

# UACM

Universidad Autónoma  
De la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

---

---

## Posgrado en Ciencias Genómicas

ANÁLISIS DE LOS GENES *msa-1* y *msa-2c* DE *Babesia bovis* EN AISLADOS MEXICANOS Y EVALUACIÓN DE EPÍTOPES COMUNES EN SUS PRODUCTOS GÉNICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

BIOL. VERÓNICA MARUSA BORGONIO CUADRA.

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JULIO VICENTE FIGUEROA MILLÁN

DRA. MINERVA CAMACHO NUEZ

MÉXICO, D.F., ABRIL 2007

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

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.

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, en el Posgrado en Ciencias Genómicas y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID- PAVET, Jiutepec Morelos) con el apoyo del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT a través del proyecto No. CO1-2003-139.

## **TUTORES**

DR. Julio Vicente Figueroa Millán.  
Investigador del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología  
Veterinaria (INIFAP).

Dra. Minerva Camacho Nuez  
Profesor – Investigador del posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad  
Autónoma de la Ciudad de México.

## **ASESORES**

Dr. Mario César López Camarillo.  
Profesor – Investigador del posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad  
Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.  
Investigador del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología  
Veterinaria (INIFAP).

M.en C. Máximo Berto Martínez Benítez.  
Profesor del posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la  
Ciudad de México.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por la formación académica.

Al Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET Jiutepec, Morelos) por haberme ayudado en mi formación profesional.

A mis directores de tesis y asesores que dedicaron parte de su valioso tiempo para supervisar, revisar y apoyar este proyecto.

Al Dr. Julio Vicente Figueroa por sus enseñanzas, apoyo y confianza durante mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Minerva Camacho por sus tan atinados comentarios y apoyo en este proyecto.

A Máximo Martínez por su entrega y disponibilidad que siempre esta dispuesto a otorgar.

Al Dr. Juan Mosqueda por su asesoría y contribución al desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del CENIT-PAVET:  
Juan Diego, Javier, Gaby (Chiapas), Gaby, Rodrigo, Carmen, Elba y Paty.

A mis compañeros y amigos de la UACM:  
Paty, Alma, Nona, Albertini, Mauro, Paloma, Julián, Guadalupe, Jorge, Vicenta, Carlitos y Omar.

A Philip por su cariño y motivación que siempre me ha brindado.

A Fer y Cony por su amistad incondicional.

A Lulu por sus atenciones y apoyo en todo momento.

A todos estos y a aquellos que pueda haber olvidado. Gracias

Los que se enamoran de la práctica prescindiendo de la ciencia son como pilotos que toman un navío sin timón ni brújula, de forma que nunca tienen seguridad de la ruta seguida. La práctica debe ser edificada siempre sobre una buena teoría.

Leonardo Da Vinci.

# ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas

Resumen

1. Marco teórico conceptual	1
1.1.1 La Babesiosis bovina	1
1.1.2 Clínica	1
1.2 <i>Babesia bovis</i>	2
1.2.1 Definición y características	2
1.2.2 Distribución de <i>Babesia</i>	3
1.2.3 Ciclo de vida	5
1.2.4 Genómica de <i>B.bovis</i>	7
2. Antecedentes particulares del proyecto	10
3. Hipótesis	14
4. Objetivos	14
4.1 Objetivos particulares	14
5. Materiales y Métodos	15
6. Resultados	30
7. Discusión	61
8. Conclusiones	70
9 Apéndices	71
10. Bibliografía	87

## ABREVIATURAS

---

Amp	Ampicilina.
APS	Persulfato de amonio.
BSA	Albúmina de suero bovino.
cbp	cuanto baste para.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genómico.
D.O.	Densidad Óptica.
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético.
ELISA	Inmunoensayo ligada a enzima.
g	Constante gravitatoria 9.8 m/s
h	Horas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta.
Kb	Kilobase.
kDa	Kilodalton.
LB	Medio de Cultivo Luria-Bertani.
ORF	Marco abierto de lectura.
pb	pares de bases.
PBS	Tampón fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
rpm	revoluciones por minuto.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
t. a	Temperatura ambiente.

TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA.
TEMED	N,N,N',N'- tetrametilen-diamina.
Tris	Tris (hidroximetil)-amino-metano.
V	Volts.
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

## RESUMEN

Los genes *msa-1* y *msa-2c* codifican para proteínas antigénicas de la superficie del merozoíto (VMSA) de *Babesia bovis*, y están involucradas en la invasión al eritrocito. Estudios realizados con MSA-1 han evidenciado variación alélica del antígeno en aislados de una misma región endémica, así como en aislados de diferentes partes del mundo (Argentina, Australia), a diferencia de MSA-2c la cual se encuentra ampliamente conservada. En este trabajo se hizo el planteamiento hipotético que las proteínas MSA-1 y MSA-2c muestran epítopes comunes a pesar de las diferencias encontradas en las secuencias nucleotídicas de los diferentes aislados de *B. bovis* colectados en distintas regiones geográficas de México. Los resultados derivados de la secuencia de la estructura primaria producto de la clonación y secuenciación de los genes *msa-1* y *msa-2c* de aislados de *B. bovis* analizadas reveló que el producto de los genes *msa-1* en los diferentes aislados estudiados es menos conservado entre aislados obtenidos de la misma región geográfica de México, identificándose porcentajes de identidad de secuencia nucleotídica en el rango de 51 a 99.7%. Sin embargo, los resultados encaminados en la búsqueda de epítopes en los aislados mexicanos, indican que estas proteínas comparten epítopes comunes, ya que un anticuerpo monoclonal anti-MSA-1 reconoce una proteína de 42 kDa en 5 de 11 aislados. En el caso de la proteína MSA-2c, se demostró un alto grado de identidad en la secuencia nucleotídica (90-100%) ya que es una molécula altamente conservada en los aislados mexicanos, y anticuerpos policlonales dirigidos contra esta proteína reconocen epítopes conservados en 7 de 11 aislados analizados. Además, dada su elevada conservación en los distintos aislados, cepas y clonas de *B. bovis* de distinto origen geográfico hasta ahora analizados, se ratifica que la molécula MSA-2c representa un importante antígeno candidato a evaluarse en pruebas de carácter inmunodiagnóstico y/o inmunoprotector.

# 1. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

## 1.1.1 LA BABESIOSIS BOVINA.

La Babesiosis bovina es una enfermedad severa causada por parásitos intraeritrocíticos del género *Babesia*, los cuales son transmitidos por garrapatas.

Las principales especies de parásitos responsables de la enfermedad son *B. bovis* y *B. bigemina* en los trópicos y subtrópicos, mientras que *B. divergens* afecta el ganado en el noroeste de Europa.

Otras especies de *Babesia* infectan un amplio rango de animales domésticos y silvestres, asimismo, la enfermedad está adquiriendo interés como una zoonosis emergente en humanos, mayoritariamente con *B. microti* (Homer *et al.*, 2000).

El principal impacto económico resultado de la enfermedad recae sobre la industria del ganado, ya que más de 1.2 billones de cabezas de ganado vacuno están expuestas a la babesiosis, y se ha estimado que hasta 500 millones de estos animales son infectados con *Babesia* cada año, similar al número de humanos que son infectados con malaria (McCosker, 1981).

Las pérdidas económicas ocasionadas por la enfermedad van desde el decremento en la producción de carne, leche, gasto por el uso de fármacos, atención médica, abortos y hasta la muerte de los animales (Homer *et al.*, 2000). Esto constituye una limitante para la introducción de razas altamente especializadas en las zonas tropicales y subtropicales, provocando retraso en el desarrollo de la ganadería en nuestro país.

## 1.1.2 CLÍNICA.

Las manifestaciones de la enfermedad son provocadas por los estadios reproductivos asexuales del parásito en el eritrocito del hospedero y por la subsiguiente lisis de estas células, por lo que se presentan una serie de eventos clínicos. Alrededor de los 7 días después de que la garrapata inoculó los parásitos se presenta fiebre rectal de 41 a 41.5 °C, este aumento en la temperatura se presenta por varios días antes de que otros signos lleguen a ser evidentes. Posterior a la temperatura se puede presentar inapetencia, depresión, incremento en la velocidad de respiración, letargia, anemia la cual puede apreciarse por la palidez de las mucosas, hemoglobinuria

causada por hemólisis intravascular relacionada con el nivel de parasitemia, esta se distingue por la coloración rojo oscura de la orina; se produce principalmente por *Babesia bigemina*, lo cual es indicativo de la gravedad del padecimiento y que generalmente va acompañada de una caída drástica del porcentaje del hematocrito (De Vos y Potgieter, 1994; Wright *et al.*, 1988).

Cuando la enfermedad es producida por *B. bigemina* o *B. divergens* los signos clínicos ocurren en el orden de una enfermedad subclínica a aguda y la severidad de la enfermedad esta determinada por el grado de parasitemia. En animales con infecciones agudas, más del 40% de eritrocitos pueden estar infectados, sin embargo solo pocos animales mueren a causa de la enfermedad (Zintl *et al.*, 2003).

*B. bovis*, por su parte, puede matar más de la mitad de animales que son susceptibles y están infectados, ya que las infecciones con este parásito se caracterizan por mostrar bajos niveles de parasitemia periférica (0.02 - 0.04%), debido esto a la agregación de eritrocitos infectados en los capilares de pulmones, riñones e hígado, también el parásito puede llegar hasta el cerebro induciendo falta de coordinación, convulsiones y en muchos casos la muerte (Wright, 1977; Wright *et al.*, 1988).

Los signos clínicos antes mencionados se manifiestan mayoritariamente en animales adultos, cuando son expuestos por primera vez al patógeno, a diferencia de bovinos jóvenes (menos de 9 meses de edad) los cuales poseen una resistencia innata a la enfermedad, en donde se detecta un decremento en el nivel de parasitemia el cual persiste por largos períodos sin ningún aparente efecto de la enfermedad (Trueman *et al.*, 1978; Smith *et al.*, 2000).

A pesar de la severidad de la infección los individuos que sobreviven generalmente desarrollan inmunidad contra la enfermedad pero no contra la infección *per se* y pueden permanecer infectados (Krause *et al.*, 1998; Allred *et al.*, 1994).

## 1.2 *Babesia bovis*.

### 1.2.1 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS.

*B. bovis*, es un hemoparásito Apicomplexa de bovinos transmitido por garrapatas. Este parásito pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, Rama Apicomplexa, clase Sporozoasida, subclase Piroplasmia, orden Eucoccidiorida, suborden

Piroplasmorina, familia Babesidae (Levine et al 1971., 1985; Allsopp et al., 1994). Miembros de este *phylum* causan algunas de las enfermedades más importantes a nivel mundial, ya que en esta rama se agrupan organismos patógenos del género *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Neospora*, *Cryptosporidium*, *Theileria* y *Babesia*. Estos protozoos se caracterizan por presentar formas anilladas o alargadas en forma de pera (piriformes), y poseer estructuras que los capacitan para invadir otras células, incluyendo un citoesqueleto que participa en la penetración mecánica y un complejo apical formado por roptrias y micronemas (sistemas de vesículas donde se almacenan enzimas líticas). El complejo apical es un carácter común a todos los Apicomplexa (Blackman and Bannister, 2001; Dubremetz et al., Preiser et al., 2000, 1998; Sam-Yellowe, 1996) ver figura1.

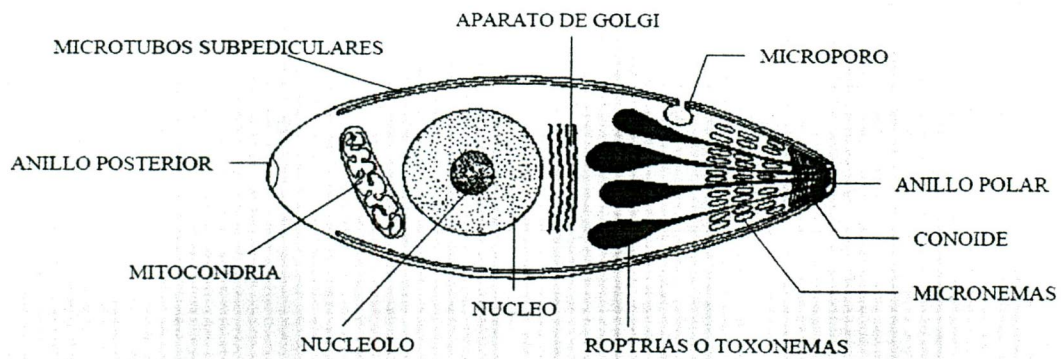
Inicialmente, las especies de *Babesia* fueron identificadas con base a los parámetros morfológicos de las formas intraeritrocíticas visibles (trofozoítos y merozoítos), las cuales han sido observadas en sangre de animales infectados teñida con colorante de Giemsa. Este análisis y la especificidad del hospedero permitieron la clasificación de más de 100 especies, varias de las cuales infectan una amplia variedad de vertebrados; sin embargo, estas descripciones pueden ser de especies similares o idénticas, que estos métodos tradicionales no pueden discriminar una de otra (Persing et al., 1995).

#### 1.2.2 DISTRIBUCIÓN DE *Babesia*.

Los principales vectores de transmisión de *Babesia* son las garrapatas del género *Boophilus* recientemente reclasificadas como *Rhipicephalus* (Homer et al., 2000).

Este artrópodo se encuentra ampliamente distribuido en varios países tropicales y subtropicales de África, Asia, América y Australia.

*B. bovis* y *B. bigemina*, aún cuando son identificadas ocasionalmente en el sur de Europa, se pueden localizar también en Asia, África y América. Estas dos especies y sus vectores fueron anteriormente endémicos en el sur de los Estados Unidos y ahora solo se encuentran en regiones texanas fronterizas con México. *B. divergens* por su



**Figura 1.** PRINCIPALES ESTRUCTURAS CELULARES, VISIBLES AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO, DE UN MEROZOÍTO APICOMPLEJO (Modificado de Levine *et al.*, 1971).

parte es un parásito importante en el Reino Unido y noroeste de Europa. *B. major* también ha sido identificada en el Reino Unido y norte de Europa, y *B. ovata* es encontrada en Japón (Ristic, 1981; Friedhoff, 1988).

Las principales especies de *Babesia*, hasta ahora encontradas en México, que afectan al ganado vacuno son *B. bovis* y *B. bigemina* (Solorio *et al.*, 1997), y las especies de garrapatas hasta el momento documentadas que transmiten estos parásitos son *Boophilus microplus* y *B. annulatus*. La primera tiene una distribución principalmente en clima tropical y subtropical mientras que la segunda es localizada en regiones de clima templado. Debido a que ambas especies transmiten *B. bovis* y *B. bigemina*, es común encontrar brotes con infecciones mixtas en condiciones naturales, esto se complica además con la presencia de la rickettsia intracelular *Anaplasma marginale*, agente causal de la anaplasmosis en los bovinos. (Fernández *et al.*, 1995)

### 1.2.3 CICLO DE VIDA.

La transmisión de *Babesia* es un proceso complejo en el cual el parásito lleva a cabo, dentro de sus hospederos, numerosas transformaciones y cambios de localización que le sirven como mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

El ciclo de vida de *Babesia* alterna de manera natural entre dos hospederos; un vertebrado (bovino) y un invertebrado (garrapata) en los que se suscitan al menos tres estadios de reproducción: 1) formación de gametogonia y fusión de gametos dentro del intestino de la garrapata; 2) esporogonia, con reproducción asexual en glándulas salivales; y 3) merogonia, reproducción asexual en el hospedero vertebrado (Kakoma y Melhorn, 1993).

#### Eventos en la garrapata

La infección de *B. microplus* con *Babesia spp* resulta compleja, mucho de lo que se ha aprendido acerca del ciclo de vida de *Babesia spp* en la garrapata ha sido obtenido de estudios con *B. canis*, *B. equi* y *B. microti* lo que ha permitido estudiar la fase sexual del parásito (Young y Morzaria, 1986; Telford *et al.*, 1993).

Los organismos se detectan en el intestino del vector alrededor de 10 horas después de que la garrapata comenzó a alimentarse de un animal infectado (Homer *et al.*, 2000). Los parásitos se diferencian en gametos los cuales desarrollan nuevos organelos entre los que sobresalen los cuerpos radiados o strahlenkorper, que están situados en el extremo anterior del organismo. Esta estructura comúnmente participa en la fusión de gametos, el cigoto (ocineto) resultante es móvil e invade diferentes células del vector tales como fibras musculares, hemocitos, células ováricas y ovocitos, conduciéndose a través de la hemolinfa donde se multiplican asexualmente para producir esporoquinetos (Kakoma y Melhorn, 1993; Rudzinska *et al.*, 1983). Estos ciclos de división continuarán en la hembra repleta durante la pre-ovoposición y ovoposición, siendo de especial trascendencia epidemiológica la replicación del parásito en los oocitos y, por extensión, en la siguiente generación de garrapatas derivada de las larvas que eclosionen de los huevos posterior a la infección de ovocitos en la hembra. Los parásitos permanecen inactivos o latentes en los tejidos de las larvas en desarrollo y cuando estas inician la alimentación, tiene lugar un proceso de esporogonia similar a la que acontece en los adultos. Los esporoquinetos han de llegar del epitelio intestinal de las larvas a las glándulas salivales, generalmente en las primeras 24 horas después de la fijación de la garrapata infectada en el hospedero mamífero, para que los esporoquinetos sufran una diferenciación a las formas infectivas, es necesario un estímulo de alimentación ó temperatura de  $\geq 37$  °C es necesario. En esta etapa es cuando se reproducen asexualmente, y dan lugar a la formación de los esporozoítos o formas infectivas que las garrapatas inocularán con su saliva, cuando se alimentan en un hospedero vertebrado (Bock *et al.*, 2004).

### Eventos en el vertebrado

Una vez que la garrapata está unida al hospedero vertebrado, ésta directamente transmite esporozoítos los cuales deben contactar con el eritrocito, excepto en el caso de *Theileria* y algunas especies de *Babesia* las cuales primero invaden los linfocitos. Los esporozoítos directamente infectan a los eritrocitos a través de procesos de invaginación formando una vacuola parasitófora, la membrana de la vacuola

gradualmente se desintegra y el parásito en ese momento presenta una forma definida característica de los piroplasmas, a diferencia de las especies de *Plasmodium*, las cuales invaden por un mecanismo similar pero retienen la membrana del hospedero. En los eritrocitos del hospedero las formas infectantes se convierten en trofozoítos los cuales se dividen por fisión binaria, y este tipo de reproducción asexual produce más merozoítos, los cuales lisan a la célula e infectan de nuevo otros eritrocitos. La rápida reproducción destruye las células del hospedero y se presenta hemoglobinuria en el hospedero; más tarde cuando los merozoítos son ingeridos por la garrapata, estos se desarrollan formando gametocitos y comienza de nuevo el ciclo (Dalglish *et al.*, 1978; Mahoney *et al.*, 1979; Young *et al.*, 1986).

Es importante señalar que las larvas de garrapata transmiten únicamente *B. bovis*, mientras que las ninfas y las garrapatas adultas son las transmisoras de *B. bigemina* (Potgieter y Els, 1977; RieK, 1964).

#### 1.2.4 GENÓMICA DE *B. bovis*

Los estudios con respecto al genoma de *Babesia spp* han sido limitados en el caso de *B. bovis*. Jones *et al.*, (1997), demostraron mediante electroforesis de campo pulsante que parásitos de cepas australianas (Cepa vacunal T y Dixie) tiene un genoma de 9.4 Mb y 4 cromosomas en su genoma haploide.

Recientemente, se ha empleado la generación de ESTs (Expressed Sequence Tags, por sus siglas en inglés), los cuales representan porciones expresadas de genes, esto con la finalidad de tener conocimiento de los genes que se expresan en los estadios intraeritrocíticos. De Vries *et al.*, (2006) han descrito mediante esta técnica aproximadamente 2,600 genes de *B. bovis*. Estos genes fueron secuenciados a partir de clonas obtenidas de una biblioteca de cDNA representando el estadio eritrocítico de una línea clonal (C61411) de Israel cultivada *in vitro*. La mayoría de los genes anotados se agruparon provisionalmente en 23 grupos funcionales. De los genes que sobresalen, están los representados en la maquinaria traduccional, los genes que codifican para proteínas mitocondriales, los genes involucrados en la expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo de las purinas y aquellos a los que se les ha atribuido importancia inmunológica como los antígenos de superficie del eritrocito

infectado, antígenos del organelo apical del merozoíto y antígenos de la superficie del merozoíto.

De los genes caracterizados que codifican para proteínas con importancia inmunológica podemos destacar las siguientes:

#### Familia multigénica ves.

Se ha descrito que *B. bovis* altera la superficie de la membrana de los eritrocitos, mediante la expresión y translocación de polipéptidos derivados del parásito. Estas proteínas han sido nombradas como antígenos variables de la superficie del eritrocito (VESA 1, por sus siglas en inglés). El *locus ves* incluye los genes *ves1 $\alpha$* , y *ves1 $\beta$*  los cuales se expresan coordinadamente, y dan lugar a un heterodímero en donde las 2 subunidades varían en paralelo. Las moléculas están involucradas en la variación antigénica y se piensa que actúan como ligando para unirse a células endoteliales de los capilares sanguíneos y propiciar el secuestro de los eritrocitos infectados (Allred *et al.*, 1993; 1994).

#### Locus rap.

El *locus rap-1* contiene 2 genes idénticos *rap* arreglados en tandem (*rap-1  $\alpha$*  y *rap-1 $\beta$* ), estos genes son altamente conservados entre diversos aislados (Suárez *et al.*, 1991a; Suárez *et al.*, 1991b; Suárez *et al.*, 1993; Suárez *et al.*, 1994). Los productos de estos genes están presentes en las roptrias, y son liberados en una mezcla compleja de proteínas las cuales están involucradas directamente en la unión e invasión al eritrocito.

#### Familia vmsa.

Las proteínas conocidas como antígenos de la superficie del merozoíto (MSA, por sus siglas en inglés) se encuentran uniformemente distribuidas en la superficie del merozoíto (Hines *et al.*, 1989; Hines, 1992), y están codificadas por los genes de la familia de antígenos variables de superficie del merozoíto (*vmsa*, por sus siglas en inglés). La familia comprende los genes *babr*, *msa-1* y *msa-2* (*msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2a<sub>2</sub>*, *msa-2b* y *msa-2c*), se caracterizan por presentar polimorfismo alélico, y miembros de esta familia de genes codifican proteínas integrales de membrana con un peso

molecular entre 42 - 44 kDa, que están definidas por una región amino terminal hidrofóbica, una región central hidrofílica y una región carboxilo terminal conservada con una secuencia señal de glicosil fosfatidil inositol (GPI). Cada uno de los *locus* (*msa-1* y *msa-2*) ya ha sido caracterizado:

#### *Locus msa-1*

Suárez *et al.* (2000), caracterizaron el locus del gen *msa-1* a partir de la clona mexicana Mo7 de *B. bovis*. Se demostró que es un gen de una sola copia, sin intrones y con un marco de lectura abierto de 901pb. El gen codifica para una glicoproteína de membrana de 42 kDa (MSA-1) inmunodominante. Se ha evidenciado que la inmunización con la proteína nativa ó MSA-1 recombinante induce respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y anticuerpos IgG que inhiben la invasión del parásito al eritrocito *in vitro* (Suarez *et al.*, 2000). Análisis de las secuencias de esta proteína han demostrado diversidad antigénica entre cepas de distintas áreas geográficas, así como entre aislados de una misma región endémica.

#### *Locus msa-2*

La estructura del locus fue descrita por Florin-Christensen *et al.*, (2002). Se caracteriza porque contiene 4 genes relacionados arreglados en tandem, que al parecer se generaron a través de la duplicación seguida por delección o inserción y recombinación génica. Estos genes han sido citados de acuerdo a como fueron descubiertos. Sin embargo, en el locus están arreglados como *msa-2c*, *msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2a<sub>2</sub>*, y *msa-2b* en dirección 5' a 3'. El gen *msa-2a<sub>1</sub>* es idéntico a la secuencia del gen antes descrita por Jasmer *et al.*, (1992) quienes lo nombraron como *msa-2*. Los 4 genes están separados por 3 regiones intergénicas idénticas de 700 pb, a diferencia de la región 5' del *msa-2c*, lo que sugiere que la regulación transcripcional de *msa-2c* puede ser diferente con respecto a los otros tres genes. Los miembros de este *locus* son genes de una sola copia, sin intrones, codificando marcos de lectura abierto (ORFs) de 797 pb, 955 pb, 848 pb y 905 pb en dirección 5' a 3' y con un tamaño de 317, 293, 288 y 266 residuos de a.a, respectivamente.

Finalmente, como se ha venido mencionando estas proteínas antigénicas participan activamente en el proceso de invasión. Se ha observado que los merozoítos extracelulares se unen a los eritrocitos a través de proteínas implicadas en este proceso, como son las proteínas asociadas a roptrias (RAP-1), antígenos de superficie del merozoíto 1 y 2 (MSA-1, MSA-2), antígeno de la membrana apical 1 (AMA-1) y la proteína anónima relacionada con trombospondina (Bb TRAP) (Florin-Christensen *et al.*, 2002; Gaffar *et al.*, 2004a; Gaffar *et al.*, 2004b; Hines *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2004; Mosqueda *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 1991; Yokohama *et al.*, 2002) ver figura 2.

## 2. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO.

El estudio de los genes de la familia VMSA no es muy extenso, sin embargo los trabajos realizados con el propósito de conocer como estas moléculas son reconocidas por el sistema inmune del hospedero, han demostrado que las proteínas MSA-1 y MSA-2 tienen epítopes inmunodominantes para linfocitos T CD4<sup>+</sup> y que antisueros monoespecíficos dirigidos contra estos antígenos son capaces de bloquear la entrada del merozoíto al eritrocito en ensayos *in vitro* (Hines *et al.*, 1992; Mosqueda *et al.*, 2002).

En el caso de la proteína MSA-1 la cual es codificada por genes unicopia, es sorprendente como varían sus secuencias extensamente entre cepas tanto de la misma zona como de diversas áreas geográficas. Esta diversificación también se observa en otros apicomplexa que tienen proteínas de superficie codificadas por un solo gen, tal es el caso de *P. falciparum*, *Theileria annulata* y *T. parva*. Se ha explicado que el polimorfismo alélico ocurre mediante el intercambio genético suscitado entre los organismos en los vectores respectivos (Suarez *et al.*, 2000).

Por consiguiente, se han llevado a cabo esfuerzos en la caracterización de alelos de *msa-1* en cepas que presentan diferencias antigénicas de *B. bovis* en distintas regiones geográficas (Texas, Argentina y Australia) y los resultados han mostrado diversidad antigénica en las secuencias presentes en cepas, tanto de la misma región, así como de diferentes países.

Por ejemplo, Suárez *et al.*, (2000) demostraron identidad de hasta el 98% en dos

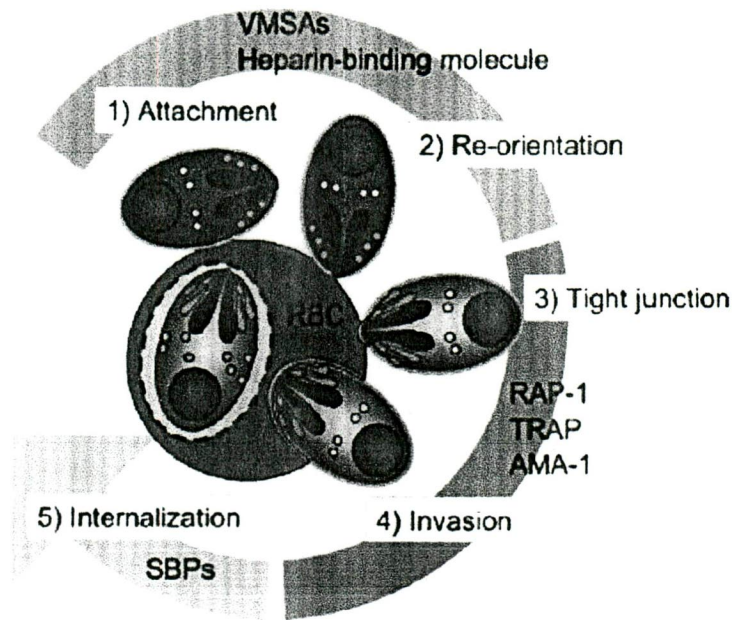


Figura 2. Representación esquemática del proceso de invasión del eritrocito por *B. bovis*. El parásito se une al glóbulo rojo (1), los ligandos del protozoario (VMSAs) interaccionan con las moléculas de unión a heparina, después de la reorientación (2), el parásito forma uniones estrechas entre la superficie del eritrocito y la región apical del parásito (3), en este momento comienza la invasión (4), la proteína RAP secretada de las roptrias (TRAP) y AMA-1 secretadas de los micronemas están involucradas en la interacción con la superficie del eritrocito, finalmente el parásito se internaliza (5) y las proteínas de cuerpos esféricos SBPs son secretadas al citoplasma del eritrocito (Yokohama *et al.*, 2006).

cepas Argentinas, pero cuando se comparan las secuencias de los genes *msa-1* de la clona Mo7 Mexicana y las dos cepas Argentinas (R1A y S2P) el porcentaje de identidad es de 52%, no así para las cepas de México y Texas (100% de identidad). Los aislados de Australia también son diferentes entre sí con respecto a MSA-1, y son menos parecidos a las secuencias de la clona Mexicana y Argentina.

La proteína MSA-1 muestra ciertas porciones extracelulares conservadas, Sin embargo la diversificación de las secuencias tiene como resultado una falta de reactividad inmunológica cruzada (LeRoith *et al.*, 2005). Por otra parte, la clona Mo7 Mexicana de *B. bovis* induce una respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específica frente a MSA-1 y que no tiene reactividad cruzada con MSA-1 de cepas de Australia e Israel, lo que sugiere que la población de alelos *msa-1* codifica proteínas inmunológicamente únicas o que este gen no existe en otras cepas.

A diferencia de MSA-1, las proteínas presentes en el locus *msa-2* están altamente conservadas entre aislados de distintas zonas geográficas, y de acuerdo a estudios basados en cepas de América, MSA-2c ha sido postulado ser menos divergente a pesar de su posición en el *locus*. La comparación de las proteínas MSA-2 de la cepa R1A Argentina con la clona Mo7 de México reveló un alto grado de conservación 83.6%, 69.4%, 79.1% y 88.7% de identidad de aminoácidos para *msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2a<sub>2</sub>*, *msa-2b* y *msa-2c*, respectivamente (Florin-Christensen *et al.*, 2002). Los ensayos de inmunolectrotransferencia competitivos con estas proteínas han demostrado que al menos *msa-2a<sub>1</sub>*, *msa-2b* y *msa-2c* muestran epítopes únicos de células B (Florin-Christensen *et al.*, 2002; Mosqueda *et al.*, 2002). Mediante el uso de anticuerpos específicos se demostró que cada una de las proteínas es co-expresada en la superficie de merozoítos vivos, mientras que antisueros dirigidos contra estas moléculas inhiben significativamente la invasión al eritrocito (Mosqueda *et al.*, 2002).

En estudios relacionados con la respuesta inmunológica, se ha observado que MSA-2c desencadena una respuesta inmune T dependiente ya que linfocitos T CD4<sup>+</sup> producen IFN- $\gamma$ , el cual estimula la producción de anticuerpos clase IgG2 con fuerte actividad opsonizante, activando macrófagos los cuales destruyen a los parásitos (Wilkowsky *et al.*, 2003).

Los avances en el entendimiento de los mecanismos de inmunidad de muchos protozoarios y el desarrollo de herramientas moleculares para generar vacunas recombinantes sugiere que ésta es la línea futura para el desarrollo de vacunas, son embargo la carencia de comprensión de los mecanismos inmunes tras una infección primaria o secundaria y la evasión de la respuesta inmune es un obstáculo en el éxito de estas vacunas.

En *B. bovis* se esta trabajando en la búsqueda de antígenos inmunogénicos para incluirlos como candidatos vacunales y en particular se están dirigiendo esfuerzos en caracterizar los antígenos de superficie inmunodominantes de la familia VMSA.

En México, no se conoce la variabilidad que guardan estos antígenos de superficie del merozoíto. Por ello, se pretende realizar el estudio de estas proteínas con la finalidad de conocer la diversidad alélica de las secuencias, a partir de diferentes aislados de *B. bovis* de la República Mexicana.

### 3. HIPÓTESIS

Las proteínas MSA-1 y MSA-2c presentan epítopes comunes en los diferentes aislados de *Babesia bovis* colectados en distintas regiones geográficas de México.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Analizar los genes *msa-1* y *msa-2c* de *Babesia bovis* en aislados mexicanos y evaluar epítopes comunes en sus productos génicos.

#### 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Amplificar, clonar y secuenciar el gen *msa-1* de merozoítos de *B. bovis* en diferentes aislados obtenidos de diferentes regiones de la República Mexicana.
- Identificar regiones conservadas en los genes *msa-1* y *msa-2c*.
- Generar la proteína recombinante MSA-2c a partir de la cepa de referencia RAD y obtener anticuerpos policlonales específicos.
- Analizar la presencia de epítopes comunes en las moléculas MSA-1 y MSA-2c de los aislados mexicanos.
- Localizar sub-celularmente las proteínas MSA-1 y MSA-2c en los diferentes aislados mexicanos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRAS BIOLÓGICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

El estudio se realizó con 13 poblaciones de *B. bovis*, 11 aislados obtenidos de bovinos infectados en campo de diferentes regiones de la república mexicana en donde la babesiosis es endémica y 2 cepas de referencia. El origen de las cepas y aislados utilizados se muestran en la tabla 1, cada aislado recibió el nombre del estado en el cual fue colectado (Figura 3). Todos los aislados fueron propagados en becerros esplenectomizados realizando de uno a dos pases de sangre parasitada para recuperar y levantar la parasitemia de cada aislado. El monitoreo de los animales infectados se realizó mediante frotis y determinación del hematocrito diariamente 7 días post-inoculación (Cantó *et al.*, 1996). En la tabla 1 se muestran los porcentajes de eritrocitos parasitados (PEP) de cada aislado con los cuales se realizó este estudio.

### **AMPLIFICACIÓN, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *MSA-1* DE AISLADOS MEXICANOS.**

Oligonucleótidos para amplificar la región codificante del gen *msa-1* de *B. bovis*.

La secuencia de DNA de la clona mexicana Mo7 de *B. bovis*, con número de acceso AF575911, y reportada en el banco de genes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) se utilizó como molde para el diseño de los oligonucleotidos, empleando el programa oligo analysis de la aplicación Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen, USA) ver tabla 2.

### Extracción de DNA

El DNA de cada una de las muestras se purificó por el método de lisis alcalina y extracción con fenol/cloroformo, según Sambrook (1989). Este método tiene como principio remover las proteínas de una muestra que contiene ácidos nucleicos, la desproteinización es más eficiente cuando dos solventes orgánicos son utilizados en vez de uno.

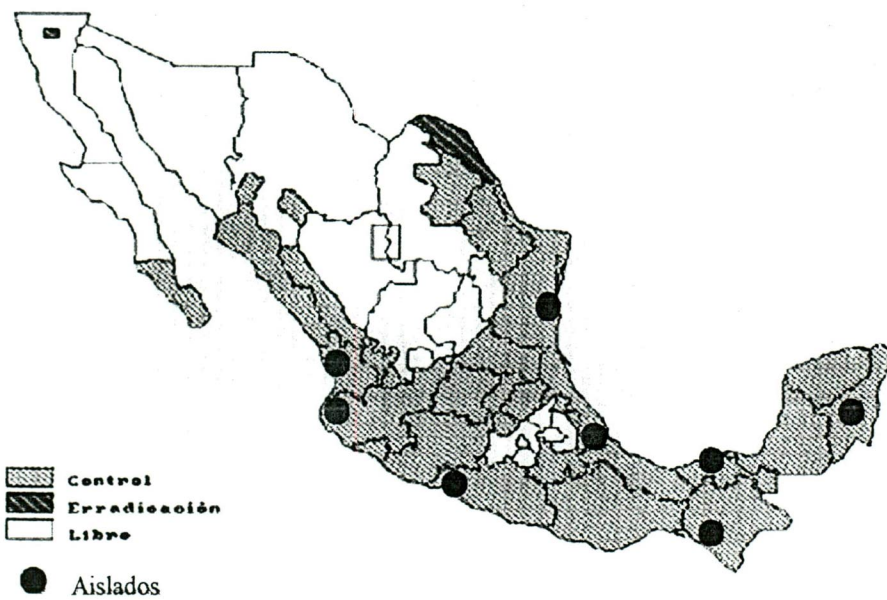


Figura 3. Mapa de distribución de la garrapata *B. microplus* y estados en donde fueron colectados los aislados.

Tabla 1. Aislados mexicanos de *B. bovis* utilizados en el estudio y porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) en los bovinos infectados.

AISLADO/CEPA	UBICACIÓN	PEP
Jalisco	Mpo. Tapalpa	0.3%
Nayarit	Mpo. Santiago Ixcuintla	< 0.1 %
Tabasco	Mpo. Emiliano Zapata	0.6%
Veracruz 1	Mpo. Medellin, Paso del Toro	0.5%
Veracruz 2	Mpo. Acayucan	< 0.1%
Tamaulipas 1	Mpo. Soto la Marina	0.8%
Tamaulipas 2	Mpo. Aldama	1%
Guerrero	Mpo. Cuajinicuilapa	1.7%
Quintana Roo	Mpo. Othón P. Blanco, Chetumal	1%
Chiapas 1	Mpo. Pichucalco	< 0.1%
Chiapas 2	Mpo. La Concordia	0.35%
*México	D.F	1.4%
**RAD	Clona cultivada <i>in vitro</i>	4%

\*Cepa México obtenida originalmente por Smith *et al.*, 1978; \*\*Clona RAD descrita por Rodríguez *et al.*, 1993 y caracterizada por Cantó *et al.*, 1996.

Los glóbulos rojos infectados (1.5 ml de paquete celular) se trataron con 10 ml de buffer de lisis, pH 8.0 (EDTA 100 mM, Tris 10 mM, SDS 0.5%) y 5  $\mu$ l de proteinasa K (100  $\mu$ g/ml). La suspensión se homogeneizó perfectamente y se incubó por aproximadamente por 12 h a 45 °C. Se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) (Invitrogen, USA) y se mezcló por inversión durante 10 min. Se obtuvo la fase acuosa por centrifugación a 10,000 x g por 10 min a 15 °C, la cual se colocó en un tubo estéril y se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Este proceso de extracción se repitió hasta que se eliminó la mayor cantidad de proteínas presentes en la muestra. El DNA presente en la fase acuosa fue precipitado con 2 volúmenes de etanol absoluto e incubado a -20 °C durante toda la noche. El DNA precipitado se recuperó por centrifugación a 10,000 x g por 1 h a 4 °C, realizando un lavado extra con 500  $\mu$ l de etanol al 70% para remover el exceso de sales y se centrifugó a 10,000 x g por 10 min a 4 °C. El etanol se removió con cuidado dejando secar la pastilla a temperatura ambiente (t.a). El DNA se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

#### Amplificación del gen *msa-1* por PCR de los diferentes aislados

El DNA purificado por el método fenol/cloroformo se utilizó para llevar a cabo la amplificación *in vitro* del gen *msa-1* de los 11 aislados y 2 cepas de referencia en estudio. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25  $\mu$ l de mezcla reactiva la cual contenía 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 U de Taq polimerasa, 0.2 mM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos, 100-200 ng de DNA genómico y 200 nM de los oligonucleotidos MSA-1F y MSA-1R. La amplificación se efectuó bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95 °C por 30 seg, posteriormente desnaturalización de 95 °C por 30 segundos, alineamiento de oligonucleótidos a 57 °C por 1 min, extensión de 72 °C por 1 min durante 35 ciclos, y un paso final de 10 min a 72 °C.

Una vez terminado el proceso de amplificación, se tomaron 15  $\mu$ l del producto de PCR los cuales se separaron en un gel de agarosa al 1% con 5  $\mu$ g de bromuro de

etidio y se corrió en un campo eléctrico de 80 V en presencia de buffer TAE (Sambrook, 1989).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para amplificar *msa-1* y *msa-2c*.

Oligonucleótido	Secuencia
MSA- 1F	5'-CAAAATGGCTACGTTTGCTCTTTT-3'
MSA-1R	5'-TTTAAATGCAGAGAGAACGAAGTAGC-3'
MSA-2cF	5'-ATGGTGTCTTTTAAACATAATA-3'
MSA-2cR	5'-AAATGCAGAGAGAACGAAGTAGCAGAGAGT-3'

#### Clonación del gen *msa-1*

Previo a la clonación, el fragmento de DNA conteniendo el gen *msa-1* se purificó del gel siguiendo las instrucciones proporcionadas por los fabricantes del kit de purificación "Wizard SV gel and PCR clean-up system" (Promega, USA). Tras haber purificado el amplicón de interés, éste se clonó en el vector TOPO utilizando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, USA) de la siguiente manera: en un tubo para PCR se colocó 1 µl de sales (1.2 M NaCl), 1 µl del vector TOPO (10 ng/µl), 1-4 µl de producto de PCR fresco y agua cbp 6 µl. La mezcla de reacción se incubó por 1 h/ t.a. Finalizado el tiempo de incubación la reacción se colocó en hielo para proceder a transformar las bacterias hospederas.

#### Transformación bacteriana

El vector recombinante producto de la ligación fue utilizado para transformar bacterias químicamente competentes cepa *E. coli* TOP10 (Invitrogen, USA). Un vial conteniendo 50 µl de células competentes se colocó en hielo y se adicionaron 2 µl de la reacción de ligación, las bacterias se incubaron durante 5 min en hielo y después fueron sometidas a choque térmico por 30 seg a 42 °C. Las bacterias inmediatamente se colocaron en hielo y se agregaron 250 µl de medio S.O.C. las bacterias se incubaron por 1 h a 37 °C en agitación a 190 rpm y finalizado el tiempo las bacterias fueron sembradas en al menos 3 placas de Petri con medio LB agar-kanamicina (50 mg/ml) conteniendo X-gal (40 mg/ml). Las placas se dejaron a 37 °C toda la noche, se seleccionaron 8 colonias blancas (clonas recombinantes que no degradan el

sustrato X-gal) y se sembraron tanto en medio LB sólido como en LB líquido, para seguir manteniendo la clona y proceder a la purificación del plásmido recombinante.

#### Purificación de DNA plasmídico.

Las colonias seleccionadas se colocaron en 5 ml de medio LB líquido conteniendo 50 mg/ml de kanamicina, los tubos se mantuvieron a 37 °C en agitación a 190 rpm toda la noche. Al día siguiente el cultivo bacteriano se centrifugó a 10,000 x g a 4°C por 10 min y se realizó la purificación de DNA plasmídico con el kit "Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system" (Promega) de la siguiente manera:

Se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 250 µl de solución de resuspensión de células (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNasa A), se adicionaron 250 µl de solución de lisis (200 mM NaOH; 1% SDS), se mezcló y dejó reposando por 5 min a t.a. Una vez finalizado el tiempo de lisis se colocaron 250 µg de proteasa alcalina y la muestra se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces, se agregaron 350 µl de solución neutralizante (4.09 M hidrocloreuro de guanidino; 0.759 M acetato de potasio; 2.12 M ácido acético glacial) e inmediatamente se invirtió el tubo 4 veces, el lisado bacteriano se centrifugó a 10,000 x g por 10 min a t.a. El sobrenadante se decantó en la columna de purificación y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min a t.a. La columna se lavó con 750 µl de solución de lavado (162.2 mM acetato de potasio; 22.6 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.109 mM EDTA, pH 8.0) previamente diluida con etanol al 95%, se volvió a centrifugar como en el paso anterior, se descartó la solución que pasó a través de la columna y se volvió a lavar con 250 µl de solución de lavado. La columna se transfirió a un tubo limpio y se eluyó el DNA plasmídico adicionando 100 µl de agua libre de nucleasas, se incubó por 5 min a t.a., se centrifugó a 10,000 x g por 2 min, y el DNA se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

#### Ensayo de digestión enzimática.

El DNA plasmídico recombinante obtenido de la transformación bacteriana y previamente purificado se sometió a digestión con la enzima *Eco*-RI (Promega). Para esto, en un tubo Ependorff se colocaron 2 µl de buffer 10X; 0.5 µl (5 U/µl) de enzima

*Eco*-RI; y 200-300 ng de DNA plasmídico y agua libre de nucleasas cpb 20  $\mu$ l. El tubo de reacción se incubó por 1 hr a 37 °C y los fragmentos de DNA se visualizaron en un gel de agarosa al 1% con 5  $\mu$ g de bromuro de etidio y se corrió en un campo eléctrico de 80 V en presencia de buffer TAE (Sambrook, 1989).

#### Secuenciación automática.

El DNA plasmídico recombinante con el inserto *msa-1* fue utilizado para obtener la secuencia de dicho gen tanto en los 11 aislados contemplados, como en las 2 cepas de referencia. Para ello, se utilizó el DNA plasmídico de 2 clonas que salieron positivas por ensayo de restricción con *Eco*-R1 y la secuenciación se realizó con los oligonucleotidos M13F 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' y M13R 5'-CAGGAAACAGCTAATGAC-3' proporcionados por el distribuidor del kit de clonación (Invitrogen, USA). Para cada uno de los aislados fue empleando el método de secuenciación automática Cycle sequencing, realizándose esto en el Instituto de Biotecnología (UNAM). Esta metodología esta basada en un sistema de electroforesis capilar que proporciona una alternativa al sistema basado en geles de acrilamida/bisacrilamida donde este soporte ha sido sustituido por un polímero que se inyecta de forma automática en un capilar antes de cargar la muestra de secuenciación. Las muestras se van analizando una a una al mismo tiempo que se va detectando la fluorescencia.

La identidad del clon recombinante se comprobó por secuenciación automática, La secuencia correspondiente de cada aislado primeramente se comparó con la secuencia de *msa-1* de la clona mexicana Mo7, y posteriormente se utilizó el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para buscar coincidencias de longitud fija con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank.

#### **ANÁLISIS in silico PARA PREDECIR EPÍTOPES LINEALES DE CÉLULAS B.**

La predicción de epítopes lineales de células B fue obtenida tomando en cuenta las propiedades físico-químicas de las moléculas analizadas (hidrofilicidad, flexibilidad, accesibilidad, polaridad, así como regiones expuestas en la superficie).

Para ello nos auxiliamos del servidor ABCpred, el cual nos permite predecir epítopes de células B con una exactitud de 65.93% en una secuencia de una proteína antigénica, el principio esta basado en Saha *et al.*, (2006), los cuales desarrollaron el primer servidor basado en el uso de una red de trabajo neuronal artificial usando colecciones de modelos matemáticos que emulan algunas de las propiedades observadas del sistema nervioso biológico. De esta manera el sistema utilizado entra en una forma de aprendizaje, para ello se apoyan en una base de datos de aproximadamente 700 epítopes de células B, la cual ha sido obtenida de un banco de datos de epítopes de células B no redundante del servidor Bciprep.

Mediante el uso de esta herramienta, se realizó la predicción de epítopes a células B a partir de las secuencias aminoacídicas de MSA-1 y MSA-2c de los diferentes aislados. Para ello se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

La longitud del epítope predicho (20 aa), valor de umbral mayor de 0.5, y se consideraron todas aquellas moléculas que al ser comparadas mostraron un porcentaje de identidad mayor o igual a 99.8 %.

Tras considerar estas características, cada una de las moléculas fue analizada y los resultados fueron obtenidos de forma tabular.

#### **OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MSA-2C Y PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.**

La proteína recombinante MSA-2c se obtuvo como proteína de fusión con thioredoxina mediante el uso de un sistema de expresión en procarionte, utilizando el kit pBAD/Thio/TOPO (Invitrogen, USA).

#### Amplificación del gen *msa-2c*.

La región codificante del gen *msa-2c*, se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *B. bovis* de la clona Rad disponible en el laboratorio de *Babesia* del CENID-Parasitología Veterinaria, para ello, se utilizó DNA purificado mediante el método de fenol/cloroformo, y los oligonucleótidos MSA-2cF y MSA-2cR (Ver tabla 2), los componentes de la reacción de PCR fueron los mismos que se utilizaron en la

amplificación del gen *msa-1*, como ya se describió anteriormente, salvo los parámetros de amplificación que fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 30 segundos, posteriormente desnaturalización a 95 °C por 30 segundos; alineamiento a 60 °C por 1 min; Extensión a 72°C por 1 min durante 35 ciclos, finalizando con un paso de 72 °C por 10 min. El amplicón se visualizó en un gel de agarosa al 1% con 5 µg de bromuro de etidio y se corrió en un campo eléctrico de 80 V en presencia de buffer TAE (Sambrook, 1989).

#### Clonación del gen *msa-2c* y transformación bacteriana.

El producto de PCR (*msa-2c*) se purificó del gel, éste se clonó en el vector de expresión pBAD/thio-TOPO y se transformaron bacterias como ya se ha descrito previamente con *msa-1*. Posteriormente, las bacterias se sembraron en al menos 3 placas con medio LB Agar conteniendo Ampicilina (50 mg/ml) y se dejaron incubando a 37 °C durante toda la noche.

#### Monitoreo colonias conteniendo el inserto *msa-2c*.

Se seleccionaron aleatoriamente 16 colonias, las cuales nuevamente se sembraron en medio LB sólido y se dejaron incubando a 37°C toda la noche. Con el propósito de identificar el inserto, a estas clonas se les realizó PCR *in situ* en un volumen de 25 µl conteniendo 10 mM Tris-HCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.5 U de Taq Polimerasa; 0.2 mM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos; 200 nM de los oligonucleotidos MSA-2cF/MSA-2cR a los cuales se inoculó una azada de colonia de bacterias por tubo de reacción. El programa utilizado para la PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 30 segundos, posteriormente desnaturalización a 95 °C por 30 segundos; alineamiento a 60 °C por 1 min; extensión a 72 °C por 1 min durante 35 ciclos, finalizando con un paso de 72 °C por 10 min. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### Identificación de colonias en orientación 5' -3'

Las colonias conteniendo el inserto *msa-2c* fueron posteriormente analizadas por PCR como ya se describió arriba, pero utilizando adicionalmente 2 oligonucleótidos

proporcionados por el proveedor del Kit de expresión, los cuales, además de ser utilizados para secuenciar el inserto clonado, en este estudio se emplearon para discriminar, por tamaño, aquellas clonas en orientación correcta. Para ello, la reacción de PCR contenía un oligonucleótido del vector y el otro del gen *msa-2c*, (Thio-F / MSA-2cR ó Thio-R/ MSA-2cF). El protocolo de ciclado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 30 segundos, posteriormente desnaturalización a 95 °C por 30 segundos; alineamiento a 55 °C por 1 min; extensión a 72 °C por 1 min durante 25 ciclos, finalizando con un paso de 72 °C por 10 min. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Las colonias identificadas con el inserto fueron confirmadas por secuenciación automática para corroborar la orientación y mantenimiento del marco de lectura en fase con la proteína de fusión. Cada secuencia fue comparada con la secuencia del gen *msa-2c* de la clona RAD obtenida de una base de datos perteneciente al laboratorio de *Babesia*, y también se realizó un alineamiento con la secuencia del gen *msa-2c* de la clona mexicana Mo7 obtenida en el GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

#### Expresión de la proteína recombinante MSA-2c.

Una clona conteniendo el inserto *msa-2c* en orientación correcta y sin corrimiento de marco de lectura fue seleccionada y sembrada en 2 ml de medio líquido LB-ampicilina incubando a 37 °C por una noche. Se inocularon 100 µl del precultivo en 10 ml de medio LB-ampicilina fresco y se mantuvo el crecimiento de las bacterias a 37 °C en agitación y a un valor medio de lectura de 0.5 - 0.8 OD a 600 nm. Enseguida, se realizó la inducción del cultivo con arabinosa al 0.1, 0.05 y 0.025% por 3 h a 37 °C, las pastillas bacterianas fueron colectadas por centrifugación a 4 °C por 10 min a 4,000 rpm y se almacenaron a -20 °C para su uso posterior, o en otros casos se resuspendieron en 3 ml de buffer de lisis (50 mM fosfato de sodio, pH 7.8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10% glicerol; 0.5% triton X-100) que contenía lisozima a 1 mg/ml. Los tubos se incubaron a 4 °C por 30 min, posteriormente se adicionó 5 U de DNAsa y 25 µl de RNAsa (1 mg/ml) y se incubó nuevamente a 4 °C por 15 min. Enseguida, las bacterias se sonicaron por 5 veces con pulsos de 20 seg, se

centrifugarón a 10,000 x g por 15 min a 4 °C, se recuperó las pastillas y sobrenadantes, y se mezclaron con 500 µl y 100 µl (v/v) de buffer de muestra 2x para SDS-PAGE, respectivamente. Las muestras se sometieron a ebullición por 5 min, se centrifugaron brevemente y 25 µl de la muestra de pastilla y 35 µl de la muestra del sobrenadante se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% a 100 V. (Laemmli, 1970)

#### Purificación de la proteína recombinante MSA-2c.

La proteína recombinante se purificó mediante 2 métodos:

a) Purificación por afinidad mediante el uso de una resina cargada con níquel ProBond (Invitrogen). Para ello, se siguieron las instrucciones de los fabricantes para purificar a la proteína en condiciones nativas mediante el sistema de purificación Ni-NTA (Invitrogen). Las proteínas unidas a la resina son eluidas por competencia con imidazol, en este caso se probaron 4 concentraciones de imidazol (150 mM, 200 mM, 250 mM y 300 mM) para despegar a la proteína unida a la resina.

Las fracciones colectadas se corrieron bajo el sistema SDS-PAGE a 100 V y los geles se tiñeron con azul de Coomassie como ya se describió anteriormente.

b) Alternativamente, la purificación de MSA-2c se realizó por electro-elución a partir de los geles de SDS-PAGE. La pastilla bacteriana previamente inducida con arabinosa se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis conteniendo 1mg/ml de lisozima. Se incubó por 30 min a 4 °C y se sonicó 5 veces por 20 seg en frío, se le adicionó 5 U de DNasa y 25 µl de RNasa (1mg/ml) por 15 min a 4 °C, y se centrifugó a 10,000 x g a 4 °C. La pastilla fue finalmente resuspendida en 500 µl de buffer de muestra 2x, se cargó en geles desnaturizantes de poliacrilamada al 8% y se corrió a 100 V. El gel se desmontó y sumergió en una solución de imidazol (0.2 M imidazol; 0.047% SDS) por 8 min en agitación constante, y se colocaron 20 ml de solución reveladora de sulfato de zinc (0.25 M). Se permitió observar la aparición de bandas translúcidas, la reacción se detuvo con agua bidestilada, se cortaron las bandas translúcidas correspondientes al tamaño esperado y se colocaron en una solución de ácido cítrico al 10% por 10 min. Los fragmentos de gel se colocaron en bolsas de diálisis

conteniendo PBS frío y se realizó la electro-elución a 80 V por 45 min, posterior a lo cual se recuperó el sobrenadante y el volumen obtenido se concentró en filtros AMICON a 10,000 x g por 30 min a 4 °C. (Ortiz, *et al* 1992).

La proteína purificada se cuantificó mediante el método de Bradford (1976), y alternativamente, se volvió a correr una fracción de la proteína purificada en SDS/PAGE para verificar la integridad de ésta.

#### Producción de anticuerpos policlonales anti MSA-2C.

Los anticuerpos policlonales contra MSA-2c se obtuvieron de tres ratones que fueron inmunizados 2 veces por vía intraperitoneal semanalmente, y 1 por vía intravenosa (iv) con 10 µg de proteína recombinante MSA-2c, la primer inmunización se realizó con proteína MSA-2c emulsificada en adyuvante completo de Freund, seguida por 2 inmunizaciones con la misma cantidad de proteína con adyuvante incompleto de Freund. Posterior a la segunda inmunización se midió el título de anticuerpos desarrollado en cada ratón, mediante un ELISA indirecto. Este sistema de detección se basa en la fijación de un antígeno (en este caso MSA-2c recombinante purificada) a la fase sólida, el cual atrapa a los anticuerpos presentes en el suero que será evaluado. Subsecuentemente se utiliza un anticuerpo secundario específico (anti IgG de ratón) conjugado con una enzima (peroxidasa) agregándose posteriormente un sustrato cromogénico (o-fenilendiamina) de la enzima marcadora. La existencia de una reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo se demuestra y se cuantifica midiendo por espectrofotometría (OD. 492 nm) la cantidad de producto enzimático resultante.

Cabe mencionar que previo a la inoculación, se obtuvo suero preinmune de los ratones, el cual sirvió como control negativo para los ensayos de inmunoelectrotransferencia e Inmunofluorescencia

## **ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE EPÍTOPES COMUNES EN LAS MOLÉCULAS MSA-1 Y MSA-2C DE LOS AISLADOS MEXICANOS MEDIANTE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.**

### Preparación de antígeno para inmunoelectrotransferencia

Eritrocitos infectados o no infectados (congelados) fueron procesados para obtención de antígeno. Para esto, 5 ml de paquete de glóbulos rojos se mezclaron con 10 ml de PBS frío y se centrifugó a 10,000 x g por 15 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se realizaron varios lavados con PBS hasta obtener las membranas de los parásitos. El botón recuperado, el cual contiene las membranas de los eritrocitos y de las formas parasitarias intraeritrocíticas se utilizaron como antígenos para los ensayos de inmunoelectrotransferencia.

### Inmunoelectrotransferencia.

Se tomaron 500 µl del stock de membranas obtenidas como se describe arriba y se trataron con 250 µl de solución de lisis 4x (50 mM fosfato de sodio, pH 7.8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10% glicerol; 0.5% Triton X-100), se adicionó 15 µl de un "cocktail" de inhibidor de proteasas (Sigma), se incubaron por 15 min a 4°C, y se sonicaron las muestras 3 veces a 20 pulsos/30 seg, las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida al 12% bajo condiciones desnaturalizantes como se ha descrito anteriormente. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 3 h a 80 V en frío, enseguida la membrana se trató con 25 ml de solución de bloqueo (PBS pH 7.2/Tween-20, leche descremada 10%) y se incubó por 1 h / t a con agitación constante ó toda la noche en frío. La membrana se lavó para eliminar exceso de solución bloqueadora y se incubó toda la noche con anticuerpos monoclonales anti-MSA-1 a una dilución 1:100 (generado por Figueroa *et al.*, 1998), anticuerpo monoclonal dilución 1: 500 generado por Dominguez *et al.*, 2004 o policlonal anti-MSA-2C dilución 1:1000. Posteriormente se efectuaron 5 lavados por 5 min con PBS-Tween 20 y se colocó el anticuerpo secundario (Conejo anti-IgG de ratón) conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000. Después de 1 hora de incubación se realizaron 5 lavados (PBS- Tween 20) y la membrana se incubó en la

solución que contenía el sustrato BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-fosfato) y el revelador Nitro Blue Tetrazolium (Coligan *et al.*, 1991).

#### **LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE LA PROTEÍNAS MSA-1 Y MSA-2C EN LOS AISLADOS MEXICANOS MEDIANTE IFI.**

##### Preparación de antígeno para inmunofluorescencia indirecta

Para esta prueba se realizaron de 20 a 50 frotis de sangre infectada con cada una de las poblaciones de parásitos de estudio. Se utilizó 5 ml de muestra, ésta se centrifugó a 10,000 x g por 15 min a 18 °C y se eliminó el plasma. El paquete globular fue lavado 2 veces con PBS por centrifugación a 10,000 x g por 15 min a 18 °C, el sobrenadante fue descartado y el paquete de glóbulos se resuspendió en PBS en una relación 4:1 (v/v), y 7 µl de estos glóbulos se utilizaron para realizar los frotis. Posterior al secado al aire, cada laminilla se envolvió en papel higiénico y en papel aluminio, se sellaron en fundas de nylon y se congelaron a -20 °C para su uso posterior. Cabe mencionar que las laminillas presentan diferentes porcentajes de parasitemia, de acuerdo al tipo de aislado utilizado (Ver tabla 1).

##### Inmunofluorescencia indirecta.

Las laminillas con antígeno se sacaron del congelador a -20 °C y se colocaron inmediatamente en un matraz con cloruro de calcio anhidro. El matraz se conectó a una bomba de vacío durante 30 min, enseguida las laminillas se fijaron en acetona al 100% por 15 min y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron pequeños círculos sobre el portaobjetos y se colocaron 7 µl de anticuerpo primario, ya sea anti-MSA-1 o anti-MSA-2c policlonal (1:10). Se incubó por 30 min a 37 °C en una cámara húmeda, se lavó 2 veces con PBS y una última con agua bidestilada. Se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-IgG de ratón (1:200) y se incubó por 30 min a 37°C en una cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados, 2 con PBS y el último con agua bidestilada, se dejaron secar las laminillas y se resguardaron en la oscuridad. Finalmente, las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia.

Como control positivo se utilizó un anticuerpo monoclonal (anti-152 kDa, diluido 1:100) dirigido contra una proteína citoplasmática de *B. bovis* (Sahún *et al.*, 2000), y como control negativo se utilizó PBS o suero pre-inmune de ratón.

## 6. RESULTADOS

### **AMPLIFICACIÓN, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN *MSA-1* DE MEROZOÍTOS DE *B. BOVIS* EN DIFERENTES AISLADOS OBTENIDOS DE DIFERENTES REGIONES DE LA REPÚBLICA MEXICANA.**

#### PCR del gen *msa-1* de aislados mexicanos de *B. bovis*.

La amplificación del gen *msa-1* de las cepas de referencia (RAD y México) mostraron un sólo amplicón de aproximadamente 960 pb, el cual correspondió al tamaño del marco de lectura abierto del gen *msa-1*, mientras que en el control negativo de la reacción, el cual no contuvo ninguna fuente de DNA, no se observó señal de producto sintetizado (Figura 4).

Por otro lado la síntesis del gen *msa-1* por PCR de los 11 aislados de campo reveló un producto de similar tamaño (960 pb). Es importante mencionar que sólo se incluyen 2 fotografías representativas que demuestran la evidencia del producto amplificado en donde se destaca la amplificación del gen *msa-1* de los aislados Jalisco, Tamaulipas 1, Nayarit y Guerrero (Figura 5, paneles A y B).

#### Clonación y ensayo de digestión enzimática.

Después de clonar el gen *msa-1* se purificó el DNA plasmídico y se sometió a digestión con la enzima *Eco-R*I; ésta reconoce dos sitios de corte en el vector TOPO flanqueando el inserto. Un clon positivo se identificó por la presencia de 2 fragmentos: un inserto de 960 pb que indica el tamaño del gen *msa-1* y un fragmento de 3.9 Kb correspondiente al vector (Figura 6 paneles A y B). En el caso de las clonas negativas, sólo se visualizó una banda de aproximadamente 3.9 Kb que correspondió al vector en su forma linearizada (Figura 6 panel A carril 2; panel B carril 1). Se muestran 2 imágenes representativas de las 13 poblaciones de estudio donde se manifiestan los cortes de restricción de los aislados Quintana Roo y Chiapas 1. (Figura 6, paneles A y B).

#### Secuenciación del gen *msa-1* de *B. bovis*

La identidad cada clon recombinante se comprobó por secuenciación automática, lo que mostró que el gen *msa-1* en las 13 poblaciones es de longitud variable con un

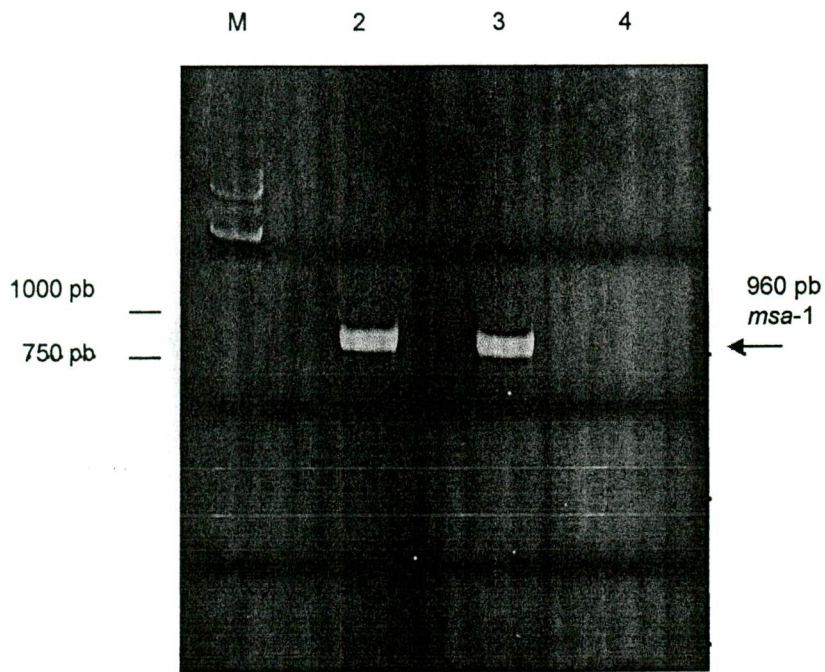


Figura 4. Amplificación por PCR del gen *msa-1* de *B. bovis* de las cepas RAD y México. El gen *msa-1* se amplificó con oligonucleótidos específicos utilizando como templado DNAg (100 ng) de fases asexuales del parásito. Posterior a 35 ciclos de amplificación, 15  $\mu$ l del producto de PCR de una reacción total de 25  $\mu$ l se corrió en un minigel de agarosa al 1% a 80 V / 1h, las bandas se visualizaron con luz UV. El carril 1 muestra el marcador de tamaño de DNA 1 Kb (M), carril 2 el amplicón de la clona RAD, carril 3 amplicón de la cepa México y carril 4 control negativo de la reacción de PCR.

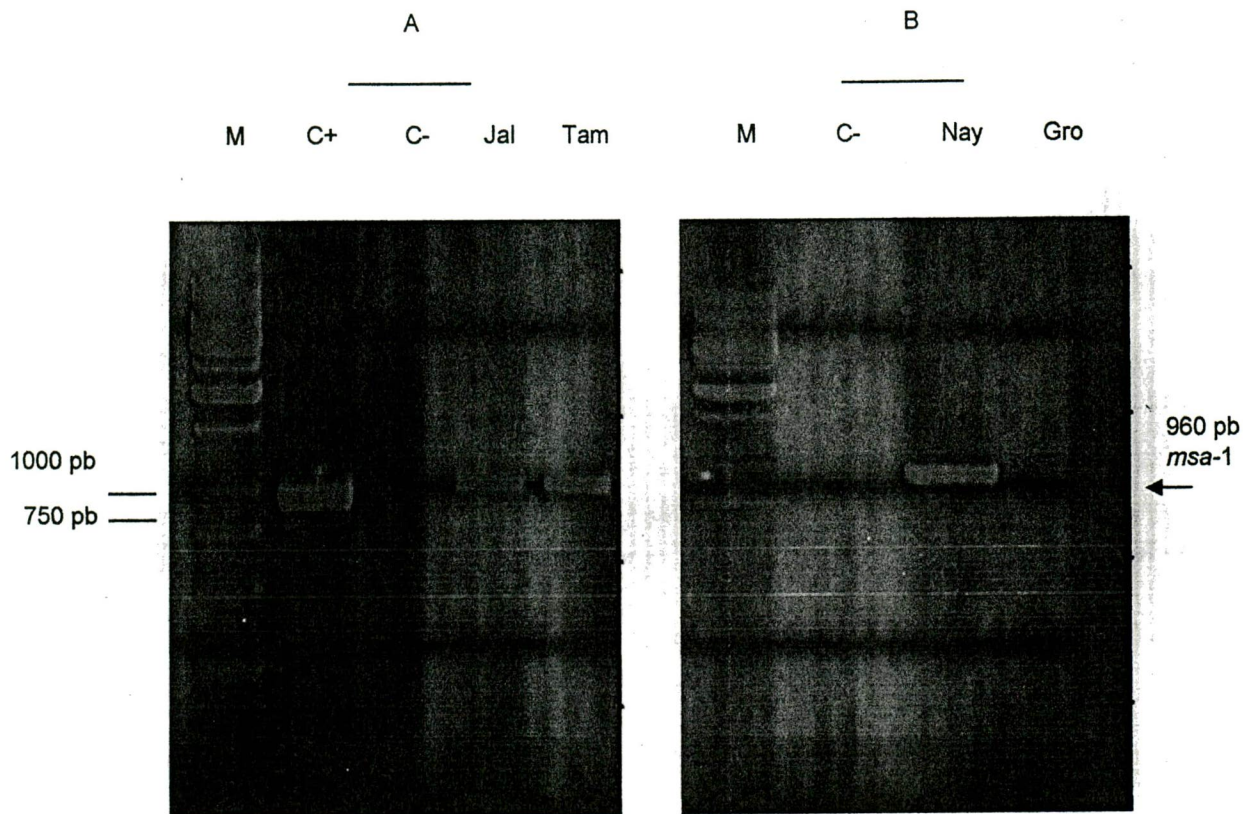


Figura 5. Amplificación por PCR del gen *msa-1* de *B. bovis* en aislados mexicanos. El gen *msa-1* se amplificó con oligonucleótidos específicos utilizando como templado DNAg (100 ng) de fases asexuales del parásito. Posterior a 35 ciclos de amplificación 15  $\mu$ l del producto de PCR de una reacción total de 25  $\mu$ l se corrió en un minigel de agarosa al 1% a 80 V/ 1 h, las bandas se visualizaron con luz UV. El panel A muestra los productos de PCR de los aislado Jalisco y Tamaulipas 1, el panel B muestra los productos de PCR de los aislados Nayarit y Guerrero. En cada uno de los ensayos se utilizó el DNAg de RAD como control positivo y un control negativo de la reacción de PCR.

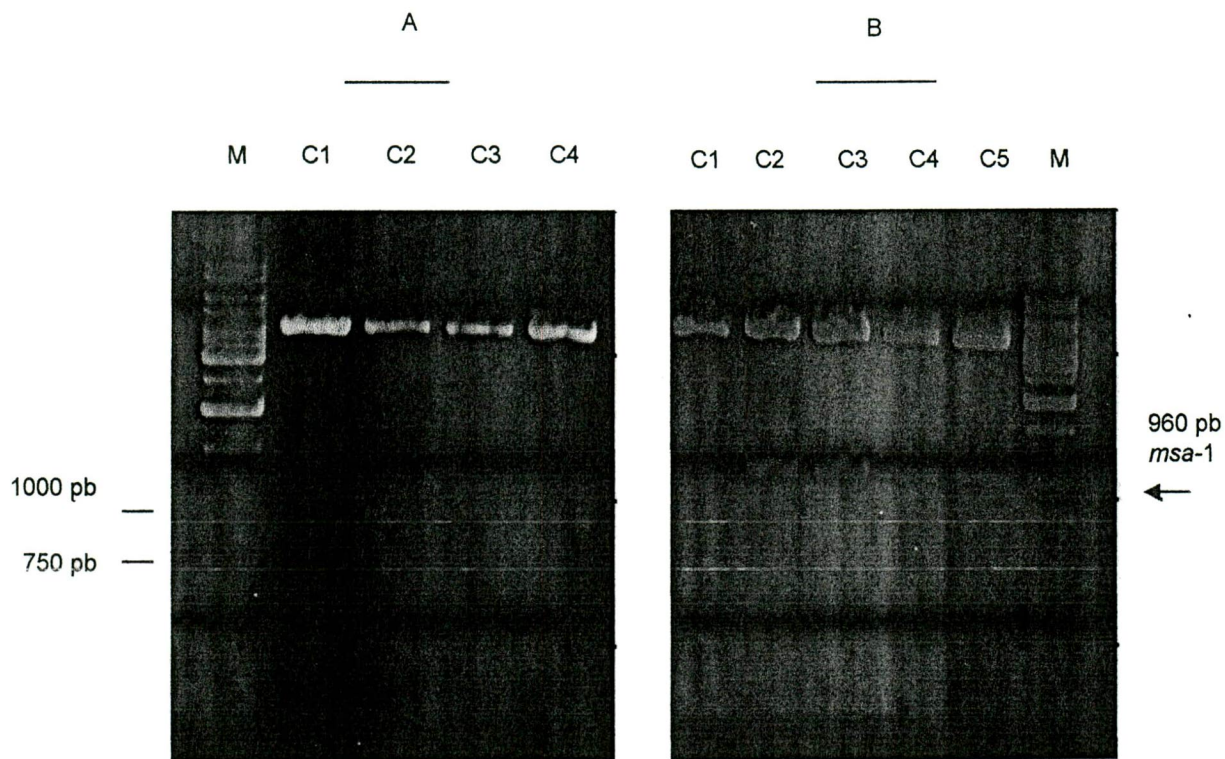


Figura 6. Análisis de restricción con la enzima *Eco*-RI de los plásmidos pCR 2.1-TOPO conteniendo insertos del gen *msa-1*. Tras seleccionar clonas transformadas con y sin el vector recombinante, se purificó el DNA plasmídico y 500 ng de este material genético se sometió a digestión con 2.5 U de la enzima *Eco*-RI a 37 °C por 1 h. El producto de digestión (20 µl) se corrió en un minigel de agarosa al 1% a 80 V /1 h, las bandas se visualizaron con luz UV. El panel A muestra el análisis de restricción del aislado Quintana Roo. En el carril 1 se observa el marcador de tamaño de DNA 1Kb (M); en el carril 2 se observa una clona transformada con el vector pCR 2.1-TOPO sin inserto; el carril 3, 4 y 5 muestra el vector pCR 2.1-TOPO conteniendo insertos de *msa-1*. El panel B muestra DNA plasmídico pCR 2.1-TOPO de 5 clonas: En el carril 2 se observa el vector pCR 2.1-TOPO linearizado, el carril 2, 3, 4 y 5 muestra el vector pCR 2.1-TOPO con insertos de *msa-1* del aislado Chiapas, el carril 6 del panel muestra el marcador de tamaño de DNA 1Kb (M).

rango de tamaño de 961 a 998 pb: el gen *msa-1* de los aislados Quintana Roo, Tabasco, Nayarit, Jalisco, Tamaulipas-1, Chiapas-2 y las 2 cepas de referencia Rad y México presentan una longitud de 961 pb. Enseguida, se tienen los aislados Guerrero, Tamaulipas-2, Veracruz-2 y Chiapas-1 con 994 pb y por último el aislado, Veracruz-1, con 988 pb (ver tabla 3).

### **IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS EN LA PROTEÍNA MSA-1 MEDIANTE ANÁLISIS *in silico*.**

El alineamiento múltiple de las secuencia de aminoácidos de la proteína madura de MSA-1 de los aislados, reveló que esta proteína es muy diversa ya que el porcentaje de identidad fue del 47.7% (Figura 7). La proteína presenta 320 a.a en promedio y las regiones que poseen mayor variabilidad se localizan en los extremos amino y carboxilo terminal. En el carboxilo terminal se acumula el mayor número de variaciones como se observa en la figura 7.

También es posible localizar pequeñas regiones de residuos idénticos de longitud variable como los motivos P, DM, SF, KFNAIF, YGAV, NPMI, y YFKKHVY (Figura 7).

De acuerdo a los porcentajes de identidad se definieron 4 grupos: el grupo I, comprendió 6 aislados, en el encontramos los aislados de Jalisco, Nayarit, Tabasco, Chiapas-2, Tamaulipas-1, Quintana Roo, además las cepas de referencia RAD y México. El porcentaje de identidad es casi del 99.8% con respecto a la clona Mo7.

El grupo II incluyó los aislados Guerrero, Tamaulipas-2 y Veracruz-2. Estos aislados se relacionan más con algunos aislados australianos en donde la identidad de MSA-1 es de hasta 81% en comparación con los propios aislados mexicanos (51%) o argentinos (44-45%) ver tabla 4.

Los grupos III y IV albergaron 1 sólo aislado, Chiapas-1 para el caso del grupo III y Veracruz-1 para el grupo IV. Estos aislados fueron de los más distantes, ya que no se pudieron agrupar entre si, ni con el resto del grupo. Entre ellos se determinó un 67% de identidad y cuando se compararon con el resto del grupo su identidad varió desde 51% a 60% para el caso de Chiapas 1, y de 51% a 54% para el caso de Veracruz-1. Este porcentaje de identidad fue relativamente más bajo cuando se compararon aislados argentinos (50-51%) y australianos (23-49%) ver tabla 4.

Tabla 3. Longitud del gen *msa-1* de *B. bovis* en diferentes aislados mexicanos.

AISLADO/CEPA	TAMAÑO DEL GEN	AISLADO/CEPA	TAMAÑO DEL GEN
RAD	961 pb	VERACRUZ 1	988 pb
MÉXICO	961 pb	VERACRUZ 2	994 pb
TABASCO	961 pb	TAMAULIPAS 1	961 pb
QUINTANA ROO	961 pb	TAMAULIPAS 2	994 pb
NAYARIT	961 pb	CHIAPAS 1	994 pb
JALISCO	961 pb	CHIAPAS 2	961 pb
GUERRERO	994 pb		

1 80

CHIAPAS 1 (1) MATFALFISALCCVSAIASSAEVIOCES----SSVVRDAALFSGYLYEDMAKFGYAVESFDKKNLFAVIANFPAKVAQ

GUERRERO (1) MATFALFISALCCVSAVTSSEPRSAENVIR----VINDSSDLPEGYLYDDMAKFGYAVESFDKTKLYAVIAANFRNGGLA

TAMAULIPAS 2 (1) MATFALFISALCCVSAVTSSEPRSAENVIR----VINDSSDLPEGYLYDDMAKFGYAVESFDKTKLYAVIAANFRNGGLA

VERACRUZ 2 (1) MATFALFISALCCVSAVTSSEPRSAENVIR----VINDSSDLPEGYLYDDMAKFGYAVESFDKTKLYAVIAANFRNGGLA

VERACRUZ 1 (1) MATFALFISALCCVSAIASSAEVIOCES----SSVVRDAALFSGYLYEDMAKFGYAVESFDKKNLFAVIANFPAKVAQ

TAMAULIPAS 1 (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

JALISCO (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

CHIAPAS 2 (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

MÉXICO (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

NAYARIT (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

QUINTANA ROO (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

RAD (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

TABASCO (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

Mo7 (1) MATFALFISALCCVLAITSAGEELTQSDV----RNADTSIVLPEGSFYDDMEKFGYAVESFDQTKLYSVLSANFKAAKMD

81 160

CHIAPAS 1 (77) D-KVNDAFKHLYIVNAMIKRNPIMRSDLFNEAAVSIPTQNTDEEKFNALFESIKANRHRIDHMDKLYLTLRWNDIAEED

GUERRERO (77) DEKVKEAASSLYKVSASIKVNPIMNSDLFKEEAVSFGTQDKKFNALFESIKTMVLRINHMQLTFLGLDWSSEITIGD

TAMAULIPAS 2 (77) DEKVKEAASSLYKVSASIKVNPIMNSDLFKEEAVSFGTQDKKFNALFESIKTMVLRINHMQLTFLGLDWSSEITIGD

VERACRUZ 2 (77) DEKVKEAASSLYKVSASIKVNPIMNSDLFKEEAVSFGTQDKKFNALFESIKTMVLRINHMQLTFLGLDWSSEITIGD

VERACRUZ 1 (81) DQKIKDQVINIYKVRDMIKRNPIMSSLEFKEAAKSFLSKTDEKFNALFESIKRSMFVRINHMDFLKSLEWNPPLSAEG

TAMAULIPAS 1 (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

JALISCO (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

CHIAPAS 2 (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

MÉXICO (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

NAYARIT (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

QUINTANA ROO (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

RAD (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

TABASCO (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

Mo7 (77) DQKVKDTFKNLYKVNALIKRNPIMRPDLFNATIVSGFSTKNDKEKFNALFESIKRSMYRQEMDKYLSLRWNTDIVEED

161 240

CHIAPAS 1 (156) REKAEDYFKKHVYKDEEELNVNGMAVCKGFLNQESSEFYKLAESFDADKGEYBGRIDNFAEPKNNVEAPKELVSAITEEA

GUERRERO (157) RKKAEYFKKHVYKEEYKVNVEGMAVCKGFLGDGSDFNKLVTFDDFARGHGYGLAENYVEFNPDLTLEGLIAEVEKE

TAMAULIPAS 2 (157) RKKAEYFKKHVYKEEYKVNVEGMAVCKGFLGDGSDFNKLVTFDDFARGHGYGLAENYVEFNPDLTLEGLIAEVEKE

VERACRUZ 2 (157) RKKAEYFKKHVYKEEYKVNVEGMAVCKGFLGDGSDFNKLVTFDDFARGHGYGLAENYVEFNPDLTLEGLIAEVEKE

VERACRUZ 1 (161) RQKAEYFKKHVYGEQYTVVNGMAVCKGFLWYEQYFKLAVCFDDFVKG-NQDVKNFVQPSSEAPQEVYTAITEE

TAMAULIPAS 1 (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

JALISCO (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

CHIAPAS 2 (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

MÉXICO (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

NAYARIT (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

QUINTANA ROO (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

RAD (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

TABASCO (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

Mo7 (157) REKAEDYFKKHVYTGEHVVDVNGMAVCKEFLSPASDFYKLVESFDAPFAHAEVHAQVGNFVKPGTDIAPPKDVTDALEKE

X bloque de residuos conservados.  
 X bloque de residuos idénticos.  
 X bloque de residuos similares.  
 X bloque de residuos débilmente similares.  
 X bloque de residuos no similares.  
 -- Gaps

— Regiones predictivas de determinantes antigénicos.

Continuación

```

                241
CHIAPAS 1 (236) WAKI KAPTNP----ENTSLPAQ--A P G A S E F T S F G Q T A P A P Q P G A S A T E P A Q E F A S T K P E Q P A G N L S G Q Q G S P
GUERRERO (237) VATV K P V E R E N N R S P G T G A V F Q P V - D G Q A Q C E I P T P S S S P S S P E S Q S P --- Q T Q G A E N P S P D S --- Q G N L N G Q R ---
TAMAULIPAS 2 (237) VATV K P V E R E N N R S P G T G A V F Q P V - D G Q A Q C E I P T P S S S P S S P E S Q S P --- Q T Q G A E N P S P D S --- Q G N L N G Q R ---
VERACRUZ 2 (237) VATV K P V E R E N N R S P G T G A V F Q P V - D G Q A Q C E I P T P S S S P S S P E S Q S P --- Q T Q G A E N P S P D S --- Q G N L N G Q R ---
VERACRUZ 1 (241) EKI G T S A Q ----- G R P Q V P E A -- E Q T Q Q V T P A V Q P S K P T T K P T E D P ----- A A G S S P V E R P A G N L T G Q Q D S S
TAMAULIPAS 1 (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T
JALISCO (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T
CHIAPAS 2 (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T
MÉXICO (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T
NAYARIT (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T
QUINTANA ROO (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T
RAD (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T
TABASCO (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T
Mo7 (237) L Q E Q K P A R S ----- E S T E V P A P ----- G D A S G V Q Q P P A S G T S P Q G P A P T T P ----- S P S P E S ----- S G N L Q G Q G T T

```

```

                321                346
CHIAPAS 1 (308) K P -- A S F T F G G L T V A T L C Y F V L S A F -
GUERRERO (306) E P A K S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
TAMAULIPAS 2 (306) E P A K S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
VERACRUZ 2 (306) E P A K S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
VERACRUZ 1 (304) K P A G S S F T F G G L T V A T L C Y F V L S A F -
TAMAULIPAS 1 (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
JALISCO (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
CHIAPAS 2 (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
MÉXICO (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
NAYARIT (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
QUINTANA ROO (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
RAD (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
TABASCO (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -
Mo7 (295) K P A G S S F T Y G G L T V A T L C Y F V L S A F -

```

X bloque de residuos conservados.  
X bloque de residuos idénticos.  
X bloque de residuos similares.  
X bloque de residuos débilmente similares.  
X bloque de residuos no similares.  
-- Gaps

— Regiones predictivas de determinantes antigénicos.

Figura 7. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína MSA-1 en aislados mexicanos.

Tabla 4. Porcentajes de identidad de la secuencia aminoacídica de la proteína MSA-1 en aislados mexicanos con respecto a otros aislados del mundo.

GRUPO	AISLADOS MEXICANOS	CLONA Mo/ MEXICANA	AISLADOS ARGENTINOS	AISLADOS AUSTRALIANOS
I	Jalisco, Nayarit, Tabasco, Chiapas 2, Tamaulipas, Quintana Roo, Rad y México	99.7 %	47% - 48%	48% - 22%
II	Guerrero, Tamaulipas 2, Veracruz 2	51%	44% - 45%	81% - 44%
III	Chiapas 1	57%	47% - 48 %	51% - 25%
IV	Veracruz 1	54%	50% - 51%	49% - 23%

### Identificación de epítopes de células B de la proteína MSA-1.

Después de someter la secuencia antigénica de una molécula representativa de los 4 variantes alélicas a una exploración de epítopes para células B, se consiguió determinar lo siguiente: se pronosticaron en promedio 27 epítopes, de los cuales más del 50% se localizaron en la región central de la proteína (80-240 aa), el 30-35% se encontraron en la región amino y sólo el 15- 20% se percibieron en el extremo carboxilo, algunos de estos epítopes presentaron valores de umbral altos sugiriendo mayor probabilidad de un epítope como fue el caso de los epítopes 3, 7, 8 y 2 presentes en los grupos I, II, III y IV respectivamente ( Figura 7, Apéndice 1).

### **ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE EPÍTOPES COMUNES EN LAS MOLÉCULAS MSA-1 DE LOS AISLADOS MEXICANOS MEDIANTE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.**

El siguiente paso fue comprobar si el anticuerpo monoclonal anti-MSA-1 era capaz de reconocer a los diferentes antígenos en su forma desnaturalizada. Para ello, las proteínas de membrana de eritrocitos infectados de las 13 poblaciones en estudio se evaluaron por inmunoelectrotransferencia, los resultados mostraron reactividad cruzada en los aislados Quintana Roo, Chiapas 2, Tamaulipas-1, Tamaulipas 2, Guerrero, Veracruz -2, además de la clona Rad y Cepa México (Figura 8) y no hubo reconocimiento en el control negativo.

### **LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE LA PROTEÍNA MSA-1 EN LOS AISLADOS MEXICANOS MEDIANTE IFI.**

Los resultados obtenidos demostraron que el anticuerpo monoclonal anti-MSA-1 reconoce el antígeno MSA-1 de *B. bovis* de la clona RAD, y la cepa México. Ésto, se observó como señal fluorescente en la periferia de los merozoítos y trofozoítos respectivamente (Figura 9, paneles C y D), mientras que la marca fluorescente observada con el anticuerpo monoclonal anti-152 kDa se observó en forma de parches dentro del parásito (Figura 9, panel B). No se detecta señal alguna cuando los parásitos son solamente incubados con PBS (Figura 9, panel A).

No obstante se observó escasa reactividad con los antígenos de *B. bovis* de los aislados Quintana Roo, Tamaulipas 1 y Guerrero (Figura 10). En el resto de los

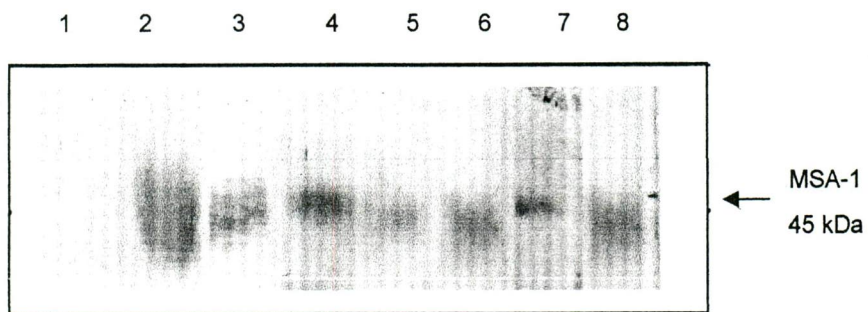


Figura 8. Detección por inmunoelectrotransferencia del antígeno MSA-1 en varios aislados mexicanos de *B. bovis*. Proteínas de membrana de parásitos intraeritrocíticos fueron tratadas con solución de lisis y sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Posterior a la transferencia, estas fueron incubadas con anticuerpo monoclonal anti-MSA-1 y fueron reveladas por colorimetría. El carril 1 muestra eritrocitos no infectados; Carril 2 muestra la clona RAD; Carril 3 la cepa México; Carril 4 el aislado Tamaulipas 1; Carril 5 el aislado Tamaulipas 2; Carril 6 el aislado Quintana Roo; Carril 7 el aislado Guerrero; Carril 8 el aislado Chiapas 2.

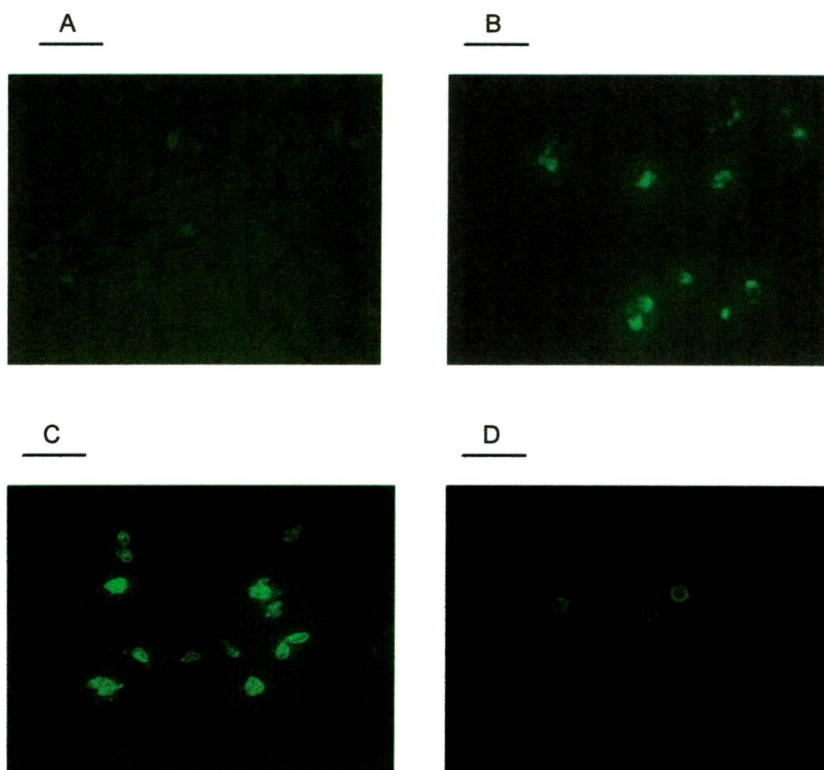


Figura 9. Reactividad del anticuerpo monoclonal anti-MSA-1 contra fases intraeritrocíticas de *B. bovis* de la clona RAD y cepa México. Frotis sanguíneos conteniendo 4% y 1.4% de eritrocitos infectados con fases asexuales de *B. bovis*, respectivamente, se fijaron en acetona al 100%. Las células se incubaron con anti-152 kDa, anti- MSA-1, o PBS. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado con Alexa Fluor 488. El panel A muestra las células incubadas con PBS, el cual es utilizado como control negativo; El panel B muestra la reactividad del anticuerpo de 152 kDa situada en el citoplasma de los parásitos; el panel C y D muestra la reactividad del anticuerpo MSA-1 observada en el contorno del parásito.

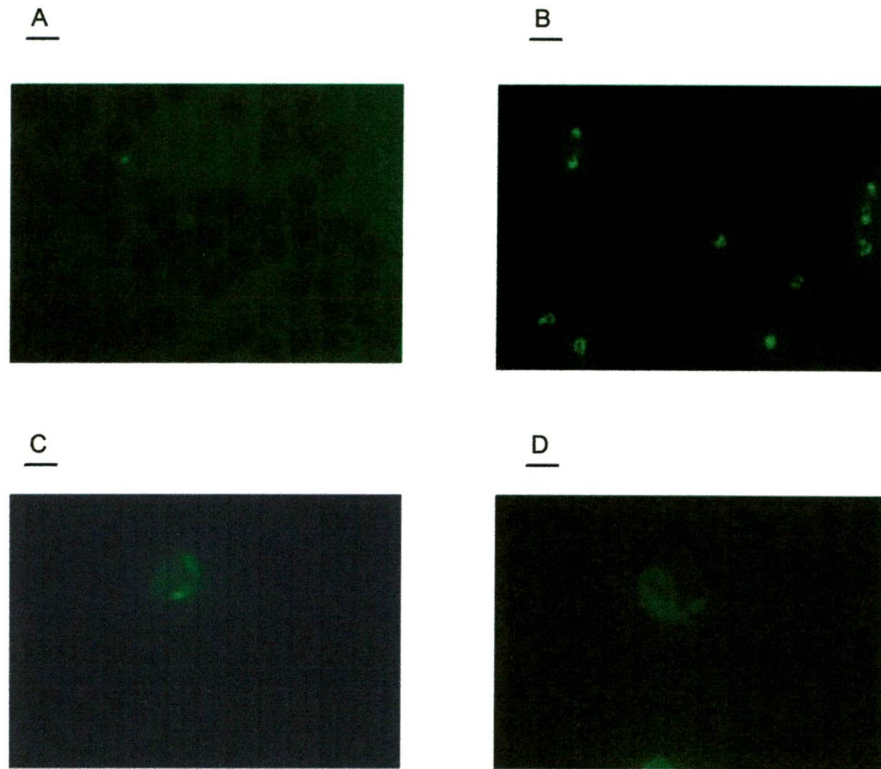


Figura 10. Reactividad del anticuerpo monoclonal anti-MSA-1 contra fases intraeritrocíticas de *B. bovis* en aislados de campo. Frotis sanguíneos conteniendo 1% y 1.7% de eritrocitos infectados respectivamente con fases asexuales de *B bovis* se fijaron en acetona al 100%. Las células se incubaron con anti-152 kDa, anti- MSA-1, o PBS. Como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgG de ratón acoplado con Alexa Fluor 488. El panel A muestra las células incubadas con PBS, el cual es utilizado como control negativo; El panel B muestra la reactividad del anticuerpo de 152 kDa situada en el citoplasma de los parásitos; el panel C muestra la reactividad del anticuerpo MSA-1 observada en parásitos del aislado Quintana Roo, el panel D muestra la reactividad del anticuerpo MSA-1 observada en parásitos del aislado Guerrero.

aislados no se apreció señal fluorescente específica, a diferencia de la reactividad cruzada observada con el anticuerpo anti-152 kDa, los resultados se resumen en la tabla 5.

#### **IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS EN LA PROTEÍNA MSA-2C MEDIANTE ANÁLISIS *in silico***

El alineamiento múltiple de las secuencias de MSA-2c demostró un antígeno muy conservado sin cambios en el tamaño de su marco de lectura abierto y poca variación en su secuencia (Figura 11, bloques en amarillo y azul). La región más variable se encuentra hacia el extremo carboxilo en donde hay mayor número de residuos no similares o débilmente similares. El porcentaje de identidad de las moléculas MSA-2c en estos aislados fue de 87%. Cuando cada secuencia se comparó con la secuencia proteica de MSA-2c de la clona Mo7 el porcentaje de identidad fue de 90-100%, al igual con los aislados argentinos y en menor grado con los australianos (Tabla 6).

#### Predicción de epítopes para células B de la proteína MSA-2c

Esta predicción se realizó mediante análisis *in silico* y con el uso del servidor ABCpred. Los resultados arrojaron en promedio 20 determinantes proteicos a lo largo de los 265 residuos de a.a de la molécula MSA-2c (Figura 11), de los cuales 12 determinantes son comunes, más del 60% de los epítopes predichos tienen la misma secuencia (ver apéndice II). Sin embargo, también se observan epítopes con identidades de aproximadamente 95%, estos representan aproximadamente el 30%, la mayor parte de estos epítopes están localizados en los 2 primeros tercios de la proteína.

#### **IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CONSERVADAS EN LA PROTEÍNA MSA-2C MEDIANTE ANÁLISIS *in silico***

El alineamiento múltiple de las secuencias de MSA-2c demostró un antígeno muy conservado sin cambios en el tamaño de su marco de lectura abierto y poca variación en su secuencia (Figura 11, bloques en amarillo y azul). La región más variable se encuentra hacia el extremo carboxilo en donde hay mayor número de residuos no

		1		70
Mo7	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
CHIAPAS 1	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
NAYARIT	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
TAMAULIPAS 2	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
QUINTANA ROO	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
VERACRUZ 2	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
CHIAPAS 2	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
GUERRERO	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
JALISCO	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
VERACRUZ 1	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
MEXICO	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
RAD	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
TABASCO	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG
TAMAULIPAS	(1)	MVSNFIITVAFCSILFTYTLASPOEKTVP	TKQVNGSLLFDDMKLYDVMRSIDESMLK	SILEKNFEAVG

		71		140
Mo7	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
CHIAPAS 1	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
NAYARIT	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
TAMAULIPAS 2	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
QUINTANA ROO	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
VERACRUZ 2	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
CHIAPAS 2	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
GUERRERO	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
JALISCO	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
VERACRUZ 1	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
MEXICO	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
RAD	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
TABASCO	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG
TAMAULIPAS	(71)	MEATSATKHDALAVKQLIKTDAPFNTSDFD	TLDLVLSGQNEELKLLIEAIYGMETIEK	TSFVG

		141		210
Mo7	(141)	ESAKHSDKLDTDLRQYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
CHIAPAS 1	(141)	ESAKHSDKLDTDLRQYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
NAYARIT	(141)	ESAEHSNNVDTLRLKYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
TAMAULIPAS 2	(141)	ESAEHSNNVDTLRLKYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
QUINTANA ROO	(141)	ESAEHSNNVDTLRLKYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
VERACRUZ 2	(141)	ESAEHSNNVDTLRLKYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
CHIAPAS 2	(141)	ESAKHSDKLDTDLRQYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
GUERRERO	(141)	ESQYSDVDVTELRKYYKANIYDDINEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
JALISCO	(141)	ESQYSDVDVTELRKYYKANIYDDINEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
VERACRUZ 1	(141)	ESQYSDVDVTELRKYYKANIYDDINEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
MEXICO	(141)	ESAKHSDKLDTDLRQYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
RAD	(141)	ESAKHSDKLDTDLRQYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
TABASCO	(141)	ESAKHSDKLDTDLRQYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI
TAMAULIPAS	(141)	ESAKHSDKLDTDLRQYYWNIYDDQSEYNK	DKLSNLYKAFITNSAALRIAEEELRKF	ETRKAQKNDYRFI

		211		265
Mo7	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
CHIAPAS 1	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
NAYARIT	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
TAMAULIPAS 2	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
QUINTANA ROO	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
VERACRUZ 2	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
CHIAPAS 2	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
GUERRERO	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
JALISCO	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
VERACRUZ 1	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
MEXICO	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
RAD	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
TABASCO	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	
TAMAULIPAS	(211)	NPSSTPEPETSSPSHGENTAQQPPPAET	TKPTSSSFTGGGLTVATLCYFVLSAF	

X bloque de residuos conservados.      X bloque de residuos idénticos.  
X bloque de residuos similares.        X bloque de residuos débilmente similares.  
X bloque de residuos no similares.      -- Gaps

— Regiones predichas de determinantes antigénicos.

Figura 11. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína MSA-2c en aislados mexicanos.

Tabla 6. Porcentajes de identidad de la secuencia de aminoácidos de la proteína MSA-2c en aislados mexicanos con respecto a otros aislados del mundo.

AISLADOS MEXICANOS	CLONA Mo7 MEXICANA	AISLADOS ARGENTINOS	AISLADOS AUSTRALIANOS
Jalisco, Nayarit, Veracruz 1, Veracruz 2, Tamaulipas 1, Tamaulipas 2, Chiapas 1, Chiapas 2, Guerrero, Tabasco Quintana Roo RAD y México	90% - 100%	89% - 95%	53% - 88%

similares o débilmente similares. El porcentaje de identidad de las moléculas MSA-2c en estos aislados fue de 87%. Cuando cada secuencia se comparó con la secuencia proteica de MSA-2c de la clona Mo7 el porcentaje de identidad fue de 90-100%, al igual con los aislados argentinos y en menor grado con los australianos (Tabla 6).

#### Predicción de epítopes para células B de la proteína MSA-2c

Esta predicción se realizó mediante análisis *in silico* y con el uso del servidor ABCpred. Los resultados arrojaron en promedio 20 determinantes proteicos a lo largo de los 265 residuos de a.a de la molécula MSA-2c (Figura 11), de los cuales 12 determinantes son comunes, más del 60% de los epítopes predichos tienen la misma secuencia (ver apéndice II). Sin embargo, también se observan epítopes con identidades de aproximadamente 95%, estos representan aproximadamente el 30%, la mayor parte de estos epítopes están localizados en los 2 primeros tercios de la proteína.

#### **GENERACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MSA-2C Y OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ESPECÍFICOS.**

##### Amplificación por PCR del gen *msa-2c* de la clona RAD.

La región codificante del gen *msa-2c* de *B. bovis* de la clona RAD se amplificó por PCR, como resultado se obtuvo una sola banda de aproximadamente 797 pb correspondiente al tamaño del gen *msa-2c*, mientras que en el control negativo de la reacción, no se observó señal de producto sintetizado (Figura 12, carril 2).

##### Monitoreo de colonias conteniendo el inserto *msa-2c*.

Las colonias de bacterias transformadas con el vector recombinante pBAD/Thio-*msa-2c* se seleccionaron mediante el monitoreo por PCR *in situ*, los resultados mostraron que de 16 clonas elegidas 14 de ellas contenían el inserto *msa-2c* (Figura 13, panel A y B). En los controles negativos de vector sin inserto no se observó producto de amplificación (Figura 13, carriles 3 y 4 en paneles A y B).

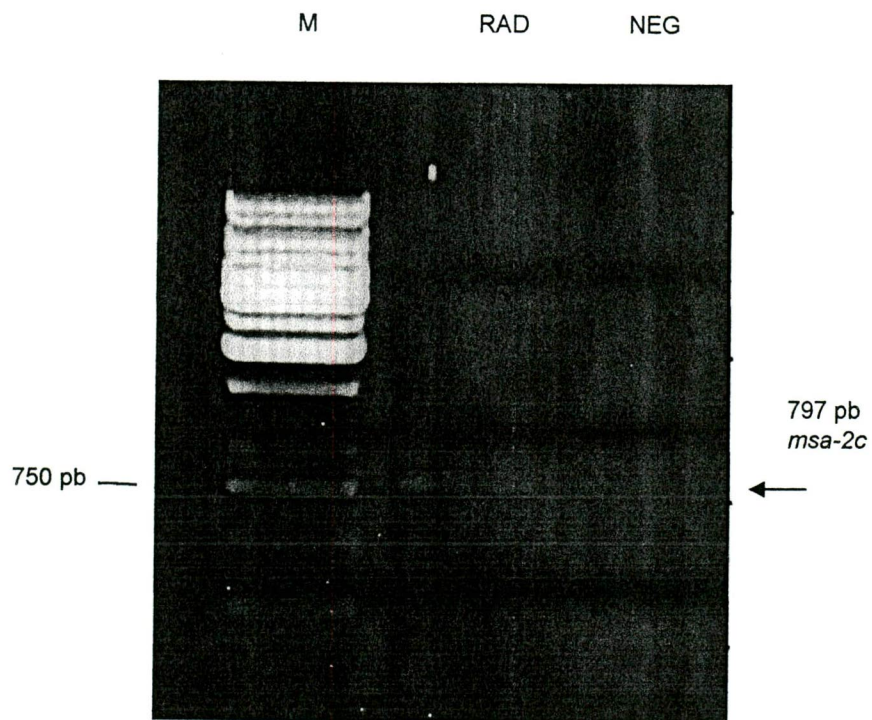


Figura 12. Amplificación por PCR del marco de lectura abierto del gen *msa-2c* de *B. bovis* de la cepa RAD. El gen *msa-2c* se amplificó con oligonucleótidos específicos utilizando como templado DNAg (100ng) de fases eritrocíticas del parásito. Posterior a 35 ciclos de amplificación 15  $\mu$ l del producto de PCR de una reacción total de 25  $\mu$ l se corrió en un minigel de agarosa al 1% a 80 V/ 1h y las bandas se visualizaron con luz UV. El carril 1 muestra el marcador de tamaño de DNA 1Kb (M); carril 2, el amplicón de la clona RAD, el carril 3 control negativo de la reacción de PCR.

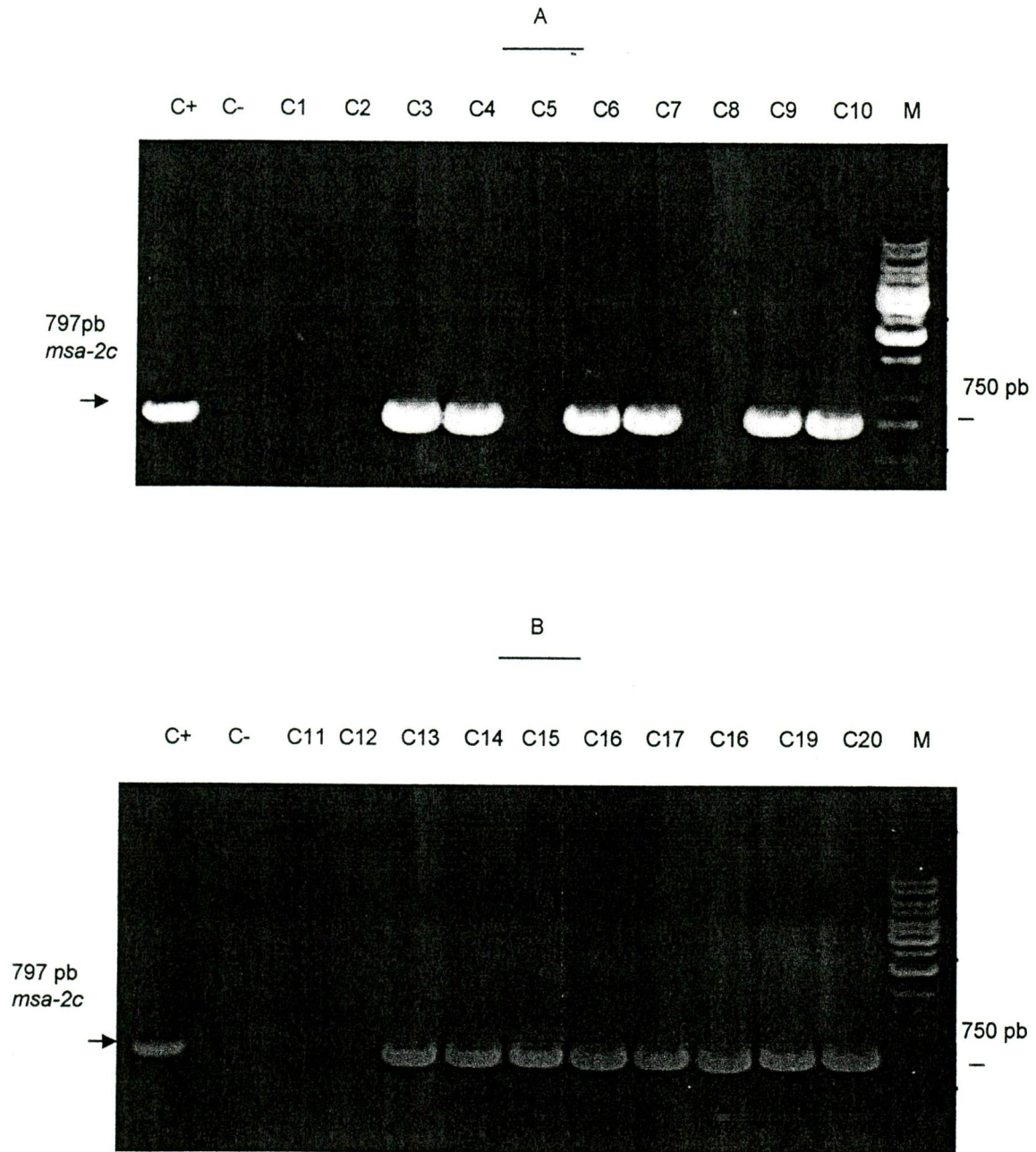


Figura 13. Monitoreo por PCR de clonas transformadas que presentan el inserto *msa-2c*. Se seleccionaron 20 colonias de bacterias transformadas con el vector y/o vector e inserto *msa-2c*. Una fracción de cada colonia se inoculó en tubos que contenían los componentes para amplificar la secuencia codificante del gen *msa-2c*. Posterior a 35 ciclos de amplificación 15  $\mu$ l del producto de PCR de una reacción total de 25  $\mu$ l se corrió en un minigel de agarosa al 1% a 80 V/ 1h y las bandas se visualizaron con luz UV. El panel A muestra el producto de PCR obtenido de las clonas 1 a 10. El panel B muestra el producto de PCR obtenido de las clonas 11 a 20. El carril 1 y 2 en paneles A y B muestran controles positivo y negativo de la reacción, respectivamente. El carril 13 representa el marcador de tamaño de DNA 1Kb (M).

### Identificación de colonias en orientación 5'- 3'.

Catorce colonias con inserto *msa-2c* fueron procesadas por PCR *in situ* los resultados mostraron que 4 de ellas nombradas como C11, C12, C14 y C15 quedaron en orientación correcta, esto se determinó por el tamaño de los productos de PCR obtenidos los cuales fueron de 982 pb cuando se utilizaron los oligonucleotidos pBAD-Trx R/ *msa-2c*-F y de 858 pb cuando se emplearon los oligonucleotidos pBAD-Trx-F/*msa-2c*-R (Figura 14). En las clonas que no presentan el inserto en orientación correcta no se detectó producto amplificado, (Figura 14, carril 4 y 5). Las 4 clonas con orientación correcta del inserto fueron secuenciadas y la secuencia corroboró la orientación y que no hubo corrimiento en el marco de lectura (datos no mostrados).

### Expresión de la proteína recombinante MSA-2c.

Para la expresión del antígeno MSA-2c se cultivó la clona C12 y tras la inducción con arabinosa al 0.1% durante 3 horas se observó una banda de aproximadamente 46 kDa correspondiente a la proteína de fusión tiorredoxina-MSA-2c, evento que no es observado cuando las bacterias carecen de inductor (Figura 15, panel A carriles 4 y 5). También se visualizó la proteína de fusión tiorredoxina de 16 kDa (Figura 15, línea 3), la cual se utilizó como control positivo de inducción. Además también se observó que a concentraciones más bajas de inductor (0.05, 0.025%) el rendimiento de la proteína se ve disminuido (datos no mostrados).

Para determinar si el antígeno recombinante MSA-2c se acumula como cuerpo de inclusión o permanece en fase soluble, se prepararon luego de la ruptura por sonicación, las fracciones solubles e insolubles de un cultivo de *E. coli* TOP 10/pBAD/Thio-MSA-2c y se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. En la figura 15 paneles E y F se observa que la proteína recombinante se encuentra tanto en la pastilla como en el sobrenadante, siendo la fracción de la pastilla donde la proteína se concentra mayoritariamente.

Para confirmar la identidad del antígeno recombinante se realizó un ensayo de inmunoelectrotransferencia, para ello se utilizó un anticuerpo monoclonal contra MSA-2C recombinante de la cepa argentina R1A el cual ya había sido utilizado por

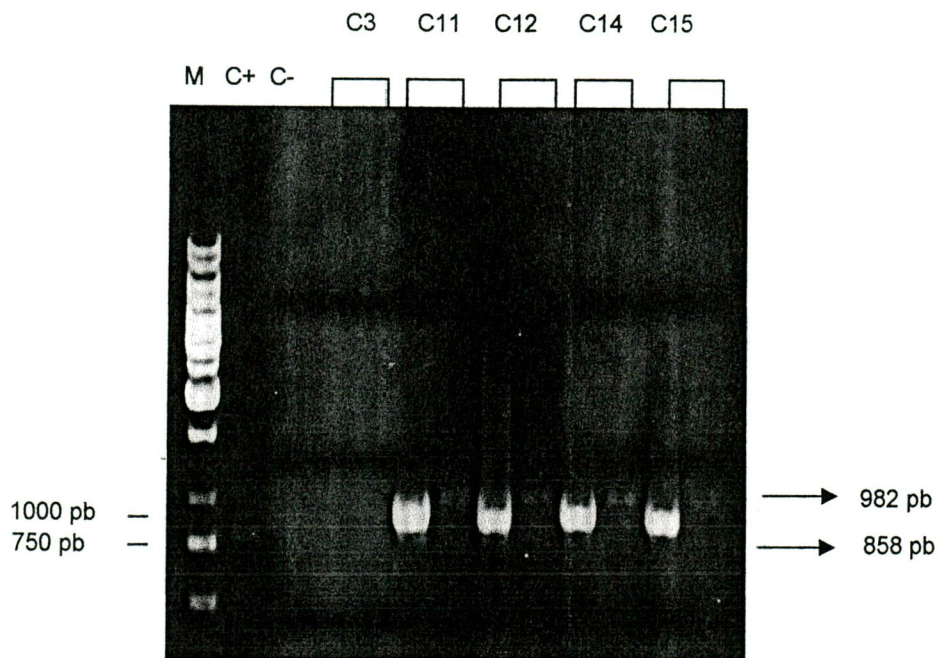


Figura 14. Amplificación por PCR de las clonas recombinantes pCR 2.1 pBAD ThioTOPO conteniendo el inserto *msa-2c* en orientación 5'-3'. Cinco clonas se inocularon en tubos conteniendo los componentes de la reacción de PCR, para cada clona se realizaron 2 reacciones de PCR en donde se combinaron los oligos del vector y del inserto (Trx-F/*msa-2cR* ó Trx-R/*msa-2cF*). Las clonas en las cuales se observó amplificación corresponden a las que presentan el inserto *msa-2c* orientado en 5'-3'. Posterior a 35 ciclos de amplificación 15  $\mu$ l del producto de PCR de una reacción total de 25  $\mu$ l se corrió en un minigel de agarosa al 1% a 80 V/ 1h y las bandas se visualizaron con luz UV. El carril 1 muestra el marcador de tamaño de DNA, 1 Kb (M), el carril 2 muestra el control positivo y representa el producto amplificado a partir de DNAg de *B. bovis*; el carril 3 muestra el control negativo de la reacción de PCR: En los carriles 4-13 se muestra la clona 3 (C3), clona 11 (C11), clona 12 (C12), clona 14 (C14) y clona 15 (C15), respectivamente.

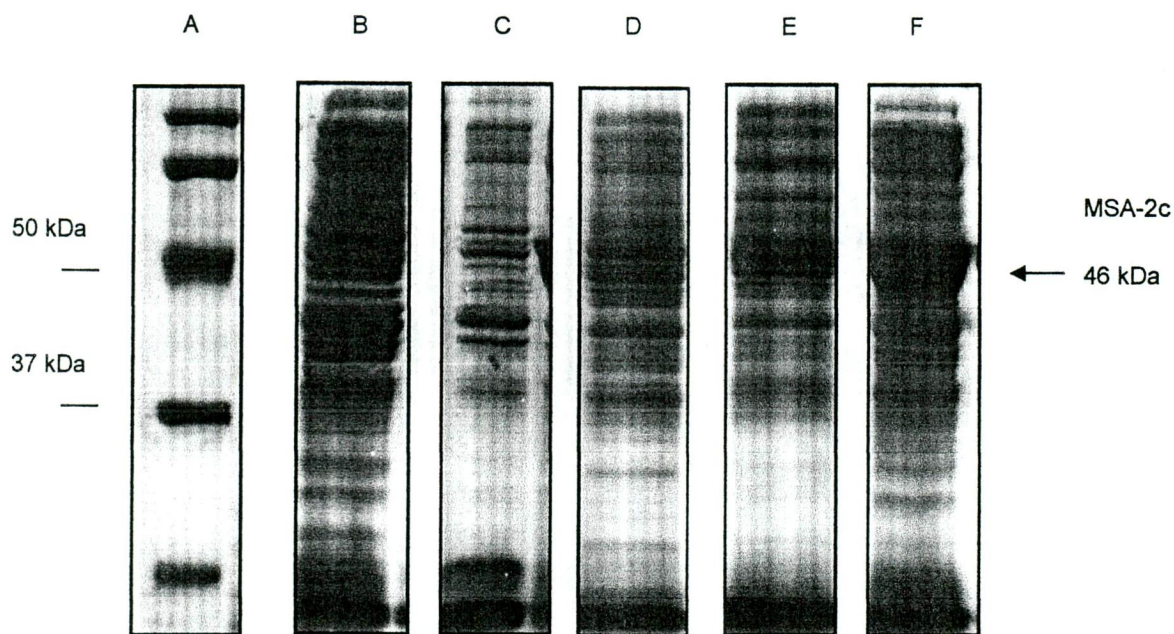


Figura 15. Distribución de la proteína MSA-2c en fase soluble y cuerpos de inclusión en *E. coli*. La pastilla bacteriana después de haber sido sonicado se corrió en geles SDS/ poliacrilamida al 12% y se tiñó con azul de Coomassie. El Carril A muestra el marcador de peso molecular; carriles B y C muestran el perfil de expresión de proteínas de *E. coli* portadora de pBAD/Thio en condiciones de no inducción e inducción respectivamente, carriles D, E, F muestran el perfil de expresión de *E. coli* portadora de pBAD/Thio-*msa-2c* en condiciones de no inducción, inducción-sobrenadante, inducción-pastilla, respectivamente.

Domínguez *et al.*, 2004. Como se muestra en la Figura 16, panel B, una banda reactiva de aproximadamente 46 kDa correspondiente a Thio-MSA-2c se presente observó en los extractos totales de *E. coli* TOP 10 transformada con pBAD/Thio-MSA-2c, producto el cual no se observa en las bacterias no inducidas (Figura 16, panel B, carril 2).

#### Purificación del antígeno recombinante MSA-2c.

El siguiente paso fue purificar el antígeno recombinante MSA-2c mediante columna de afinidad. Tras utilizar 4 concentraciones diferentes de imidazol como eluyente se observó que la proteína de interés se obtuvo de forma más pura a concentraciones de imidazol de 200 mM, y concentraciones más elevadas ya no son necesarias para desprender la proteína de la columna (Figura 17, Paneles A y B). Cuando una pequeña fracción de esta proteína fue analizada por inmunoelotransferencias se observó reactividad contra esta proteína cuando se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-MSA-2c (Figura 17, panel C).

Otro sistema utilizado para purificar la proteína MSA-2c fue por electroelusión, inicialmente se detectó la proteína de interés como una banda translúcida cuando el gel fue tratado mediante tinción reversa (Figura 18 panel A). Subsiguientemente la proteína de interés se purificó del gel por electroelusión el resultado que se obtuvo fue una proteína pura de aproximadamente 45 kDa la cual se visualizó en un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie (Figura 18 panel B).

#### Producción de anticuerpos policlonales anti-MSA-2c.

Se obtuvo una respuesta de anticuerpos significativa detectada por ELISA en los sueros de los 3 ratones inmunizados con la proteína recombinante MSA-2c desde la segunda semana de inoculación del antígeno por vía intraperitoneal (IP) y este título aumento en la tercer semana post- inmunización. (Figura 19).

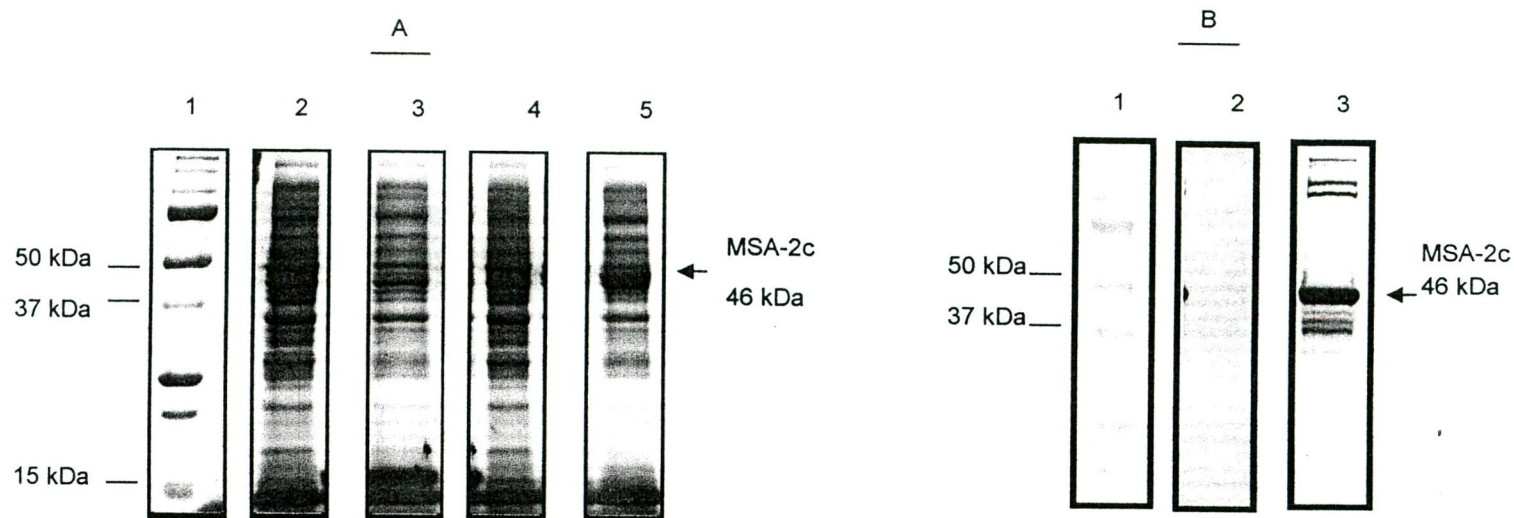


Figura 16. Expresión heteróloga del antígeno MSA-2c en el vector inducible pBAD-Thio/TOPO.

La expresión de *msa-2c* se realizó por la inducción con arabinosa al 1% por 3 hr a 37°C. Posterior a la inducción las bacterias se centrifugaron y la pastilla celular se trató con buffer que contenía 2-beta-mercaptoetanol para correr cada muestra en geles de poliacrilamida. La proteína se visualizó en geles SDS-poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Coomassie o mediante ensayos de inmunoelectrotransferencia. El panel A muestra los extractos proteicos de *E. coli* visualizados en SDS-PAGE al 12%, teñido con azul de Coomassie. El carril 1 representa el marcador de pesos moleculares; el carril 2 *E. coli* pBAD/Thio en condiciones de no inducción; el carril 3 *E. coli* pBAD/Thio en condiciones de inducción; el carril 4 *E. coli* pBAD/Thio-*msa-2c* en condiciones de no inducción; el carril 5 *E. coli* pBAD/Thio-*msa-2c* en condiciones de inducción. El panel B muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal anti-MSA-2c: En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular; carriles 2 y 3 muestran la reacción de anti-MSA-2c con extractos proteicos totales en condiciones de no inducción e inducción, respectivamente.

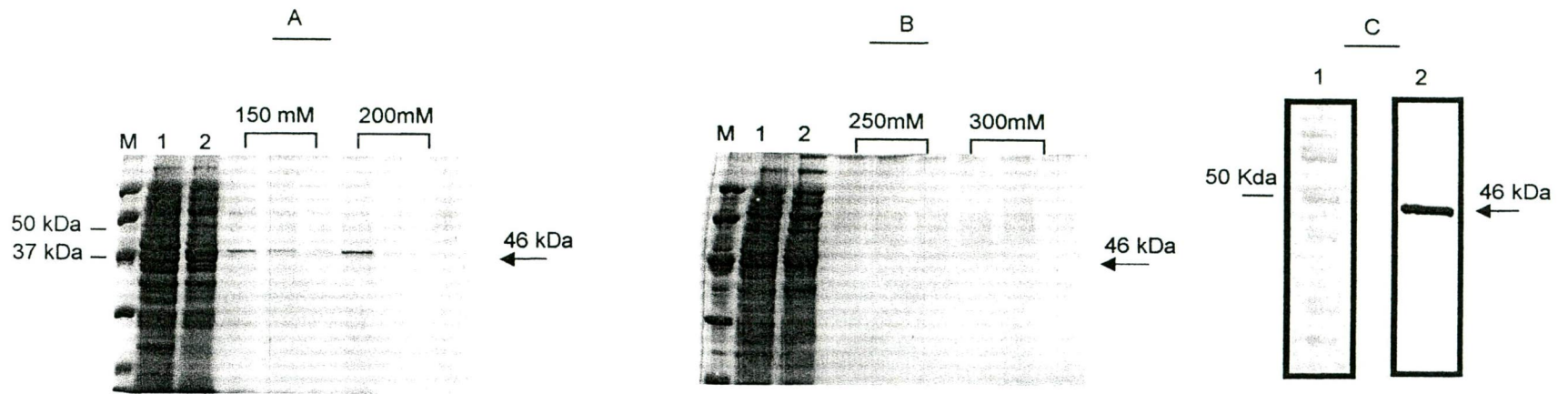


Figura 17. Purificación del antígeno MSA-2c por columna de afinidad a iones Níquel.

El lisado bacteriano proveniente de bacterias que expresan el antígeno MSA-2c, se pasó por la columna de afinidad. La proteína recombinante, tras varios lavados, se eluyó con 4 diferentes concentraciones de imidazol. Para cada concentración se colectaron 3 fracciones y cada fracción se visualizó en geles SDS-poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Coomassie. El panel A muestra la proteína MSA-2c eluida a 150mM y 200mM; El panel B muestra la proteína MSA-2c eluida a 250 mM y 300 mM; El panel C muestra la reactividad con anticuerpos monoclonales de la proteína recombinante MSA-2c purificada.

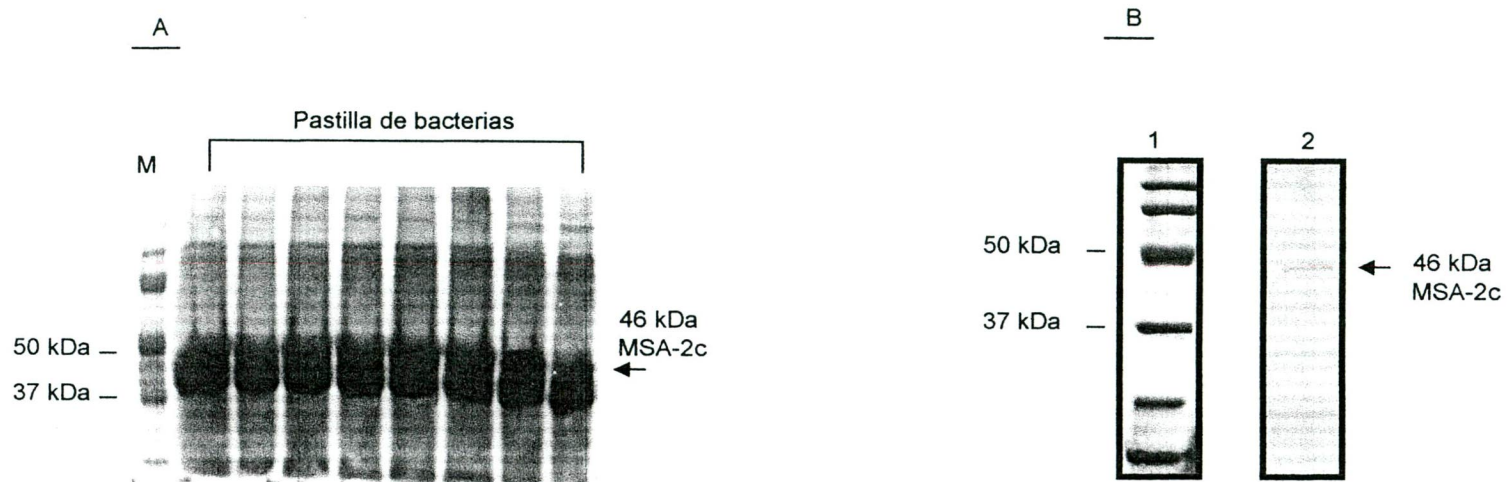


Figura 18. Purificación del antígeno MSA-2c por electro-elución. La pastilla proveniente de bacterias que expresan el antígeno MSA-2c se corrió en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, y las bandas se visualizaron mediante tinción reversa con imidazol y sulfato de zinc. Las bandas correspondientes a la proteína de interés se cortaron y se electro-eluyeron. La proteína purificada se visualizó en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. El panel A muestra un gel preparativo de la fracción de la pastilla visualizado mediante tinción reversa y el panel B muestra la proteína recombinante purificada por este método.

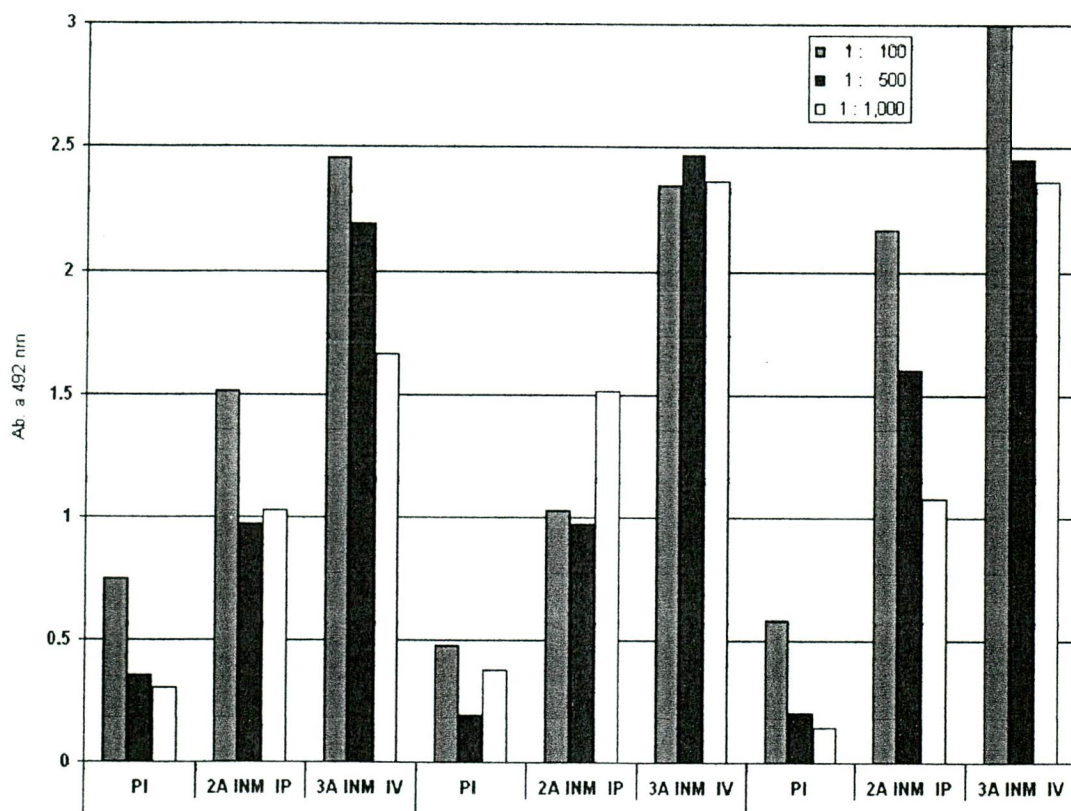


Figura 19. Título de anticuerpos policlonales anti-MSA-2c por ELISA indirecta. Se muestran los valores de absorbancia a 492 nm de suero pre-inmune (PI) y antisuero de la segunda y tercera inmunización (vía intraperitoneal e intravenosa respectivamente) monitoreados de 3 ratones inmunizados con la proteína recombinante MSA-2c. IP: vía intraperitoneal, IV: vía intravenosa.

#### **ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE EPÍTOPES COMUNES EN LAS MOLÉCULAS MSA-2c DE LOS AISLADOS MEXICANOS MEDIANTE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.**

Los ensayos de inmunoelectrotransferencia realizado con antígeno obtenido de los 11 aislados y expuesto al anticuerpo policlonal MSA-2c revelaron una clara reactividad cruzada en 7 aislados dentro de los que se encuentran: Quintana Roo, Chiapas 2, Tamaulipas 1, Tamaulipas 2, Guerrero, Veracruz 1 y Veracruz 2 (Figura 20) a diferencia de los aislados Nayarit, Chiapas 1, Jalisco y Tabasco, en los que no se logró detectar el reconocimiento antigénico con este procedimiento (Figura 20, tabla 7). Cabe señalar que en este caso también se tomaron como controles positivos la cepa de referencia México y RAD.

#### **LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE LA PROTEÍNA MSA-2c EN LOS AISLADOS MEXICANOS MEDIANTE IFI.**

Los resultados obtenidos demostraron que el anticuerpo policlonal anti-MSA-2c no reconoce el antígeno MSA-2c de *B. bovis* de la clona RAD, ni del resto de los aislados, esto se observó como ausencia de señal fluorescente en la periferia de los merozoítos y trofozoítos a pesar de las 4 concentraciones utilizadas de anti- MSA-2c (1: 500, 1:100, 1:10 y anticuerpo concentrado) y 3 respectivas repeticiones, mientras que la marca fluorescente observada con el anticuerpo monoclonal anti-152 kDa se observó en forma de parches dentro del parásito. Los resultados se resumen en la tabla 7.

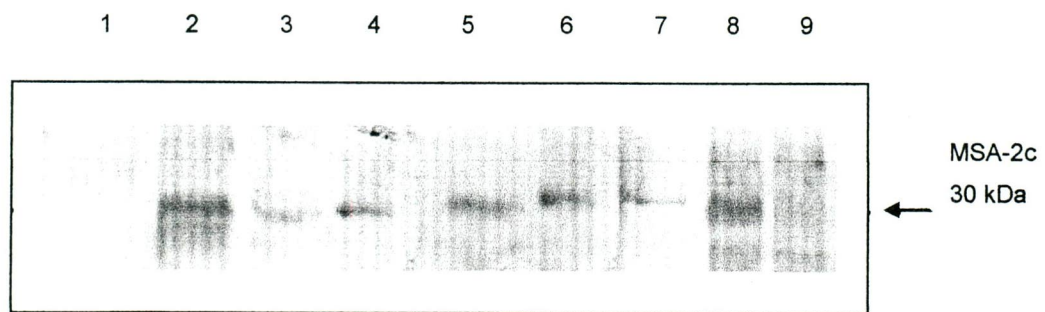


Figura 20. Detección por inmunoelectrotransferencia del antígeno MSA-2c en varios aislados mexicanos de *B. bovis*. Proteínas de membrana de parásitos intraeritrocíticos fueron tratadas con solución de lisis y se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Posterior a la transferencia, estas fueron incubadas con anticuerpo policlonal anti-MSA-2c y fueron reveladas por colorimetría. El carril 1 muestra eritrocitos no infectados, el carril 2 muestra la clona RAD, el carril 3 la cepa México, el carril 4 el aislado Tamaulipas 1, el carril 5 el aislado Tamaulipas 2, el carril 6 el aislado Quintana Roo, el carril 7 el aislado Guerrero, el carril 8 el aislado Chiapas 2, el carril 9 Nayarit.

Tabla 7. Reactividad cruzada observada en MSA-2c de diferentes aislados mediante el uso de un anticuerpo policlonal.

AI SLADO	INMUNOBLOT	IFI	AI SLADO	INMUNOBLOT	IFI
Jalisco	Negativo	Negativo	Guerrero	Positivo	Negativo
Nayarit	Negativo	Negativo	Quintana Roo	Positivo	Negativo
Tabasco	Negativo	Negativo	Chiapas 1	Negativo	Negativo
Veracruz 1	Positivo	Negativo	Chiapas 2	Positivo	Negativo
Veracruz 2	Positivo	Negativo	Cepa México	Positivo	Negativo
Tamaulipas 1	Positivo	Negativo	*Clona RAD Propagada <i>in vit</i>	Positivo	Negativo
Tamaulipas 2	Positivo	Negativo			

## 7. DISCUSIÓN

Los merozoítos de *B. bovis* son parásitos intracelulares facultativos que han desarrollado la capacidad de evadir los mecanismos de defensa del hospedero bovino remodelando las moléculas de superficie del eritrocito infectado (Allred, 2003) así como sus propias moléculas de la cubierta superficial. Estas estrategias le han permitido la replicación exitosa en las células rojas del mamífero bovino y además han garantizado la permanencia en su hospedero.

A pesar de los esfuerzos llevados a cabo en la última década muy poco es lo que se conoce sobre los mecanismos genéticos y moleculares que subyacen al proceso infectivo. La hipótesis de que los parásitos babesiales utilizan sus moléculas de superficie (MSA-1, MSA-2a<sub>1</sub>, MSA-2a<sub>2</sub>, MSA-2b y MSA-2c) para unirse a los eritrocitos ya ha sido demostrada por ensayos de neutralización con merozoítos y anticuerpos monoclonales dirigidos contra estos antígenos (Suárez *et al.*, 2000, Florin-Christensen *et al.*, 2002; Mosqueda *et al.*, 2002; LeRoith *et al.*, 2006). Una de las consideraciones previas más importantes es la diversidad antigénica presente en estas proteínas debido a que se ha observado polimorfismo alélico, en donde los epítopes expuestos no son completamente conservados entre los diferentes aislados y esto ha sido una de las principales limitantes en el desarrollo de vacunas contra este parásito. Sin embargo, esta diversidad existente *per se* no ha sido ampliamente estudiada y solo recientemente se han iniciado trabajos encaminados a tratar de generar conocimiento asociado a la conservación/diversidad de secuencias de estos genes en un mayor número de poblaciones/aislados de *B. bovis*.

En este trabajo nos propusimos estudiar la diversidad genética de los alelos *msa-1* y *msa-2c*, así como la presencia de epítopes comunes en sus productos génicos que son expresados en las fases asexuales de *B. bovis*; Todos ellos caracterizados a partir de aislados de campo originarios de diferentes regiones de la república mexicana.

Una de las inquietudes inmediatas además de la incertidumbre del grado de identidad presente en estas moléculas fue conocer, en primera instancia, la presencia de estos genes. Se tiene conocimiento que al menos el número de moléculas VMSEA en este

patógeno pueden variar, y no se sabe si este evento se presenta solo en aislados de ciertas regiones geográficas. Por ejemplo, para el *locus* MSA-2 en aislados australianos solo se han caracterizado dos secuencias codificantes en lugar de cuatro como las que se han reportado en aislados americanos (Berens *et al.*, 2006). En el caso de otras proteínas antigénicas de superficie como gp45 de *B. bigemina*, Fisher *et al.*, (2001), han reportado la ausencia de este gen en al menos 2 aislados de Puerto Rico y la ausencia de transcripción en 1 aislado mexicano.

En este estudio, se amplificó y procedió a secuenciar el alelo *msa-1* a partir de 11 aislados de *B. bovis*; Los resultados derivados demostraron que el alelo que codifica para dicha molécula esta presente en las fases asexuales de *B. bovis* en todos los aislados estudiados, similar a lo encontrado para *msa-2c* (Genis, 2006).

La presencia de una solo amplicón de similar tamaño, derivado de la síntesis por PCR de *msa-1* observado en todos los aislados, presume la presencia de al menos un alelo.

Cuando analizamos las 11 secuencias de cada uno de los aislados nos percatamos que el alelo *msa-1* es polimórfico en talla y secuencia (Tabla 4, Figura 7), y aislados de la misma región endémica son diferentes entre ellos, como se demostró en los aislados provenientes de los estados de Veracruz, Tamaulipas y Chiapas. Una de las explicaciones es que posiblemente en una misma región endémica se presentan diferentes genotipos o subpoblaciones de *B. bovis*.

En estudios realizados con *Theileria annulata*, un importante parásito piroplásmido causante de la enfermedad denominada theileriosis tropical, Gubbels *et al.*, (2000), caracterizaron 11 aislados obtenidos de una extensa región geográfica de Asia y Europa. Después de amplificar y clonar el gen que codifica para el antígeno de superficie del merozoito *tams-1*, seleccionaron entre 5 a 46 clonas de cada aislado generando en total 129 secuencias mediante esta estrategia, demostraron la presencia de diversos alelos *tams-1* en una sola muestra (de 1 a 28).

Estudios encaminados a la búsqueda de la estructura poblacional en otros parásitos apicomplexas, como por ejemplo en *Plasmodium*, han demostrado que algunos pacientes enfermos presentan múltiples infecciones con diferentes genotipos de *P. falciparum*. Esto, se ha observado en las proteínas polimórficas MSP-1, MSP-2,

TRAP, o la proteína del circunsporozoíto (CS), (Contamin *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2002; Raj *et al.*, 2004).

En este estudio, debido al reducido número de aislados por estado y número de clonas secuenciadas, no se puede argumentar que las poblaciones de bovinos infectadas con este patógeno estén excluidas de presentar infecciones múltiples. Este punto es de considerable interés y deberá estudiarse con mayor énfasis, ya que de esto depende el éxito de la selección de moléculas como candidatas vacunales.

Ahora bien, a pesar del polimorfismo observado en MSA-1, esta molécula presenta motivos comunes de los cuales actualmente se desconoce su función. En estudios que se han realizado con respecto al análisis y búsqueda de función de motivos comunes presentes en proteínas de superficie en parásitos apicomplexas, se ha encontrado que algunos motivos interesantes son aquellos en donde se encuentran residuos ricos en prolinas. Si bien en *Babesia* no se ha determinado su función, en *Plasmodium* se ha propuesto que están involucrados en la determinación de la inmunogenicidad, tal y como se ha descrito en la proteína del circunsporozoíto del agente causal de la malaria (Williamson, 1994). En *Theileria annulata* se ha reportado el motivo EKL en la proteína Tmsa-1 presente en 129 distintas secuencias. Dicho motivo se encuentra también presente en *B. bovis* en la molécula MSA-1, ubicado aproximadamente en la posición 240. Esta región ya ha sido considerada por otros autores como la región hipervariable (HVR) de la molécula, y de manera interesante LeRoith *et al.*, (2006) demostraron mediante el uso de dos anticuerpos monoclonales específicos a MSA-1 que efectivamente, estos se unen en la región HVR, utilizando para ello diferentes construcciones de la molécula. Además, estos anticuerpos fueron capaces de inhibir la infección del parásito al eritrocito. Por lo tanto, el dominio EKL encontrado en la secuencia antigénica de MSA-1 en aislados mexicanos de *B. bovis* posiblemente es susceptible a bloqueo por parte de anticuerpos mono-específicos, sin embargo habría que demostrarlo experimentalmente.

A pesar del polimorfismo observado se tuvo el interés de identificar epítopes comunes en los 11 alelos estudiados. Al realizar un análisis computacional de determinantes comunes presente en MSA-1 en los aislados de campo se demostró solo la presencia de epítopes específicos de grupo, es decir solo se identificaron en aquellas secuencias que son altamente idénticas, y no se estimó ningún epítope común para las secuencias estudiadas, no obstante se percibe la existencia de zonas de traslape en aquellas regiones donde se encuentran residuos idénticos o similares, por lo que la secuencia del epítope puede coincidir en hasta más de 10 residuos de aa, sin llegar a ser completamente iguales (Figura 7).

Para identificar reactividad cruzada entre los aislados de campo se resolvió recurrir a un anticuerpo monoclonal disponible contra MSA-1 y utilizado por Figueroa *et al.*, (1998) en un trabajo previo para identificar antígenos comunes en 4 aislados de *B. bovis* provenientes de diferentes regiones del mundo (Texas, Costa Rica, Australia y México) y adaptados a cultivo *in vitro*. Además, previamente se encontró que este anticuerpo reconoce la molécula recombinante expresada por pBv42 (Hines *et al.*, 1992) y también reconoció la molécula MSA-1 de la clona Rad (Figueroa *et al.*, resultados no publicados), y debido a que gran parte de los aislados presentaron identidades de secuencia mayores del 90% cuando fueron comparados con la secuencia de aminoácidos de esta molécula, esto dio pauta para utilizarlo en este estudio. En las poblaciones mexicanas en estudio el anticuerpo monoclonal reconoció y reaccionó de manera intensa con MSA-1 de la clona Rad, sin embargo, aislados con secuencias muy conservadas a la de esta molécula fueron pobremente reconocidos (Quintana Roo y Tamaulipas 1, por ejemplo). No obstante, el anticuerpo monoclonal también reaccionó con MSA-1 del aislado Guerrero, este hecho nos hace suponer que pese a la diversidad encontrada, las moléculas de los aislados del grupo I y II podrían ser reconocidas por este anticuerpo monoclonal. En contraparte, todos los aislados presentaron reacción cruzada con el anticuerpo control utilizado (anti-152 kDa) por lo que descartamos la posibilidad de ausencia de parásitos en los frotis utilizados como antígenos para la prueba de IFI.

Una probable explicación a la carencia de reactividad cruzada en aislados con porcentajes altos de identidad, podría ser que los parásitos utilizados para la generación del anticuerpo fueron derivados de una línea clonal cultivada *in vitro*, una población homogénea de parásitos, evento que muy probablemente no ocurre en un aislado de campo, de esta manera el uso de un anticuerpo policlonal podría ser mas apropiado para este tipo de análisis. Lo mas conveniente en estudios posteriores será el utilizar también una cepa que no esté adaptada a cultivo *in vitro*, y de esta forma tener otro parámetro de comparación. Una hipótesis alterna es que los parásitos cultivados *in vitro* presenten un mecanismo de control de expresión de la molécula MSA-1 diferente al de aislados multiplicados exclusivamente *in vivo*. Estudios realizados muy recientemente con *P. falciparum* cultivado *in vitro* han demostrado la presencia de un esquema de control a nivel transcripcional, diferente al mostrado en parásitos no cultivados (Peters *et al.*, 2006). Si este fenómeno ocurre en *Babesia bovis*, será motivo de nuevas investigaciones el explorarlo.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los ensayos de inmunoelectrotransferencia nos sugieren por un lado que, mediante esta técnica es posible detectar mayor reactividad cruzada entre los aislados en comparación con IFI, una explicación podría ser que la prueba de IFI es mas subjetiva, dependiendo de la experiencia del microscopista, comparada además con la mayor sensibilidad analítica de la técnica de inmunoelectrotransferencia.

El hecho de que no se identifican claramente aquellas moléculas antigénicas que por resultados de secuenciación deducida son casi idénticas, puede estar relacionado con mucho en la naturaleza *per se* del aislado (conjunto de subpoblaciones), y también derivado de la dificultad de tener suficientes cantidades de parásitos para extraer las proteínas antigénicas y realizar los ensayos inmunoquímicos. Sin embargo, es claro que al menos el antígeno MSA-1 presenta epítopes comunes en los aislados del grupo I y II.

También podemos aseverar que el anticuerpo monoclonal utilizado reconoce epítopes lineales ya que cuando el antígeno es sometido a condiciones desnaturalizantes el anticuerpo es aún capaz de unirse al determinante. No obstante hace falta conocer la relevancia de este anticuerpo en las funciones biológicas de la molécula MSA-1.

Otro de los objetivos fue, también, conocer la presencia de determinantes antigénicos comunes presente en la molécula MSA-2c de *B. bovis* en los diferentes aislados mexicanos analizados.

Uno de los abordajes fue a través de la realización de análisis *in silico*, aprovechando que ya se tenían las secuencias de cada una de estas moléculas y las cuales ya han sido utilizadas previamente en un análisis filogenético (Genis, 2006).

Como ya se ha mencionado, MSA-2c es una molécula ampliamente conservada alrededor del mundo y en los distintos aislados mexicanos hasta ahora analizados se ha demostrado que guardan hasta un 88% de identidad; el mapeo de epítopes lineales demostró al menos 12 determinantes comunes a lo largo de toda la molécula, no obstante habrá que tomarse en cuenta que la predicción de epítopes mediante análisis *in silico* es solo una herramienta en la búsqueda de determinantes antigénicos y que la mejor forma de comprobarlo es mediante la experimentación, Una de las formas sería generando anticuerpos contra estos epítopes en particular, pero también no debe olvidarse que este método solo predice epítopes lineales y los epítopes conformacionales no están representados en este tipo de análisis.

En este estudio se escogió la opción de generar anticuerpos policlonales contra el antígeno de superficie MSA-2c y de esta manera identificar determinantes antigénicos lineales o conformacionales en esta molécula.

Para la obtención del antígeno MSA-2c fue necesario definir una estrategia, desde el principio la opción más atractiva fue la producción de la proteína antigénica como proteína recombinante, siendo la principal razón la gran disponibilidad de vectores de clonación/expresión/secreción, la facilidad de control y economía del cultivo. Sin embargo la acumulación de la proteína recombinante en cuerpos de inclusión y el bajo rendimiento obtenido, propició el hecho de purificarla en condiciones desnaturalizantes.

Los anticuerpos policlonales producidos se emplearon en las pruebas de IFI e inmunolectrotransferencia. En los resultados obtenidos por IFI es posible apreciar que estos anticuerpos no reconocen a la molécula MSA-2c del aislado a partir del cual fueron generados, ni tampoco de ningún otro de los aislados probados. Caso

contrario, cuando se utiliza un anticuerpo monoclonal contra una proteína de 152 kDa de *B. bovis* como control positivo utilizado a lo largo del ensayo, todos los aislados son reconocidos lo cual sugiere que las laminillas empleadas contienen los suficientes parásitos para ser visualizados y que la ausencia de señal fluorescente en las muestras en cuestión se debe a la naturaleza de la molécula utilizada en la generación de los anticuerpos (anti-MSA-2c), una explicación es que los epítopes antigénicos de linfocitos B mayoritariamente son dependientes de conformación ya que pese a los 12 epítopes lineales comunes presente a lo largo de la molécula, anticuerpos policlonales obtenidos a partir de animales inmunizados con una proteína purificada en condiciones desnaturalizantes no son capaces de reaccionar con los aislados.

Por otro lado, los resultados obtenidos por inmunoelectrotransferencia demostraron que el anticuerpo policlonal reaccionó con la proteína MSA-2c de la mayoría de los aislados por lo que se confirmó que estos anticuerpos reconocen epítopes lineales. Sin embargo, se esperaba que el resto de los aislados que no fueron reconocidos, también presenten epítopes comunes, debido al alto grado de identidad de secuencia compartida entre ellos no obstante el bajo número de parásitos presentes en algunos aislados fue uno de los principales obstáculos para poder demostrarlo.

En el caso del anticuerpo monoclonal utilizado contra la proteína de 152 kDa, y el cual fue utilizado como control positivo en IFI, no fue posible utilizarlo en los ensayos de inmunoelectrotransferencia ya que Sahagún et al., (2000) ha reportado que este anticuerpo reconoce una proteína de 175 kDa en aislados de Nuevo León y Yucatán, lo que significa que esta proteína pudiera ser polimórfica en tamaño. Esto, garantiza realizar un análisis por inmunoelectrotransferencia de esta proteína con los extractos de los aislados de *B. bovis* disponibles no obstante no se contó con suficiencia del reactivo.

Una de las formas para demostrar que la falta de reconocimiento de este anticuerpo se debe a la baja concentración de proteína mas que a la diversidad presente en el aislado sería utilizando una proteína control, que este presente en la fase asexual de *B. bovis* y que se este expresando constantemente, por ejemplo la proteína de choque térmico de 20 kDa (HSP-20). Sin embargo, hace falta contar en el laboratorio

con anticuerpos dirigidos contra este tipo de moléculas para utilizarlos como controles.

Estudios similares encaminados en la búsqueda de epítopes comunes en MSA-2c han demostrado conservación en epítopes expuestos a células B. Wilkowsky *et al* (2003) evaluaron 2 cepas Argentinas y demostraron la presencia de epítopes comunes en ensayos de inmunoelectrotransferencia e IFI. Además, los resultados permitieron inferir que la moléculas es altamente inmunogènica, sugiriendo que este antígeno puede ser usado como una herramienta útil en la detección de exposición a la enfermedad. Mas recientemente, Domínguez *et al* (2004) desarrollaron una prueba de ELISA competitiva mediante el uso la proteína recombinante MSA-2c y un anticuerpo monoclonal contra ésta, en donde han demostrado que la prueba es capaz de identificar anticuerpos específicos contra *B. bovis* en animales infectados ya sea natural o experimentalmente.

Alternativamente, se tendrían que generar y evaluar nuevos anticuerpos monoclonales producidos contra algunos de los distintos epítopes predichos presentes en las moléculas de MSA-1 y MSA-2c, con el propósito de poder así caracterizar las posibles regiones importantes involucradas en el proceso de reconocimiento e invasión del parásito al eritrocito bovino, y que posteriormente estas sean tomadas en cuenta como posibles determinantes antigénicos a ser incluidos en el desarrollo de vacunas de nueva generación para la babesiosis bovina causada por *B. bovis*.

Finalmente, este estudio da pauta para seguir investigando la importancia e implicaciones biológicas de estas proteínas presentes en la superficie de *B. bovis*. En México, antes de este estudio, se desconocía la diversidad presente en MSA-1 y 2c, mientras que en otras regiones del mundo ya se especulaba mayor diversidad antigénica en MSA-1 a diferencia de MSA-2c. Sin embargo, no se han realizado estudios con un número de aislados lo suficientemente representativos a excepción de 16 aislados australianos. En este estudio se incluyeron 11 aislados de parásitos colectados en distintas regiones del país, permitiendo percatarse que el polimorfismo encontrado, sobre todo en la molécula MSA-1, es superior. No obstante, hace falta

generar mayor conocimiento acerca de la variabilidad en las moléculas de la familia VMSA para optar como uso terapéutico o de diagnóstico a nivel regional o mundial. Por ejemplo, en las investigaciones realizadas hasta la fecha, no se conocía que la diversidad genética de las poblaciones de *B. bovis* variara de acuerdo con las características epidemiológicas de la región. En consecuencia, para una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la adquisición de inmunidad a la babesiosis, y para el desarrollo de medidas de control efectivas en las diferentes regiones con transmisión de la enfermedad se requiere, entre otros aspectos, conocer la estructura genética de *B. bovis*.

## 8. CONCLUSIONES

El gen *msa-1* de *B. bovis*, aún cuando polimórfico en secuencia y tamaño, está presente en los 11 aislados estudiados.

El antígeno MSA-1 de fases asexuales de *B. bovis* es menos conservado que el antígeno MSA-2c en aislados mexicanos.

El antígeno MSA-1 presenta epítopes comunes en al menos 9 de los aislados estudiados, a pesar de la diversidad observada.

La conformación nativa de las proteínas MSA-1 y MSA-2c es importante para que estas moléculas puedan ser completamente reconocidas por anticuerpos específicos generados contra ellas.

## 9. APÉNDICES

### APÉNDICE I

PREDICCIÓN DE EPÍTOPES PARA CÉLULAS B DEL ANTÍGENO MSA-1 CLONA RAD, ESTA CLONA REPRESENTA A TODOS LOS AISLADOS ENGLOBADOS EN EL GRUPO I.

NIVEL	SECUENCIA	POSICIÓN DE INICIO	PUNTUACIÓN
1	EGSFYDDMSKFGAVGSFDQ	40	0.90
2	SKFYGAVGSFDQTKLYSVLS	48	0.89
3	<b>GSSFTYGGLTVATLCYFVLS</b>	<b>298</b>	0.88
3	VEEDREKAVEYFKKHVYTGE	153	0.88
4	SGTSPQGPAPTTSPSPSS	265	0.87
5	SFDAFAHAKVHAQVGNFVKP	200	0.86
5	DLFNATIVSGFSTKNDEEKF	103	0.86
6	GNFVKPGTDIAPPKDVTDAL	214	0.85
7	PASDFYKLVESFDAFAHAKV	190	0.83
7	VEYFKKHVYTGEHVVDVNGM	161	0.83
7	IKGMYYRAQHMDKYLKSLRW	129	0.83
8	VPAPGDASGVQQPPASGTSP	250	0.81
9	TQSDVRNADTSIVLPEGSFY	25	0.79

9	<b>EHVVDVNGMAGVCKEFLSPA</b>	172	0.79
9	<b>DEEKFN<del>A</del>IFDSIKGMYRAQ</b>	118	0.79
10	<b>VNALIKNNPMIRPDLFNATI</b>	90	0.75
10	<b>DQTKLYSVLSANFKAAMDD</b>	58	0.75
11	<b>HMDKYLKSLRWNTDIVEEDR</b>	138	0.74
12	<b>KVKDTFKNLYKVNALIKNNP</b>	79	0.72
13	<b>SSGNLQGQQGTTKPAGSSFT</b>	283	0.71
14	<b>ITSAGEELTQSDVRNADTSI</b>	17	0.70
15	<b>SLRWNTDIVEEDREKAVEYF</b>	145	0.66
16	<b>LSANFKAAMDDQKVKDTFK</b>	66	0.65
16	<b>APPKDVTDALEKELQEKP</b>	224	0.65
17	<b>VCKEFLSPASDFYKLVESFD</b>	183	0.64
18	<b>ISALCCVLAITSAGEELTQS</b>	8	0.60
19	<b>SGFSTKNDEEKFN<del>A</del>IFDSIK</b>	111	0.59

Los epitopes a células B están alineados de acuerdo al puntaje arrojado por el sistema neural recurrente (ABCpred). La puntuación más alta del péptido significa la probabilidad más alta de ser un epítopo. Todos los péptidos mostrados están por arriba del valor del umbral de 0.5. En negritas se muestra un epítopo localizado en la región hipervariable.

PREDICCIÓN DE EPÍTOPES PARA CÉLULAS B DEL ANTÍGENO MSA-1 AISLADO GUERRERO.  
 LA SECUENCIA DE ESTA MOLÉCULA REPRESENTA A LOS AISLADOS DEL GRUPO II

NIVEL	SECUENCIA	POSICIÓN DE INICIO	PUNTUACIÓN
1	SDFNKL VVT FDD FARGRHYG	192	0.92
2	AENPSPDSSQGNLNGQREPA	289	0.88
2	IKTMVLRINHMQTFLKGLDW	129	0.88
3	PEGYLYDDMAKFYGA VESFD	39	0.85
3	TFDDFARGRHYGLAENYVEP	200	0.85
4	SSEPRSAENVIRVIDSSDL	19	0.84
5	<b>PAKSSFTYGGLTVATLCYFV</b>	<b>307</b>	<b>0.83</b>
5	GTGAVPQPPVDGQAQQEIP	252	0.83
6	DLFKEEA VSSFSGKTDKDKF	103	0.82
7	YKVNVEGMAAVCKGFLGDGS	173	0.81
8	PEGLIAEVEKEVATVKPVER	226	0.79
8	EEYFKKHVYKEEYKVNVEGM	161	0.79
9	IAANFRNGGLADEK VKEAFS	66	0.78

9	IPTPSSSPSSPESQSPQTQG	269	0.78
10	DRTKLYAVIAANFRNGGLAD	58	0.76
10	TFLKGLDWSSEITEGDRKKA	141	0.76
11	RVIDSSSDLPEGYLYDDMAK	30	0.75
12	PNPDLTLPEGLIAEVEKEVA	219	0.74
13	YGAVESFDRTKLYAVIAANF	51	0.73
14	ATVKPVERENNRSPGTGAVP	238	0.71
15	TFALFISALCCVSAVTSSEP	3	0.70
16	PPVDGQAQQEIPTPSSSPSS	259	0.68
17	LYKVSASIKVNPMINSDLFK	87	0.65
17	FSGKTDKDKFNAIFESIKTM	113	0.65
18	EGDRKKAEEYFKKHVYKEEY	154	0.64
19	GGLADEKVKEAFSSLYKVSA	73	0.60

Los epítopes para células B están alineados de acuerdo al puntaje arrojado por el sistema neural recurrente (ABCpred). La puntuación más alta del péptido significa mayor probabilidad de ser un epítipo. Todos los péptidos mostrados están por arriba del valor del umbral de 0.5. En negritas se muestra un epítipo localizado en la región hipervariable.

PREDICCIÓN DE EPÍTOPES PARA CÉLULAS B DEL ANTÍGENO MSA-1 AISLADO CHIAPAS I  
 LA SECUENCIA DE ESTA MOLÉCULA ES REPRESENTATIVA DE GRUPO III.

NIVEL	SECUENCIA	POSICIÓN DE INICIO	PUNTUACIÓN
1	ISANFEAAKVQDKVNDAFKH	66	0.85
1	<b>APSTKPEQPAGNLSGQQGSP</b>	<b>288</b>	<b>0.85</b>
1	IDHMDKYLKTLRWNDIAEE	135	0.85
2	PENTELPAQAAPGASEPTSP	245	0.83
2	EFYKLAESFDAFDKGKYHGR	192	0.83
2	KGFLNQESEFYKLAESFADF	184	0.83
3	NNDIAEEDREKAEDYFKKHV	148	0.82
3	VSAIASSAEEVIQQESSVV	14	0.82
4	YGAVESFDKNKLFAVISANF	51	0.81
4	PGASEPTSPGGQPTAAPAQ	256	0.81
4	AIFESIKAMYRRIDHMDKYL	123	0.81
5	NAMIKRNPMIRSDLFNEAAV	90	0.79
5	VNDAFKHLYIVNAMIKRNPM	79	0.79
5	AALPSGYLYEDMAKFGAVE	36	0.79

6	EVIQQESSVVRDAALPSGY	23	0.77
6	VSAIEEAVAKIKAPNPENT	229	0.77
7	KGKYHGRIDNFAEPKNNVEA	205	0.76
7	HEINVNGMAGVCKGFLNQES	172	0.76
8	AAVSIFSQKTDEEKFNIFE	107	0.75
9	GGQPTAPAAPQPGASATEPA	265	0.73
10	KTDEEKFNIFESIKAMYRR	115	0.72
11	YFKKHVYKDEHEINVNGMAG	162	0.71
11	DREKAEDYFKKHVYKDEHEI	155	0.71
12	APQPGASATEPAQEPAPSTK	273	0.65
13	TFALFISALCCVSAIASSAE	3	0.64
14	DNFAEPKNNVEAPKELVSAI	213	0.59
15	NNVEAPKELVSAIEEAVAKI	220	0.57

Los epítopes a células B están alineados de acuerdo al puntaje arrojado por el sistema neural recurrente. (ABCpred). La puntuación más alta del péptido significa la probabilidad más alta de ser un epítope. Todos los péptidos mostrados están por arriba del valor del umbral de 0.5. En negritas se muestra un epítope localizado en la región hipervariable.

PREDICCIÓN DE EPITOPES PARA CÉLULAS B DEL ANTIGENO MSA-1 AISLADO VERACRUZ I.  
 LA SECUENCIA DE ESTA MOLÉCULA REPRESENTA EL GRUPO IV.

NIVEL	SECUENCIA	POSICIÓN DE INICIO	PUNTUACIÓN
1	FDDFVKGKNQDVKGNFVQPS	205	0.95
2	AEGRKQAEYFKKHVYGEQY	158	0.89
3	SKPTTGKPTEDPAASGSSPV	270	0.88
3	EAEQTQQVTPAVQPSKPTTG	256	0.88
3	SSDEAPPQEVTTAIETEEKI	224	0.88
4	ISSELFKETAAKSFLSKTDE	104	0.87
5	QSILRTTSSSDAPAGFLYD	30	0.84
6	<b>VERPAGNLTGQQDSSKPAGS</b>	<b>289</b>	<b>0.83</b>
7	QEVTTAIETEEKIQGTTSAQG	231	0.81
7	TVDVNGMAAFCKWFWYEQSY	178	0.81
8	FKKHVYGEQYTVDVNGMAAF	168	0.79
9	YNVISANFKAALQNDQQIKD	67	0.78
9	KIQGTTSAQGRPQVPEAEQTQ	242	0.78
10	ALFISALCCVSATASLGQKV	5	0.77

10	LTGQQDSSKPAGSSFTFGGL	296	0.77
11	CKWFWYEQSYFYKLAVCFDD	188	0.73
11	INHMDKFLKSLEWNPDLSE	140	0.73
12	VESFGVNKLYNVISANFKAA	58	0.72
13	CCVSATASLGQKVVPDSSQS	12	0.70
14	GFLYDDMVKYYGAVESFGVN	45	0.67
14	LGQKVVPDSSQSILRTDSS	20	0.67
15	ETAAKSFLSKTDEDKFNAIF	111	0.66
16	QVIKDTVINIYKVRDMIKNN	82	0.64
16	LSKTDEDKFNAIFDSLKSMF	118	0.64
17	QDVKGNFVQPSSDEAPPQEV	214	0.63
17	AIFDSLKSMFVRINHMDKFL	128	0.63
18	PTEDPAASGSSPVERPAGNL	277	0.62
19	INIKVVRDMIKNNPMISSEL	89	0.60

Los epitopes a células B están alineados de acuerdo al puntaje arrojado por el sistema neural recurrente. (ABCpred). La puntuación más alta del péptido significa la probabilidad más alta de ser un epítope. Todos los péptidos mostrados están por arriba del valor del umbral de 0.5. En negritas se muestra un epítope localizado en la región hipervariable.

# BIBLIOTECA UACM

10	ATSATKTHDALKAVKQLIKT	<b>73</b>	0.68
11	SNEELLKLLIEAIYGMEIII	<b>113</b>	0.67
12	TSDFDTLDDLDSLQSGSNEEL	98	0.65
13	KAVKQLIKTDAPFNTSDFDL	<b>84</b>	0.63
14	AIYGMEIIIIEKTHSFVGSQ	124	0.60
15	SSTSEPETPSPSSGENTAAQ	<b>213</b>	0.57
16	KTDAPFNTSDFDLDDLDSL	<b>91</b>	0.54
16	NIITVAFCSILFTYTLASPQ	<b>5</b>	0.54

Los epítopes a células B están alineados de acuerdo al puntaje arrojado por el sistema neural recurrente. (ABCpred). La puntuación más alta del péptido significa la probabilidad más alta de ser un epítipo. Todos los péptidos mostrados están por arriba del valor del umbral de 0.5. En negritas se muestran epítipes comunes cuando se comparan con el resto de los aislados. Sólo se incluyen los resultados obtenidos de algunos aislados.

PREDICCIÓN DE EPITOPES PARA CÉLULAS B DEL ANTIGENO MSA-2C GUERRERO

NIVEL	SECUENCIA	POSICIÓN DE INICIO	PUNTIACIÓN
1	TLASPQEKTVPTKQVNGSHL	19	0.91
2	LTKFETRKFQKEDYRFINPS	194	0.84
2	IYDDINEYNKDKLSNLYKAF	161	0.84
3	SGALGIALEELTKFETRKFQ	184	0.82
4	IDESMLKSILEKNFEAVGME	53	0.81
4	QKEDYRFINPSSTSEPEPS	203	0.81
5	RKYYKANIYDDINEYNKDKL	154	0.80
6	ILEKNFEAVGMEATSATKAH	61	0.79
7	PAESAKPTGSSFTFGGLTVA	236	0.78
8	TKQVNGSHLLFDDMKMFYDV	30	0.75
8	DLDYLSGQSNEELLKLLIEA	105	0.75
9	FVGESQKYSDVDTELKYY	138	0.73
10	ATSATKAHDALKAVKLIKT	73	0.68

11	SNEELLKLLIEAIYGMEIII	<b>113</b>	0.67
12	SSTSEPESPPSSGENTAAQ	<b>213</b>	0.62
13	KAVKQLIKTDAPFNTSDFDT	<b>84</b>	0.61
14	TAAQPPQPAESAKPTGSSFT	<b>229</b>	0.60
14	AIYGMEIIIIEKTHSFVGESQ	124	0.60
15	KTDAPFNTSDFDTLDDYLS	<b>91</b>	0.57
16	NIITVAFCSILFTYTLASPQ	<b>5</b>	0.54

Los epítopes a células B están alineados de acuerdo al puntaje arrojado por el sistema neural recurrente. (ABCpred). La puntuación más alta del péptido significa la probabilidad más alta de ser un epítope. Todos los péptidos mostrados están por arriba del valor del umbral de 0.5. En negritas se muestran epítopes comunes cuando se comparan con el resto de los aislados.

PREDICCIÓN DE EPITOPES PARA CÉLULAS B DEL ANTIGENO MSA-2C CHIAPAS-2

NIVEL	SECUENCIA	POSICIÓN DE INICIO	PUNTUACIÓN
1	TLASPQEKTVPTKQVNGSHL	19	0.91
2	YDDQSEYNKDKLSNLYKAFI	162	0.86
3	KAFITDSGALRIASEELTKF	178	0.85
4	QKDDYKFINPSSSTSEAETPS	203	0.83
5	PAETPKPTESSFTFGGLTVA	236	0.82
6	IDESMLKSILEKNFEAVGME	53	0.81
7	LTKFETRKVQKDDYKFINPS	194	0.80
8	ILEKNFEAVGMEATSATKTH	61	0.79
9	TKQVNGSHLLFDDMKMFYDV	30	0.75
9	SFTFGGLTVATLCYFVLSAF	246	0.75
9	DLEYLSGQSNEELLKLLIEA	105	0.75
10	GALRIASEELTKFETRKVQK	185	0.74
11	FVGESAKHSDKLDLDRQYY	138	0.73

12	ATSATKTHDALKAVKQLIKT	<b>73</b>	0.68
13	ENTAAQPPKPAETPKPTESS	<b>227</b>	0.67
14	TSDFDTLDLLEYLSGQSNEEL	98	0.65
15	KAVKQLIKTDAPFNSTSDFDT	<b>84</b>	0.63
15	QSNEELLKLLIEAIYGMEII	<b>112</b>	0.63
16	LLIEAIYGMEIIIIEKTNSFV	120	0.62
17	SSTSEAETPSPSSGENTAAQ	<b>213</b>	0.55
18	KTDAPFNSTSDFDTLDLLEYLS	<b>91</b>	0.54
18	NIITVAFCSILFTYTLASPQ	<b>5</b>	0.54

Los epítopes a células B están alineados de acuerdo al puntaje arrojado por el sistema neural recurrente. (ABCpred). La puntuación más alta del péptido significa la probabilidad más alta de ser un epítipo. Todos los péptidos mostrados están por arriba del valor del umbral de 0.5. En negritas se muestran epítipes comunes cuando se comparan con el resto de los aislados.

PREDICCIÓN DE EPITOPES PARA CÉLULAS B DEL ANTIGENO MSA-2C VERACRUZ-2

NIVEL	SECUENCIA	POSICIÓN DE INICIO	PUNTUACIÓN
1	YDDQSEYNKDKLSNLYKAFI	162	0.90
2	NFEAVGMEATSATKTHDALK	65	0.84
2	SAALRIASEELRKFETRKAQ	184	0.84
3	QKNDYRFINPSSTPEPETSS	203	0.83
3	AVASPQEEAVPTKQVNGSHL	19	0.83
4	PAETPKPTGSSFTFGGLTVA	236	0.81
5	LRKFETRKAQKNDYRFINPS	194	0.80
6	RKYYWDNIYDDQSEYNKDKL	154	0.78
6	FVGKSAEHSNNVDTELKYY	138	0.78
7	TKQVNGSHLLFDDMKMLYDV	30	0.75
7	DLEYLSGQFNEELLKLLIEA	105	0.75
8	MLKRILEKNFEAVGMEATSA	57	0.73
9	TAAQPPKPAETPKPTGSSFT	229	0.72

10	YDVMRSIDESMLKRILEKNF	47	0.71
11	ATSATKTHDALKAVKQLIKT	<b>73</b>	0.69
12	NIITVAFCSILFNYAVASPQ	<b>5</b>	0.67
13	TSDFDTLDLEYLSGQFNEEL	98	0.65
14	LLIEAIYGMEIIIEKTNSFV	120	0.64
15	KAVKQLIKTDAPFNTSDFDT	<b>84</b>	0.63
15	QFNEELLKLLIEAIYGMEII	<b>112</b>	0.63
16	NPSSTPEPETSSPSHGENTA	<b>211</b>	0.60
17	KTDAPFNTSDFDTLDLEYLS	<b>91</b>	0.54

Los epítopes a células B están alineados de acuerdo al puntaje arrojado por el sistema neural recurrente. (ABCpred). La puntuación más alta del péptido significa la probabilidad más alta de ser un epítope. Todos los péptidos mostrados están por arriba del valor del umbral de 0.5. En negritas se muestran epítopes comunes cuando se comparan con el resto de los aislados.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Allred, D. R., Cinque, D. M., Lane, T.J., Ahrens, K. P. 1994. Antigenic variation of parasite-derived antigens on the surface of *Babesia bovis* – infected erythrocytes. *Infect. Immun.* **62**:91-98.
- Allred, D.R., Hines, S. A., Ahrens, K. P. 1993. Isolate-specific parasite antigens of de *Babesia bovis* infected erythrocytes surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**:121-132.
- Allred, D. R. 2003. Babesiosis: Persistence in the face of adversity. *Trends in Parasitol.* **19** (2):51-56.
- Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., de Wall, D.T and Allsopp, B.A. 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology.* **108**:147-152.
- Alonso, M., Arellano, S.C.; Ceresér, V.H., Cordoves, O., Guglielmone, A. R., Kessler, A.J., Nari, A., Patarroyo, J.H., Solari, M.A., Vega, C.A., Viscaíno, O., Camus, E. 1992. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev. Sci. Tech. Of. Int. Epizoo.* **11**:713-733.
- Blackman, M.J., Bannister, L.H. 2001. Apical organelles of apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **117**:11-25
- Bock, R., Jackson, L., Devos, A., Jorgensen, W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* **129**:247-269.
- Brown, W.C.. Palmer, G. H. 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Parasitol. Today* **15**:275-281.
- Cantó Alarcón, G.J., Figueroa Millán, J.V., Alvarez Martínez, J.A., Ramos Aragón, J.A., Vega y Murguía, C.A. 1996. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo in vitro. *Téc. Pecu. Méx.* **34**(3) 127-135.
- Contamin, H., Fandeur, T., Bonnefoy, S., Skouri, F., Ntoumi, F., Puijalon, O. 1995. PCR typing of fields isolates of *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Microbiol.* **4**:944-951.
- Dalgliesh, R.J., Stewart, N.P., Callow, L.L. 1978. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* **154**: 205-21.
- Devera, R., Fernandes, O., Coura R.J. 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex?. A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98** (1):1-12

- De Vries, E., Corton, C., Harris, B., Cornelissen, A., Berriman, M. 2006. Expressed sequence tag (EST) analysis of the erythrocytic stages of *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* **138**:61-74.
- Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N. 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* **28**:1007-1013.
- Fernández, M. Canto, G. y Abortes, R. 1995. Prevalencia de anticuerpos séricos en contra de *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* en el municipio de Santiago Ixcuintla. *Nayarit. Vet. Méx.* **26**(4):407-409.
- Figuroa, J.V., Kinden, D.A., Buening, G.M. 1998. Use of monoclonal antibodies for the identification of a common surface antigen of *Babesia bovis*. *Ann. New York Acad. Sci.* **849**: 433-437.
- Fisher, T., McElwain, T. F., Palmer, G. 2001. Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American Isolates of *Babesia bigemina*. *Infect. Immun.* **6**: 3782-3790.
- Friedhoff, K. T. 1988. Transmission of *Babesia*. In *Babesiosis of Domestic Animals and man* (ed. Ristic, M) : 23-52. Boca Raton, Florida, CRC Press, INC.
- Florin-Christensen, M., Suarez, C.E., Hines, S. A., Palmer, G. H., Brown, W.C., McElwain, T.F. 2002. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunological distinct proteins. *Infect. Immun.* **70**:3566-3575.
- Gaffar, F.R., Yatsuda. A.P., Franssen, F.F., de Vries, E. 2004a. A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **136**:25-34.
- Gaffar, F.R., Yatsuda. A.P., Franssen, F.F., de Vries, E. 2004b. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrana antigen-1. *Infect. Immun.* **72**:2947-2955.
- Gubbels, M., Katzer, F., Hide, G., Jongejan, F., Shiels, B. 2000. Generation of a mosaic pattern of diversity in the mayor merozoite-piroplasm surface antigen of *Theileria annulata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**: 23-32.
- Hines, S.A., McElwain, T.F., Buening, G.B., Palmer, G. H. 1989. Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoites surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. *Mol. Biochem. Parasito.* **37**:1-10.

Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., McGuire, T.C., McElwain, T.F. 1992. Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**:85-94.

Hoffmann, E., Ribolla, P., Ferreira, M. 2003. Genetic relatedness of *Plasmodium falciparum* isolates and the origin of allelic diversity at the merozoite surface protein-1 (MSP-1) locus in Brazil and Vietnam. *Malaria Journal.* **2**:24-31.

Homer, M.J., Delfin, I., Telford III, S.R., Krause, P.J., Persing, D. H. 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Reviews.* **22**:451-469.

Hopps, D.C. 1977. An evaluation of colostral immunity and the acquired immune response to bovine babesiosis using the complement fixation and the indirect fluorescent antibody test. *Diss. Abstr. Inst.* **37**:3806-3807.

Jasmer, D.P., Reduker, D.W., Hines, L.E., McGuire, T.C. 1992. Surface epitope localization and gene structure of a *Babesia bovis* 44 kilodalton variable merozoite surface antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* **55**:75-83.

Jiménez, N.J., Muskus, E.C., Vélez, D.I. 2005. Diversidad genética de *Plasmodium falciparum* y sus implicaciones en la epidemiología de la malaria. *Biomédica.* **25**: 588-602.

Jones, S.H., Lew, A.E., Jorgense, W.K., Barker, S.C. 1997. *Babesia bovis*: Genome size, number of chromosomes and telomeric probe hybridisation. *Int. J. Parasitol.* **27**:1569-1573.

Kakoma, I., Mehlhorn, H. 1993. *Babesia* of domestic animals. En J. P. Kreier (ed), *Parasitic protozoa*, 2nd ed., vol. 7. p.141-216. Academic press, San Diego.

Krause, P.J. 1998. Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N. Engl. J. Med.* **339**:160-165.

Kumar, S., Yokoyama, N., Kim, J.Y., Huang, X., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I., Sugimoto, C. 2004. Expresión of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocytes and their interaction with erythrocyte membrane skeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **133**:221-227.

LeRoith, T., Brayton, K. A., Molloy, J. B., Bock, R. E., Hines, S. A., Lew, A. E., McElwain, T. F. 2005. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. *Infect. Immun.* **73**(9):5388-5394.

LeRoith, T., Berens, J.S., Brayton, A.K., Hines, A.S., Brown, C.W., Norimine, J., McElwain, F.T. 2006. The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 hypervariable region induces surface-reactive antibodies that block merozoite invasion. *Infect. Immun.* **74**(6): 3663-3667.

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

Levine, N.D. 1971. Taxonomy of the piroplasmosis. *Trans. Amer. Microscop. Soc.* **90**:2-33.

Levine, N.D. 1985. *Veterinary protozoology*. Ames. Iowa State University Press.

McCosker, P.J. 1981. The global importance of Babesiosis. En: *Babesiosis*. Ristic, M., Krerier, J.P. (eds) p. 1-24. Academic Press, New York.

Mosqueda, J., McElwain, T. F., Stiller, D., Palmer, G. H. 2002a. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect. Immun.* **70** (3):1599-1603.

Mosqueda, J., McElwain, T. F., Palmer, G. H. 2002b. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. *Infect. Immun.* **70**:6448-6455.

Ortiz, M., Calero, M., Patron, C., Castellanos, L., Mendez, E. 1992. Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequence of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS*. **296**:300-304.

Palmer, G. H., McElwain, T.F. 1995. Molecular basis for vaccines development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet. Parasitol.* **57**:233-253.

Pereira, F., Cordeiro, J., Hoffmann, E., Ferreira, M. 2002. Genetic diversity and differentiation in natural *Plasmodium falciparum* populations inferred by molecular typing of the merozoite surface proteins 1 and 2. *Rev. sociedade Brasileira de Med. Trop.* **35**: 527-530.

Persing, D. H., and P.A Conrad. 1995. Babesiosis: new insights from phylogenetic analysis. *Infect. Agents Dis.* **4**:182-195.

Preiser, P., Kaviratne, M., Kahan, S., Bannister, L., Jarra, W., 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microb. Infect.* **2**:1461-1477.

Potgieter, F.T., Els, H.J. 1977. Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **44**:157-168.

- Raj, D., Das, B., Supakar, P. 2004. Genetic diversity in the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium falciparum* in different malaria-endemic localities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**:285-289.
- Riek,R.F.1964. The life cycle of *Babesia bigemina* in the tick vector *Boophilus microplus*. *Australian Journal Agricultura Reserch.* **15**:802-821.
- Riek,R.F.1973. The life cycle of *Babesia bigemina* in the tick vector *Boophilus microplus*. *Aust. J. of Agr. Res.* **15**:802-821.
- Ristic, M. Babesiosis. En:Diseases of cattle in the tropics. Martinus Nihhoff Publishers. Ristic, M., McIntyre, I. (eds) the Hague, The Netherlands :443-468, 1981.
- Rodríguez, S.D., Buening, G.M., Carson, C.A. 1993. Caracterización bioquímica preliminar de clones de *Babesia bovis* irradiadas con cobalto 60. *Téc. Pecu. Méx.* **31**:16-23.
- Rudzinska, M.A., Lewengrub, S., Spielman, A., Piesman, J. 1983. Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in *Babesia microti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:966-2970.
- Saha, S., Raghava, G. P. S. 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins.* **65**: 40-48.
- Sahagun-Ruiz A., Waghela S.D., Romany M.M., Holman P.J., Melendy D., Cruz D., Wagner G.G. 2000. A common high molecular weight antigen of *Babesia bovis* isolates from Mexico. *Int. J. Parasitol.* 2000 Jan;30(1):59-64.
- Sam-Yellowe, T.Y. 1996. Rhoptry organelles of the apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol. Today.* **12**:308-316.
- Sambrook, J. Fritsch, E. Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor, New York.
- Smith, R.D., Osorno, B.M., Brener, J., de la Rosa, R, Ristic, M. 1978. Bovine babesiosis: severity and reproducibility of *Babesia bovis* infections induced by *Boophilus microplus* under laboratory conditions. *Ann. NY. Acad Sci.* **612**:436-454.
- Smith, R.D., Evans, D.E., Martins, J.R. 2000. Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. *Ann. NY. Acad Sci.* **916**: 510-520.
- Suarez, C.E., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., Hines, S.A., Perryman, L.E., McElwain, T.F. 1991. Characterisation of the gene encoding a 60 KDa *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface expressed epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **46**: 45-52.

Suárez, C.E., Palmer, G.H., Hines, S.A. McElwain, T.F. 1993. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species. *Infect. Immun.* **61**:3511-3517.

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

Suárez, C.E., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Palmer, G.H., Brown, W.C., McElwain, T.F. 2000. Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. *Infect. Immun.* **23**: 6865-6870.

Telford, S.R., Gorenflot, A., Brasseur P., Spielman, A. 1993. Babesial infection in humans and wildlife. En: J. P. Kreier (ed), *Parasitic protozoa*, 2<sup>nd</sup> Ed. Vol 5 p.1-47. Academic press, San Diego.

Trueman, K.F., Blight, G.W.1978. The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. *Aust Vet J.* **54**:301-305.

Yokoyama, N., Suthisak, B., Hirata, H., Matsuo, T., Inoue, N., Sigimoto, C., Igarashi, I. 2002. Cellular localisation of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein I and its erythrocyte binding activity. *Infect. Immun.* **70**: 5822-5826.

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

Young, A., Morzaria, S. 1986. Biology of *Babesia*. *Parasitol. Today.* **2**:211-219.

Wilkowsky, S., Farber, M., Echaide, I., Echaide, S., Zamorano, P., Dominguez, M., Suarez, C Florin-Christensen. 2003. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Mol. Biochem. Parasitol.* **127**:133-141.

Wright, I.G., Kerr, J.D. 1977. Hypotension in acute *Babesia bovis* infections of splenectomized calves. *J. Comp. Pathol.* **87**:531-537.

Wright, I.G. 1988. Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* infections. *Parasitol. Today.* **4**:214-218.

Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H. E., Taylor, S. M., Gray, J.S. 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 622-636.

## POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

---

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la ciudad de México aprobó esta tesis el día 13 de Abril del 2007, en la Ciudad de México D.F para optar al grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Bióloga Verónica Marusa Borgonio Cuadra.

DR. Julio Vicente Figueroa Millán.



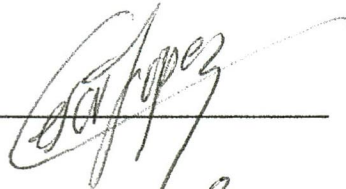
---

Dra. Minerva Camacho Nuez.



---

Dr. Mario César López Camarillo.



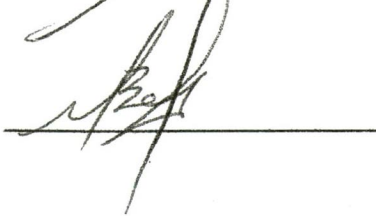
---

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.



---

M. en C. Máximo Berto Martínez Benítez.



---

