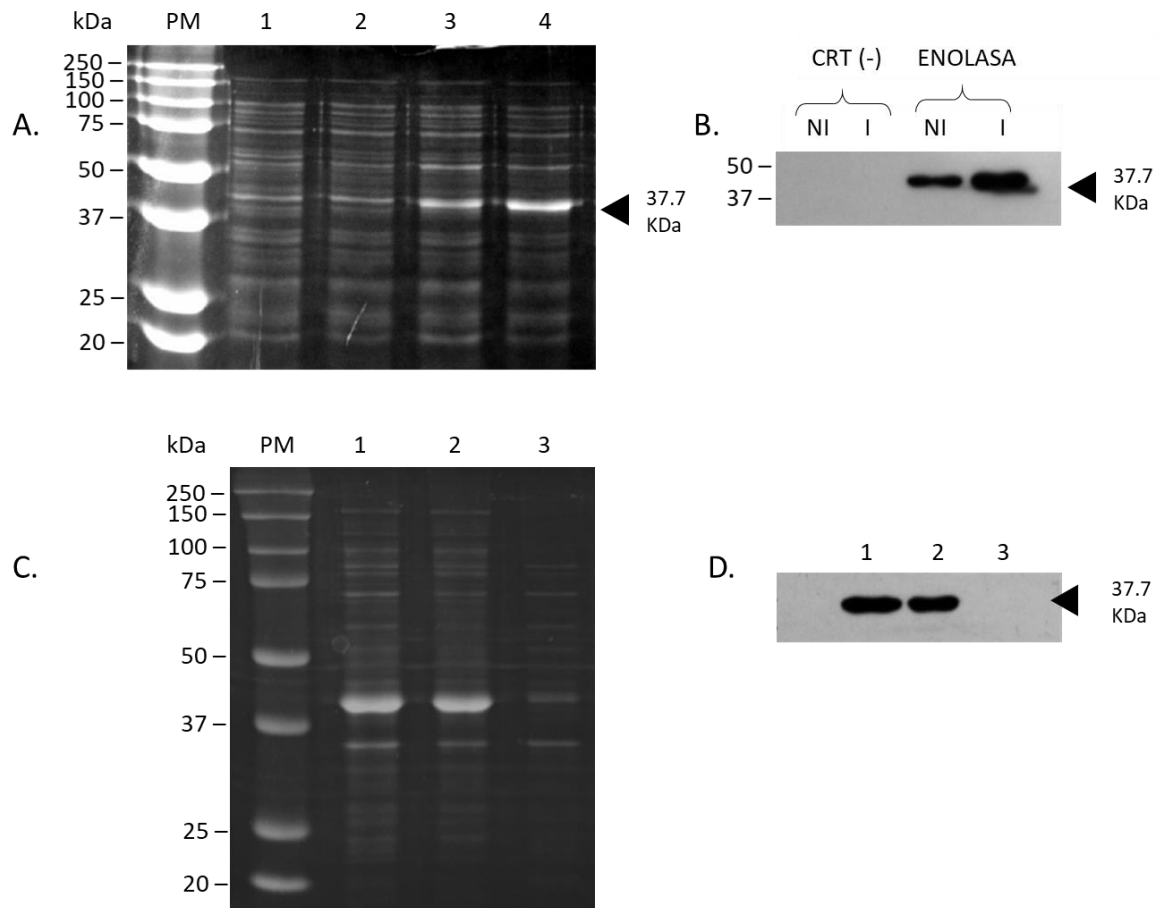


Figura 21. Análisis de la inducción de la proteína recombinante enolasa de *B. bigemina*. A. Electroforesis SDS/PAGE al 10% de un fragmento de la enolasa de 37.7 kDa, carril 1 marcador de peso molecular, Control negativo no inducido (NI) (2), control negativo inducido (I) (3), enolasa no inducida (4) y enolasa inducida (5). B. Detección de la proteína recombinante mediante Western Blot usando anti tag-His. C. Análisis de solubilidad de la proteína recombinante mediante SDS PAGE al 10% y D. Western Blot de la fase soluble e insoluble, (1) inducción, (2) fase insoluble y (3) fase soluble.

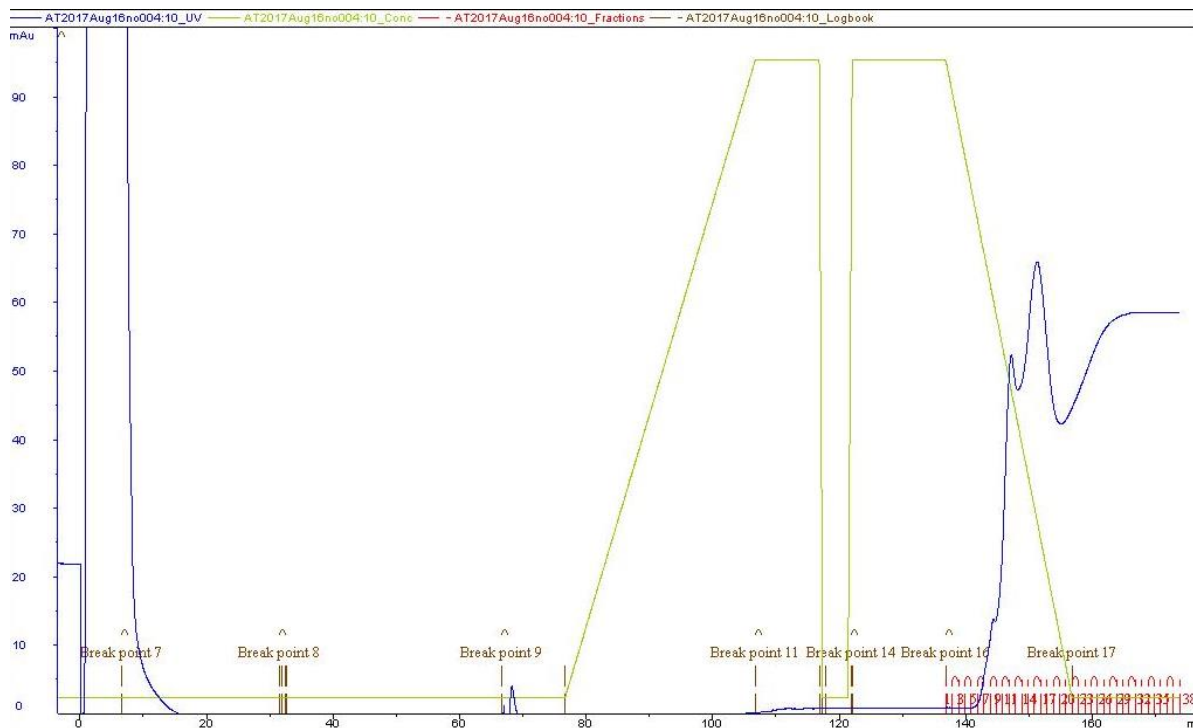


Figura 22. Cromatograma de la purificación de la proteína enolasa recombinante donde se empleó el protocolo “On column refolding”. Se muestra en azul la Absorbancia (mAu) a 280 nm contra las fracciones eluidas, en verde se muestra el gradiente del programa con Urea y en rojo se indican las fracciones colectadas y analizadas.

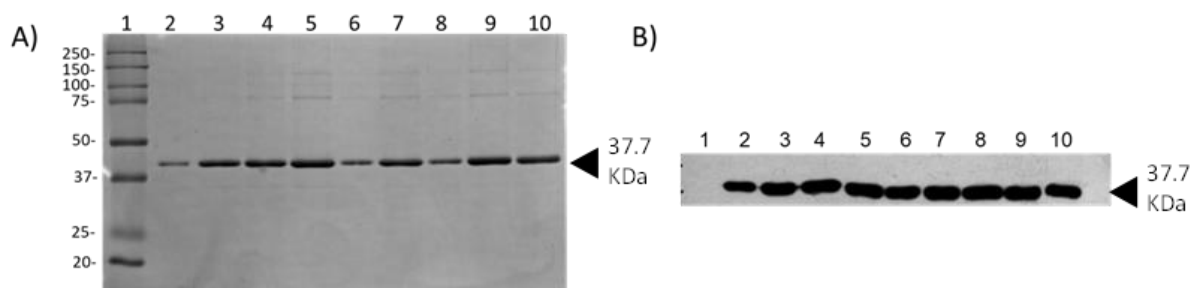


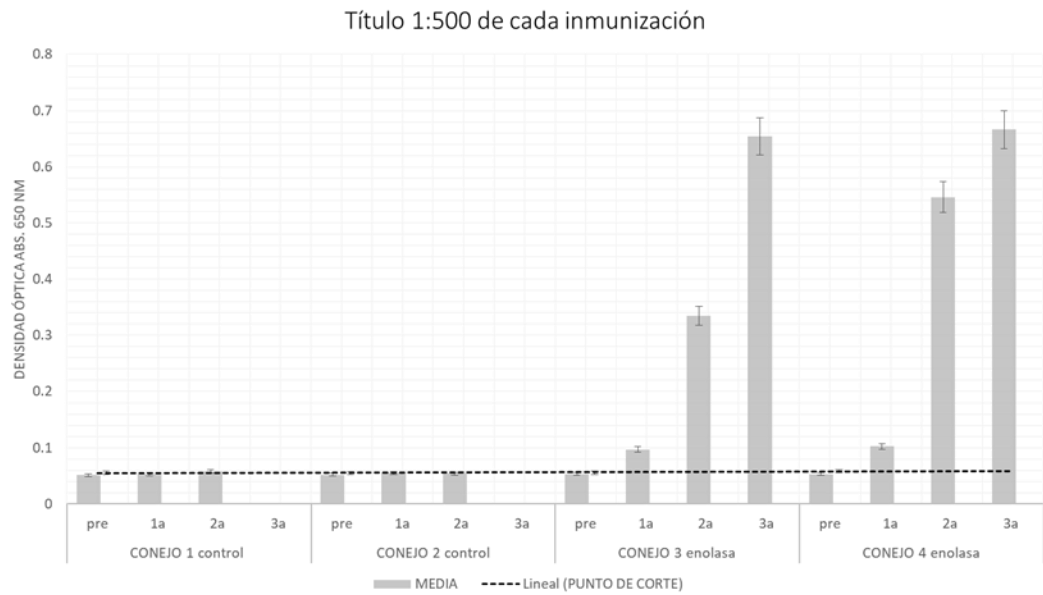
Figura 23. Fracciones obtenidas mediante FPLC. A) SDS.PAGE de las fracciones colectadas con la proteína purificada por FPLC. B) Western Blot de las fracciones colectadas con la proteína purificada por FPLC.

7. Titulación de anticuerpos obtenidos en conejos contra la enolasa.

Se produjeron sueros anti-enolasa en conejos inmunizados con la proteína recombinante purificada y mediante la técnica de ELISA se analizaron los títulos de anticuerpos en cada suero. En la figura 24 panel superior se muestran graficados los títulos de anticuerpos de cada inmunización en dilución 1:500 por conejo, en los sueros de los conejos control no se levantaron títulos como se esperaba y en los conejos inmunizados con enolasa a partir de la primera inmunización se ve como los títulos sobrepasan el punto de corte.

En el panel inferior se muestran graficados los títulos a distintas diluciones del suero del conejo 4 de la 3^a inmunización, como se puede ver el suero pasa el punto de corte desde la dilución 1:128,000 hasta 1:500, como control se usó el suero de la 2^a inmunización.

A)



B)

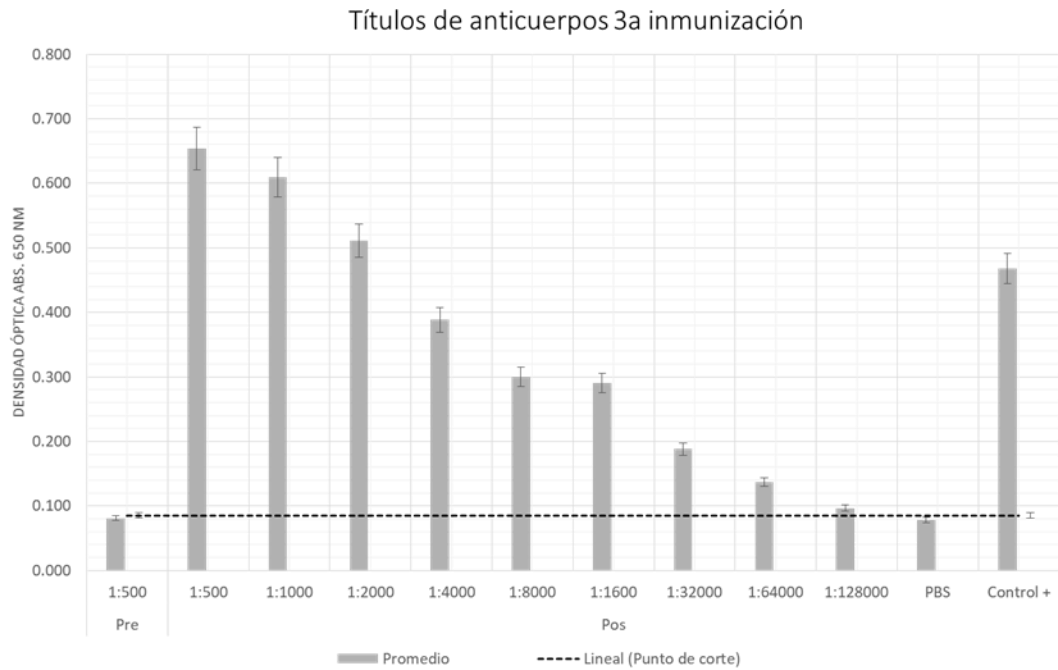


Figura 24. Gráficos de titulación de anticuerpos de suero de conejo. A) Títulos de anticuerpos en dilución 1:500 de cada inmunización y de cada conejo, donde el conejo 1 y 2 se inmunizaron con adyuvante y el 3 y 4 se inmunizaron con 100µg de enolasa recombinante B) Títulos de anticuerpos del suero inmune 3^a del conejo 4 en distintas diluciones.

8. Inmunodetección de la proteína enolasa en fase eritrocítica

Para comprobar la especificidad de los sueros anti-enolasa se llevó a cabo un Western Blot con membranas que contenían las proteínas de sangre infectada y no infectada, para esto se preparó el antígeno frío para Western Blot de ambas muestras. Se usó suero preinmune en dilución 1:2,000 y suero de la 2ª inmunización 1:500, como anticuerpo secundario se usó anti conejo IgG HRP en dilución 1:5000, la exposición se llevó a cabo durante 48 horas donde se visualizó una banda en el peso esperado y pequeñas bandas en pesos bajos como productos de degradación (Figura 25). En la tira con suero inmune no se reveló ninguna banda así como en las tiras de sangre no infectada como se esperaba.

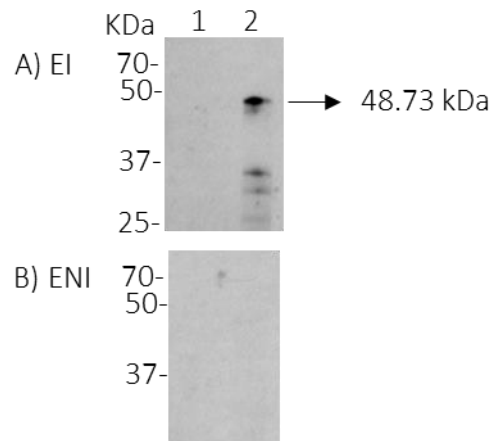


Figura 25. Inmunodetección de la proteína enolasa de *B. bigemina* en fase eritrocítica. Western Blot de proteínas. Panel A: Eritrocitos Infectados (EI), panel B: Eritrocitos No Infectados (ENI), el carril (1) fue incubado con suero preinmune de conejo y el carril (2) con suero de conejo inmunizado con la enolasa recombinante.

9. Inmunolocalización de la proteína enolasa con anticuerpos anti-enolasa

Mediante Inmunofluorescencia Indirecta en frotis de sangre de bovino infectada con una cepa de *B. bigemina* Texas y con los sueros anti-enolasa de la última inmunización y suero preinmune se reveló la proteína enolasa del parásito. En la figura 26 en el panel superior se muestra un eritrocito infectado en la primer columna se muestran los núcleos del parásito dentro del eritrocito, en la siguiente columna se observa la proteína enolasa en verde generalmente en el citoplasma aunque se alcanzan a diferenciar cúmulos en la membrana del parásito, la siguiente columna muestra un sobrelapamiento de todas las imágenes más el campo claro donde se diferencia el eritrocito infectado. En el panel inferior se muestra otro eritrocito infectado pero no se observa a la proteína enolasa ya que el suero no contiene anticuerpos anti-enolasa.

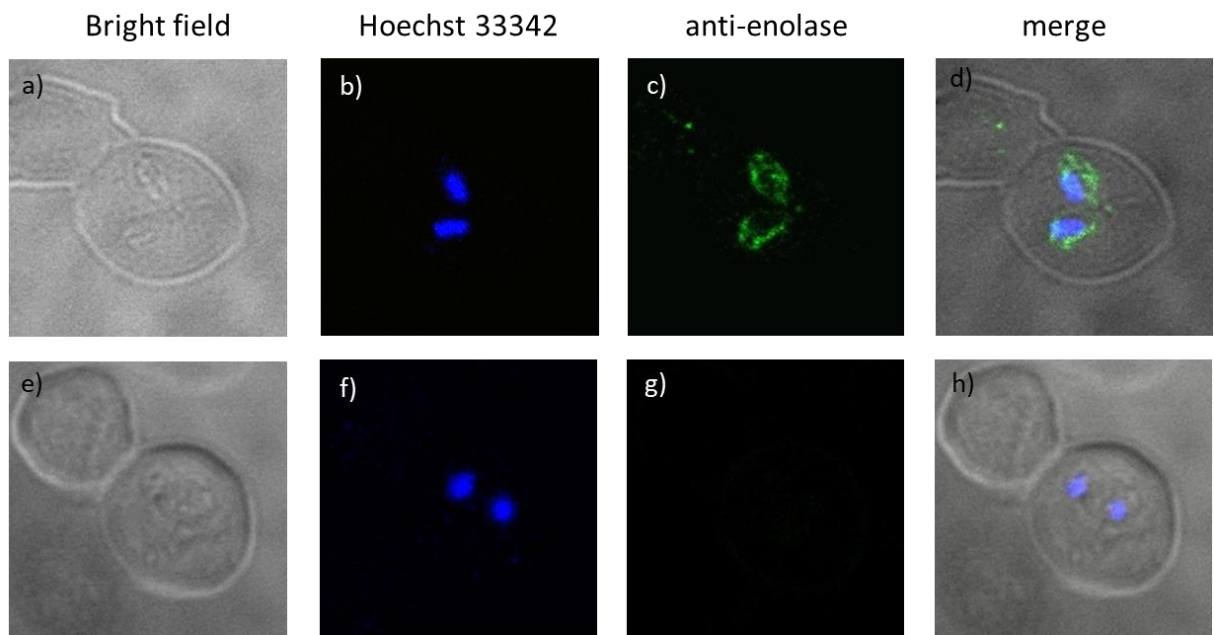


Figura 26. Inmunolocalización de la proteína enolasa de *B. bigemina*. Frotis de eritrocitos infectados con *B. bigemina* se incubaron con suero de conejo anti enolasa (a, b, c, d). Como control negativo se incubó con el suero preinmune de conejo y no se observó ninguna señal (e, f, g, h).

X. DISCUSIÓN

El ciclo de vida de *B. bigemina* es complejo, con reproducción asexual en el eritrocito del hospedero vertebrado y sexual en el vector invertebrado *R. microplus*. La fase sexual de la reproducción se lleva a cabo en el intestino medio de la garrapata, en este sitio el parásito sufre una serie de transformaciones hasta la formación de gametocitos que dan lugar a los gametos los que se fusionan para formar un cigoto, el cual se convierte en una forma móvil que atraviesa el epitelio intestinal medio para pasar a la hemolinfa. El estudio de las moléculas involucradas en este proceso es clave para conocer los mecanismos moleculares de la interacción vector-parásito e identificar proteínas que puedan estudiarse como blancos en el desarrollo de vacunas contra el parásito (Mosqueda et al., 2004; Mosqueda et al., 2012; Mukherjee et al., 2016).

En diversos microorganismos se ha identificado a la proteína enolasa como factor de virulencia y además esta proteína participa en el proceso de invasión a sus células blanco (Díaz-Ramos et al., 2012) por lo que el presente estudio se enfocó al análisis del gen y la proteína enolasa de *B. bigemina*.

La proteína enolasa es una enzima glicolítica que es altamente conservada y puede llevar a cabo otras funciones por lo que se le conoce como una proteína “moonlight”, muchos parásitos *apicomplexa* expresan a la enzima enolasa en la superficie celular con la finalidad de facilitar el mecanismo de invasión en el hospedero y el vector (Amblee et al., 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio nos permitieron determinar la localización de la enolasa y distintas características del gen *EnoBb* de *B. bigemina* y de la proteína. El análisis *in silico* evidenció que la longitud del gen y la secuencia codificante es muy similar a lo reportado para otros parásitos. El gen *EnoBb* contiene un intrón al igual que los genes de la enolasa reportados de *B. bovis*, *T. annulata*, *T. gondii* y distintas especies

de *Plasmodium*, inclusive este intrón se encuentra muy cercano a la región 5' en todas estas secuencias. En cuanto a la longitud del gen *EnoBb* de *B. bigemina* el tamaño varía un poco con respecto a otros parásitos *apicomplexa*, pero el RNAm mantiene un tamaño similar, por ejemplo el gen TGME49_268850 de *T. gondii* tiene una longitud de 2365 pb pero el RNAm mide 1428 pb, en *P. falciparum* el gen PF3D7_1015900 mide 1874 pb y el RNAm es de 1341pb, el gen BBOV_III007950 de *B. bovis* tiene 1366 pb y al transcribirse consta de 1329 pb, el gen TA10425 de *T. annulata* tiene 1365 pb y el RNAm 1329 pb (Bhowmick., 2007; Brayton et al., 2007; Cayir et al., 2014).

En consecuencia de lo anterior los productos de la traducción también mantiene un peso molecular aproximado, como *T. africano*, *T. americano* y *Leishmania* la proteína enolasa está conformada por 429 aminoácidos con un peso de 46 kDa (Hannaert et al., 2003) en *P. yoelii* el producto del gen de la *enolasa* tiene un peso de 50 kDa (Bhowmick., 2007), en *B. bovis* y en *T. annulata* el gen se expresa en una proteína de 442 aminoácidos con un peso de 48 kDa (Brayton et al., 2007; Cayir et al., 2014) y en *T. gondii* la enolasa está formada por 475 aminoácidos, aunque el tamaño es similar entre todas las especies, la diferencia se puede deber a la conservación o pérdida de dominios funcionales.

La secuencia del gen *EnoBb* evidenció un cambio en una base con relación a la secuencia del gen de la *enolasa* de la cepa BOND (BBBOND_0306700) reportada en el GenBank, este cambio de nucleótido conlleva al cambio del residuo de aminoácido en la posición 31, de una leucina por una valina, no obstante este cambio no se considera relevante ya que ambos aminoácidos tienen una cadena lateral apolar.

El alineamiento de los aminoácidos de la proteína enolasa de *B. bigemina* mostró que la enzima enolasa es altamente conservada al ser comparada con otros organismos similares, el porcentaje de identidad de la enolasa cepa Chiapas es del 70% al 90% aproximadamente, excepto con *Toxoplasma* con quien tiene un porcentaje de identidad del 63.72%. La proteína enolasa de la cepa Chiapas presenta los dominios característicos reportados para esta enzima, como el dominio en forma de barril en el extremo carboxilo terminal el cual pertenece a la familia de proteínas

ICL/PEPM_KPHMT, éste contiene el sitio activo donde se lleva a cabo la conversión del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en la glicólisis (Keller et al., 2007), también conserva los sitios de unión a metales en el residuo 41, 252, 300 y 327 los cuales han sido mencionados en reportes donde se describe que son esenciales para la activación de la enzima enolasa glicolítica provocando un cambio en su conformación (Avilán et al., 2011), también contiene los sitios de unión a sustrato en los residuos 165, 217, 352, 380-382 y 403 y las interfaces diméricas en los residuos 8, 10-18, 22, 33, 166-138, 189, 193, 194, 197, 198, 213, 214, 221, 223, 384-386, 409-411, 414, 415, 417, 420, 421 y 424 esenciales para llevar a cabo su función común en el citosol (Nelson et al., 2007), la secuencia de la proteína enolasa no muestra regiones transmembranales ni péptidos señal y como se ha reportado hasta ahora se desconoce cómo es que la enolasa se localiza en regiones transmembranales de los parásitos (Mukherjee et al., 2016).

La enolasa de otros parásitos como *Plasmodium* y *Toxoplasma* contienen un dominio de lisinas de unión al plasminógeno en el extremo C-terminal (DLDFKTPNNDKS) sin embargo se menciona en la literatura que éste dominio se ubica en el mismo lugar en otras enolasas de otros organismos aunque no conserven las lisinas y aun así llevan a cabo la unión de plasminógeno (Bhowmick et al., 2009; Pancholi., 2001), esta región es precisamente la más variable entre secuencias de cada organismo, sin embargo en *B. bovis*, *B. bigemina* y *T. annulata* esta región es muy conservada entre ellas y solo conservan una lisina.

Otra región de la enolasa de *Plasmodium* involucrada en el proceso de invasión del epitelio del intestino medio del mosquito es el epítipo EWGWS el cual está ausente en la enolasa del humano, hospedero de *Plasmodium*, este epítipo al ser bloqueado con anticuerpos monoclonales inhibe el crecimiento de los merozoítos en la sangre, el sitio en el que se encuentra el epítipo EWGWS en el alineamiento se observa como una región muy conservada (Dutta et al., 2018; Mukherjee et al., 2016). En la secuencia de aminoácidos de la enolasa de la cepa Chiapas de *B. bigemina* existe una secuencia EWGHC, similar a la anteriormente mencionada de *Plasmodium*, solo diferente en los

dos últimos residuos, por lo que anticuerpos contra este epítipo podrían inhibir la infección en eritrocitos.

Los resultados presentados aquí demuestran que el gen de la *enolasa* de *B. bigemina* *EnoBb* se expresa a nivel de transcrito tanto en la fase asexual como en fases sexuales del parásito, esto sucede de igual manera en distintas especies de *Plasmodium*, donde la enzima se expresa en las fases sanguíneas en el humano como en el intestino medio del vector (Alvarado-Delgado et al., 2016). Reportes anteriores mencionan que la enolasa se sobre expresa en los estadios sexuales de una gran variedad de parásitos facilitando el proceso de invasión mediante la unión y activación de plasminógeno en plasmina la cual degrada a la matriz extracelular permitiendo que el parásito atraviese las células y continúe con su ciclo de vida, como sucede en el proceso de invasión de *Plasmodium* en el intestino de su vector el mosquito (Bhowmick et al., 2009; Dutta et al., 2018).

La enzima enolasa de *Plasmodium* ha sido localizada en gran parte en el citosol pero también se encontró en el núcleo, vacuola, citoesqueleto y membrana plasmática (Vega-Rodríguez et al., 2014), en nuestro estudio nosotros logramos inmunolocalizar a la proteína enolasa de *B. bigemina* en eritrocitos de un bovino infectado, los resultados muestran que la enzima enolasa se expresa en eritrocitos infectados, fundamentalmente en el citoplasma como se esperaba, debido a la función común que lleva a cabo en la vía glicolítica, también se distinguen pequeños depósitos o cúmulos en la membrana del parásito y la membrana nuclear del parásito, sin embargo en el presente trabajo fuimos incapaces de identificar a la proteína en membranas o citoesqueleto, por lo que será necesario en estudios futuros, realizar ensayos de colocalización usando anticuerpos específicos contra diferentes componentes celulares de *B. bigemina*. En otros parásitos *apicomplexa* se ha reportado la expresión de la enolasa en la membrana plasmática lo que podría relacionar a esta proteína al proceso de invasión a las células hospedero (Gómez et al., 2014). La presencia de la enolasa en el núcleo de *Plasmodium* spp se ha reportado que se asocia con la regulación de la transcripción, además la localización de esta proteína en el citoesqueleto en asociación

con proteínas como la actina se cree que puede relacionarse con el proceso por el cual la enolasa es translocada a otros compartimentos celulares como vacuola y membrana plasmática (Bhowmick., 2007; Bhowmick et al., 2009).

En *P. yoelii* mediante ensayos de neutralización y bloqueo con anticuerpos específicos contra un fragmento extracelular de la enolasa, se logró demostrar la inhibición de la infección de los eritrocitos identificando a la enolasa como una proteína inmunogénica, bloqueadora de la transmisión y por lo tanto como candidata vacunal.

Este trabajo es el primer reporte de estudios de la proteína enolasa de *B. bigemina* la que se expresa en las etapas asexuales y sexuales del ciclo de vida del parásito sin embargo es importante realizar ensayos adicionales de colocalización y neutralización que revelen más información sobre la función de esta proteína en *B. bigemina* durante el proceso de invasión a su vector invertebrado *R. microplus*.

XI. CONCLUSIONES

1. El genoma de *B. bigemina* contiene un gen de 1366 pb que codifica para la proteína enolasa.
2. El gen *EnoBb* de la enolasa se localiza en el cromosoma III de *B. bigemina*.
3. El gen *EnoBb* (MK400919) tiene un 99% de identidad con el gen de la *enolasa* (BBBOND_0306700) reportado en el en el GenBank.
4. El gen *EnoBb* se expresa en las fases eritrocíticas y en el vector *R. microplus*..
5. La proteína enolasa se expresa en la membrana plasmática y citosol del parásito en eritrocitos de bovino infectado con *B. bigemina*.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alaa, T. M., Junio, S. F., Eko, W. P., Xuan, H. N., Minoda, Y., Aboulaila, M., Kawai, S., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I. (2011). Secretion of a new spherical body protein of *Babesia Bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasit.* 178, 4-45
2. Albert, M., Haanstra, J., Hannaert, V. (2005). Experimental and in silico analyses of glycolytic flux control in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (31), 28306–28315.
3. Alonso, M., Arellano-Sota, C., Cereser, V., Cordoves, C., Guglielmone A., Kessler R. (1992). Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev. Off. Int. Epizoot*, 11, 713–733.
4. Alvarado-Delgado, A., Perales Ortiz, G., Tello-López, Á. T., Encarnación, S., Conde, R., Martínez-Batallar, Á. G., Moran-Francia, K., ... Lanz-Mendoza, H. (2016). Infection with *Plasmodium berghei* ookinetes alters protein expression in the brain of *Anopheles albimanus* mosquitoes. *Parasites & vectors*, 9(1), 542.
5. Amblee, V., Jeffery, C. J. (2015). Physical Features of Intracellular Proteins that Moonlight on the Cell Surface. *PLoS ONE*, 10(6), 1-16.
6. Araque, A., Ujueta, S., Bonilla, R., Gómez, D., Rivera, J. (2014). Acaricidal resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in some colombian cattle farms. *Actualidad & Divulgación Científica*, 17 (1), 161 – 170.
7. Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., González-González, L., Hannaert, V., Michels, P. A., & Concepción, J. L. (2011). Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of *Trypanosomatid* parasites- perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme research*, 2011, 932549.

8. Benavides, E., Romero, J., & Villamil, L. (2016). *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*. Obtenido de Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático (Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático): <http://repiica.iica.int/docs/B4212e/B4212e.pdf>
9. Bhowmick, I. V. (2007). Sub-cellular localization and post-traductional modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. *Malaria Journal*, 6(45).
10. Bhowmick, I., Kumar, N., Sharma, S., Coppens, I., & Jarori, G. (2009). *Plasmodium falciparum* enolase: stage-specific expression and sub-cellular localization. *Malaria Journal*, 8(179), 16.
11. Brayton, K., Lau, A., Herndon, D., Hannick, L., Kappmeyer, L., Berens, S., Bidwell, S., Brown, W., Crabtree, J., Fadrosch, D., Feldblum, T., Forberger, H., Haas, B., Howell, J., Khouri, H., Koo, H., Mann, D., Norimine, J., Paulsen, J., Radune, D., Ren, Q., Smith, R., Suarez, C., White, O., Wortman, J., Knowles, D., McElwain, T., Nene, V.(2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of *apicomplexan* hemoprotozoa. *PLoS Pathog.* 3(10). 1401-13.
12. Brown, W. C., McElwain, T. F., Hötzel, I., Suarez, C. E., & Palmer, G. H. (1998). Helper T-Cell Epitopes Encoded by the *Babesia bigemina* rap-1 Gene Family in the Constant and Variant Domains Are Conserved among Parasite Strains. *Infection and Immunity*, 66(4), 1561-1569.
13. Cantu, A., Ortega-S, A., Mosqueda, J., Garcia-Vazquez, Z., Henke, E., George, J. (2007). Immunologic and Molecular Identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Free-Ranging White-Tailed Deer in Northern Mexico *Journal of Wildlife Diseases*, 43(3), 504-507

14. Cayir, E., Erdemir, A., Ozkan. (2014). Cloning of Intron-Removed Enolase Gene and Expression, Purification, Kinetic Characterization of the Enzyme from *Theileria annulata*. *Mol Biotechnol* 56 (8), 689-696.
15. Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37-55.
16. Coleman, P., Perry, B., Woolhouse, M. (2001). Endemic stability a veterinary idea applied to human public health. *The Lancet*, 357(9264), 1284-1286.
17. Dalglish, J., Stewart, P., Callow, L. (1978). Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus*. *Aust Vet J*, 54, 205-206
18. Degen, J. L., Bugge, T. H., Goguen, J. D. (2007). Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5 (1), 24-31.
19. De la Torre-Escudero, D., Manzano-Román, R., Pérez Sánchez, R., Siles-Lucas, M., Oleaga, A. (2010). Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Veterinary Parasitology*, 173, 73-84.
20. Díaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A., & López-Aleman, R. (2012). α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 156795.
21. Dutta, S., Tewari, A., Balaji, C., Verma, R., Moitra, A., Yadav, M., Agrawal, P., Sahal, D., ... Jarori, G. K. (2018). Strain-transcending neutralization of malaria parasite by antibodies against *Plasmodium falciparum* enolase. *Malaria journal*, 17(1), 304.
22. Gaffar, F. R., Yatsuda, A. P., Franssen, F. F. J., & de Vries, E. (2004). Erythrocyte Invasion by *Babesia bovis* Merozoites Is Inhibited by Polyclonal Antisera Directed against Peptides Derived from a Homologue of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1. *Infection and Immunity*, 72(5), 2947-2955.

23. Gale, P., Stephenson, B., Brouwer, A., Martinez, M., de la Torre, A., Bosch, J., Muñoz, M. (2012). Impact of climate change on risk of incursion of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in livestock in Europe through migratory birds. *J Appl Microbiol*, 112(2), 246-257.
24. Gallego, J. (2007). Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. *Barcelona: Edicions Universitat Barcelona*, 166-206.
25. Gim, SA, Lee, SR, Shah, FA, y Koh, PO (2015). La curcumina atenúa la reducción inducida por la oclusión de la arteria cerebral media en la expresión de la γ -enolasa en un modelo animal. *Laboratorio de investigación con animales*, 31 (4), 198-203.
26. Gómez, A., Acosta, H., Quiñones, W., Concepción, J. L., Michels, P., Avilán, L. (2014). Extracellular functions of glycolytic enzymes of parasites: Unpredicted use of ancient proteins. *Molecular & Biochemical Parasitology Review*, 193, 75-81.
27. Gosh, A., Coppens, I., Gårdsvoll, H., Ploug, M., & Jacobs, M. (2011). *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *PNAS*, 108(14), 17153-17158.
28. Gosh, A & Jacobs, M. (2011). Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *NIH Public Access*. 106(0 1), 85-90.
29. Hannaert, V., Albert, M., Rigden, D. (2003). Kinetic characterization, structure modelling studies and crystallization of *Trypanosoma brucei* enolase. *European Journal of Biochemistry*, 270(15), 3205-3213.
30. Howell, S. A., I. Well, S. L. Fleck, C. Kettleborough, C. R. Collins, and M. J. Blackman. (2003). A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. *J. Biol. Chem.* 278, 23890-23898.
31. Jeffery, C.J. (2014). An introduction to protein moonlighting. *Biochemical Society Transactions*. 42 (6), 1679-1683.

32. Kaberdin, V. Lin-Chao, S. (2009). Unraveling new roles for minor components of the *E. coli* RNA degradosome. *RNA Biology*. 6(4). 402–405.
33. Keller, J. Peltzer, G. Carpentier. (2007). Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1770(6). 919–926.
34. Kornblatt, M., Lange, R., Balny, C. (1998). Can monomers of yeast enolase have enzymatic activity. *European Journal of Biochemistry*, 251(3), 775–780.
35. Lähteenmäki, K., Kuusela, P., Korhonen, T.K. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiology Reviews*, 25 (5), 531–552.
36. Levine, N. (1971). Taxonomy of the Piroplasms. *Transactions of the American Microscopical Society*, 90(1), 2-33.
37. Nelson, L.D., Cox, M.M. (2007). Structure and catalysis: Enzymes: Examples of Enzymatic Reactions. *Lehninger Principles of Biochemistry. Fifth ed. (New York, United States of America)*, 213
38. Niu, Q., Liu, Z., Yu, P., Yang, J., Abdallah, M. O., Guan, G., Liu, G., Luo, J., Yin, H. (2015) Genetic characterization and molecular survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Babesia ovata* in cattle, dairy cattle and yaks in China. *Parasites & Vectors*, 8 (518), 1-13.
39. Nomura, M., Kato, K., Nagasaka, A., Shiga, Y., Miyagi, Y., Fukui, R., Nakano, H., Abo, Y., Okajima, S., ... Nakai, A. (1987). Serum beta-enolase in acute myocardial infarction. *British heart journal*, 58(1), 29-33.
40. McElwain, T. F., L. E. Perryman, A. J. Musoke, and T. C. McGuire. (1991). Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47, 213–222.
41. Mehlhorn, H., Schein, E. (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* 23, 37–103.
42. Miles, L. A., Hawley, S. B., Baik, N., Andronicos, N. M., Castellino, F. J., Parmer, R. J. (2005). Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation. *Frontiers in Bioscience*.10 (2), 1754–1762.

43. Morahan, B. J., Wang, L., Coppel, R. L. (2009) No TRAP, no invasion. *Trends Parasitol* 25, 77–84.
44. Morrissette, N., Sibley, L. (2002). Cytoskeleton of *Apicomplexan* Parasites. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66 (1), 21–38.
45. Mosqueda, J., Falcon, A., Alvarez, J., Ramos, J., Oropeza-Hernandez, L.F., Figueroa, J.V. (2004). *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *Int. J. Parasitol*, 34, 1229–1236.
46. Mosqueda, J., Olvera, A., Aguilar, G., Cantó, G. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19 (10), 1504-1518.
47. Mukherjee, D., Mishra, P., Joshi, M., Kumar, Prasoona., Hosur, R, Jarori, G. (2016). EWGWS insert in *Plasmodium falciparum* ookinete Surface enolase is involved in binding of pwwp containing peptides: Implications to mosquito midgut invasion by the parasite. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 68, 13-22.
48. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2004). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Obtenido de: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
49. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2013). Bovine Babesiosis https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/BOVINE_BABESIOSIS.pdf
50. Pal-Bhowmick, I., Mehta, M., Coppens, I., Sharma, S., Jarori, G. K. (2007). Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase. *Infect Immun*, 75 (11), 5500-5508.
51. Pancholi, V. (2001). Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58 (7). 902–920.

52. Prado, P.G., Rodrigues, L. K., Bonatto, D., Bunselmeyer, F. H. (2015). Systems biology approach reveals possible evolutionarily conserved moonlighting functions for enolase. *Computational Biology and Chemistry*, 58, 1-8.
53. Quiñones, W., Peña, P., Domingo, M. (2007). Leishmania mexicana: molecular cloning and characterization of enolase. *Experimental Parasitology*, 116, (3), 241-251.
54. Ray, B., Bailey, C., Jensen, J., Carson, C. (1992). Chromosomes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Mol Biochem Parasitol*, 51 (1), 123-126.
55. Riek, R. (1964). The life cycle of *babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893). *Australian Journal of Agricultural Research*, 802-821.
56. Rojas, E., Mosqueda, J., Álvarez, J., Hernández, R., Ramos, J., Rojas, C., Cantó, G., Vega, C., Figueroa, J. (2011). Transmissibility of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* attenuated strains by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Revista Mexicana de Ciencias Precuarias*, 2 (3), 267-281.
57. Segovia-Gamboa, N., Chávez-Munguía, B., Medina-Flores, Y. (2010). Entamoeba invadens, encystation process and enolase. *Experimental Parasitology*, 125 (2), 63-69.
58. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2019). Situación actual del control de la garrapata boophilus spp.
<https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
59. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). (2006). Manual de Anaplasmosis y Babesiosis.
<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=874&io=3414>
60. Smith, R. (1978). Ciclo biológico de *babesia* en la garrapata. *Ciencia Veterinaria*, 2, 234-260

61. Solis, S. (1991). Epidemiología de garrapatas *Boophilus* y *Amblyomma* en México. *Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten.*, Morelos, México, 19-30.
62. Solorio, J., & Rodríguez, R. (1997). Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. *Rev Biomed*, 8(1), 37-47.
63. Terkawi, M. A., Ratthanophart, J., Salama, A., AbouLaila, M., Asada, M., Ueno, A., Igarashi, I. (2013). Molecular Characterization of a New *Babesia bovis* Thrombospondin-Related Anonymous Protein (BbTRAP2). *PLoS ONE*, 8(12).
64. The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). (2007). Obtenido de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* : http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_microplus-es.pdf
65. The Food Security and Public Health (CFSPH). (2008). Obtenido de Babesiosis bovina http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis_bovina.pdf
66. Uilenberg, G. (2006). Babesia – A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138, 3–10
67. Vanegas, G., Quiñones, W., Carrasco, L. C., Concepción, J. L., Albericio, F., Avilán, L. (2007). Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitology Research*, 101 (6), 1511–1516.
68. Vega-Rodríguez, J., Ghosh, A. K., Kanzok, S. M., Dinglasan, R. R., Wang, S., Bongio, N. J., Kalume, D. E., Miura, K., Long, C. A., Pandey, A., ... Jacobs-Lorena, M. (2014). Multiple pathways for *Plasmodium* ookinete invasion of the mosquito midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), E492-500.
69. Walker, M., McArthur, J., McKay, F., Ranson, M. (2005). Is plasminogen deployed as a *Streptococcus pyogenes* virulence factor. *Trends in Microbiology*. 13(7). 308–313.

70. Wang, S., Ghosh, A. K., Bongio, N., Stebbings, K. A., Lampe, D. J., Jacobs-Lorena, M. (2012). Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 12734–12739.
71. Willadsen, P and Jackson, L. *Sanger Institute*. Obtenido de Babesia bigemina: <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/babesia-bigemina.html>

XIII. ANEXO

1. Soluciones y medios de cultivo

- Medio LB- ampicilina

Disolver 10 g de Luria Broth (LB) en 500 ml de H₂O destilada, esterilizar y dejar enfriar, una vez frío en área estéril añadir la ampicilina 1 M.

- LB Agar- ampicilina

Disolver 10 g de Luria Broth (LB) y 7.5 g de Agar en 500 ml de H₂O destilada, esterilizar y dejar enfriar, antes que gelifique añadir la ampicilina 1 M y distribuir en cajas Petri.

- Tampón de corrida 5x para SDS-PAGE (1 litro)

Tris 15.1 g

Glicina 94 g

H₂O destilada 900 ml

SDS 10% 50 ml

- Tris Cl/SDS pH 6.8 (0.5 M Tris Cl, 0.4%SDS)

Disolver 6.05 g de Tris Base en 40 ml de H₂O destilada, ajustar el pH a 6.8 con 1N de HCl, aforar a 100 ml con H₂O destilada, filtrar con 0.45 µm, adicionar 0.4 g de SDS y guardar a 4°C.

- Tris Cl/SDS pH 8.8 (1.5 M Tris Cl, 0.4%SDS)

Disolver 91 g de Tris Base en 300 ml de H₂O destilada, ajustar el pH a 8.8 con 1N de HCl, aforar a 500 ml con H₂O destilada, filtrar con 0.45 µm, adicionar 2 g de SDS y guardar a 4°C.

- Tampón de muestra de proteínas SDS 2x

4x Tris Cl/SDS Ph6.8 25 ml

Glicerol (20% final) 20 ml

SDS (4% final) 4 g

2-mercaptoetanol (0.2% final) 2ml o DTT (0.2 M final)

Azul de bromofenol (0.001 % final) 1 mg

Adicionar H₂O destilada a un volumen final de 100 ml y almacenar a -70°C

- Tampón de muestra de proteínas SDS 6x

4x Tris Cl/SDS Ph6.8 7 ml

Glicerol (30% final) 3 ml

SDS (10% final) 1 g

DTT (10.6 M final) 0.93 g

Azul de bromofenol (0.012% final) 1.2 mg

Adicionar H₂O destilada a un volumen final de 20 ml y guardar alícuotas de 0.5 ml

- Acrilamida/Bisacrilamida

Acrilamida 30 g

Bisacrilamida 0.8 g

Aforar a 100 ml con H₂O destilada, filtrar con 0.45 µm, proteger de la luz y almacenar a 4°C

- Gel de acrilamida concentrador

Acrilamida 650 µl

Tris Cl/SDS pH 6.8 (0.5 M Tris Cl, 0.4%SDS) 1.25 ml

H₂O destilada 3.03 ml

PSA 25 µl

TEMED 5 µl

- Gel de acrilamida separador al 10%

Acrilamida 5 ml

Tris Cl/SDS pH 8.8 (1.5 M Tris Cl, 0.4%SDS) 3.75 ml

H₂O destilada 6.25 ml

PSA 50 µl

TEMED 10 µl

- TANK 10x

Tris base 30 g

Glicina 144 g

Aforar con H₂O destilada a 1,000 ml

- Tampón de transferencia (1 litro)

TANK 10X 100ml

Metanol 200 ml

H₂O destilada 700 ml

- TBS 10X

Tris base 24 g

NaCl 88 g

Disolver en 700 ml, ajustar pH a 7.6 y aforar a 1,000 ml

- TBS-Tween 0.1%

TBS 10x 100ml

Tween 1 ml

Aforar con H₂O destilada a 1,000 ml

- Solución desteñidora (1 litro)

Ácido acético 50 ml

Metano 165 ml

H₂O destilada 785 ml

- Tampón de unión (puerto 1 A, 500 ml)

6 M de Hidrocloruro de Guanidina

20 mM de TrisHCl

0.5 M NaCl

5 mM Imidazol

1 mM 2-Mercaptoetanol

Disolver en menos de 500 ml, ajustar el pH a 8.0, aforar a 500 ml, filtrar con 0.45 μ m y desgasificar.

- Tampón para solubilizar (puerto 2 A, 500 ml)

6 M de Urea

20 mM de TrisHCl

0.5 M NaCl

5 mM Imidazol

1 mM 2-Mercaptoetanol

Disolver en menos de 500 ml, ajustar el pH a 8.0, aforar a 500 ml, filtrar con 0.45 μ m y desgasificar.

- Tampón de elución (puerto 3 A, 500 ml)

20 mM de TrisHCl

0.5 M NaCl

0.5 M Imidazol

1 mM 2-Mercaptoetanol

Disolver en menos de 500 ml, ajustar el pH a 8.0, aforar a 500 ml, filtrar con 0.45 μ m y desgasificar.

- Tampón de repliegue (puerto B, 500 ml)

20 mM de TrisHCl

0.5 M NaCl

5 mM Imidazol

1 mM 2-Mercaptoetanol

Disolver en menos de 500 ml, ajustar el pH a 8.0, aforar a 500 ml, filtrar con 0.45 μm y desgasificar.

2. Congresos

Identificación de la enolasa en el hemoparásito bovino *Babesia Bigemina*.

Luna Rodríguez Ana Laura¹, Mosqueda JJ², Castañeda-Ortiz EJ¹, Becerril Puente Karen Anell¹, Camacho-Nuez M¹.

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, CDMX, México.

²Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Juriquilla, Juriquilla, México.

RESUMEN

La babesiosis bovina es una infección causada por protozoarios del género *Babesia* quienes infectan los eritrocitos de la sangre del ganado, esta enfermedad es transmitida por las garrapatas del género *Rhipicephalus*, las cuales se encuentran adaptadas en zonas tropicales teniendo como resultado una distribución de la enfermedad o riesgo de infección en estas mismas áreas. La población bovina es de gran importancia económica en la industria ganadera y se encuentra en constante riesgo de padecer babesiosis bovina, causante de anemia y muerte por lo que se considera de gran importancia el estudio de éste parásito. *Babesia bigemina* es el parásito más importante causante de esta enfermedad después de *B. bovis*, pero los estudios acerca de éste son escasos. Los parásitos del género *Babesia* pertenecen al phylum apicomplexa los cuales tienen características en común, en ellos se ha descrito una proteína glicolítica llamada enolasa la cual cumple distintas funciones, una de ellas es transportarse por un mecanismo no identificado a la superficie celular con la finalidad de degradar la matriz extracelular para la invasión de las células del intestino del vector transmisor. El objetivo del presente proyecto es identificar el gen de la enolasa en el hemoparásito bovino *B. bigemina*. En este estudio se encontró mediante un análisis in sílico una secuencia del gen de la enolasa en el parásito de interés en el cromosoma III con un tamaño de 1366 pares de bases (pb) la cual contiene un intrón de 37 pb, se evaluó la función mediante RT-PCR en muestras de eritrocito infectado, garrapata infectada a las 0 y 72 horas, intestinos de garrapata infectada a las 48 y 72 horas y garrapata no infectada, el aumento en la expresión se observaron en muestras de garrapata infectada e intestino a las 72 horas. Una proteína parcial recombinante de 37.7 KDa fue obtenida por clonación en el vector pCold I en cepas de *Escherichia coli* Rosetta Gami y purificada de la fase insoluble mediante cromatografía líquida, esto nos dio como resultado 9 fracciones enriquecidas con la proteína enolasa, éste último resultado con la finalidad de poder generar anticuerpos para el ensayo de Inmunolocalización. Estos primeros

resultados permitirán ampliar el panorama en estudios de *B. bigemina*, identificando la proteína enolasa como un nuevo factor de virulencia y podría ser un blanco para el diseño de una futura vacuna.



X CONGRESO NACIONAL DE PARASITOLOGÍA VETERINARIA
UN MUNDO, UNA SALUD

Asociación Mexicana de Parasitólogos Veterinarios, A.C.
Otorgan la presente

CONSTANCIA

A:
Luna Rodríguez Ana Laura, Mosqueda JJ, Castañeda-Ortiz EJ, Becerril Puentes Karen Anell,
Camacho-Nuez M.

Por su presentación de trabajo en el X Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria "Un Mundo,
Una Salud" titulado:

IDENTIFICACIÓN DE LA ENOLASA EN EL HEMOPARÁSITO BOVINO *BABESIA BIGEMINA*.

Puebla, Pue. 9-11 de agosto de 2017.


Dr. Germinal J. Cantó Alarcón
Secretario


Dr. Juan Mosqueda Gualito
Presidente


Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Tesorera



***Babesia bigemina* enolase gene is expressed in erythrocytic and tick stages.**

Ana Laura Luna Rodríguez*, Minerva Camacho-Nuez*, Juan Joel Mosqueda Gualito, Elizabeth J. Castañeda Ortiz***

*Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**Universidad Autónoma de Querétaro

ABSTRACT

Babesia bigemina is a vector-borne pathogen that causes important economical losses in livestock in México and other countries. Enolase is glycolytic enzyme with multiple functions. In many vector-borne pathogens this enzyme plays an important role in the process of invasion, serving as a surface receptor for the binding of plasminogen on the surface of a variety of cells. It converts plasminogen to plasmin that helps to degrade the fibrin of extracellular matrix helping the pathogen invasion process. *Babesia* parasites have a complex life-cycle, including asexual stages in the bovine host and sexual stages in ticks and little is known about the molecular events and proteins that lead to tick midgut invasion. The aim of this work was to identify and study the *B. bigemina* enolase gene. We amplified the gene by PCR, cloned into TOPO-TA vector and sequenced it. Besides we analyzed the expression of the gene by RT-PCR in erythrocytic and tick stages, and cloned and expressed a 300 aminoacids fragment of *B. bigemina* enolase to obtain antibodies for immunolocalization of the protein. The full-length sequence of 1366 base pairs contains an intron of 37 bp and encode a protein of 47.51 kDa. The gene is expressed by infected erythrocytes and infected ticks. The immunofluorescence showed the localization of the protein in cytosol, but it was also found associated with membranes suggesting a non-glycolytic function in *B. bigemina*. Further studies need to be done in order to know the function of the *B. bigemina* enolase.